



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**CARLOS WAGNER DE SOUZA WANDERLEY**

**VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararacussu* INDUZ UMA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA LOCAL DEPENDENTE DE PROTANÓIDES E DA MIGRAÇÃO  
DE NEUTRÓFILOS**

**FORTALEZA**

**2014**

**CARLOS WAGNER DE SOUZA WANDERLEY**

**VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararacussu* INDUZ UMA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA LOCAL DEPENDENTE DE PROTANÓIDES E DA MIGRAÇÃO  
DE NEUTRÓFILOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior

**FORTALEZA**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca de Ciências da Saúde

---

W215v Wanderley, Carlos Wagner de Souza.

Veneno da serpente *bothrops jararacussu* induz uma resposta inflamatória local dependente de prostanoídes e da migração de neutrófilos. / Carlos Wagner de Souza Wanderley. – 2014.

92 f.: il. color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado). – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Júnior.

1. Bothrops. 2. Edema. 3. Venenos. 4. Inflamação. 5. Neutrófilos. I. Título.

---

CDD 615.942

**CARLOS WAGNER DE SOUZA WANDERLEY**

**VENENO DA SERPENTE *Bothrops jararacussu* INDUZ UMA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA LOCAL DEPENDENTE DE PROTANÓIDES E DA MIGRAÇÃO  
DE NEUTRÓFILOS**

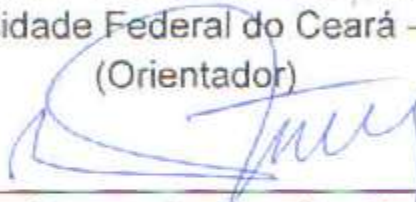
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

**Aprovada em: 16 de junho de 2014.**

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior  
Universidade Federal do Ceará – UFC  
(Orientador)



Prof. Dr. Manassés Claudino Fonteles  
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR.

*À Camila,*

*Por todo amor, cuidado e  
companheirismo, e imensurável apoio,  
por dar sentido a minha vida e tornar  
meus dias mais felizes. Sem você eu não  
faria nada.*

*A toda a minha família,*

*Em especial aos meus pais Carlos Henrique Dias Wanderley e Luciene de Souza Wanderley, ao meu tio/pai Antonio Carlos Dias Wanderley, e a minha Avó Isabel Dias Wanderley, por me guiar, iluminar e não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior, pela sua completa orientação, dedicação, imensurável incentivo e, sobretudo pela amizade e confiança. Um grande mestre capaz de inspirar e mudar a vida das pessoas a sua volta. Muitíssimo Obrigado.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro por acreditar em mim, pelos conselhos e ensinamentos diários, nestes últimos dois anos eu ganhei um novo amigo, um novo pai, uma nova família, sempre vou admirá-lo e respeitá-lo.

À professora Dr. Gerly Anne de Castro Brito pela presteza e disponibilidade para realizar as análises histopatológicas que enriqueceram o trabalho.

Ao professor Dr. Fernando de Queiroz Cunha por me receber em seu laboratório na FMRP/USP, permitindo uma experiência única que contribuiu muito para o meu amadurecimento acadêmico.

Ao professor Dr. Alexandre Havt Bindá por ter cedido gentilmente o veneno bruto da serpente *Bothrops jararacussu*.

Aos amigos e parceiros, Dra Deysi Wong, Dr. François Cosker e Msc. David Colón pela paciência e generosidade em dividir seus conhecimentos científicos.

Ao amigo Caio Abner pelos momentos de descontração, conversas, risadas e a gentileza de criar o modelo hipotético apresentado nesse trabalho.

A inestimável e indispensável técnica onipotente, onipresente e onisciente Vandinha França Pinheiro (LAFICA).

Aos amigos do LAFICA e LAFARMULI: Amilcar, Deysi, Ana Paula, Larisse, Franzé, Adriana, Terezinha, François, Helder, Patrícia pelos vários momentos de descontração e alegrias compartilhadas.

Ao professores Pedro Magalhães e Armênio Aguiar pelos bons conselhos sempre na hora certa.

Às secretárias Aura, Célia e Laura pela atenção e gentileza com que sempre me atendeu quaisquer que fossem minhas necessidades em relação à pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Haroldo e Adalto pela indispensável ajuda na manutenção das atividades do biotério.

Ao CNPQ, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.



*“Assim como casas são feitas de pedras, a ciência é feita de fatos. Contudo, uma pilha de pedras não é uma casa e uma coleção de fatos não é, necessariamente, ciência.”*

*Jules Poincaré*

## RESUMO

Os efeitos locais provocados por venenos botrópicos são caracterizados por edema, hemorragia e dor local. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos relacionados a esses venenos podem variar de acordo com a espécie. Esta característica espécie-específica pode prejudicar a eficácia da soroterapia. Desta forma, considerando a diversidade da resposta fisiopatológica dos venenos, investigamos os mecanismos e mediadores envolvidos na resposta inflamatória local induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu). Camundongos *Swiss* fêmeas foram submetidos à injeção intraplantar de solução salina ou VBjsu (0,125-8 µg/pata). Para o estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos, diferentes sub-grupos de animais foram submetidas ao pré-tratamento com loratadina (um antagonista do receptor H1), composto 48/80 (para induzir a depleção dos mastócitos), capsaicina (para promover a dessensibilização das fibras C), infliximabe (um anticorpo anti-TNF- $\alpha$ ), indometacina (um inibidor não-específico da COX), celecoxibe (um inibidor seletivo da COX-2) ou fucoidina (um modulador de P- e L-selectinas) administrados antes do VBjsu. O edema da pata foi medido por pletismografia. Além disso, os tecidos da pata foram recolhidos para determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), dosagem dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e da imunoexpressão da COX-2. O efeito quimiotático direto do VBjsu também foi estudado por meio do ensaio da câmara de Boyden, e o estado de ativação dos neutrófilos humanos foi avaliado através da dinâmica intracelular de cálcio em neutrófilos realizado *in vitro* com auxílio da microscopia confocal. O VBjsu causou uma resposta edematogênica concentração e tempo dependentes com aumento da produção local de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e da imunoexpressão da COX-2 nos tecidos quando comparado ao grupo salina ( $P < 0,05$ ). Ambos, edema e migração de neutrófilos foram impedidos pelos inibidores da COX (indometacina ou celecoxibe), ou pelo modulador de P - e L-selectinas (fucoidina) *vs.* VBjsu ( $P < 0,05$ ). O exame histopatológico revelou que o VBjsu induz uma precoce migração de neutrófilos para o local da lesão *vs.* o grupo salina ( $P < 0,05$ ). Além disso, o VBjsu induz a quimiotaxia e ativa neutrófilos *in vitro* aumentando diretamente a dinâmica de cálcio intracelular quando comparado ao RPMI ( $P < 0,05$ ). Portanto, o VBjsu induz uma resposta edematogênica precoce dependente da produção de prostanoídes e da migração de neutrófilos.

**Palavras-chave:** Bothrops; Edema; Venenos; Inflamação; Neutrófilos.

## ABSTRACT

Local tissue reactions provoked by *Bothrops* venoms are characterized by edema, hemorrhage, pain, and inflammation; however, the mechanisms of tissue damage vary depending upon the species of snake. This mechanistic variability reduces the efficacy of antivenom treatment. Considering the diversity of intraspecific pathophysiological responses, we investigated the mechanisms and mediators involved in the local inflammatory response induced by the *Bothrops jararacussu* venom (VBjsu). Female Swiss mice were injected with either saline or VBjsu (0.125-8 µg/paw). In a subset of VBjsu-treated mice, loratadine (an H<sub>1</sub> receptor antagonist), compound 48/80 (for mast cell depletion), capsaicin (for C-fiber desensitization), infliximab (an anti-TNF-α antibody), indomethacin (a non-specific COX inhibitor), celecoxib (a selective COX-2 inhibitor) or fucoidan (a P- and L-selectins modulator) were administered before VBjsu treatment. Paw edema was measured by plethysmography. In addition, paw tissues were collected for the measurement of myeloperoxidase (MPO) activity, TNF-α and IL-1 levels, and COX-2 immunoexpression. The direct chemotactic effect of VBjsu was also studied using a Boyden chamber assay, and the *in vitro* calcium dynamic in neutrophils was investigated using confocal microscopy. VBjsu caused concentration- and time-dependent edematogenic responses and increased the local production of TNF-α and IL-1β as well as COX-2 expression *vs.* saline group ( $P<0.05$ ). Both edema and neutrophil migration were prevented by pretreatment with cyclooxygenase inhibitors (indomethacin or celecoxib) or by the P- and L-selectins modulator, fucoidan *vs.* VBjsu ( $P<0.05$ ). Furthermore, VBjsu induced a direct *in vitro* neutrophil chemotaxis by increasing intracellular calcium *vs.* RPMI ( $P<0.05$ ). Therefore, VBjsu induces an early onset edema dependent upon prostanoid production and neutrophil migration.

**Keywords:** Bothrops; edema; venoms; inflammation; neutrophil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A serpente <i>Bothrops jararacussu</i> . .....	23
Figura 2. Cascata de formação dos eicosanóides durante o processo inflamatório.....	28
Figura 3. Recrutamento, migração e diapedese de neutrófilos.....	31
Figura 4. Entrada de cálcio nos neutrófilos dependente e independente de estoque.....	32
Figura 5. O Veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) induz a formação de edema de maneira concentração e tempo dependente envolvendo a participação de mediadores da resposta inflamatória.....	50
Figura 6. O veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) induz uma resposta edematogênica dependente da produção de prostanóides e da migração de neutrófilos.....	52
Figura 7. A migração de neutrófilos induzida pelo veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) pode ser prevenida pela modulação da atividade da ciclooxigenase e da P- e L-selectinas...54	
Figura 8. Curso temporal das alterações histopatológica induzidas pelo Veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) na pata de camundongos.....	56
Figura 9. O Veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) induz aumento na produção local de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ . .....	58
Figura 10. O Veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) aumenta a imunoexpressão da Ciclooxigenase-2 (COX-2) na pata de camundongos. ....	59
Figura 11. O Veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) induz diretamente a migração de neutrófilos humanos <i>in vitro</i> . .....	61
Figura 12. O Veneno da <i>Bothrops jararacussu</i> (VBjsu) ativa diretamente os neutrófilos humanos aumentando os níveis de cálcio intracelular.....	62
Figura 13. Papel dos prostanóides e dos neutrófilos na resposta inflamatória induzida pelo veneno da serpente <i>Bothrops jararacussu</i> (modelo hipotético). .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **5-HT:** Serotonina
- **AA :** Ácidos Araquidônicos
- **BK:** Bradicinina
- **Ca<sup>++</sup>:** Cálcio
- **CID:** Coagulação Intravascular Disseminada
- **COX - 1:** Ciclooxigenase 1
- **COX:** Ciclooxigenase
- **COX-2:** Ciclooxigenase 2
- **COX-3:** Ciclooxigenase 3
- **eNOS:** Oxido Nítrico Sintase Endotelial
- **HE:** Hematoxilina-Eosina
- **HIS:** Histamina
- **HTAB:** Brometo de Hexadeciltrimetilamonio
- **i.p:** Intraplantar
- **i.pl:** Intraplantar
- **i.v:** Intravenoso
- **ICAM:** Moléculas de Adesão Intercelular
- **IL-1:** Interleucina 1
- **IL-6:** Interleucina 6
- **IL-8:** Interleucina 8
- **INF- $\gamma$ :** Interferon- $\gamma$
- **IRA:** Insuficiência Renal Aguda
- **L-NAME:** L-NG-nitro Argenina Metil Ester
- **LT:** Leucotrieno
- **LTB<sub>4</sub>:** Leucotrieno B4
- **MPO:** Enzima Mieloperoxidase
- **NO:** Oxido Nítrico
- **PAF:** Fator de Ativação Plaquetária
- **PBS:** Tampão Fosfato de Sódio

- **PG:** Prostaglandina
- **PGD<sub>2</sub>:** Prostaglandina D<sub>2</sub>
- **PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>
- **PGF<sub>2α</sub>:** Prostaglandina F<sub>2α</sub>
- **PGG<sub>2</sub>:** Prostaglandina G<sub>2</sub>
- **PGH<sub>2</sub>:** Prostaglandina H<sub>2</sub>
- **PGI<sub>2</sub>:** Prostaglandina I<sub>2</sub> (prostaciclina)
- **PLA<sub>2</sub>:** Fosfolipase A<sub>2</sub>
- **PLC:** Fosfolipase C
- **PLD:** Fosfolipase D
- **s.c:** Subcutâneo
- **SP:** Substância P
- **VBjsu:** Veneno da *Bothrops jararacussu*
- **TNF:** Fator de Necrose Tumoral
- **TXA<sub>2</sub>:** Tromboxano A<sub>2</sub>
- **TXB<sub>2</sub>:** Tromboxano B<sub>2</sub>
- **v.o:** Via Oral
- **VF:** Volume Final
- **VI:** Volume Inicial

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS VENENOS BOTRÓPICOS .....	19
1.2. A SERPENTE <i>BOTHRUPS JARRACUSSU</i> .....	22
1.3. A RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL .....	26
1.4. PAPEL DOS PROSTANÓIDES NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA .....	27
1.5. PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA .....	29
1.6. CÁLCIO INTRACELULAR: A MARCA REGISTRADA DA ATIVAÇÃO DOS NEUTRÓFILOS .....	31
2. JUSTIFICATIVA .....	34
3. OBJETIVO GERAL .....	35
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
4.1. ASPECTOS ÉTICOS .....	37
4.2. LOCAL DE EXECUÇÃO .....	37
4.3. ANIMAIS .....	37
4.4. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS .....	38
4.5. VENENO, DROGAS, SOLUÇÕES, CORANTES E ANTICORPOS .....	39
4.5.1. Veneno .....	39
4.5.2. Drogas .....	39
4.5.3. Soluções .....	39
4.5.4. Corantes .....	40
4.5.5. Anticorpos .....	40
4.6. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM ANIMAIS .....	41
4.6.1. Edema de pata .....	41
4.6.2. Protocolos experimentais .....	41
I - CURVA CONCENTRAÇÃO RESPOSTA DO VBJSU: FOI REALIZADA A INJEÇÃO I.P.L. DE SOLUÇÃO SALINA ESTÉRIL (0,9 %) OU VBJSU NAS CONCENTRAÇÕES DE 0,125, 0,5, 2 E 8 µG/PATA. APÓS 0,5; 1,5; 2,5; 4,5; 6,5; 12,5 E 24,5 HORAS DA ADMINISTRAÇÃO DO VENENO OU SOLUÇÃO SALINA A VARIAÇÃO DE VOLUME DA PATA FOI DETERMINADA POR PLETISMOGRAFIA .....	41
4.7. ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO) .....	43
4.8. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	43
4.9. IMUNOISTOQUÍMICA PARA CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) .....	44
4.10. DETECÇÃO DE CITOCINAS (IL-1B E TNF-A) NOS TECIDOS POR ELISA .....	44
4.11. EXPERIMENTOS REALIZADOS COM MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO .....	45
4.11.1. Isolamento de neutrófilos .....	45
4.11.2. Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos na Câmara de Boyden .....	45
4.11.3. Teste de viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán .....	46
4.11.4. Mensuração da dinâmica intracelular de cálcio em neutrófilos isolados .....	47
4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	47

5. RESULTADOS.....	49
5.1. O VENENO DA <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJSU) INDUZ UMA RESPOSTA EDEMATOGÊNICA COM PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	49
5.2. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL INDUZIDA PELO VENENO DA <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJSU).....	51
5.3. CURSO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INDUZIDAS PELO VENENO DA <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJSU) NA PATA DE CAMUNDONGOS.....	55
5.4. O VENENO DA <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJSU) INDUZ AUMENTO NA PRODUÇÃO DE TNF-A, IL-1B E A IMUNOEXPRESSION DA CICLOOXIGENASE-2 (COX-2) NA PATA DE CAMUNDONGOS.....	57
5.5. O VENENO DA <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJSU) INDUZ DIRETAMENTE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS <i>IN VITRO</i> .....	59
5.6. O VENENO DA <i>BOTHROPS JARARACUSSU</i> (VBJSU) ATIVA DIRETAMENTE OS NEUTRÓFILOS AUMENTANDO A DINÂMICA DE CÁLCIO INTRACELULAR.....	60
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÃO.....	75
MODELO HIPOTÉTICO.....	76
REFERÊNCIAS.....	78
DESAULNIERS, P., ET AL. CHARACTERIZATION OF AN ACTIVATION FACTOR RELEASED FROM HUMAN NEUTROPHILS AFTER STIMULATION BY TRICLINIC MONOSODIUM URATE CRYSTALS J RHEUMATOL. 33, 928-938, 2006.....	80
ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARACIDO (TCLE).....	90
ANEXO II – MANUSCRITO ACEITO PELA REVISTA TOXICON.....	91
ANEXO III – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL – CEPA.....	92



# *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

As serpentes são animais vertebrados, ectotérmicos, de corpo alongado coberto de escamas que compõem a classe Reptília, ordem Squamata, subordem Ofídia. No mundo, existem aproximadamente 3000 espécies registradas, das quais no Brasil, são conhecidas 366. Dessas, 15 % (55 espécies) são classificadas como peçonhentas (ARAÚJO et al., 2003; BERNELIS et al., 2010).

De forma geral, a maioria das serpentes produz veneno. Contudo, o que diferencia animais peçonhentos de não peçonhentos é a presença do aparelho inoculador, composto por uma glândula, que produz e estoca a peçonha, ligada por ductos aos dentes inoculadores. Sendo assim, o acidente ofídico ou ofidismo pode ser definido como o quadro de envenenamento decorrente da inoculação de veneno através do aparelho inoculador das serpentes (ZUG et al., 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Atualmente o acidente ofídico é considerado, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), uma causa negligenciada de morbidade e mortalidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). Estima-se que pelo menos 421 mil envenenamentos com consequentes 20.000 mortes ocorram anualmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014; KASTURIRATNE et al., 2008). No entanto, de acordo com Chippaux (1998), esse número poderia ser elevado para 5,5 milhões de acidentes ofídicos com o número de mortes variando entre 20.000 a 94.000. Considerada uma doença ocupacional e ambiental o ofidismo afeta principalmente trabalhadores e crianças de comunidades rurais de países situados nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Oceania e América Latina (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014; KASTURIRATNE et al., 2008).

Na América Latina, especialmente no Brasil, o número de acidentes ofídicos registrados entre 2000 a 2011 apresentaram aumento de 1290 %. Em 2000, foram registrados aproximadamente 10 mil casos. Já em 2011, o número de ocorrências foi de 139 mil acidentes ofídicos, com 293 mortes relacionadas apenas naquele ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Então, ao se considerar a média dos últimos 11 anos as serpentes peçonhentas foram responsáveis, anualmente, por 35 mil acidentes, sendo que, 90,5 % podem ser atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops*, seguidas das serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis) com 7,7 % dos casos, das serpentes

do gênero *Lachesis* (surucucus) com 1,4 %, e *Micrurus* (“corais verdadeiras”) com 0,4 % dos acidentes relatados (BRASIL, 2005).

As manifestações clínicas dos efeitos locais provocadas por venenos botrópicos são caracterizadas por edema acentuado, dor, eritema, equimose, descamação superficial dos tecidos, hemorragia e necrose (AMARAL et al., 1985). A literatura referencia que tais efeitos podem ser decorrentes das ações patológicas diretas, induzindo lesão e destruição dos tecidos devida à atividade proteolítica de componentes do veneno, ou indireta, através da ativação da resposta inflamatória (TREBIEN; CALIXTO, 1989; de FARIA et al., 2001; BARBOSA et al., 2003).

Diversos estudos demonstraram que diferentes mediadores inflamatórios participam dos mecanismos fisiopatológicos induzidos pela injeção intraplantar de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000; ARAÚJO et al., 2000; BARBOSA et al., 2003). Por exemplo, com relação aos efeitos locais induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca*, foi relatado o papel de mediadores oriundos da atividade da ciclooxigenase e lipoxigenase e o envolvimento dos receptores  $\alpha 1$ - e  $\alpha 2$ -adrenérgicos como os principais agentes envolvidos nas ações edematogênicas do veneno, ao passo que a hemorragia observada foi parcialmente atribuída à atividade da serotonina e de mediadores neuro-humorais (TREBIEN; CALIXTO, 1989). Nesse estudo a histamina foi caracterizada como um mediador com um papel pouco relevante (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000). Em contraste, a histamina, o óxido nítrico (NO) e produtos de ciclooxigenase, sem a participação da serotonina, foram imputados às ações edematogênicas induzidas pelo veneno da *Bothrops insularis* (BARBOSA et al., 2003). Por outro lado, os efeitos locais nocivos induzidos pelo veneno da *Bothrops lanceolatus* envolvem principalmente a participação de produtos da ciclooxigenase e lipoxigenase, sem envolvimento da histamina e da serotonina (ARAÚJO et al., 2000).

Estes estudos claramente sugerem que dentro do mesmo gênero podem ocorrer variações quanto à participação de mediadores e mecanismos envolvidos na resposta inflamatória local. Desta forma, pode-se considerar um possível efeito espécie-específico das toxinas dos venenos que seriam capazes de modular a resposta inflamatória endógena por diferentes vias, tendo repercussão sobre as manifestações locais e principalmente sobre a escolha do tratamento mais adequado a ser instituído.

Além disso, a ação biológica dos venenos botrópicos pode estar relacionada a uma interação direta com células do sistema imune. Moreira et al. (2009) demonstraram que a incubação do veneno bruto da *Bothrops asper* com neutrófilos ou macrófagos induz a expressão da COX-2. Além disso, Elifio-Esposito et al. (2011) demonstraram que uma lectina purificada a partir do veneno da *Bothrops jararacussu*, pode reconhecer glicoligantes na superfície de neutrófilos e promover a polarização e a migração de neutrófilos *in vitro*.

A utilização do soro antiofídico obtido de equinos imunizados com um *pool* de venenos nativos, epidemiologicamente mais relevantes, consiste na abordagem terapêutica mais recomendada no caso de acidentes ofídicos. O imunógeno constitui-se de uma mistura de cinco venenos botrópicos com a seguinte composição: 50 % de veneno de *Bothrops jararaca*, e outros 50 % constituídos de 12,5 % de veneno de *Bothrops alternatus*, 12,5% de *Bothrops jararacussu*, 12,5 % de *Bothrops moojeni* e 12,5 % de *Bothrops neuwiedi* (RAW et al., 1991). Contudo, os anticorpos induzidos por este *pool* são eficientes na neutralização de apenas parte dos efeitos e à medida que há progressão do processo inflamatório local, o restabelecimento da integridade tecidual torna-se comprometida, mesmo com a utilização do soro. Isso se deve à presença de substâncias espécie-específicas que não são neutralizados pela ação do soro polivalente (GUTIERREZ et al., 1986; LEITE, 1992; CHAVES et al., 2003; ZAMMUNER et al., 2004; da SILVA et al., 2007; EL-DIN; OMAR, 2013).

Estudos realizados *in vitro*, com várias espécies do gênero *Bothrops*, demonstraram que a soroterapia é ineficiente em neutralizar completamente a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e da hialuronidase (CARDOSO et al., 1993; QUEIROZ, et al., 2008).

Desta forma, levando em consideração a diversidade de respostas fisiopatológicas intraespecíficas induzidas por venenos botrópicos, optou-se, neste trabalho por investigar os mecanismos e mediadores envolvidos na resposta inflamatória local induzida pelo veneno bruto da *Bothrops jararacussu* uma das serpentes nativas mais agressivas da América do Sul.

### **1.1. Composição e atividade biológica dos venenos botrópicos**

A gravidade dos efeitos locais e sistêmicos relacionados a acidentes ofídicos depende diretamente da quantidade e da composição de veneno inoculado (MINISTÉRIO

DA SAÚDE, 2005). Logo, fatores como idade, peso corporal, alimentação e principalmente gênero e espécie das serpentes peçonhentas podem influenciar nos efeitos, bem como nos mediadores inflamatórios envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos (TREBIEN; CALIXTO, 1989; ARAÚJO et al., 2000; BARBOSA et al., 2003).

De forma geral, os venenos botrópicos possuem uma composição mais complexa que os venenos de espécies de outros gêneros. Aproximadamente 90 % do peso seco dos venenos botrópicos são constituídos por peptídeos, proteínas, compreendendo uma grande variedade de enzimas além da existência de carboidratos, lipídeos, amins biogênicas, lectinas (principalmente do tipo C), e outros componentes inorgânicos. Os componentes enzimáticos mais comumente encontrados são fosfolipases (PLAs), fosfodiesterases, fosfatases, acetilcolinesterases, L-aminoácido oxidases (LAAOs), nucleotidasas, hialuronidasas, metaloproteases e fatores relacionados à coagulação (ESCARSO et al., 2000; KETELHUT et al., 2003; KASHIMA et al. 2004; PANUNTOA et al., 2006.).

Os efeitos locais relacionados aos venenos botrópicos inicialmente foram atribuídos às enzimas proteolíticas (ROSENFELD, 1971). Contudo, atualmente a patogenicidade das ações locais dos venenos são atribuídas a uma série de fatores, incluindo a participação da resposta inflamatória, dos quais os efeitos hemorrágicos e miotoxidade e edematogênicos estão bem documentados para várias espécies.

A ação de componentes, tais como, fosfolipases e metaloproteinasas, está relacionada à lesão direta nos tecidos sendo também observado dano na parede de pequenos vasos sanguíneos. Membros da família da PLA<sub>2</sub> desempenham ação lipolítica clivando especificamente a ligação Sn-2-acil dos fosfolipídeos de membrana para produzir quantidades equivalentes de lisofosfatídeos e ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico. Estes produtos tornam-se disponíveis para serem convertidos em potentes mediadores pró-inflamatórios como o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) e os eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina, e troboxanos) (CHANG, 1987). Em vários tipos de venenos, a maioria dos efeitos deletérios se deve a ação das PLA<sub>2</sub>. Estes fatores participam na gênese da inflamação local, necrose, dano ao epitélio vascular e alteram a permeabilidade da membrana, através da liberação de histaminas e bradicininas que desencadeiam o edema (MÉNDEZ, 2001).

Aproximadamente 1 % do veneno total é constituído de metaloproteinasas, que são enzimas com atividade proteolítica, edematogênica, que causam dano tecidual, e

desempenham uma importante ação hemorrágica e vasculo-tóxica caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular através do rompimento da membrana basal e endotelial (RODRIGUES et al., 2001). A hemorragia induzida pelos venenos botrópicos pode ser local ou sistêmica, afetando os pulmões e rins, sendo geralmente fatal quando atinge o sistema nervoso central. Ação coagulante, além de consumir o fibrinogênio, tem capacidade de ativar o fator X, protrombina, plaquetas e o sistema pró-fibrinolítico. Quando ocorre a ativação do fator X, consumo dos fatores V, VII e a formação de trombina, são desenvolvidos microtrombos na rede capilar levando ao quadro de Coagulação Intravascular Disseminada (CID), um fator que pode desencadear a insuficiência renal aguda (IRA) e consequente morte (MELO, 2004).

Nos venenos botrópicos, vários membros da família de enzimas LAAO também contribuem para a toxicidade. As LAAOs catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos específicos para produzir alfa-cetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia. Estudos têm mostrado que LAAOs presentes nos venenos botrópicos são capazes de induzir apoptose de várias linhagens celulares, tais como, células endoteliais vasculares. Tal efeito *in vivo* poderia contribuir para o sangramento prolongado após um acidente ofídico (ALVES et al, 2008;. SUHR; KIM, 1996). Adicionalmente, as LAAOs podem inibir a agregação plaquetária, tendo assim, um efeito anticoagulante capaz de agravar o quadro de hemorragia (SAKURAI et al., 2003).

Campos et al. (2013) avaliaram a atividade enzimática proteolítica, das PLAs e das LAAOs obtidas do veneno de cinco diferentes espécies de *Bothrops*: *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi*, e *Bothrops alternatus*, que são as espécies utilizadas na produção do soro comercial preparado em cavalos. Nesse estudo, os autores constataram significativa variação na atividade enzimática entre as espécies, onde o veneno da *Bothrops moojeni* mostrou a atividade enzimática mais elevada, seguida de maneira decrescente pelos venenos de *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus*.

A participação de mediadores da resposta inflamatória induzida por serpentes do gênero *Bothrops* assim como a interação biológica entre substâncias presentes nos venenos e componentes da resposta imune já esta bem caracterizada na literatura (TREBIEN; CALIXTO, 1989; BARBOSA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2000).

Por exemplo, a inflamação induzida pela toxina da serpente *Bothrops asper* é marcada por uma rede complexa de mediadores químicos ativados através da lesão induzida por metaloproteases e fosfolipases. Estas enzimas atuam iniciando uma cascata de eventos que culminam com a liberação de metabólitos derivados do ácido aracádônico (AA), mediadores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ -adrenérgicos, além da liberação de citocinas inflamatórias como Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Interleucinas do tipo 1 e 6 (IL-1 e IL-6, respectivamente) e Fator de Necrose tumoral (TNF), bem como Leucotrieno B4 (LTB<sub>4</sub>), Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), Óxido Nítrico (NO), aumento na expressão de P e L selectinas, além de outros fatores (TEXEIRA, 2009). Entretanto, para outras serpentes do gênero *Bothrops*, como a *Bothrops jararacussu*, pouco se sabe sobre os mecanismos e mediadores envolvidos nos seus efeitos locais.

**Tabela 1.** Mediadores da resposta inflamatória envolvidos no edema induzido por venenos botrópicos.

	<i>Bothrops jararaca</i> (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000)	<i>Bothrops insularis</i> (BARBOSA et al., 2003).	<i>Bothrops Moojeni</i> (NASCIMENTO et al. 2009)	<i>Bothrops lanceolatus</i> (ARAÚJO et al., 2000).
<b>Prostanoides</b>	+	+	+	+
<b>Histamina</b>	-	+	+	-
<b>Serotonina</b>	+	-	NA	-
<b>NO</b>	NA	+	-	NA

Não analisados (NA)

## 1.2. A serpente *Bothrops jararacussu*

A *Bothrops jararacussu* pode ser encontrada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Esta serpente é considerada uma das maiores espécies do gênero podendo alcançar 2,2 m de comprimento, e em um único bote pode inocular até 1200 mg de veneno, o que em um indivíduo adulto de 70 kg equivaleria a dose 17 mg/kg. É conhecida por sua coloração característica à região frontal da cabeça negra e as laterais amarelas, possui o dorso de coloração negra com intervalos oblíquos de coloração amarela forte e o ventre

predominantemente amarelo como demonstrado na Figura 1 (CAMPBELL; LAMAR, 2004; MELGAREJO, 2003; ARCOLINE 2006).

**Figura 1.** A serpente *Bothrops jararacussu*.



(Fonte: CAMPOS, 2014).

Um dos primeiros relatos experimentais dos efeitos localmente produzidos pela injeção do veneno da *Bothrops jararacussu* demonstra que a injeção de doses subletais do veneno da *Bothrops jararacussu* (5 – 20 µg) no músculo tibial anterior produzia uma grande área de necrose, fenômeno que os autores atribuíram a um possível efeito direto do veneno nos tecidos (QUEIROZ et al. 1984).

Em 1988, foi isolada do veneno da *Bothrops jararacussu* uma miotoxina que não exibiu nenhuma atividade semelhante a PLA<sub>2</sub>. Tal substância foi denominada bothropstoxina. Este composto isolado foi caracterizado com atividade exclusivamente miotóxica, diferente do veneno total que possuía forte efeito hemorrágico associado (BRANDEBURGO, et al. 1988). No mesmo ano Melo e Kurtz (1988) demonstraram que o veneno da *Bothrops jararacussu* induzia um dano direto no retículo sarcoplasmático de



maneira independente da participação da PLA<sub>2</sub>, uma vez que os estudos foram realizados *in vitro* e na ausência de cálcio.

A atividade da PLA<sub>2</sub>, chamada de bothropstoxina II, isolada do veneno da *Bothrops jararacussu*, foi demonstrada por Gutiérrez et al. (1991) em camundongos. Neste trabalho os autores observaram que a bothropstoxina II induziu um rápido aumento dos níveis plasmáticos de creatina quinase. Alterações histopatológicas ultraestruturais demonstram, ainda, que esta toxina afeta fibras musculares destruindo a integridade da membrana plasmática (GUTIÉRREZ et al. 1991).

Posteriormente, Cintra et al. (1993) avaliaram a sequência de aminoácidos das bothropstoxina I e a classificaram como uma Lys49-PLA<sub>2</sub> capaz de produzir dano as membranas de maneira independente de cálcio (CINTRA et al., 1993; GIOTTO et al., 1998). Somente em 1998 foi identificada a sequência de aminoácidos da bothropstoxina II que passou a ser classificada como uma Asp49-PLA<sub>2</sub> com atividade miotóxica dependente de cálcio (PEREIRA et al., 1998).

A composição do veneno da *Bothrops jararacussu* foi descrita mais detalhadamente por Kashima et al. (2004). Ao avaliar as sequências de aminoácidos encontradas no veneno os autores constataram uma similaridade para a PLA<sub>2</sub> isolada do veneno da *Bothrops jararaca*, onde 83,2% eram variantes homólogas a Lys49-PLA<sub>2</sub> (bothropstoxina I), apenas 0,1% correspondiam a forma básica da Asp49-PLA<sub>2</sub> (bothropstoxina II) e 0,6 % eram referentes a forma ácida da Asp49-PLA<sub>2</sub> chamada de bothropstoxina III. Ao lado desta classe muito abundante de proteínas foram encontradas 88 transcrições para sequências putativas de metaloproteases. Outras 25 transcrições relacionadas com lectinas do tipo C e um grupo de oito serina- proteases distintas. Foi identificado ainda um fator de crescimento do nervo (NGF-Bj) com 92 % de semelhança ao NGF humano.

Apesar do conhecimento acerca dos efeitos locais relacionados ao veneno da *Bothrops jararacussu*, o envolvimento de mediadores da resposta inflamatória foi demonstrado somente em 1998 por Landucci et al. através da modulação farmacológica do edema induzido pela injeção da bothropstoxinas I e II. Neste trabalho os autores observaram que o pré-tratamento com ciproheptadina (antagonista de receptores H1 e 5HT<sub>3</sub>) inibiu a formação de edema em ratos. No mesmo ano foi demonstrado, através de uma avaliação

histopatológica, que a injeção de 5 µg do veneno da *Bothrops jararacussu* na pata induz intenso edema observado 1 hora após (PEREZ et al., 1998).

Posteriormente, de Castro et al. (2000) demonstraram que a injeção intraperitoneal de bothropstoxinas I e II, principalmente a II induz a migração de leucócitos para a cavidade através de um mecanismo independente da atividade de mastócitos e da atividade enzimática, uma vez que, o pré-tratamento com o p-bromofenacil bromide (um inibidor da atividade enzimática das PLA) e a depleção de mastócitos com o composto 48/80 não interferiu nos resultados. Em 2008, foram identificados, por espectrometria de massa peptídeos potenciadores de bradicinina presentes no veneno da *Bothrops jararacussu*. A avaliação dos efeitos biológicos desses compostos demonstrou que estes aumentam o recrutamento e a adesão de leucócitos e são potencialmente vasodilatadores (RIOLI, 2008).

Mais recentemente foi demonstrado que uma lectina purificada do veneno da *Bothrops jararacussu* pode reconhecer glicoligantes na superfície de neutrófilos e promover a polarização e a migração de neutrófilos *in vitro* (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011). Além disso, Patrão-Neto et al. (2013) demonstraram que a dexametasona pode impedir os efeitos locais desse veneno.

Sistemicamente a complicação mais comum entre os casos letais associados a acidentes ofídicos botropico, é a insuficiência renal aguda (IRA). Este processo pode ocorrer mesmo após o tratamento com o soro antiofídico. Havt et al. (2001) demonstraram que o veneno da *B. jararacussu* altera diversos parâmetros funcionais renais. Neste trabalho os autores observaram diminuição da pressão de perfusão e da resistência vascular renal. No entanto, a taxa de filtração glomerular e o fluxo urinário aumentaram significativamente. Sendo que, partes desses efeitos deletérios mostraram-se dependentes da participação do Fator Ativador de Plaquetas (PAF).

Estes trabalhos reforçam a idéia de que a resposta inflamatória contribui para os efeitos locais do veneno da *Bothrops jararacussu* e que pouco se sabe a cerca dos mecanismos patológicos associados a este veneno.

### 1.3. A resposta inflamatória local

A inflamação é uma resposta vascular, celular e humoral, responsável pelo processo defensivo dos organismos vivos frente a agentes agressores. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão. Por incorporar vários mecanismos biológicos como a formação de edema, fagocitose, angiogênese, liberação de mediadores químicos, além de outros fatores, a inflamação passou a ser entendida como um processo proveniente de uma soma de eventos, que de acordo com o tempo de evolução e as características patológicas envolvidas, pode ser classificada em inflamação aguda ou crônica (COLLINS, 2000).

A inflamação aguda local é caracterizada como uma resposta rápida e de curta duração (horas a dias), apresentando três fases distintas na primeira ocorrem alterações no calibre vascular, que levam ao aumento no fluxo sanguíneo; na segunda fase iniciam-se as alterações estruturais na microcirculação, que permitem a passagem de proteínas plasmáticas e leucócitos através do endotélio; na terceira e última fase ocorre a migração de leucócitos da microcirculação para o foco da lesão (COLLINS, 2000; RINGLER, 2000).

As reações vasculares são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas plasmáticas ou células inflamatórias que são produzidos ou ativados pelo estímulo de agentes agressores. Tais mediadores, agindo isoladamente, em conjunto ou em sequência, amplificam a resposta inflamatória que só termina quando o agente agressor é eliminado e os mediadores produzidos são inativados (PEREIRA, 2004). Esse conjunto de alterações vasculares leva a formação de edema e infiltração celular nos tecidos.

O edema inflamatório é basicamente composto por água, eletrólitos e proteínas, cuja formação inicia-se a partir de uma série de eventos que interferem na microcirculação sanguínea local. Inicialmente, ocorre uma vasoconstrição, seguida de uma vasodilatação reflexa. A transição de constrição para dilatação vascular é mediada por fatores derivados de mastócitos como leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e, particularmente, a histamina (HIS) e a serotonina (5-HT) que contribuem para a vasodilatação. Tal aumento do calibre do vaso permite a intensificação do fluxo sanguíneo local, seguido do extravasamento do fluido intravascular para o interstício (ALLER, 2006).

A permeabilidade vascular é um dos fatores principais dentro da formação do edema inflamatório e mediadores como HIS, bradicinina (BK), LT, componentes do complemento, fator ativador de plaquetas (PAF) e as taquicininas, derivadas das fibras sensoriais aferentes desmielinizadas (fibras C), como a substância P atuam isoladamente ou em conjunto para auxiliar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual. Estes fatores alteram intensamente as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas (COLLINS, 2000; RINGLER, 2000; ALLER et al., 2006).

As citocinas como a IL-1 e o TNF- $\alpha$  atuam aumentando a permeabilidade vascular promovendo uma reorganização estrutural do citoesqueleto das células endoteliais fazendo com que estas se retraiam e se separem. As alterações vasculares promovidas por estas substâncias têm efeito mais duradouro, do que o promovido pelas aminas vasoativas (HIS e 5-HT), podendo o efeito ser mantido por 24 horas ou mais (COLLINS, 2000).

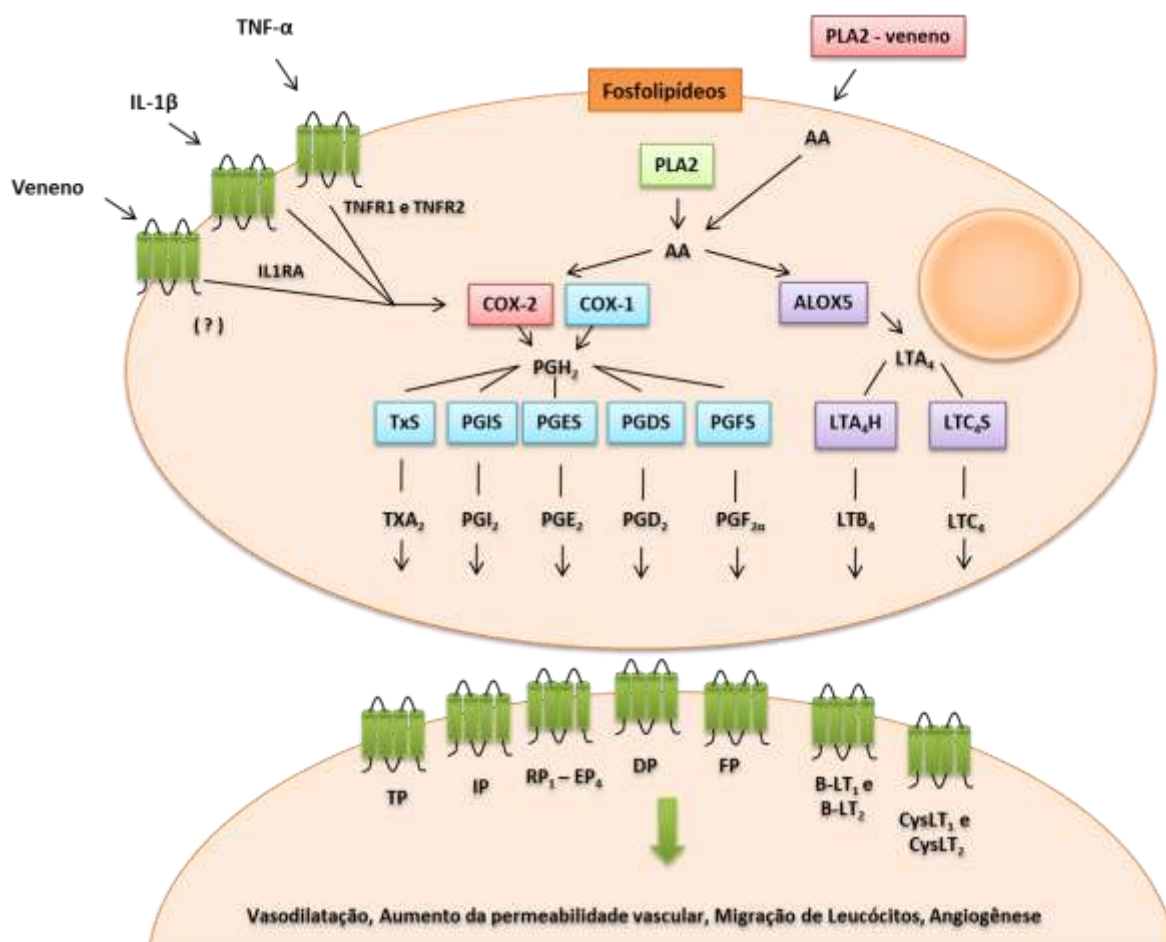
#### **1.4. Papel dos prostanóides na resposta inflamatória aguda**

Prostaglandinas, tramboxanos e leucotrienos coletivamente chamados de eicosanóides são substâncias lipídicas derivadas do metabolismo do ácido aracdônico (AA), um ácido graxo constituinte das membranas celulares. Diversos estímulos fisiológicos ou mesmo patológicos podem desencadear a biosíntese dos metabolitos do ácido aracdônico através da ativação das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que uma vez ativadas clivam os fosfolipídios da membrana liberando o AA (LONE; TASKEN, 2013).

O metabolismo do AA livre é realizado por duas classes de enzimas: As ciclooxigenases e as lipoxigenases. As ciclooxigenases apresentam três isoformas denominadas ciclooxigenase-1 (COX-1), que é uma enzima constitutiva e está presente na maioria das células, a ciclooxigenase-2 (COX-2) que é uma forma induzível da enzima e está presente em vários tipos de células e tecidos sendo expressa principalmente a partir da sinalização de citocinas como o TNF e a IL-1 durante a resposta inflamatória e a ciclooxigenase-3 (COX-3), que parece desempenhar uma atividade semelhante a da COX-1 no Sistema Nervoso Central (SNC), mas, o seu papel em processos patológicos ainda não é bem elucidado. As COXs são enzimas responsáveis pela produção dos prostanóides como as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TXA<sub>2</sub> e TXB<sub>2</sub>)

e as lipoxigenases são responsáveis pela produção de leucotrienos e lipoxinas (COLLINS, 2000, NETO et al., 2011, LONE; TASKEN, 2013) (FIGURA 2.)

**Figura 2.** Cascata de formação dos eicosanóides durante o processo inflamatório.



O ácido aracádico (AA) liberado pela ação de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) endógenas ou oriundas de venenos botrópicos pode ser metabolizado por duas classes de enzimas: as ciclooxigenases (COX) e as lipoxigenases (ALOX5). As COXs apresentam isoformas denominadas ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) que é a forma cuja expressão pode ser regulada pela atividade das citocinas (Fator de Necrose Tumoral-  $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ] e Interleucina 1 $\beta$  [IL-1 $\beta$ ]) bem como pela ação do veneno da *B. asper* (mecanismo desconhecido). As COXs são enzimas responsáveis pela produção dos protanóides como as prostagandinas (PGH<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e PGD<sub>2</sub>), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TXA<sub>2</sub> e TXB<sub>2</sub>) e as lipoxigenases são responsáveis pela produção de leucotrieno B<sub>4</sub> e C<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub>) e lipoxinas. Após a síntese os eicosanóides atuam em receptores acoplados a proteína G em diversos tipos celulares e desempenham funções fisiológicas ou patológicas dependendo do contexto. Receptores 1 e 2 de TNF- $\alpha$  (TNFR1 e TNFR2), Receptor de IL-1 (IL1RA), Tromboxano sintases (TxS), LTA<sub>4</sub> hidrolase (LTA<sub>4</sub>H), LTC<sub>4</sub> sintase (LTC<sub>4</sub>S), prostaglandinas sintase (PGIS, PGES, PGDS, PGFS), Receptores de PGE<sub>2</sub> (EP1- EP4), Receptor PGD<sub>2</sub> (DP), Receptor PGF<sub>2</sub> (FP), Receptor PGI<sub>2</sub> (IP), Receptores de LTB<sub>4</sub> (B-LT<sub>1</sub> e B-LT<sub>2</sub>), Receptores de Leucotrienos Cisteínico (CysLT<sub>1</sub> e CysLT<sub>2</sub>) e Receptor TXA<sub>2</sub> (TP). (Fonte: Figura adaptada de Fletcher, et al., 2010).

Os prostanóides localmente produzidos durante o processo inflamatório agudo atuam como autacóides (moléculas de meia vida curta que sinalizam de forma parácrina) e iniciam sua função ao ligar-se a receptores acoplados a proteína G de vários tipos celulares produzindo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e inibição da agregação plaquetária, um conjunto de efeitos que auxiliam na migração de leucócitos, e contribuem para a formação do edema de acordo com a FIGURA 2 (FLETCHER, 2010).

Na resposta inflamatória resultante da injeção da carragenina, a participação das prostaglandinas na formação e manutenção da resposta edematogênica está bem caracterizada como um evento mais tardio observado horas após a injeção desse estímulo (VINEGAR, 1976). Este padrão de resposta não se reproduz na resposta inflamatória local induzida por venenos botrópicos onde é evidenciada a participação desses mediadores já nas fases iniciais da resposta edematogênica (TREBIEN; CALIXTO, 1989; de FARIA et al., 2001; BARBOSA et al., 2003). A hipótese que justifica este contraste é baseada na composição dos venenos que possuem uma variedade de fosfolipases ativas capazes de clivar os fosfolipídios de membrana rapidamente (ESCARSO et al., 2000; KETELHUT et al., 2003; PANUNTOA et al., 2006). Além disso, foi demonstrado recentemente que o veneno da *Bothrops asper* pode diretamente induzir a expressão da COX-2 em neutrófilos e macrófagos isolados (MOREIRA et al., 2009).

### **1.5. Papel dos neutrófilos na resposta inflamatória aguda**

A migração de leucócitos é resultado de uma interação biológica complexa que pode ser orquestrada por uma vasta variedade de fatores de origem intrínseca ou extrínseca ao organismo. Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos compõem a primeira linha de defesa da resposta imune celular, devido à sua capacidade de migrar rapidamente em direção a fatores quimiotáticos liberados durante a resposta inflamatória local, incluindo fatores quimioatraentes endógenos, como por exemplo, o leucotrieno B<sub>4</sub>, IL-8, C5a, e o fator ativador de plaquetas (PAF) e fatores exógenos, tais como o Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP) derivado da parede bacteriana (LUSTER et al., 2005; SADIK et al., 2011).

Durante a homeostase os neutrófilos são encontrados no centro dos vasos sanguíneos. Entretanto, estas células sentinelas rapidamente respondem ao menor estímulo

inflamatório migrando para o local exato do dano. Apesar da velocidade da resposta dos neutrófilos, para que estas células efetivamente consigam deixar o leito vascular e atingir o seu alvo, é necessário uma série de mudanças vasculares e celulares (WENINGER et al. 2014).

Logo após o dano ou o contato com microrganismos invasores, mastócitos, macrófagos e células dendríticas residentes nos tecidos produzem e liberam quimiocinas com a IL-8 e o LTB<sub>4</sub> e citocinas como o TNF- $\alpha$ , e a IL-1 $\beta$ . Estas substâncias atuam contribuindo para amplificar a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular levando à diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo que facilita a aproximação dos neutrófilos a margem endotelial. O contato dessas citocinas com receptores específicos induz a ativação de mecanismos celulares que levam a exposição de selectinas na superfície da membrana dos neutrófilos (L-selectina) e das células endoteliais (P e E-selectinas) (WENINGER et al. 2014). (FIGURA 4).

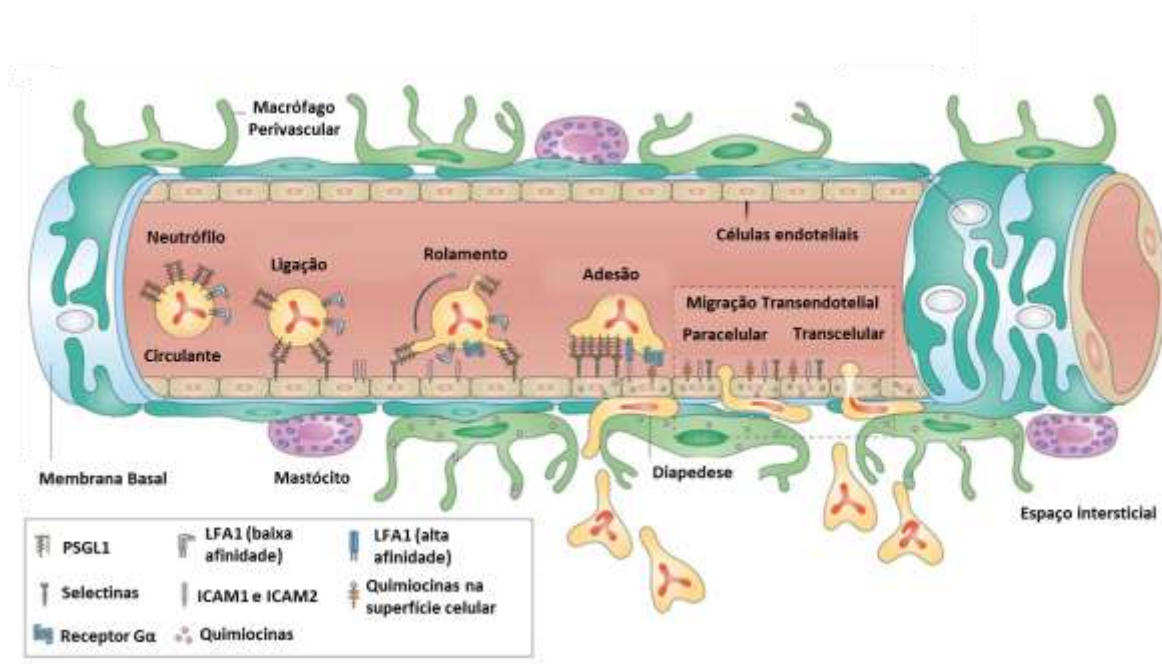
Uma vez que os neutrófilos ativados são quimicamente atraídos e aproximam-se do endotélio, ocorrem as interações entre as selectinas presentes na membrana dos neutrófilos e aquelas expostas na superfície endotelial com carboidratos ligantes de selectinas (Sialyl Lewis X). Contudo, essa interação possui baixa afinidade (Kd ~100nm) e o estresse de cisalhamento sanguíneo faz com que estas ligações iniciais se desfaçam e novas interações sejam feitas. A sucessão desses eventos permite que o neutrófilo “role” sobre as células endoteliais. Posteriormente, quando os neutrófilos estão próximos ao local do dano passam a ser expressas as moléculas de adesão firme chamadas integrinas. As Moléculas de Adesão Intercelulares (ICAM) ou a Molécula de Adesão de Células Vasculares - 1 (VCAM-1), expressas nas células endoteliais, interagem com os neutrófilos a partir de fortes ligações com as integrinas do tipo Antígeno-1 Associado à Função Linfocitária (LFA-1) ou a VLA-4, o que facilita a fixação dessas células ao revestimento endotelial (ABBAS et al. 2008) (FIGURA 4).

Após a fixação firme dos neutrófilos ao endotélio essas células iniciam o processo de extravasação a favor de um gradiente de fatores químiatraentes endógenos ou exógenos presente nos tecidos. A extravasação, transmigração ou diapedese dos neutrófilos pode ocorrer de duas formas distintas: 1) com auxílio de proteases lisossomais essas células rompem a membrana basal vascular do espaço interendotelial e extravasam para o interstício

pela via paracelular ou 2) atravessam as células endoteliais chegando ao interstício em um fenômeno conhecido como diapedese transcelular (WENINGER et al. 2014) (FIGURA 4).

Uma vez no interstício, o neutrófilo desempenha um papel fisiológico importante de fagocitar e destruir agentes estranhos. Entretanto, quando o processo inflamatório se dá de maneira descontrolada, um número excedente de neutrófilos pode produzir grande quantidade de radicais livres e contribui para lesionar os tecidos e amplificar os danos (WENINGER et al. 2014).

**Figura 3.** Recrutamento, migração e diapedese de neutrófilos.



Após o estímulo inflamatório, quimiocinas e citocinas ativam neutrófilos e células endoteliais induzindo uma série de modificações morfológicas em ambos os tipos celulares, o que permite a ligação e rolamento - mediante a interação entre selectinas (P, L e E-selectinas) com carboidratos ligantes de selectinas (Sialyl Lewis X). A adesão ao endotélio – dependente da interação com integrinas (LFA-1, VLA-4, ICAM e VCAM), e a diapedese dessas células para os tecidos pelas vias paracelular e tanscelular. Fonte: Figura adaptada de WENINGER et al. (2014).

### 1.6. Cálcio intracelular: A marca registrada da ativação dos neutrófilos

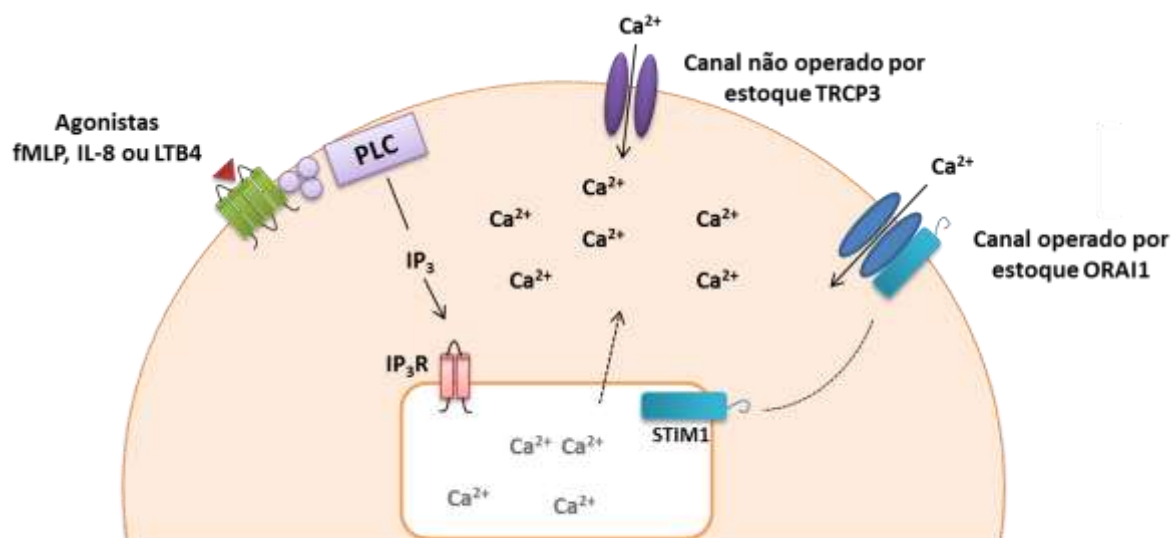
Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos podem se movimentar em direção a um alvo, aderir ao endotélio vascular, produzir Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e secretar peptídeos antimicrobianos e enzimas proteolíticas (LUSTER et al. 2011). Estas e



outras funções iniciam-se com ativação dos neutrófilos, que podem ser regulada por fatores endógenos (IL-8, LTB<sub>4</sub>, C5a e PAF) ou exógenos (fMLP) ao organismo (LUSTER et al., 2005; SADIK et al., 2011). A ligação desses fatores a receptores de membrana acoplados a uma proteína G, desencadeiam diversos mecanismos de sinalização intracelular, marcados pelo aumento intracelular dos níveis de cálcio. Desta forma, o influxo de cálcio é visto como um mecanismo comum de ativação de neutrófilos estimulados por diferentes mediadores inflamatórios (SALMON; AHLUWALIA, 2010).

A entrada de cálcio nos neutrófilos inicia-se, por exemplo, com a ligação de um fator quimiotático (fMLP, IL-8 ou LTB<sub>4</sub>) ao seu receptor na membrana do neutrófilo. Esta ligação ativa a proteína G que estimula a Fosfolipase C (PLC) a produzir 1,4,5 Trifosfato de Inositol (IP<sub>3</sub>) a partir de fosfolípidos da membrana, este fator por sua vez, sinaliza sobre o Retículo Endoplasmático (RE) provocando uma rápida e transitória liberação das reservas de cálcio no citosol seguido pelo influxo de cálcio através da membrana (SALMON; AHLUWALIA, 2011) (FIGURA 4).

Figura 4. **Entrada de cálcio nos neutrófilos dependente e independente de estoque.**



Com a ligação de um fator quimiotático (fMLP, IL-8 ou LTB<sub>4</sub>) ao seu receptor na membrana do neutrófilo. Esta ligação ativa a proteína G que estimula a Fosfolipase C (PLC) a produzir 1,4,5 Trifosfato de Inositol (IP<sub>3</sub>) provocando uma rápida e transitória liberação das reservas de cálcio Retículo Endoplasmático (RE). A depleção das reservas de cálcio do RE ativam Moléculas de Interação Estromal 1 (STIM1) que migram para a membrana do neutrófilo, se acoplam as proteínas canais para cálcio (ORA1) provocando uma mudança conformacional no canal que passa a permitir a entrada de cálcio através de Canais Operados por Estoque (SOC). Além disso, a ativação do TRPC3 pode implicar no influxo de cálcio direto e independente de estoque. (Fonte: Figura adaptada de SALMON e AHLUWALIA, 2011).

Este influxo de cálcio através da membrana pode ser explicado através de duas hipóteses. Na primeira acredita-se que a depleção das reservas de cálcio do RE ativam Moléculas de Interação Estromal 1 e 2 (STIM1 e STIM2) que migram para a membrana do neutrófilo se acoplam as proteínas canais para cálcio (ORAI1) provocando uma mudança conformacional no canal que passa a permitir a entrada de Cálcio através de Canais Operados por Estoque (SOC) (SALMON; AHLUWALIA, 2011). A outra hipótese baseia-se na entrada de Cálcio Regulada por Receptores (ROC). Vários trabalhos apontam que as proteínas canais para cálcio presentes na membrana citoplasmática dos neutrófilos pertencem à superfamília dos Receptores de Potencial Transiente (TRP). Em particular, o RNAm para receptores TRPC1, TRPC3, TRPC4 e TRPC6 foram encontrados em neutrófilos. As hipóteses mais aceitas acerca destes mecanismos afirmam que o SOC interage com os receptores TRPC1 e TRPC6 para produzir o influxo de cálcio enquanto que a ativação do TRPC3 implica no influxo de cálcio direto e independente de estoque (BURGOS et al. 2011) (FIGURA 4).

## 2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos experimentais têm demonstrado a participação de vários mediadores inflamatórios, no dano tecidual induzidos por venenos de diversas serpentes como a *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis*, *Bothrops ilhoa* dentre outras (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000; ARAÚJO et al., 2000; BARBOSA et al., 2003). Contudo, em relação ao veneno da *Bothrops jararacussu*, praticamente não há qualquer descrição, até onde conhecemos, sobre a resposta inflamatória tecidual e os mecanismos associados a este veneno. Desta forma, considerando a intoxicação botrópica um processo multifatorial, espécie específico com participação direta de fatores relacionados à resposta inflamatória aguda, decidimos investigar os mecanismos e mediadores envolvidos na resposta inflamatória local induzida pelo veneno bruto da *Bothrops jararacussu*, uma das serpentes nativas mais agressivas da América do Sul. A descoberta de mediadores essenciais para o desenvolvimento da resposta inflamatória que contribui para o dano local induzido pelo VBjsu poderia oferecer uma alternativa terapêutica complementar à soroterapia tornando o tratamento mais eficaz.

### 3. OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos e mediadores envolvidos na resposta inflamatória local induzida pelo veneno bruto da *Bothrops jararacussu*.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de concentrações crescentes e o curso temporal das alterações histopatológicas induzidas pelo VBjsu na resposta inflamatória local na pata de camundongos;
- Estudar a participação de mediadores inflamatórios (histamina, prostanóides, citocinas [TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ], e da COX-2) na resposta inflamatória local induzida pelo VBjsu na pata em camundongos;
- Investigar a participação de células inflamatórias, mastócitos e neutrófilos, e das fibras sensoriais aferentes sensíveis à capsaicina na resposta inflamatória local induzida pelo VBjsu na pata em camundongos;
- Avaliar o efeito quimiotático direto do VBjsu sobre neutrófilos humanos *in vitro* e a influência deste sobre a dinâmica intracelular de cálcio.

## *Material e Métodos*

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

*“Nós somos o que repetidamente fazemos.  
Excelência, então, não é um ato, mas um hábito”. (Aristóteles)*

### 4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos em animais foram realizados após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA, número de protocolo 66/2012 – anexo III) de acordo com as diretrizes apresentadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). Os estudos utilizando neutrófilos isolados de humanos foram realizados após aprovação no Comitê de Ética Humano da Universidade Federal do Ceará (protocolo 543.774) e todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE), em anexo.

### 4.2. Local de execução

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do departamento de Farmacologia e Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC) e no Laboratório da Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

### 4.3. Animais

Os experimentos foram realizados utilizando camundongos suíços fêmeas com peso variando entre 25 – 27 g distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais (n=7 por grupo). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará - UFC. Durante o período de adaptação e realização dos experimentos os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, medindo 40 centímetros (cm) de comprimento, 31 cm de largura e 17 cm de altura, forradas com raspa de madeira, trocadas duas vezes por semana. Os animais permaneceram em um ambiente com temperatura de  $22 \pm 2$  °C com exaustão de ar, ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*.

#### 4.4. Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- ✓ Agitador Vortex – Cetomart MV
- ✓ Balança Analítica Ohaus AS2600
- ✓ Câmera de contagem Neubauer
- ✓ Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- ✓ Contador Automático de Células - Colter
- ✓ Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- ✓ Espectrofotômetro de placas - ELISA ELX800, Biotek
- ✓ Freezer -80°C, Thermo Scientific
- ✓ Fluxo Laminar
- ✓ Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8
- ✓ Estufa Incubadora de CO<sub>2</sub>
- ✓ Lâmina lisa para microscopia 26 x 76 mm
- ✓ Lamínula 24 x 32 mm
- ✓ Material cirúrgico
- ✓ Medidor de pH, Hanna Instruments HI 8519N
- ✓ Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- ✓ Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- ✓ Microscópio óptico de invertido Nikon Diaphot
- ✓ Microscópio Confocal, Olympus
- ✓ Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000 µL
- ✓ Micropipeta Multicanal Gilson 200 µL
- ✓ Pipetas sorológicas de 1, 5 e 10 mL
- ✓ Placa estéril de 24 e 96 poços
- ✓ Tubos de Falcon 15 e 50 mL
- ✓ Câmara de Boyden (Neuro Probe Inc.)
- ✓ Pletismômetro (UgoBasile 7140)

## 4.5. Veneno, drogas, soluções, corantes e anticorpos

### 4.5.1. Veneno

- ✓ O veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) liofilizado foi obtido do Instituto Butantan, São Paulo e estocado a - 20 °C. Para avaliar a atividade biológica do veneno, alíquotas foram reconstituídas em solução salina 0,9 %;

### 4.5.2. Drogas

- ✓ Dexametasona (Decadron®, Aché Laboratórios farmacêuticos SA)
- ✓ Loratadina (Loratadina®, Nova Química Farmacêuticos LTDA)
- ✓ Composto 48/80 (Sigma)
- ✓ Capsaicina (Sigma)
- ✓ Infliximabe (Remicade®, Schering-Plough Co.)
- ✓ Indometacina (Sigma)
- ✓ Celecoxibe (Celebrex®, Pfizer Pharmaceuticals LLC)
- ✓ Fucoidina (Sigma)
- ✓ Carragenina (Sigma)
- ✓ Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP) (Sigma)
- ✓ IL-8 (Sigma)
- ✓ Teofilina (Sigma)
- ✓ Terbutalina (Sigma)
- ✓ Tribromoetanol 2% (Sigma)

### 4.5.3. Soluções

- ✓ Avidina-Peroxidase (Dako)
- ✓ Água destilada
- ✓ Água Mili-Q
- ✓ Álcool 70%
- ✓ Diaminobenzidina –DAB (Dako)



- ✓ Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 10% (Merck)
- ✓ Meio de cultura RPMI (Sigma)
- ✓ O-dianisidina (Sigma)
- ✓ Paraformaldeído 4% (PFA)
- ✓ Peróxido de Hidrogênio 30% (Sigma)
- ✓ Salina tamponada com fosfato (PBS)
- ✓ Solução salina estéril (NaCl 0,9%).
- ✓ Soro Bovino fetal (Sigma)
- ✓ Tampão fosfato de potássio
- ✓ Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)
- ✓ Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma)
- ✓ Solução Salina Equilibrada de Hank (HBSS) (Sigma)

#### 4.5.4. Corantes

- ✓ Azul de tripan 0,04%, (Sigma)
- ✓ Hematoxilina (Merck)
- ✓ Eosina (Merck)
- ✓ Romanowsky (Dade Behring)
- ✓ Fluo-4 (Invitrogen)
- ✓ Hematoxilina de Harry (sigma)

#### 4.5.5. Anticorpos

- ✓ Anticorpo primário anti-COX-2 produzido em caprinos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).
- ✓ Anticorpo secundário produzido em coelhos anti o anticorpo primário produzido em caprinos (sc-2018 kit, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).
- ✓ Anticorpo primários anti-IL-1 $\beta$  produzido em coelhos (R&D systems)
- ✓ Anticorpo primários anti-TNF- $\alpha$  produzido em coelhos (R&D systems)
- ✓ Anticorpo secundário produzido em caprinos anti os anticorpos primários anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  produzido em coelhos (R&D systems)

## 4.6. Experimentos realizados com animais

### 4.6.1. Edema de pata

Neste estudo, inicialmente foi aferido o volume inicial (VI) do membro posterior direito até a articulação tarsometatársica mediante pletismografia (UgoBasile 7140). Em seguida, foi realizada a injeção intraplantar (i.pl.) em diferentes grupos de solução salina estéril (0,9 %), VBjsu (0,125 – 8 µg/pata), ou carragenina (300 µg/pata) em volume constante de 30 µL. A diferença de volume da pata foi mensurada em vários intervalos de tempo sendo que os valores obtidos para cada faixa de tempo de avaliação correspondeu ao volume final (VF). Desta forma, a variação do volume da pata será expressa em percentagem de variação conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Variação do volume da pata (\%)} = \frac{\text{VF}-\text{VI}}{\text{VI}} \times 100$$

### 4.6.2. Protocolos experimentais

**I - Curva concentração resposta do VBjsu:** Foi realizada a injeção i.pl. de solução salina estéril (0,9 %) ou VBjsu nas concentrações de 0,125, 0,5, 2 e 8 µg/pata. Após 0,5; 1,5; 2,5; 4,5; 6,5; 12,5 e 24,5 horas da administração do veneno ou solução salina a variação de volume da pata foi determinada por pletismografia.

**II – Avaliação do envolvimento de mediadores inflamatórios no edema induzido pelo VBjsu:** Para isso foi realizada a administração de um glicocorticoide, a dexametasona (1 mg/kg, i.p., controle positivo) 1 h antes da injeção de VBjsu (8 µg/pata) ou carragenina (300 ng/pata) em diferentes grupos de animais.

**III - Avaliação da participação da histamina e receptores H<sub>1</sub>:** Para isso a administração do antagonista de receptores H<sub>1</sub>, loratadina (5 mg/kg, v.o) diluída em solução salina estéril (0,9 %), foi realizada uma hora antes da injeção do VBjsu (8 µg/pata, i.pl.).

**IV - Avaliação da participação dos mastócitos:** Foi induzida a depleção de mastócitos utilizando o composto 48/80 (0,6 mg/kg, i.p) dissolvido em solução salina, administrado a cada 12 horas durante 3 dias consecutivos. Somente no quarto dia foi administrada a dose de 1,2 mg/kg. No quinto dia os animais depletados de mastócitos foram submetidos a injeção do VBjsu (8 µg/pata, i.pl.).

**V - Avaliação da participação das fibras C:** A dessensibilização das fibras aferentes primárias foi realizada utilizando doses tóxicas de capsaicina diluída em etanol mais tween 80 % e PBS na proporção de 1:1:8, administrada (25 mg/kg, s.c.), seguida da administração de outras doses de 50 mg/Kg, 12, 24 e 48 horas após a primeira aplicação (Junqueira Junior, 2011). Para neutralizar a depressão respiratória antes da aplicação da capsaicina os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5 % (1 mL/100 g) e pré-tratados com teofilina (20 mg/kg, i.p) e terbutalina (0,2 mg/kg, i.p). Os animais dessensibilizados foram submetidos à injeção do VBjsu (8 µg/pata, i.pl.).

**VI - Avaliação da participação do TNF- $\alpha$ :** Foi administrado o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , Infliximabe (5 mg/kg, i.v.) diluído em solução salina estéril (0,9 %), uma hora antes da injeção do VBjsu (8 µg/pata, i.pl.).

**VII - Avaliação da participação de prostaglandinas:** Para isso foi utilizado um antagonista inespecífico para a enzima ciclooxigenase (COX), a indometacina (10 mg/kg, i.p.), diluída em solução de bicarbonato de sódio 5 %, administrada uma hora antes da injeção VBjsu. Outro grupo de animais foi submetido ao pré-tratamento com um antagonista específico para COX-2, celecoxibe (5 mg/Kg, i.p.), diluído em solução salina estéril (0,9 %), 30 minutos antes da injeção do VBjsu (8 µg/pata, i.pl.).

**VIII - Avaliação da participação dos neutrófilos:** Para isso foi administrado um modulador da P- e L-selectinas, a fucoidina (25 mg/kg, i.p), diluída em solução salina estéril (0,15 M), administrada 30 minutos antes da injeção do VBjsu (8 µg/pata, i.pl.).

Em todos os protocolos, após a injeção do VBjsu a variação do volume da pata nos animais foi aferida à 0,5; 1,5; 2,5 e 4,5 horas respectivamente. Ao final da última determinação do volume plantar, os animais foram eutanasiados mediante deslocamento cervical. A superfície plantar foi seccionada e as amostras de tecidos obtidas foram utilizadas para determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), análise histopatológica, dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), e avaliação da imunexpressão da COX-2, como descrito abaixo.

#### **4.7. Ensaio para determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)**

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos utilizada como marcador indireto da presença dessas células nos tecidos inflamados. A atividade enzimática da MPO foi detectada de acordo com o método colorimétrico anteriormente descrito por Bradley et al., (1982). Para isso a MPO foi extraída a partir de amostras da pata em suspensão com 0,5 % de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) misturado com tampão de potássio na proporção de 50 mg de tecido para 1 mL de HTAB (pH 6,0), homogeneizada e submetida a um processo de congelamento e descongelamento rápido. O homogeneizado foi centrifugado a 1500 x g durante 20 min a 4 °C resultando em um sobrenadante e um sedimento. O sobrenadante foi novamente centrifugado 1500 x g por 10min para melhor remoção de contaminantes. Para a determinação da atividade da MPO, 7  $\mu$ L de sobrenadante foram misturados com 200  $\mu$ L da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H<sub>2</sub>O). A MPO foi determinada por espectrofotometria, medindo a variação da absorbância a 450 nm ( $t_0 = 0$  min e  $t_1 = 1$  min). Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de degradar 1  $\mu$ mol de peróxido/min e os resultados obtidos foram expressos como a atividade da MPO/mg de tecido (MPO U/mg de tecido).

#### **4.8. Análise histopatológica**

Para a análise histopatológica os fragmentos de tecido da pata foram fixados em formol incluídos em parafina, cortados em micrótomo (4  $\mu$ m de espessura), corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e examinados sob microscopia óptica. Nas observações

microscópicas, foram analisados quanto à presença de infiltrado inflamatório, edema e hemorragia.

#### **4.9. Imunoistoquímica para Ciclooxigenase-2 (COX-2)**

A análise imunoistoquímica para a COX-2 nos tecidos foi realizada pelo método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). As peças histológicas embebidas em parafina foram cortadas em 5 mm de espessura de tecido, montadas em lâminas para microscópio revestidas de poli-L-lisina foram processadas em banhos de xileno, alcoóis graduados, aquecidas em tampão de citrato, para recuperação de antígenos, e tratada com 3 % (v/v) de peróxido de hidrogênio, para o bloqueio da peroxidase endógena (15 min). As lâminas foram incubadas durante a noite (4 °C) com anticorpo primário produzido em caprinos anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), diluído a 1:200 em 5 % de Albumina Sérica Bovina (BSA a 5 %). Após os procedimentos de lavagem em Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS), as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário biotinilado produzido em coelhos anti o anticorpo primário produzido em caprinos (sc-2018 kit, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), diluído a 1:400 em BSA 5%. Em seguida, o complexo estreptavidina- biotina-peroxidase (sc -2017, ABC Coloração Sistema de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foi adicionado, junto com a 3,3'-diaminobenzidina (referência K3468, Dako líquido DAB + peróxido, CA, EUA) e as lâminas foram contrastadas com hematoxilina de Harry. Após a desidratação dos tecidos em álcool foi realizada a montagem das lâminas. As amostras foram avaliadas por um patologista, que através de teste cego, classificou a imunomarcagem nos tecidos em escores variado de 0-3, onde 0 seria equivalente a nenhuma marcação e 3 equivalente a marcação máxima.

#### **4.10. Detecção de citocinas (IL-1 $\beta$ E TNF- $\alpha$ ) nos tecidos por ELISA**

Os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  presentes nas amostras foram mensurados por ELISA, como descrito anteriormente por Melo et al. (2008). Resumidamente, os anticorpos primários anti-IL-1 $\beta$  ou anti-TNF- $\alpha$  (2  $\mu$ g/ml) foram incubados durante a noite à 4 °C em microplacas de 96 poços. Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram

adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24 h a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo secundário produzido em caprinos anti os anticorpos primários anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ , (na proporção de 1:1000 diluído com o tampão de ensaio, BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1 h, as placas foram lavadas e 100  $\mu$ l do complexo estreptavidina-HRP diluída 1:200 foi adicionado em cada poço. Em seguida foi acrescentado o substrato aos poços (1:1 mistura de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina; R&D systems, EUA) e após 20 min de incubação à temperatura ambiente em local protegido da luz, a reação enzimática foi parada utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 2N. A reação colorimétrica foi mensurada pela absorbância medida a 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mg de tecido.

#### **4.11. Experimentos realizados com material biológico humano**

##### **4.11.1. Isolamento de neutrófilos**

Sangue humano de voluntários sadios foi colhido por meio de punção venosa da veia braquial utilizando seringa e agulha descartáveis. Imediatamente após a colheita, 2 mL de sangue foi adicionado a um tubo *falcon* contendo quatro gradientes de percoll (72, 63, 54, e 45 %, 2 mL cada). Após centrifugação a 650 x g durante 30 min a 25 °C, a camada inferior de células brancas contendo neutrófilos foi recolhida e lavada em Solução Salina Equilibrada de Hank (HBSS). Após nova centrifugação a 450 x g durante 8 minutos a 25 °C. O sedimento, livre de células vermelhas do sangue, foi novamente suspenso em meio RPMI 1640 contendo BSA a 0,1 %. As preparações contendo 98 % de neutrófilos foram consideradas ideais para a realização dos ensaios de quimiotaxia *in vitro* e estudo da dinâmica intracelular cálcio (ITAKURA et al, 2013; SOUTO et al, 2011).

##### **4.11.2. Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos na Câmara de Boyden**

O ensaio de quimiotaxia de neutrófilos foi realizado na câmara de Boyden contendo 48 poços (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, EUA) como previamente descrito

por Souto et al., (2011). Neste experimento, inicialmente o VBjsu (10, 30, 100 ng/poço) ou os controles IL-8 (100 ng/poço, controle positivo), ou meio RPMI (controle negativo), foram adicionados aos poços da placa inferior da câmara em volume fixo de 27 µL. Uma membrana de policarbonato (Neuro Probe, 5 µm de poro) foi cuidadosamente colocada sobre a superfície da placa inferior, sobre a membrana foi colocada e fixada a placa superior finalizando a montagem da câmara de Boyden. Nos poços da placa superior foram adicionados  $5 \times 10^4$  neutrófilos em cada poço. Após a adição dos neutrófilos a câmara foi incubada durante 1 h a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, as membranas foram lavadas em PBS, fixadas em metanol 80 %, e coradas utilizando corantes Romanowsky (Dade Behring, Inc., Newark, DE). O número de células foi contado em cinco campos diferentes em cada poço com auxílio do microscópio ótico (ampliação de 1000 x). Esse ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como o número médio de neutrófilos por poço.

#### **4.11.3. Teste de viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán**

O teste de exclusão por azul de tripan permitiu quantificar separadamente as células viáveis das células mortas. O corante azul de tripan penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira, observar uma coloração azulada nas células metabolicamente inativas. Os neutrófilos isolados ( $5 \times 10^4$  por poço) foram incubados com o VBjsu (10, 30, 100 ng/poço) ou com meio RPMI (controle negativo) durante 1 h a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, foram coletadas alíquotas de 50 µL da suspensão de células as quais foram adicionadas 50 µL do azul de tripan (0,04 %) e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Os neutrófilos viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contados nos 4 quadrantes da câmara de Neubauer (100 x). A percentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a fórmula descrita abaixo

$$\text{Células viáveis (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$

#### 4.11.4. Mensuração da dinâmica intracelular de cálcio em neutrófilos isolados

A dinâmica intracelular de cálcio em neutrófilos humanos incubados com o VBjsu, foi investigado como relatado anteriormente por Huang et al, (2013) e Itakura et al, (2013). Resumidamente, foi adicionado um indicador de  $\text{Ca}^{2+}$ , o Fluo-4 a suspensão de neutrófilos humanos isolados (0,2 % de concentração final). Após a adição do indicador as células foram incubadas durante 30 min a 37 °C com 5 % de  $\text{CO}_2$ . Para remover o excesso de Fluo-4, as células foram lavadas com meio RPMI 1640 e submetidas à centrifugação a 450 x g durante 8 minutos a 25 °C. O sedimento foi suspenso em RPMI 1640 contendo BSA a 0,1 %. A dinâmica intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em neutrófilos foi monitorada por 10 min a 488 nm através de microscopia confocal (FluoView® FV1200, Olympus). Após os registros da atividade espontânea basal foram adicionados a cuba o VBjsu (30 ng/mL), ou os controles, fMLP (10 nM, controle positivo), IL-8 (100 ng/mL, controle positivo) ou solução de Tyrode (controle negativo). As imagens obtidas foram analisadas pelo FIJI 1.47v Software (NIH, EUA). Os resultados foram expressos como razão da intensidade de fluorescência final pela Inicial ( $F/F_0$ ) e o número porcentual de células ativas por campo.

#### 4.12. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (S.E.M.), com exceção da análise dos escores atribuídos a imunohistoquímica, cujo resultado foi expresso na forma de mediana (dados não paramétricos). Os dados paramétricos foram analisados através do teste de análise de variância ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo teste de Bonferroni ou teste T. Para os dados não paramétricos a análise foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. A significância estatística foi aceita quando  $P < 0,05$ . Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism versão 6.01.



## *Resultados*

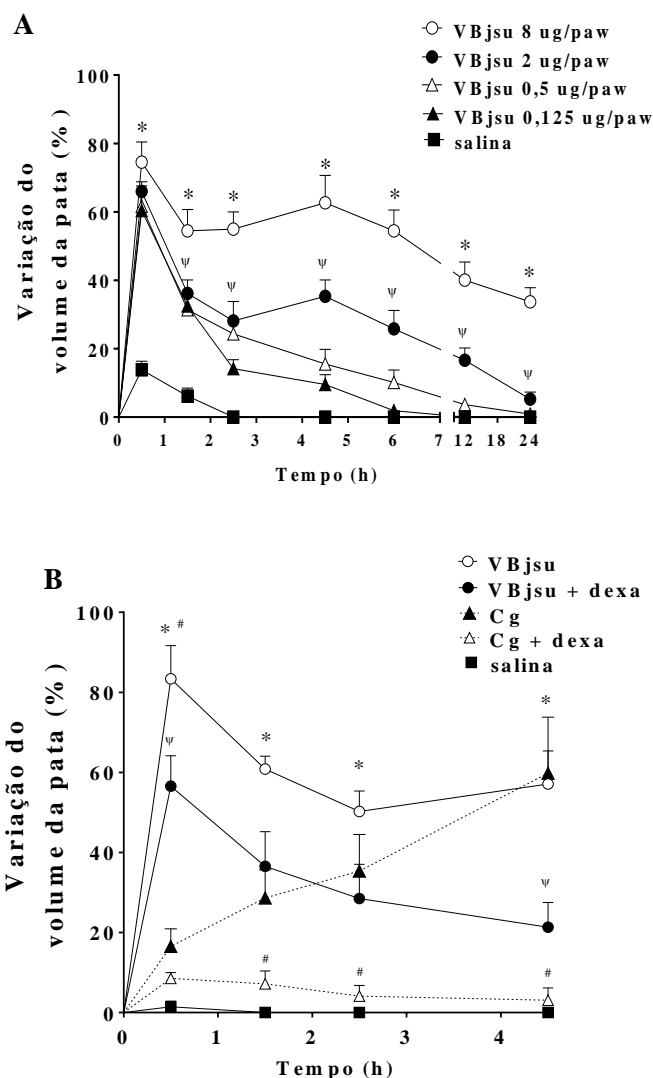
---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. O veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz uma resposta edematogênica com participação de mediadores inflamatórios

Como mostrado na Fig. 5A, o VBjsu induziu uma resposta edematogênica concentração e tempo dependentes quando comparado com o grupo que recebeu a injeção de solução salina ( $P < 0,05$ ). O VBjsu em todas as concentrações testadas induziu a formação de edema, que atingiu o pico máximo 0,5 h após a injeção do veneno (aumento de  $74,5 \pm 5,8\%$  do volume da pata [VBjsu 8  $\mu\text{g/pata}$ ] vs.  $13,8 \pm 2,5\%$  no grupo controle). Na maior concentração estudada (8  $\mu\text{g/pata}$ ), esta resposta foi sustentada até 4,5 h após a injeção do VBjsu, a partir desse ponto, o edema decresceu gradualmente. Além disso, como mostrado na Fig. 5B, o VBjsu induziu uma precoce resposta edematogênica, quando comparado com o edema resultante da injeção de carragenina ( $P < 0,05$ ). No entanto, o edema induzido por ambos: VBjsu ou por carragenina foram reduzidos pela dexametasona (1 mg/kg, i.p.,  $P < 0,05$ ). Em virtude destes expressivos resultados, as experiências subsequentes foram realizadas utilizando a concentração de 8  $\mu\text{g/pata}$  do VBjsu.

**Figura 5.** O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz a formação de edema de maneira concentração e tempo dependente envolvendo a participação de mediadores da resposta inflamatória.

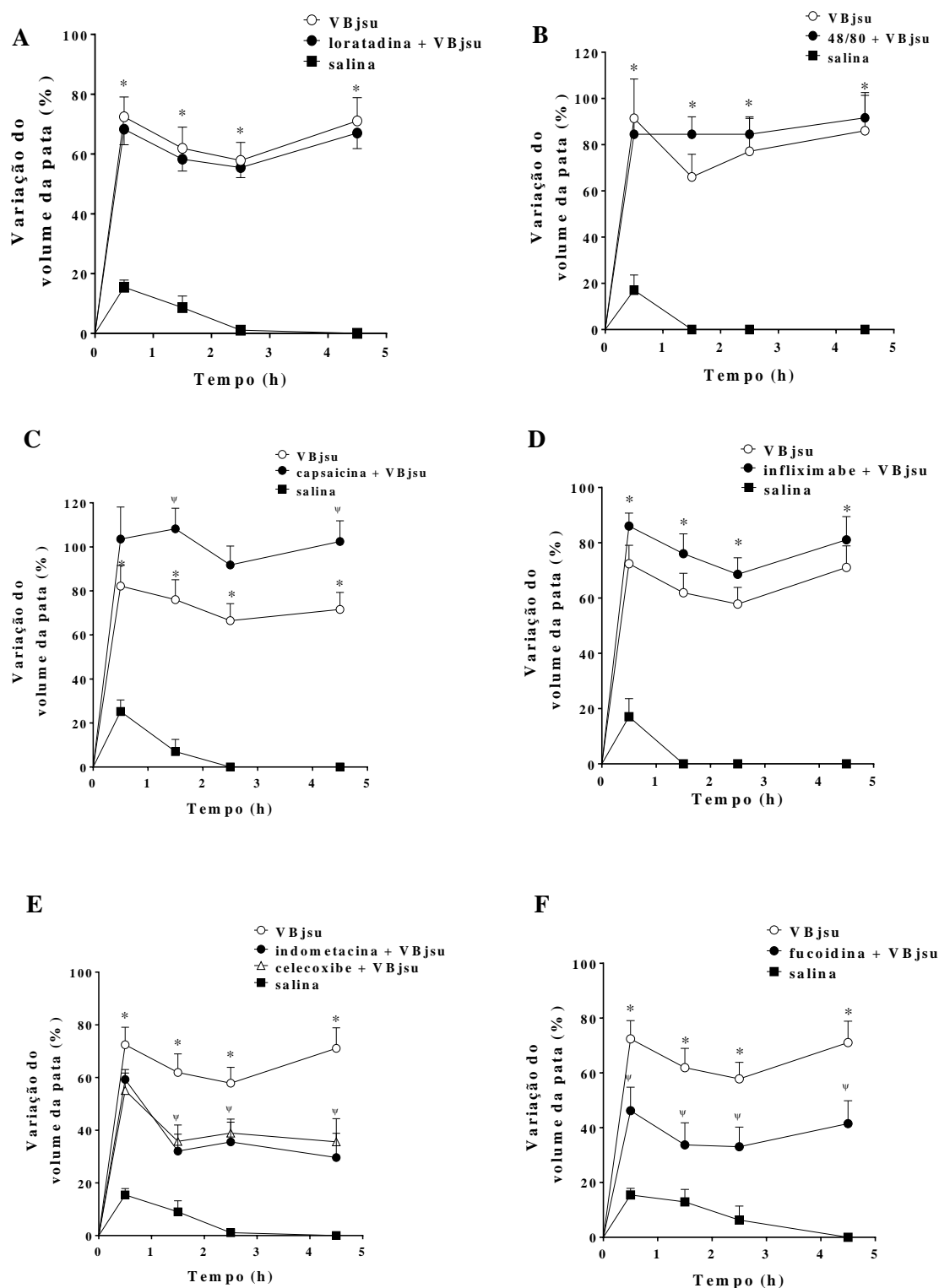


(A) Diferentes grupos de camundongos ( $n=7$ ) foram submetidos à injeção intraplantar (i.pl.) de solução salina ( $30 \mu\text{L/pata}$ , grupo controle) ou VBjsu ( $0,125 - 8 \mu\text{g/pata}$ ). (B) A administração de dexametasona ( $1 \text{ mg/kg}$ , i.p., dexa) 1 h antes do VBjsu  $8 \mu\text{g/pata}$  ou carragenina ( $300 \mu\text{g/pata}$ , Cg) foi utilizada como controle positivo. A resposta edematogênica foi avaliada por plestimografia. O painel A demonstra que o VBjsu induz uma resposta edematogênica concentração e tempo dependentes. O painel B demonstra que o pré-tratamento com dexametasona ( $1 \text{ mg/kg}$ , i.p.) pode inibir a resposta local induzida pelo VBjsu na maior concentração estudada ( $8 \mu\text{g/pata}$ ) de maneira semelhante ao observado no grupo carragenina. Os valores foram obtidos a partir da diferença percentual entre o volume inicial e final da pata [Variação do volume da pata (%)] e foram expressos como média  $\pm$  S.E.M.,  $*P<0.05$  vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) solução salina,  $\Psi P<0.05$  vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) VBjsu ( $8 \mu\text{g/paw}$ ), e  $\#P<0.05$  vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) carragenina.

## 5.2. Modulação farmacológica da resposta inflamatória local induzida pelo Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu)

A fim de investigar os mecanismos e mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pelo VBjsu, várias intervenções farmacológicas foram realizadas. A injeção do VBjsu (8 µg/pata) invariavelmente induziu a formação de edema e aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) nos tecidos em comparação com os animais que receberam a injeção de solução salina ( $P < 0,05$ , Fig. 6 e 7, os painéis A-F). Ambas as respostas induzidas pelo veneno não foram alteradas em animais pré-tratados com o antagonista do receptor  $H_1$ , loratadina (Fig. 6A e 7A), submetidos à depleção dos mastócitos com o composto 48/80 (Fig. 6B e 7B), submetidos à dessensibilização das fibras C com a capsaicina (Fig. 6C e 7C) ou pelo uso do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , infliximabe (Fig. 6D e 7D) ( $P > 0,05$ ). Em contraste, o pré-tratamento com inibidores da atividade da ciclooxigenase (COX), indometacina (inibidor não específico da COX, Fig. 6E e 7E) ou com o celecoxibe (inibidor seletivo da COX-2, Fig. 6E e 7E) pode-se observar uma redução no edema e na atividade da MPO nos tecidos induzidos pelo VBjsu ( $P < 0,05$ ). Além disso, a inibição da atividade da P- e L-selectinas, utilizando a fucoïdina (Figura 6F e 7F), também reduziu ( $P < 0,05$ ) o edema ( $46,2 \pm 8,5$  % de variação no volume da pata) e a atividade da MPO indicando uma diminuição no infiltrado neutrofílico (atividade de MPO:  $15,1 \pm 3,0$  U/mg de tecido) induzidos pela injeção do VBjsu (edema:  $72,4 \pm 6,6$  % e atividade da MPO:  $31,5 \pm 3,6$  U/mg de tecido). A participação de outros mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina, na resposta edematogênica induzida pelo VBjsu foi investigada por meio da modulação de farmacologia usando HOE 140 (antagonista do receptor B2). No entanto, observou-se que a bradicinina não contribuiu para a resposta edematogênica (dados não mostrados).

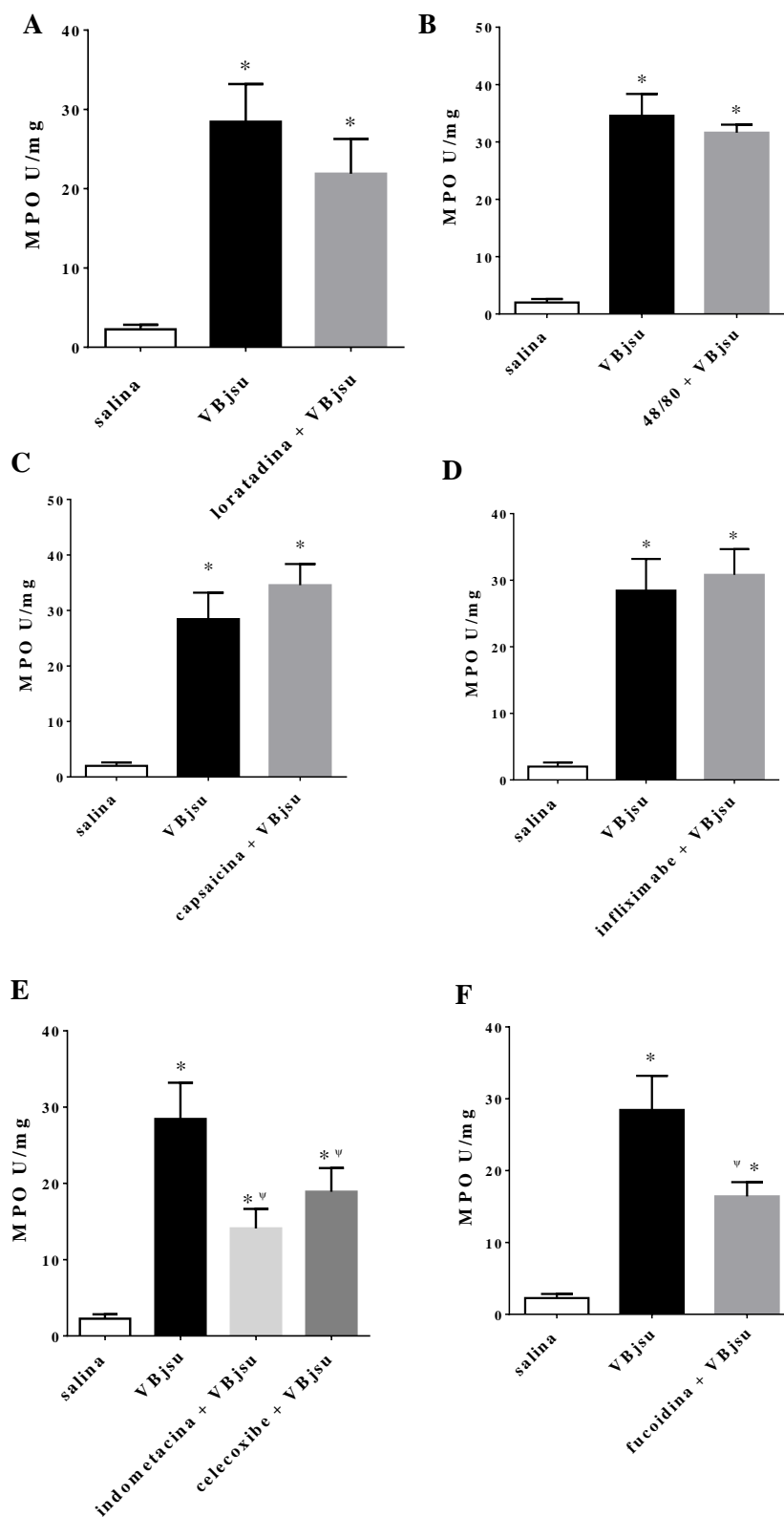
**Figura 6.** O veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz uma resposta edematogênica dependente da produção de prostanoídes e da migração de neutrófilos.



Diferentes grupos de animais foram pré-tratados com (A) loratadina (um antagonista de receptores H<sub>1</sub>, 5 mg/kg, v.o.). (B) composto 48/80 (6 x 0.6 + 2 x 1.2 mg/kg, i.p.) para induzir

a depleção de mastócitos. (C) capsaicina (2x 25 + 50 mg/kg, i.p.) para induzir a dessensibilização das fibras C. (D) infliximabe (um anti-corpo anti-TNF- $\alpha$ , 5 mg/kg, i.v.). (E) indometacina (um inibidor inespecífico da COX, 10 mg/kg, i.p.), e celecoxibe (um inibidor específico da COX-2, 5 mg/kg, i.p.), (F) fucoidina (um modulador da P- e L-selectinas, 25 mg/kg) que foram administrados antes do VBjsu (8  $\mu$ g/pata). Como mostrado nos painéis E e F, apenas a inibição da atividade da COX promovida pelo pré-tratamento com indometacina ou celecoxibe ou a inibição da migração de neutrófilos pelo uso da fucoidina reduziram significativamente a resposta edematogênica induzida pelo VBjsu (8  $\mu$ g/pata). Os valores foram obtidos a partir da diferença percentual entre o volume inicial e final da pata [Variação do volume da pata (%)] e foram expressos como média  $\pm$  S.E.M.. \* $P < 0.05$  vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) solução salina,  <sup>$\Psi$</sup>   $P < 0.05$  vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) VBjsu (8  $\mu$ g/paw).

**Figura 7.** A migração de neutrófilos induzida pelo veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) pode ser prevenida pela modulação da atividade da ciclooxigenase e da P- e L-selectinas.



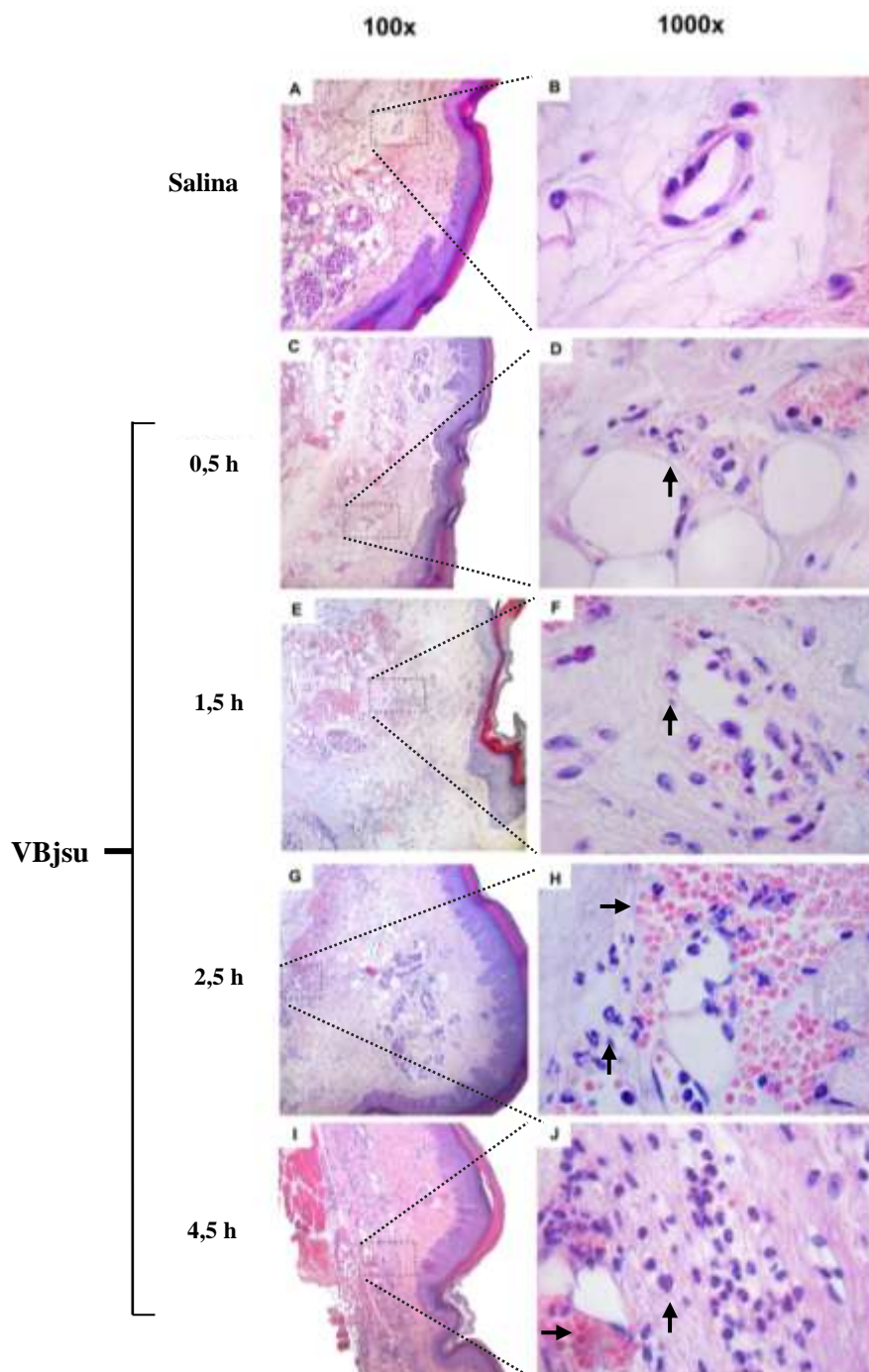
Diferentes grupos de animais foram pré-tratados com (A) loratadina (um antagonista de receptores  $H_1$ , 5 mg/kg, v.o.). (B) composto 48/80 (6 x 0.6 + 2 x 1.2 mg/kg, i.p.) para induzir a depleção de mastócitos. (C) capsaicina (2x 25 + 50 mg/kg, i.p.) para induzir a dessensibilização das fibras C. (D) infliximabe (um anti-corpo anti-TNF- $\alpha$ , 5 mg/kg, i.v.). (E) indometacina (um inibidor inespecífico da COX, 10 mg/kg, i.p.), e celecoxibe (um inibidor específico da COX-2, 5 mg/kg, i.p.), (F) fucoidina (um modulador da P- e L-selectinas, 25 mg/kg) que foram administrados antes do VBjsu (8  $\mu$ g/pata). Após 4,5 h da injeção de VBjsu os animais foram eutanasiados e as amostras de pata coletadas para mensuração da atividade da MPO nos tecidos. Como demonstrado nos painéis E e F apenas o pré-tratamento com indometacina, celecoxibe e fucoidina reduziram a atividade de MPO. Os valores foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. da atividade de MPO (MPO U/mg) de tecido. \* $P < 0.05$  vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) solução salina,  $^{\Psi} P < 0.05$  vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) VBjsu (8  $\mu$ g/paw).

### **5.3. Curso temporal das alterações histopatológicas induzidas pelo Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) na pata de camundongos**

A Fig. 8 apresenta fotomicrografias representativas das amostras histopatológicas da pata de camundongos obtidas em diferentes tempos a partir da injeção de solução salina ou VBjsu. As amostras recolhidas após a injeção de solução salina mostram a morfologia intacta dos tecidos (Fig. 8, Painéis A e B). Em contraste, a injeção do VBjsu induziu uma rápida resposta inflamatória marcada pela presença de estase sanguínea, edema, hemorragia e um intenso infiltrado inflamatório neutrofílico que foram progressivamente observados 0,5 - 4,5 h após a injeção do VBjsu (Fig. 8, Painéis C - J).



**Figura 8.** Curso temporal das alterações histopatológica induzidas pelo Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) na pata de camundongos.



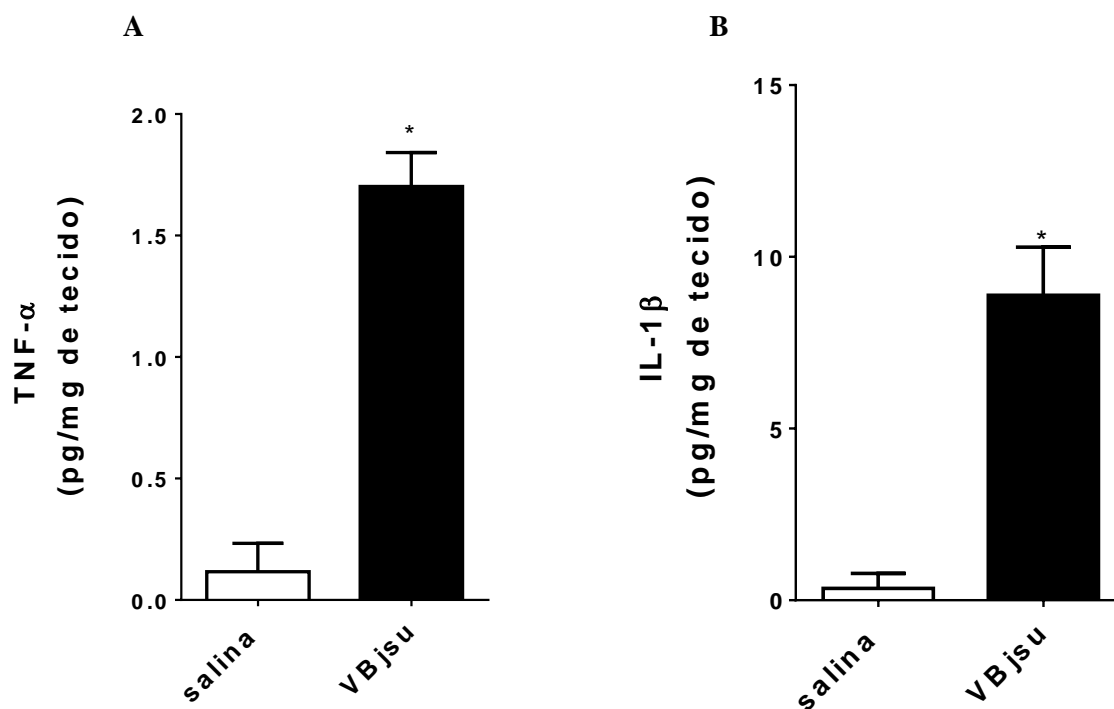
Diferentes grupos de camundongos (n=7) foram submetidos à injeção intraplantar (i.pl.) de solução salina (30  $\mu$ L/pata, grupo controle, painéis A-B) ou VBjsu (0,125 – 8  $\mu$ g/pata, Painéis C-J). Amostras das patas obtidas do grupo controle apresentam a morfologia dos tecidos integra (painéis A e B). Os danos nos tecidos provocados pela injeção do VBjsu pode ser observado a 0,5 h (painéis C e D), 1,5 horas (Painéis E e F), 2,5 h (painéis G e H) e 4,5 h (painéis I e J), O dano tecidual induzido por VBjsu esta relacionado principalmente ao infiltrado neutrofílico (setas verticais), e hemorragia (setas horizontais) que

progressivamente aumentam ao longo do tempo. As microfotografias apresentadas são correspondentes a exemplares representativos corados em H&E, painéis A, C, E, G e I (aumento de 100 x) e os painéis B, D, F, H e J (aumento de 1000 x).

#### **5.4. O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz aumento na produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e a imunexpressão da Ciclooxygenase-2 (COX-2) na pata de camundongos.**

Amostras obtidas da pata de camundongos 4,5 h após a injeção do VBjsu apresentavam níveis aumentados de TNF- $\alpha$  ( $1,7 \pm 0,1$ , Fig. 9A.) e IL-1 $\beta$  ( $8,8 \pm 1,4$ , Fig. 9B.) quando comparado ao grupo controle (TNF:  $0,1 \pm 0,1$  ; IL-1 $\beta$ :  $0,3 \pm 0,0$ ,  $P < 0,05$ ). Além disso, a injeção do veneno também aumentou ( $P < 0,05$ ) a imunexpressão da COX-2 nos tecidos (3 [3-3]) em comparação com o grupo de animais que recebeu a injeção de solução salina na pata (1 [0-2]), como mostrado na Tabela 1 e nas fotomicrografias representativas das amostras histológicas obtidas da pata de camundongos (Fig. 10). As setas indicam a imunomarcção para COX-2 nas células endoteliais e nos neutrófilos presentes no tecido (Fig. 10).

**Figura 9.** O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz aumento na produção local de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .



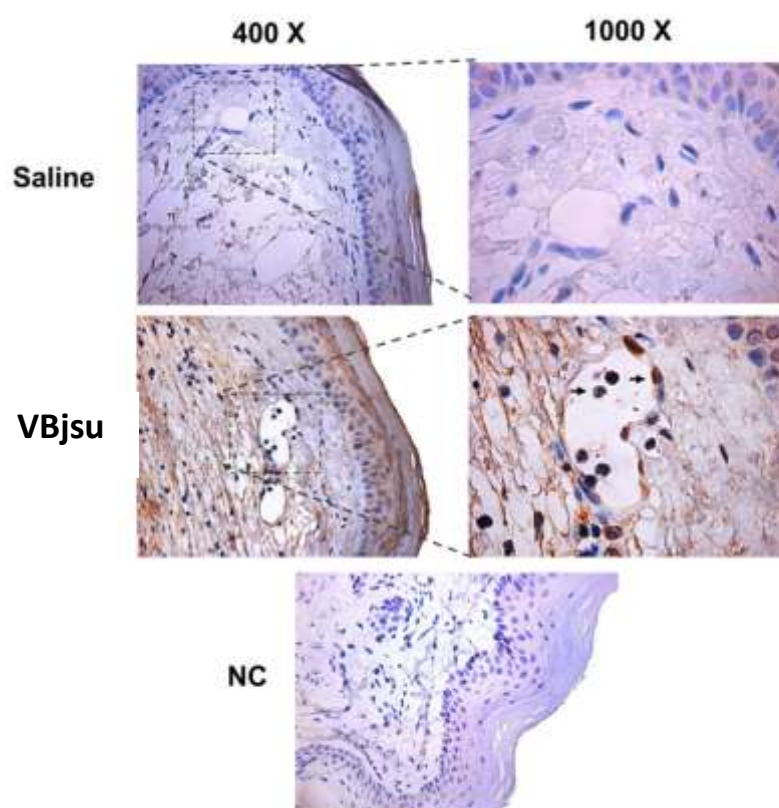
Diferentes grupos de camundongos (n=7) foram submetidos à injeção intraplantar (i.pl.) de solução salina (30  $\mu$ L/pata, grupo controle) ou VBjsu (0,125 – 8  $\mu$ g/pata). Após 4,5 h da injeção do VBjsu (8  $\mu$ g/pata) ou solução salina os animais foram eutanasiados e amostras de pata foram coletadas. Os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  presentes nos tecidos foram mensurados por ELISA. Como demonstrado nos painéis A e B o VBjsu induz a produção local de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , respectivamente. Os valores foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. do nível de citocinas expresso em pg/mg de tecido \* $P$ <0.05 vs. o grupo que foi injetado (i.pl.) solução salina.

**Tabela 2.** O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz a expressão da Ciclooxygenase-2 (COX-2) na pata de camundongos.

Imunoistoquímica para COX-2	
Salina	1 (0-2)
VBjsu	3 (3-3)*

\* $P$ <0.05 vs. grupo que recebeu a aplicação de salina i.pl.

**Figura 10.** O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) aumenta a imunoposição da Ciclooxigenase-2 (COX-2) na pata de camundongos.



Diferentes grupos de camundongos (n=7) foram submetidos à injeção intraplantar (i.pl.) de solução salina (30  $\mu$ L/pata, grupo controle) ou VBjsu (0,125 – 8  $\mu$ g/pata). Após 4,5 h da injeção do VBjsu (8  $\mu$ g/pata) ou solução salina os animais foram eutanasiados e amostras de pata foram coletadas para determinação imunohistoquímica da expressão da COX-2 nos tecidos. As setas indicam a imunoposição da COX-2 presente em neutrófilos e em células endoteliais nos tecidos onde foi injetado o VBjsu (aumento 1000 x). O controle negativo (CN) representa uma amostra de pata onde o anti-corpo primário anti-COX-2 foi substituído por 5 % PBS/BSA e nenhuma imunomarcagem foi detectada. A figura apresenta fotomicrografias representativas (no aumento de 400 x e 1000 x).

### 5.5. O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz diretamente a migração de neutrófilos *in vitro*.

O ensaio de câmara de Boyden foi realizado para investigar o potencial efeito quimiotático direto do VBjsu sobre neutrófilos humanos. Como mostrado na Fig. 11A, o VBjsu (10, 30 e 100 ng/poço) assim como a IL-8 (100 ng/poço, controle positivo),

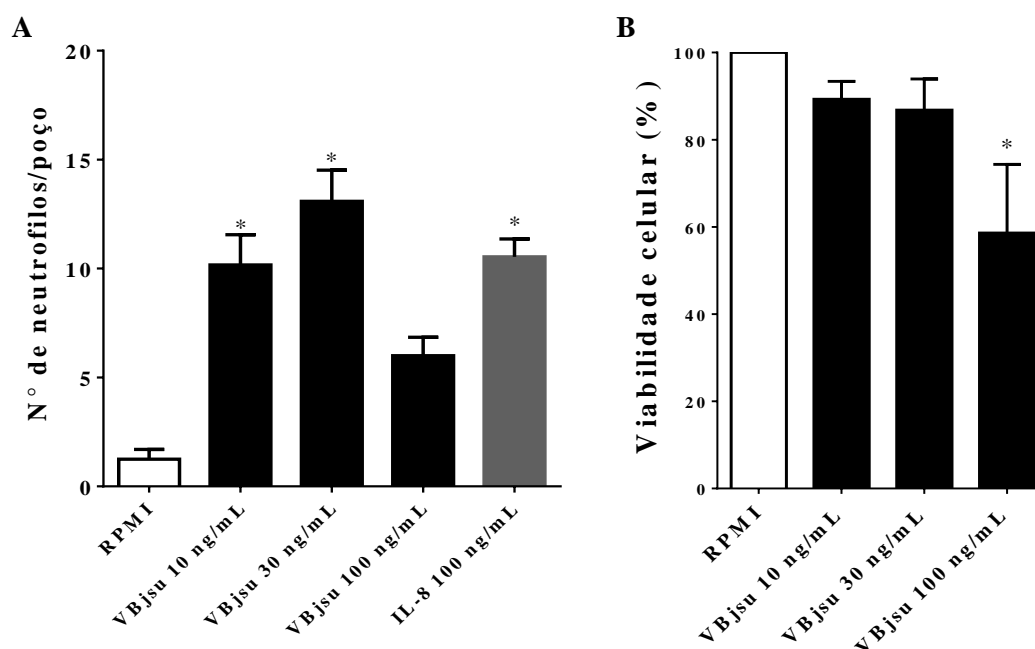
induziram a migração dos neutrófilos quando comparada com o meio RPMI utilizado como controle negativo ( $P < 0,05$ ). Além disso, foi constatado que apenas a concentração de 100 ng/mL do VBjsu é capaz de reduzir a viabilidade das células após 1 h de incubação em comparação com o meio RPMI (Fig. 11B,  $P < 0,05$ ).

### **5.6.O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) ativa diretamente os neutrófilos aumentando a dinâmica de cálcio intracelular**

O estudo do efeito direto do VBjsu sobre a dinâmica de cálcio intracelular e o estado de ativação dos neutrófilos foi avaliado *in vitro* com auxílio do microscópio confocal. Após a incubação dos neutrófilos com o indicador fluorescente para cálcio (Fluo 4), foi realizado o registro temporal, durante 600 segundos, das variações na fluorescência intracelular. As medidas aferidas entre 0 a 180 s corresponderam ao sinal de fluorescência basal, aos 180 s foi realizada a aplicação dos diferentes estímulos, e entre 180-600 s foi registrado o efeito dos diferentes estímulos sobre a dinâmica de cálcio e o estado de ativação das células. Sob tais condições, os neutrófilos foram incubados com solução de Tyrode (controle negativo), fMLP, IL-8 ou VBjsu. O fMLP (10 nM) produziu um aumento imediato na fluorescência, o que se manteve sustentado durante o período estudado. Em contraste a IL-8 (100 ng/ml) induziu apenas uma breve resposta. No entanto, o VBjsu produziu uma resposta lenta e crescente, mas de longa duração quando comparada aos demais estímulos (Fig 12A). A proporção de intensidade de fluorescência/basal ( $F/F_0$ ) foi determinada e expressa para cada estímulo na Fig. 12B. onde foi demonstrado que o VBjsu, fMLP e IL-8 aumentaram os níveis de cálcio intracelular nos neutrófilos quando comparados com o controle negativo (solução de Tyrode,  $P < 0,05$ ). A Fig. 12C, exprime a porcentagem de neutrófilos ativados em diferentes pontos de tempo (100, 200, e 400 s). Pode-se constatar que o número percentual

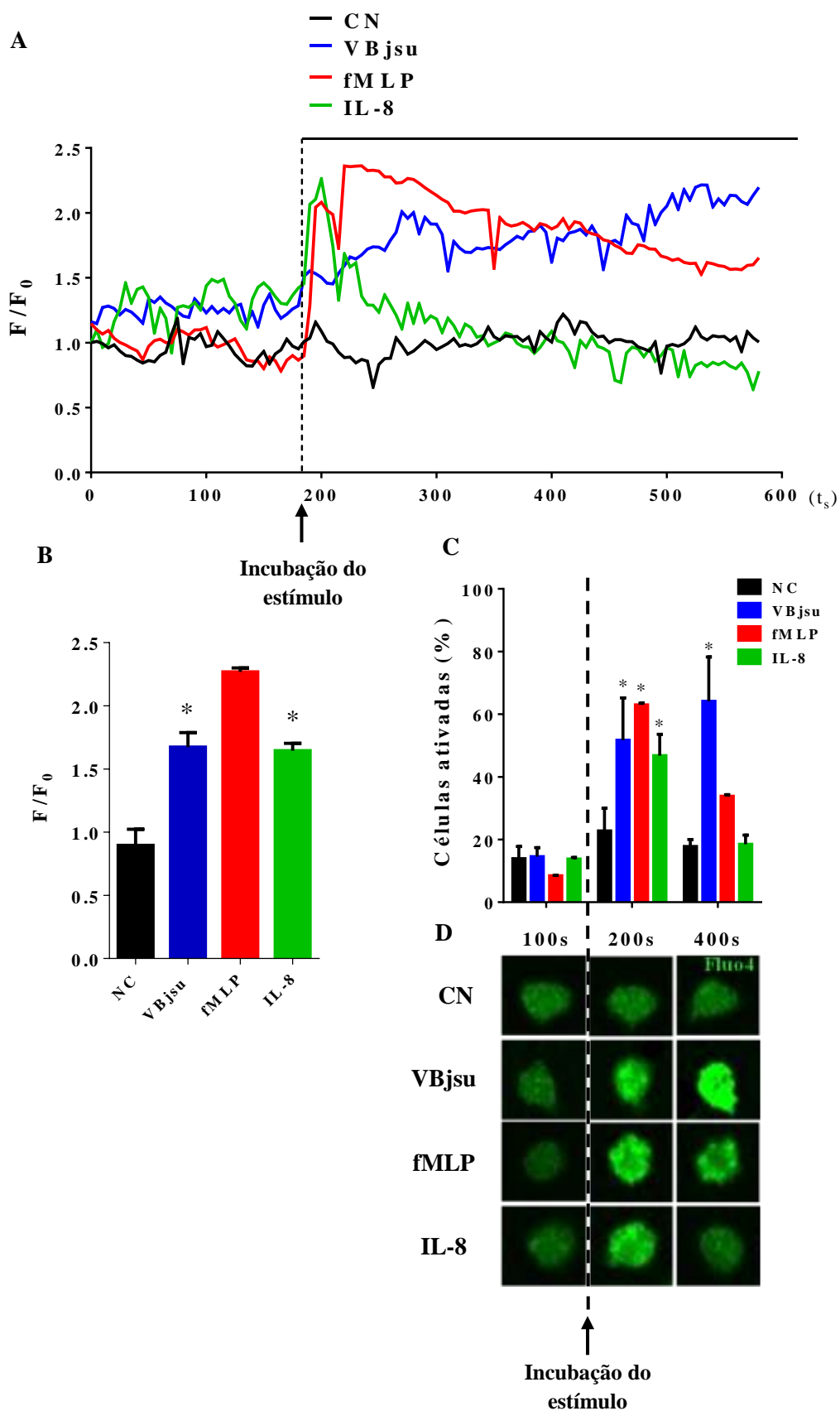
de células ativadas aumentou após a incubação dos neutrófilos com VBjsu, fMLP e IL-8 em comparação com o grupo controle negativo (solução de Tyrode,  $P < 0,05$ ). A Fig. 12D apresenta o padrão de intensidade de fluorescência observado nos neutrófilos no estado basal (100 s) e no estado ativado induzido pelos diferentes estímulos VBjsu, fMLP e IL-8 (200 e 400 s).

**Figura 11.** O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) induz diretamente a migração de neutrófilos humanos *in vitro*.



Neutrófilos obtidos de voluntários humanos saudáveis foram utilizados para realizar o ensaio de quimiotaxia *in vitro* na câmara de Boyden de 48 poços. Nos poços da placa superior foram adicionados  $5 \times 10^4$  neutrófilos humanos por poço. Enquanto que nos poços da placa inferior foram adicionados o VBjsu (10, 30 e 100 ng/poço) ou IL-8 (100 ng/poço, adotada como controle positivo) e o meio RPMI (controle negativo). Após 1 h de incubação a 37 °C com CO<sub>2</sub> a 5 %, o número de células que migraram foi contado em cinco campos diferentes em poço com auxílio de microscópio óptico (aumento 1000 x). O experimento foi realizado em triplicata. O painel A demonstra que o VBjsu (10, 30 e 100 ng/poço) ou IL-8 (100 ng/poço) são capazes de atrair diretamente neutrófilos humanos quando comparados ao controle negativo RPMI. O painel B mostra que a viabilidade celular foi reduzida quando os neutrófilos foram incubados com a maior concentração do VBjsu (100 ng/poço). Os valores são expressos como média  $\pm$  S.E.M. de neutrófilos por poço \* $P < 0,05$  vs. RPMI (controle negativo).

**Figura 12.** O Veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) ativa diretamente os neutrófilos humanos aumentando os níveis de cálcio intracelular.



Os neutrófilos humanos obtidos de voluntários sadios foram incubados com o indicador fluorescente de cálcio (painel D, Fluo 4, células marcadas em verde). A dinâmica intracelular de cálcio nos neutrófilos foi monitorada durante 600 s a 488 nm com auxílio do microscópio confocal. Após um período basal de observação (180 s) foram adicionados à cuba, contendo os neutrófilos, solução de Tyrode (controle negativo, CN), VBjsu (30 ng/mL), fMLP (10 nM), ou IL-8 (100 ng/mL). O painel A mostra o curso temporal da dinâmica intracelular de cálcio nos neutrófilos entre 0 a 180 s (fluorescência basal), aos 180 s (tempo de aplicação do estímulo) e 180-600 s após a incubação dos estímulos. No painel A pode-se observar que o fMLP produziu uma resposta imediata e sustentada, diferente da produzida pela IL-8, que levou a uma resposta rápida e breve, enquanto que o VBjsu produziu uma resposta lenta crescente e de longa duração. A proporção de intensidade de fluorescência/basal ( $F/F_0$ ) foi determinada e expressa para cada estímulo na Fig. 12B, onde demonstra-se que o VBjsu, fMLP e IL-8 aumentaram os níveis de cálcio intracelular nos neutrófilos quando comparados com o controle negativo (solução de Tyrode). O Painel C apresenta o número percentual de neutrófilos ativados, contados em diferentes pontos de tempo (100, 200 e 400 s). O número percentual de células ativadas aumentou após a incubação dos neutrófilos com VBjsu, fMLP e IL-8 em comparação com o grupo controle negativo (painel C). Fotomicrografias representativas dos neutrófilos são mostrados no Painel D que apresenta o padrão de intensidade de fluorescência observado nos neutrófilos no estado basal (100 s) e no estado ativado induzido pelos diferentes estímulos VBjsu, fMLP e IL-8 (200 e 400 s). Os valores foram expressos como média  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0,05$  vs solução de Tyrode, adotada como controle negativo (CN).



## *Discussão*

---

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstrou-se que os efeitos patológicos locais induzidos pelo veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu) são parcialmente dependentes da ação de substâncias relacionados à resposta inflamatória. O VBjsu invariavelmente induziu a formação de edema, aumento da atividade da enzima MPO e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, foi evidenciado que os neutrófilos e os prostanóides são componentes chave para a amplificação do dano local iniciado pelo da VBjsu. A injeção do VBjsu na pata de camundongos causou uma resposta edematogênica concentração e tempo dependente, que pode ser parcialmente bloqueada pela administração de inibidores da ciclooxigenase (indometacina ou celecoxibe), ou pelo modulador de P- e L-selectinas (fucoidina). Foi observado que a resposta local induzida pelo veneno evolui com uma migração precoce de neutrófilos, aumento da produção local de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e imunexpressão da COX-2 nos neutrófilos e células endoteliais, estudado 4,5 h após a aplicação do veneno. Além disso, foi demonstrado que o VBjsu induz diretamente a ativação e a quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro*.

O envenenamento induzido por espécies do gênero *Bothrops* em humanos, causa edema, dor local, eritema, equimose, cianose e bolhas com transudato claro seroso ou hemorrágico no local da picada, resultando em descamação de tecidos superficiais, hemorragia, e necrose (AMARAL et al., 1985). Os achados obtidos a partir do modelo experimental murino reproduziram os principais sinais clínicos provocados por este veneno. Experimentalmente, a injeção do VBjsu induziu uma imediata resposta edematogênica observada em todas as concentrações utilizadas, principalmente na maior concentração (8  $\mu\text{g/pata}$ ), que produziu uma rápida e sustentada resposta edematogênica com pico observado as 0,5 h, estável até 4,5 h após a injeção do VBjsu, decrescendo gradualmente a partir desse ponto. Este curso temporal de resposta edematogênica foi semelhante ao evidenciado em outros estudos utilizando roedores submetidos à injeção de venenos obtidos de diferentes espécies do gênero *Bothrops*. Trebien e Calixto, (1989) observaram que a injeção do veneno da *Bothrops jararaca* na pata de ratos na concentração de 10  $\mu\text{g/pata}$  induz uma rápida e sustentada resposta edematogênica com pico observado 0,5 h estável até 4 h após a injeção do veneno. Mais recentemente Nascimento et al. (2010), demonstraram que a injeção do veneno da *Bothrops moojeni* na pata de camundongos na concentração de 6  $\mu\text{g/pata}$  apresenta comportamento semelhante ao edema ainda presente 24 h após a injeção

do veneno. Desta forma, a concentração de 8 µg/pata foi adotada para a realização dos demais experimentos.

O edema induzido pelo VBjsu foi comparado àquele resultante da injeção de carragenina, utilizando a dexametasona como controle para avaliar o envolvimento de componentes da resposta inflamatória em ambas condições experimentais. A injeção de carragenina conduziu a uma resposta edematogênica de origem inflamatória, um pressuposto corroborado pela anulação quase completa da sua capacidade de induzir o edema na presença de dexametasona. Em contraste, a proteção parcial promovida pela dexametasona sobre o edema induzido pelo VBjsu sugere que os mediadores ou células inflamatórias são parcialmente responsáveis pelos efeitos patológicos locais induzido pelo envenenamento botrópico. No trabalho publicado por Patrão-Neto et al. (2013), os autores concluem que a inflamação parece desempenhar um papel importante no dano muscular local induzido pelos venenos das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca*, uma vez que o uso da dexametasona protegeu o tecido muscular do efeito miotóxico desses venenos. Levando esses achados em consideração, propõe-se que o efeito local dos venenos botrópicos pode ser resultante da soma da ação direta de componentes do veneno causando danos aos tecidos como descrito por Queiróz et al., (2002) junto a uma ação patológica indireta produzida a partir da interação com componentes da resposta imune que uma vez estimulados contribuem para amplificação do dano tecidual (MOREIRA et al., 2009; ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011).

Considerando que parte da resposta edematogênica induzida pelo VBjsu ocorreu de maneira dependente da participação de componentes da resposta inflamatória, foi realizada a modulação farmacológica de várias vias e/ou células do sistema imunológico numa tentativa de caracterizar como este veneno sinaliza para produzir os seus efeitos deletérios locais. Como visto, anteriormente, venenos de serpentes podem agir diferencialmente de acordo com a composição química do veneno e até a espécie estudada (TREBIEN; CALIXTO, 1989; GONÇALVES; MARIANO, 2000; ARAÚJO et al., 2000; BARBOSA et al., 2003).

O aumento da permeabilidade vascular consequente a um estímulo inflamatório é o principal mecanismo para a formação de edema, sendo este fenômeno depende da produção e/ou liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão (RYAN, 1977). Esta resposta inflamatória pode ser iniciada rapidamente pelos mastócitos. Estas células uma vez

ativadas, degranulam liberando histamina e outros mediadores. Quase simultaneamente, a estimulação das fibras aferentes sensoriais, principalmente as fibras C, conduz à libertação de taquicininas, tais como a substância P, que interage com mastócitos, estimulando a libertação de mais histamina. A substância P e a histamina podem agir sobre os vasos sanguíneos locais induzindo uma vasodilatação importante para a formação do edema e manutenção da resposta inflamatória (SOTER; AUSTEN, 1976; SUZUKI et al., 1999; LI et al., 2012). No entanto, no presente estudo, os animais pré-tratados com o antagonista do receptor H<sub>1</sub> (loratadina), ou submetidos à depleção dos mastócitos utilizando o composto 48/80 ou mesmo a dessensibilização das fibras C, mediante o uso repetido de altas doses de capsaicina, não afetaram a formação do edema e a migração de neutrófilos para o local da lesão induzidos pelo VBjsu. Tais achados permitem afirmar que histamina, mastócitos ou as fibras C aferentes desempenham um papel menor no mecanismo fisiopatológico induzido pelo VBjsu. As razões para apoiar tal hipótese são discutidas adiante.

Os mastócitos são os principais reservatórios de histamina no organismo. Estas células sintetizam e armazenam histamina em grânulos secretórios. Contudo a taxa de renovação da histamina nestes grânulos é muito lenta e, por isso, após a degranulação dos mastócitos, semanas podem ser necessárias até que as concentrações do autacóide retornem aos níveis normais (ALBRECHT; STEPHENSON, 1988). Experimentalmente, o composto 48/80 é usado para promover o esgotamento das reservas de histamina dos mastócitos (SMITH, 1953; GURGEL, 2013). Entretanto, mesmo em animais submetidos à depleção mastocitária, o edema de pata e o infiltrado neutrofílico induzidos pelo VBjsu persistiram, o que sugere que a histamina e os mastócitos não tem um papel preponderante no desenvolvimento no edema e na migração de neutrófilos induzidos pelo VBjsu.

Resultados semelhantes foram encontrados para o veneno da *Bothrops jararaca*, de acordo com Gonçalves e Mariano, (2000) o pré-tratamento com fármacos antagonistas de receptores H<sub>1</sub>, meperamida e prometazina, não interferiram na resposta edematogênica induzida pela injeção de 5 µg do veneno da *Bothrops jararaca* na pata de ratos. Contudo a participação da histamina, e dos mastócitos é relevante para o mecanismo fisiopatológico observado no edema resultante da injeção da bothropstoxinas I e II isoladas do veneno da *Bothrops jararacussu*. Neste trabalho os autores observaram que o pré-tratamento com ciproheptadina (antagonista de receptores H<sub>1</sub> e 5HT<sub>3</sub>) inibiu a formação de edema em ratos (LANDUCCI et al., 1998).

Em outras espécies do gênero *Bothrops*, incluindo a *Bothrops lanceolatos*, *Bothrops insularis* e *Bothrops moojeni* (de FARIA et al., 2001; BARBOSA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2010), a modulação farmacológica utilizando antagonistas para os receptores de histamina como a mepiramina (antagonista H<sub>1</sub>), prometazina (antagonista H<sub>1</sub>), cimetidina (antagonista H<sub>2</sub>), tioperamida (antagonista H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub>), ou a utilização da ciproheptadina (antagonista de receptores H<sub>1</sub> e 5HT<sub>2</sub>) foram eficientes. Contrastando com os nossos resultados, Nascimento et al. (2010) demonstraram que a depleção de mastócitos induzida pelo 48/80 ou a utilização de um fármaco capaz de estabilizar a membrana desta célula impedindo dessa forma a degranulação mastocitária (cromoglicato) são eficazes em combater a resposta edematogênica resultante da injeção do veneno da *Bothrops moojeni* na pata de camundongos.

As fibras sensoriais primárias sensíveis à capsaicina são extremamente importantes na participação neurogênica do processo inflamatório. Esses neurônios consistem em aferentes finos (fibras C e A $\delta$ ) com receptores específicos em suas terminações periféricas que são facilmente sensibilizados por mediadores químicos, produzidos durante a resposta inflamatória (HOLZER, 1998). A fim de investigar o papel dos neuropeptídeos oriundos das fibras sensoriais na resposta inflamatória relacionada ao VBjsu, um grupo de animais foi tratado com doses elevadas de capsaicina suficientes para induzir a desnervação das fibras sensoriais aferentes do tipo C (JANCSÓ et al., 1967; GURGEL, 2013). No entanto, a formação do edema e a migração de neutrófilos persistiu em camundongos dessensibilizados submetidos à injeção do VBjsu. De forma semelhante, Gonçalves e Mariano (2000) mostraram que o edema induzido pelo veneno da *Bothrops jararaca* não foi afetado em ratos pré-tratados com guanetidina, capsaicina ou mesmo submetidos a uma secção cirúrgica dos nervos ciático e safeno. Entretanto, curiosamente neste mesmo trabalho os autores observaram que a resposta edematogênica induzida por este veneno era dependente de receptores opióides uma vez que foi debelada pelo pré-tratamento com morfina (GONÇALVES E MARIANO, 2000). Tal mecanismo pode representar uma importante via para a realização de novos estudos.

Após uma lesão tecidual, diversos mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas e eicosanóides são produzidos, na circulação ou em estreita proximidade com o local da lesão, por células endoteliais e células residentes, principalmente mastócitos, macrófagos e células dendríticas. Esses mediadores são

substâncias chave que orquestram uma sequência de eventos pró-inflamatórios em resposta à lesão inicial (TEIXEIRA et al., 2009).

A participação das citocinas no processo inflamatório induzido por venenos já foi demonstrada anteriormente em serpentes do gênero *Bothrops*. Petricevich et al. (2000) observaram aumento nos níveis séricos de várias citocinas em camundongos submetidos a injeção, por via intraperitoneal, da dose letal média (DL50) do veneno da *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca*. Apesar das diferenças observadas no decorrer do tempo, na produção e nos níveis de citocinas no soro, ambos os venenos induzem proeminentes elevações nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  (PETRICEVICH et al., 2000 ).

No presente estudo, a injeção do VBjsu no tecido da pata de camundongos aumentou os níveis locais de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , aferidos 4,5 horas após o estímulo. Curiosamente, o pré-tratamento com o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , infliximabe, não inibiu a formação de edema ou a migração de neutrófilos para os tecidos. Estes resultados estão de acordo com os achados de Chaves et al. (2005) que constataram que o pré-tratamento de camundongos com pentoxifilina, um inibidor de citocinas, ou com anticorpos anti-TNF- $\alpha$  , IL-1 $\beta$  ou IL-6 não modificam a extensão do edema local, hemorragia, dermonecrose ou mesmo a mionecrose induzida pelo veneno da *Bothrops asper*. Além disso, camundongos submetidos à deleção dos genes responsáveis pela expressão dos receptores para TNF- $\alpha$  (TNFR1 e TNFR2), IL-1 $\beta$  e IL-6, não mostrou qualquer diferença quando comparados aos camundongos selvagens em sua susceptibilidade à hemorragia e edema induzidos por uma metaloproteinase isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, curiosamente a necrose dérmica foi abolida em camundongos deficientes em receptores TNFR1 e TNFR2, e nos camundongos deficientes para IL-6 (LAING et al., 2003). Portanto, o papel destas citocinas nos eventos patológicos induzidos por venenos botrópicos pode não estar relacionado com os eventos imunológicos iniciais. No entanto, várias citocinas, histamina e outros mediadores possuem grande relevância no processo inflamatório agudo estimulando a produção de eicosanóides (HERRMANN et al., 1990; RISTIMÄKI et al., 1994; JUAN; SAMETZ, 1980), que estão envolvidos contribuindo para o aumento da permeabilidade, formação de edema e migração de neutrófilos (ISSEKUTZ et al., 1981; MOVAT et al., 1987).

O ácido araquidônico é um precursor endógeno comum para a biossíntese de eicosanóides, sendo rapidamente convertido por ciclooxigenases ou lipoxigenases em vários

mediadores lipídicos com potente atividade biológica, as prostaglandinas e os leucotrienos, respectivamente (FREIRE; DYKE, 2000). Os eicosanóides derivados da atividade das ciclooxigenases (COXs), como as prostaglandinas, estão aumentados em locais de inflamação e contribuem para as manifestações da resposta imune, como a formação de edema e infiltração de células inflamatórias durante a inflamação aguda (SCHUMERT et al., 1988;. LONE; TASKEN, 2013).

Na resposta inflamatória local induzida por venenos botrópicos os eicosanóides participam como elemento chave do mecanismo fisiopatológico associado à *Bothrops jararaca*, *Bothrops lanceolatus*, *Bothrops insularis*, *Bothrops asper* e *Bothrops moojeni* (TREBIEN; CALIXTO, 1989; de FARIA et al., 2001; BARBOSA et al., 2003; OLIVO et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2010). Em consonância a esses estudos, nossos resultados indicaram o envolvimento de prostaglandinas na resposta inflamatória relacionada ao VBjsu, uma vez que, a imunexpressão da COX-2 encontrava-se aumentada nas células endoteliais, neutrófilos, e no tecido conjuntivo da pata dos camundongos. Além disso, o papel das prostaglandinas nos danos teciduais induzidos pelo VBjsu foi confirmada pela modulação farmacológica da atividade da COX, com a indometacina, um inibidor não seletivo da COX ou com o celecoxibe, um inibidor específico para a COX-2, que reduziram a migração de neutrófilos e a formação do edema.

Nossos resultados estão de acordo com Olivo et al. (2007) que examinaram o possível papel da ciclooxigenase (COX) na gênese do edema de pata induzido pelo veneno da *Bothrops jararaca* e *Bothrops asper* em camundongo. Nesse estudo, os venenos induziram um rápido aumento nos níveis de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e na expressão de COX-1 e COX-2 nos tecidos da pata observado 1 h após a injeção dos venenos (OLIVO et al., 2007), sendo que apenas em relação ao veneno da *Bothrops jararaca* o pico da formação do edema e a liberação de PGE<sub>2</sub> estão correlacionados a expressão aumentada da COX-2 nos tecidos. Moreira et al. (2009) avaliaram a capacidade do veneno da *Bothrops asper* em aumentar a produção de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>) *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, observaram que o veneno da *Bothrops asper* aumentou a síntese de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>, em conjunto com uma maior expressão da COX-2 em camundongos. A incubação de macrófagos e neutrófilos isolados com uma concentração sub-citotóxica do veneno da *Bothrops asper* resultou no aumento da produção de PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> por macrófagos e PGE<sub>2</sub> por neutrófilos, concomitantemente a um incremento na expressão da COX-2, em ambas as

células *in vitro*. Estes resultados sugerem que os produtos da atividade da COX são primordiais para o desencadeamento da resposta inflamatória induzida por venenos botrópicos. Uma vez que, contribuem para a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, formação de edema e consequente migração de neutrófilos.

A participação de células procedentes da circulação sanguínea em processos inflamatórios locais é dependente da atração, também denominada quimiotaxia. Na resposta imune inata, os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo, devido sua capacidade de migrar rapidamente em direção a fatores quimiotáticos liberados durante a resposta inflamatória local, incluindo fatores quimioatraentes endógenos, como por exemplo, o leucotrieno B4 e a IL-8, e fatores exógenos, tais como o Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP) derivado da parede bacteriana (LUSTER et al., 2005; SADIK et al., 2011).

O recrutamento de neutrófilos requer inicialmente rolamento e a aderência dessas células à superfície luminal do endotélio vascular. O rolamento é mediado pela interação de baixa afinidade entre a L-selectina ou a Sialyl Lewis X presentes na superfície da membrana dos neutrófilos com a E-selectina e outros glicoligantes do endotélio vascular. A adesão firme, por sua vez, é mediada pela interação com integrinas e moléculas de adesão celular, que por sua vez, conduzem a alterações na morfologia dos neutrófilos que passa a apresentar um perfil celular ativado o qual permite que essa célula possa transmigrar através das barreiras endoteliais e extravasar para os tecidos (WILLIAMS et al., 2011).

No presente estudo, o pré-tratamento dos animais com fucoïdina, um modulador de P-e L-selectinas, reduziu a formação do edema induzido pelo VBjsu já nas fases iniciais. Estes resultados estão de acordo com os achados de Mora et al. (2008) que demonstram o efeito protetor da fucoïdina frente à resposta inflamatória induzida pela injeção do veneno da *Bothrops asper* em camundongos. Além disso, o exame histopatológico mostrou que o VBjsu causou uma precoce infiltração de neutrófilos, observada 0,5 e 1,5 h após o estímulo, como também relatado para injeção do veneno da *Bothrops lanceolatus* em ratos (GUIMARÃES et al, 2004.). Estes resultados apoiam a hipótese de que os neutrófilos desempenham um papel chave no desenvolvimento do dano tecidual induzido pelo VBjsu, já nas fases iniciais do processo. Neste ponto, a questão era se a quimiotaxia dos neutrófilos para o local do dano seria resultante do efeito biológico direto ou indireto do veneno da *Bothrops jararacussu* (VBjsu).



Para testar a hipótese de que a precoce infiltração de neutrófilos nos tecidos se deve em parte ao efeito quimiotático direto do VBjsu sobre essas células, realizou-se o ensaio de quimiotaxia *in vitro* na câmara de Boyden utilizando neutrófilos humanos. Os nossos resultados mostraram que VBjsu induz a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, modulando a migração dessas células através de um mecanismo direto. Corroborando com estes resultados, de Castro et al. (2000) demonstraram que a injeção intraperitoneal de bothropstoxinas I e II isoladas do veneno da *Bothrops jararacussu*, principalmente a bothropstoxina II induz a migração de leucócitos para a cavidade através de um mecanismo independente da atividade de mastócitos e da atividade enzimática, uma vez que, o pré-tratamento com o *p*-bromofenacil bromide (um inibidor de PLA) e a depleção de mastócitos com o composto 48/80 não interferiu nos resultados.

A migração de neutrófilos é dependente de um estímulo inicial capaz de desencadear a ativação dos neutrófilos promovendo mudanças conformacionais que possibilitem a movimentação dessas células em favor de um gradiente de concentração (SALMON; AHLUWALIA, 2011). Esta e outras funções dos neutrófilos dependem de uma complexa sinalização celular envolvendo o cálcio. Logo o aumento intracelular dos níveis desse íon nos neutrófilos é considerado uma marca registrada da ativação dessas células (DESAULNIERS et al., 2006; DEITCH et al., 2006; MAIL et al., 2011). Neste trabalho foi demonstrado que neutrófilos *naive* incubados com o VBjsu prontamente respondem mostrando um fenótipo morfológicamente ativado associado a um aumento gradual no influxo de cálcio para dentro da célula.

Os venenos são fontes naturais de compostos bioativos capazes de modular a função de canais iônicos das células excitáveis incluindo canais de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  e  $Ca^{2+}$  (MOUHAT, 2004). O aumento do influxo de cálcio induzido pelo VBjsu, numa concentração sem atividade citotóxica, curiosamente manifestou-se de maneira lenta e crescente contrastando com a resposta produzida pelo fMLP e IL-8. Este padrão particular de resposta poderia ser explicado através de duas possíveis hipóteses, uma vez que, componentes do veneno podem se ligar a receptores acoplados a proteína Gq presente na membrana dos neutrófilos e desencadear uma sinalização intracelular complexa capaz de regular a entrada de cálcio através de Canais Regulados por Estoque (SOCs), ou estas substâncias poderiam atuar como agonistas parciais dos receptores de cálcio ligante dependentes como o TRPC3. Tais hipóteses poderiam ser investigadas utilizando

ferramentas farmacológicas como a toxina pertusis (inibidor da proteína G), ou a *n*-propargil-nifedipina (inibidor específico dos SOCs)

No trabalho publicado por Elifio-Esposito et al. (2011) foi demonstrado que uma lectina purificada a partir do veneno da *Bothrops jararacussu* pode reconhecer glicoligantes presentes na superfície dos neutrófilos e promover a polarização e a migração de neutrófilos *in vitro*. Possivelmente, as lectinas presentes no VBjsu bruto podem ser responsáveis por esses efeitos sobre os neutrófilos. No presente estudo, foi demonstrado que tal fenômeno pode contribuir para a lesão do tecido relacionada com o VBjsu *in vivo*, uma vez que a inibição da migração de neutrófilos impediu parte significativa dos efeitos deletérios associados ao veneno da *Bothrops jararacussu*.

Portanto, estes resultados sugerem que a ação deletéria do veneno da *Bothrops jararacussu* pode não ser exclusivamente relacionada ao dano tecidual direto provocado pela ação do veneno, mas ser resultado de uma interação biológica com componentes da resposta imune que conjuntamente contribuem para a formação e amplificação da lesão local, abrindo perspectivas para futuras investigações na busca de novos alvos terapêuticos e/ou terapias complementares.

*Conclusão*

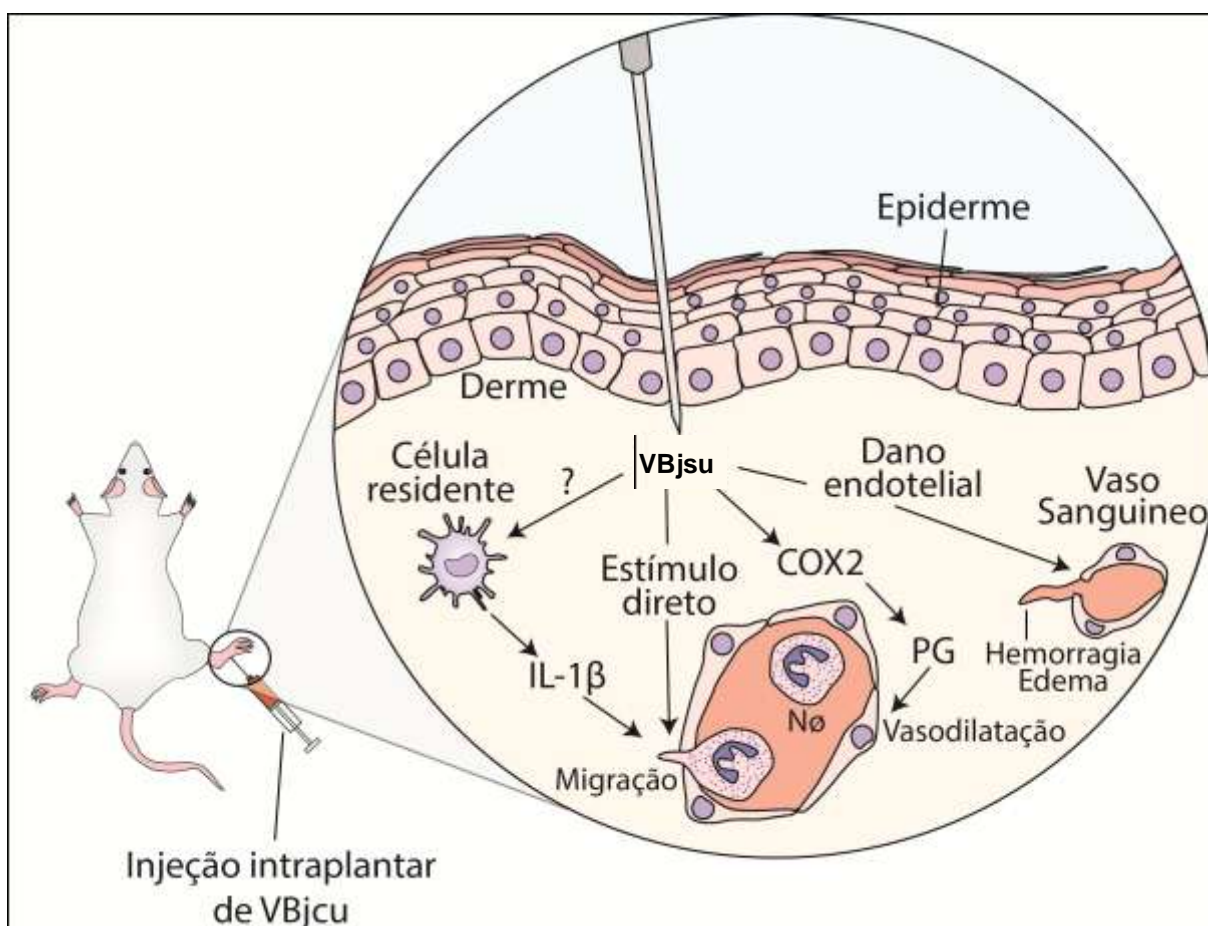
---

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o veneno da *Bothrops jararacussu* induz uma resposta edematogênica precoce, tempo e concentração dependentes. Tais efeitos estão relacionados à produção local de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e a expressão da COX-2, seguindo da síntese de prostanóides e quimiotaxia direta sobre neutrófilos. Conforme demonstrado na figura 13, a qual representa o modelo hipotético do estabelecimento da lesão tecidual.

## MODELO HIPOTÉTICO

**Figura 13.** Papel dos prostanóides e dos neutrófilos na resposta inflamatória induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararacussu* (modelo hipotético).



O veneno da *Bothrops jararacussu* induz uma resposta edematogênica precoce, que é dependente da produção de prostanóides e da migração de neutrófilos. Estes efeitos parecem ser mediados por um aumento da produção local de IL-1 $\beta$ , expressão aumentada de COX-2 e do efeito quimiotático direto do veneno sobre os neutrófilos. (Fonte: ABNER, 2014).

## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. R.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citocinas. In: ABBAS, A. R.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**, 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 267-303 p.

ALBRECHT, W. N.; STEPHENSON, R. L. Health hazards of tertiary amine catalysts. **Scand J Work Environ Health**. v. 14, p. 209-219. 1988.

ALLER, M. A., et al. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, p. 225-234, 2006.

ALVES, R. M., et al. Evidence of caspase mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. a Mol. Integr.**

AMARAL, C. F. S., et al. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. Jararacussu* snake bite. **Toxicon**, 23, 877-885, 1985.

ARAÚJO, A. L., et al. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, v. 38, p. 209–221, 2000.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**.1.ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 6-12 p.

ARCOLINI, T. **Guia de animais brasileiros: Répteis e Peixes de água doce**. 2. ed. São Paulo, 2006. 22-30 p.

BARBOSA, A. M., et al. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515–523, 2003.

BÉRNILS, R. S. Brazilian reptiles - List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2010. Disponível em: <http://www.sbherpetologia.org.br>. Acesso em: 25 de maio de 2014.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618–622, 1982.

BRANDEBURGO, M. I. H., et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

BRASIL. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, p. 816, 2005.

BURGOS, R. A., Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. **Vet. Immu. Immunopath.** v. 143, n. 2, p. 1–10, 2011.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Western emispher. **Comst. Pub. Assoc.**, v. 2, 2004.

CAMPOS, A. C. A serpente *Bothrops jararacussu*. Disponível em: <http://biologocalouro.tumblr.com/post/31641988895/jararacu-u>. Acesso em: 25 de maio de 2014.

CAMPOS, L. B. et al. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 1–10, 2013.

CARDOSO, J. L. C. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quart. J. Med.**, v. 86, p. 315-325, 1993.

CHANG, J.; MUSSER, J. H.; GREGOS, M. C. H. Phospholipase A2 function and pharmacological regulation. **Biochem. FÁrmaco**, v. 36, p. 2429-2436, 1987.

CHAVES, F., et al. Intramuscular administration of antivenoms in experimental envenomation by *Bothrops asper*: comparison between Fab and IgG. **Toxicon** , v. 41, p. 237–244, 2003.



CHAVES, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p. 171–178, 2005.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin WHO**, v. 76, p. 515–524, 1998.

CINTRA, A. C, et al., Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J. Protein. Chem.** v. 12, n. 1, p. 57-64, 1993.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V. I.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 44-79 p.

da SILVA, N. M. V., et al. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon** v. 50, p. 196–205, 2007.

de CASTRO, R. C., et al. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A<sub>2</sub> into the rat pleural cavity. **Toxicon**. v. 38 n. 12, p. 1773-1785, 2000.

de FARIA, L., et al., Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* ( Fer de lance ) venom. **Toxicon**, v. 39, p. 825–830, 2001.

DEITCH, E. A., et al. Neutrophil activation is modulated by sex hormones after trauma-hemorrhagic shock and burn injuries. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, p. 1456–1465, 2006.

DESAULNIERS, P., et al. Characterization of an activation factor released from human neutrophils after stimulation by triclinic monosodium urate crystals **J Rheumatol**. 33, 928-938, 2006.

EL-DIN, H.: OMAR, M. The biological and medical significance of poisonous animal. **J Biol Earth Sci** v. 3, p. 25-41, 2013.

ELIFIO-ESPOSITO, S., et al. Human neutrophil migration and activation by BJcuL , a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunol.** v. 12, p. 1-7, 2011.

ESCARSO, S. H. A. et al. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie.** v. 82, p. 755-763, 2000.

FLETCHER, J. I. et al. OPINION: ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature Rev. Can.** v. 10, p. 147-156, 2010.

GIOTTO, M. T. S, et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue. **Proteins.** v. 30, n. 4, p. 442-454, 1998.

GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators Inflamm.** v. 9, p. 101–107, 2000.

GUIMARÃES, A. Q., et al., Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm. Res.** v. 53, p. 284–291, 2004.

GURGEL, J. A., et al. Amitriptyline, clomipramine, and maprotiline attenuate the inflammatory response by inhibiting neutrophil migration and mast cell degranulation. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 35, p. 387-389, 2013.

GUTIBRREZ, J. M., et al. Comparative study of the edema-forming activity of costa rican snake venoms and Its neutralization by a polyvalent antivenom. **Camp. Biochem. Physiol.** 85, p. 171-175, 1986.

GUTIERREZ, J. M., et al. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Mol. Pathol.** v. 55, n. 3, p. 217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M., et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223–1235, 2010.

HAVT, A.; FONTELES, M. C. H.; MONTEIRO, S. A. The renal effects of *Bothrops jararacussu* venom and the role of PLA<sub>2</sub> and PAF blockers. **Toxicon**. v. 39, P. 1841–1846, 2001.

HERRMANN, F., et al. Cytokine-stimulation of prostaglandin synthesis from endogenous and exogenous arachidonic acids in polymorphonuclear leukocytes involving activation and new synthesis of cyclooxygenase. **Eur J Immunol**. v. 20, p. 2513-2516, 1990.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **Gen Pharmacol**. v. 36, p. 5-11, 1998.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**. v. 26, n. 7, p. 615-627, 1988.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem**. v. 29, p. 1349–1353, 1981.

HUANG, W., et al. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca<sup>2+</sup>-dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. **Gut**, v. 53, p. 1–12, 2013.

ISSEKUTZ, A. C. Vascular responses during acute neutrophilic inflammation. Their relationship to in vivo neutrophil emigration. **Lab Invest**. v. 45, p. 435-441, 1981.

ITAKURA, A., et al. p21-Activated kinase (PAK) regulates cytoskeletal reorganization and directional migration in human neutrophils. **PLoS One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

JANCSÓ, N.; JANCZO-GABOR, A.; SZOLCSANYI, J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. **Br. J. Pharmac. Chemother**. v. 31, p. 138-151, 1967.

JUAN, H.; SAMETZ, W. Histamine-induced release of arachidonic acid and of prostaglandins in the peripheral vascular bed: mode of action. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 314, p. 183-90, 1980.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. **Toxicon**, v. 27, p. 955-963, 1989.

KASHIMA, S., et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie**. v. 86, n. 3, p. 211-219, 2004.

KASTURIRATNE, A., et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.**, v. 5, p. 1591-1604, 2008.

KETELHUT, D. F. J. et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 85, p. 983-991, 2003.

LAINING, G. D., et al. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol.** v. 33, p. 3458–3463, 2003.

LANDUCCI, E. C., et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur J Pharmacol.**, v. 343, n. 3, p. 257-263, 1998.

LEITE, L. C. C. et al. Characterization of the snake venoms from seven brazilian species of *Bothrops* by FPLC Anion-exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 102B, n. 3, p. 515-520, 1992.

LEITE, L. C. C., et al. Characterization of the snake venoms from seven brazilian species of bothrops by FPLC anion-exchange chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102, p. 515-520, 1992.

LI, W., et al. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. **Anesthesiol.** 116, 892–895, 2012.

LONE, A. M.; TASKÉN, K.. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. **Front. Immunol.** v. 4, p. 1–15, 2013.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; ANDRIAN, U. H. V. Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. **Natu. Immunol.** v. 6, p. 1182–1190, 2005.

MAIL, L. P., et al. Sulfhydryl Modification Induces Calcium Entry through IP<sub>3</sub>-Sensitive Store-Operated Pathway in Activation-Dependent Human Neutrophils. **PLoS ONE**, v. 6, p. e25262, 2011.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1.ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 33-61 p.

MELO, M. L. et al. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother. Pharmacol.** v. 61, p. 775–784, 2008.

MELO, M. M. et al. Envenenamento Botrópico,. In: ARAÚJO R. B.; OLIVEIRA M. M. V.; NUNES I. J. **Serpentes Venenosas**. Cad. Téc. Vet. Zootec. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004, 59-79 p.

MELO, P. A., et al. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothrospoxin by polyanions. **Toxicon.**, v. 31, n. 3, p. 285-291, 1993.

MELO, P. A.; Kurtz, G. S. Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. **Toxicon**, v. 26, n. 1, p. 87-95, 1988.

MÉNDEZ, M. C. Envenenamento Botrópico. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças em Ruminantes e Equinos**. 2. ed. São Paulo: Varela Editora, 2001, 169-176 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes ofídicos: Guia de Vigilância Epidemiológica. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, caderno 14, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, normas e manuais técnicos, Brasília, ed. 6, 2005.

MINISTÉRIO SAÚDE. Acidentes Ofídicos. In: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7592->. Acesso em: 25 de maio de 2014

MOHAN, S., et al. Putative role of prostaglandin receptor in intracerebral hemorrhage. **Front. Neurol.**, v. 3, p. 1-17, 2012.

MORA, J., et al. Effects of *Bothrops asper* Snake Venom on Lymphatic Vessels : Insights into a Hidden Aspect of Envenomation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, p. e318, 2008.

MOREIRA, V., et al. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes in vivo, and by isolated neutrophils and macrophages in vitro. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 8, p. 107–114, 2009.

MOUHAT, S., et al. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. **Biochem. J.**, v. 378, p. 717–726, 2004.

MOVAT, H. Z. The role of histamine and other mediators in microvascular changes in acute inflammation. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 65, p. 451-457, 1987.

NASCIMENTO, G. N., et al. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon.** v. 55, p. 343–352, 2010.

NETO, J. P.; ARRUDA, R. P.; MADUREIR, E. H. Prostaglandinas. In: SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011. 230-244 p.

OLIVO, R. A. et al. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, p. 670–677, 2007..

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OIE. Snakebites. In: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/snakebites/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/). Acesso em: 25 de maio de 2014.

PANUNTOA, P. C. et al. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 47, p. 21-31, 2006.

PATRÃO-NETO, F. C., et al. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**. v. 69, p. 55–64, 2013.

PEREIRA, F. E. L. Inflamação. In: FILHO, G. B. **Bongliolo: Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 130-170 p.

PEREIRA, M. F., et al. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A2 activity. **J Protein Chem**. v. 17, n. 4, p. 381-386, 1998.

PEREZ, O. C. A., et al. Hemorrhagic and edema-forming activity and histologic changes in the mouse footpad induced by venoms from Argentinian *Bothrops* and *Crotalus* genuses. **Toxicon**. v. 36, n. 8 p. 1165-1172, 1998

PETRICEVICH, V. L., et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1253–1266, 2000.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

QUEIROZ, L. S, et al. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**. v. 22, n. 3, p. 339-346, 1984.

QUEIRÓZ, L. S., et al. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**. v. 40, p. 1483–1486, 2002.

RAW, I. et al. In: TU, A. T. T. **Antivenins in Brazil: preparation. Handbook of Natural Toxins**. New York: Marcel Dekker Inc. 1991, 557-581 p.

RINGLER, D. J. Inflamação e Reparo. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, 2000. 119-150 p.

RIOLI, V., et al. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. **FEBS J.** v. 275, n. 10, p. 2442-2454, 2008.

RISTIMÄKI, A., et al. Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. **J Biol Chem.** v. 269, p. 11769-11775, 1994.

RODRIGUES, V. M. et al. Pathological alterations induced by neuwiedi, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, n. 6, p. 471-479, 2001.

ROSENFELD, G. Symptomatology pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. **Venomous animals and their venoms.** New York: Academic Press, 1971, 345-384 p.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous Animals and their Venoms* (Edited by Bucherl W., Buckey E. and Deulofeu V.), **Academic Press, New York.** p. 345-348, 1971.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute Inflammation: A Review. **Amer. J. Pathol.** v. 86, p. 185-274, 1977.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol.** v. 32, p. 452-460, , 2011.

SAKURAI, Y., et al. Anticoagulant activity of M-LAO, L amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1649, p. 51-57, 2003.

SALMON, M. D., AHLUWALIA, J. Pharmacology of receptor operated calcium entry in human neutrophils. **Int. Immunopharmacol.** v. 11, n. 2, p. 145-148, 2010.

SCHUMERT, R.; TOWNER, J.; ZIPSER, R.D. Role of Eicosanoids in Human and Experimental Colitis. **Digest. Dis. Scien.** v. 33, p. 58-64, 1988.

SMITH, A. N. Release of histamine by the histamine liberator compound 48/80 in cats. **J. Physiol.** v. 121, p. 517-538, 1953.



SOTER, N. A.; AUSTEN, K. F. The diversity of mast cell-derived mediators: implications for acute, subacute, and chronic cutaneous inflammatory disorders. **J Invest Dermatol.** v. 67, p. 313-319, 1976.

SOUTO, F. O., et al. Quercetin Reduces Neutrophil Recruitment Induced by CXCL8, LTB<sub>4</sub>, and fMLP: Inhibition of Actin Polymerization and fMLP: Inhibition of Actin Polymerization. **J. Nat. Prod.** 74, 113–118, 2011.

SOUZA, F. A., et al. <sup>60</sup>Co gamma irradiation prevents *Bothrops jararacussu* venom neurotoxicity and myotoxicity in isolated mouse neuromuscular junction. **Toxicon.**, v. 40, n. 8, p. 1101-1106, 2002.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 224, p. 134–139, 1996.

SUZUKI, R., et al. Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance. **P. J Immunol**, v. 163, p. 2410-2415, 1999.

TEIXEIRA, C., et al. Toxicon Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 988–997, 2009.

TREBIEN, H. A., CALIXTO, J. B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. *Agents and Actions* v. 26, p. 292-300, 1989.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenan inflammation. **Fed Proc.**, v. 35, n. 13, p. 2447-2456, 1976.

WENINGER, W.; BIRO, M.; JAIN, R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. **Nature Rev. Immu.** v. 14, p. 232–246, 2014.

WILLIAMS, M. R., et al. Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium. **Trends Immunol.** v. 32, p. 461–469, 2011.

ZAMUNER, S. R., et al. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon.** v. 44, p. 259–271, 2004.

ZUG, G. R.; VITT, L. J; CALDWELL, J. P. Herpetology: Na introductory biology of amphibians and reptiles. **Academic Press**, ed. 2, 2000.

## ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARACIDO (TCLE)

### APÊNDICE A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**TÍTULO DA PESQUISA:** Mecanismos e mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararacuçu*.

**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:** Carlos Wagner de Souza Wanderley (Mestrando em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará) e Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Você está sendo convidado pelo pesquisador Carlos Wagner de Souza Wanderley, a participar como voluntário de uma pesquisa. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos dessa pesquisa sejam esclarecidos. Nós pesquisadores desse projeto estamos investigando o efeito *in vitro* do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* sobre a migração de neutrófilos (células presentes no sangue) durante a resposta inflamatória induzida por este agente, e para isso, gostaríamos de lhe convidar para participar desta pesquisa. O objetivo deste estudo é investigar os mecanismos das lesões associadas ao envenenamento induzido pela serpente *Bothrops jararacussu*. Participando, você estará contribuindo para os avanços na área da saúde e ajudando a descobrir fatores que influenciam no desenvolvimento das lesões induzidas pela picada dessa cobra. Caso deseje participar, será necessário que você assine este termo de consentimento e permita apenas a colheita de 3 ml de sangue, por profissional treinado, de uma veia do braço, isto não trará risco à sua vida, mas poderá ocasionar um leve desconforto e um pouco de dor no local da coleta devido à inserção da agulha. Ressaltamos que nenhum estudo será realizado em você paciente, mas somente em células. Além disso, será preenchido um formulário com informações como idade, data de nascimento, telefone, endereço, e histórico médico recente. Seu consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem prejuízo. Você não pagará e nem receberá qualquer valor em dinheiro pela participação neste estudo. Todos os seus dados referentes serão preservados, não aparecendo em qualquer momento na apresentação dos resultados ou síntese deste trabalho. Os dados obtidos e o sangue coletado serão utilizados somente para esta pesquisa, não sendo utilizado para nenhum outro fim. Os resultados da pesquisa gerados pelo trabalho serão disponibilizados ao participante e à comunidade. Você terá todas as informações que desejar sobre os resultados parciais da pesquisa através dos pesquisadores responsáveis pelo projeto: Carlos Wagner de Souza Wanderley (85-96607090) e Prof. Dr. Roberto Cesar Pereira Lima Junior (85-8612-2574/3366-8588). Os pesquisadores serão encontrados no endereço: Rua Coronel Nunes de Melo n° 1315, Bairro Rodolfo Teófilo 2° andar. Fortaleza-CE. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre sua participação na pesquisa entre em contato com o comitê de Ética em pesquisa da UFC- Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo fone: 3366-8344.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_ declara que é de livre e espontânea vontade que concorda com a participação na pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do voluntário	Data	Assinatura
--------------------	------	------------

Nome do pesquisador	Data	Assinatura
---------------------	------	------------

Nome da testemunha	Data	Assinatura
--------------------	------	------------

(se o voluntario não souber ler)

## ANEXO II – MANUSCRITO ACEITO PELA REVISTA TOXICON.

ELSEVIER

[Home](#)[Products](#)[User Resources](#)[About Us](#)[Support & Contact](#)[Elsevier Websites](#)[Search](#)[Advanced Product Search](#)[Author's Home](#) > Track your accepted article**TRACK YOUR ACCEPTED ARTICLE**Welcome! [Login](#) to get personalized options. New user? [Register](#) | [Why register?](#)

Your article's details and status are shown in the following table:

**Article status**

Article title:	Bothrops jararacussu SNAKE VENOM-INDUCES A LOCAL INFLAMMATORY RESPONSE IN A PROSTANOID- AND NEUTROPHIL-DEPENDENT MANNER
Reference:	TOXCON4893
Journal title:	Toxicon
Corresponding author:	Prof. Roberto CP Lima-Júnior
First author:	Dr. Carlos Wagner S Wanderley
Received at Editorial Office:	20 May 2014
Article revised:	29 Jul 2014
Article accepted for publication:	5 Aug 2014
Received at Elsevier:	5 Aug 2014
PDF offprint:	Yes
DOI information:	10.1016/j.toxicon.2014.08.001
Status comment:	Your article has been received at Elsevier.  You will receive a PDF file of your published article free of charge.  You will be alerted by e-mail once the expected dispatch date for your proofs is available.

[Track another article](#)

## ANEXO III – APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL – CEPA



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 66/2012, sobre o projeto intitulado: **"MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA TOXINA DA SERPENTE BOTHROPS JARARACUSSU EM CAMUNDONGOS"**, de responsabilidade do Prof. Roberto César Pereira Lima Júnior e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 28 de novembro de 2012.

Fortaleza, 16 de abril de 2013

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar  
Coordenadora da CEPA/DFF/FANED/UFC  
MAT. SIAPE 2166369