

MARLOS CORTEZ SAMPAIO

**ESTUDO DO COMPONENTE LEUCOCITÁRIO E DE MEDIADORES
QUIMIOTÁTICOS DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO
VENENO DE *Bothrops moojeni*. PARTICIPAÇÃO DE MASTÓCITOS E
DA HISTAMINA NO RECRUTAMENTO LEUCOCITÁRIO**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências (Imunologia).**

**São Paulo
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARLOS CORTEZ SAMPAIO

**ESTUDO DO COMPONENTE LEUCOCITÁRIO E DE MEDIADORES
QUIMIOTÁTICOS DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELO
VENENO DE *Bothrops moojeni*. PARTICIPAÇÃO DE MASTÓCITOS E
DA HISTAMINA NO RECRUTAMENTO LEUCOCITÁRIO**

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dra. Catarina F. P. Teixeira

**São Paulo
2009**

Trabalho realizado na Unidade de Inflamação do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“As dificuldades domadas são oportunidades conquistadas”

Winston Churchil

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha
irmã, pelo amor e pelo apoio incondicional, em
todos os momentos desta bela jornada.

Aos meus amados pais,

Wilson e Fátima, somente nós sabemos as dificuldades que passamos, que vocês passaram para que eu pudesse chegar onde cheguei e para poder realizar os meus sonhos. Algumas coisas sempre foram constantes em nossa vida: amor, união, apoio incondicional, determinação, superação. Pai, você diz que a educação de um filho começa 200 anos antes dele nascer e você tem razão! Você e a mãe me deram uma formação, uma profissão! Investiram e confiaram no meu potencial! Durante todos esses anos, enfrentamos muitas lutas e vencemos todas elas. Tenho muito orgulho ao dizer que vocês são meus heróis, meus ídolos. Os verdadeiros Mestres aqui são vocês! Como as palavras não conseguem dizer tudo o que quero, vou usar palavras simples, mas muito significativas: Amo muito vocês! Vocês são tudo para mim!

À minha irmã,

Mônica, maninha querida, jamais poderei esquecer o quanto você apoiou e incentivou as minhas decisões e escolhas na vida. Dedicar-se à ciência, em nosso País, exige um intenso investimento, principalmente por parte da família, e você sempre o fez, em todos os momentos. Em muitos momentos, você saiu dos bastidores e colocou a mão na massa para me ajudar. Sempre nos demos muito bem e, independente dos raros desentendimentos que tivemos, preciso que você saiba, maninha, que eu te amo e que me sinto a pessoa mais feliz do mundo por ter você como irmã.

Ao meu irmãozinho *Pitoco*,

não me esqueci de você! Obrigado pelas conversas ao telefone, pelas suas gargalhadas que me fizeram rir nos momentos de estresse. Obrigado por todo carinho e por todas as belas palavras já ditas. Você é único!

À toda a minha família, obrigado por tudo!

À minha orientadora,

Catarina Teixeira

Você me ensinou, com dedicação, muitas coisas como, por exemplo, descrever os resultados de um estudo, no entanto, você nunca me disse como é difícil encontrar as palavras corretas para expressar toda a gratidão que se pode ter por uma pessoa que muda completamente a nossa vida. Embora, ainda não tenham criado tais palavras, vou tentar encontrar aquelas mais adequadas.

Quando entrei no laboratório, não conhecia nada sobre venenos, inflamação ou mesmo o que seria fazer ciência. No decorrer dessa jornada, você me ensinou o quanto é maravilhoso e dinâmico o mundo da ciência. Mas, muito mais do que ensinar, você confiou e acreditou plenamente em mim. Vieram os desafios da vida, alguns dos quais achei que seria capaz de superar, no entanto, você acreditou em mim e me incentivou a superá-los com determinação e empenho. Hoje, não temo mais os desafios que virão, pois sei que sou capaz de enfrentá-los e sei que as pessoas esperam isso de mim.

Tenho muito orgulho de ser seu aluno. Você me ensinou a fazer ciência e a ter um olhar crítico, principalmente com os meus resultados. Essa visão crítica, fez-me enxergar a beleza e a importância contida neste mestrado. Você segurou na minha mão e me apoiou para dar o primeiro passo. Agora sinto que você está ansiosa para que eu dê os passos seguintes e posso lhe garantir que, se puder contar com o seu apoio, vou longe.

Obrigado por tudo o que você representa para mim!

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

Escrever os agradecimentos às pessoas que passaram em nossa vida é um momento muito especial e emocionante. Há muito venho pensando nesse tópico com a intenção de não esquecer ninguém. No entanto, de antemão, agradeço a todos àqueles que participaram direta ou indiretamente deste mestrado.

Agradeço a Deus pela força, pelas realizações alcançadas e pela oportunidade de revelar a ciência como ela é.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”
Louis Pasteur

À Dra. Cristina Maria Fernandes, colaboradora desse mestrado. Cris, quando entrei no laboratório, como seu estagiário, não tinha experiência alguma e você, com toda a sua paciência, me ensinou muitas coisas. Com você aprendi a ter determinação, senso crítico e humildade científica. Mas muito mais do que me ensinar ciência, você me mostrou o valor de uma grande amizade. Jamais poderei esquecer as palavras de apoio, os risos francos e sua constante preocupação comigo. Você é uma grande amiga e uma cientista brilhante! Vejo muito da Catarina em você! Obrigado por tudo.

Elbitcho, a ciência para você é o oxigênio das suas células. Seu entusiasmo é empolgante. Espero sempre mantermos essa parceria que começamos no mestrado. Além disso, você é um ótimo amigo, sempre preocupado e solícito. Obrigado por essa amizade verdadeira e desinteressada. Obrigado por sempre me fazer rir, inclusive de mim mesmo! Você é uma figura!

Liza, não poderia deixar de agradecer a você também. Obrigado pela bela amizade que cultivamos durante os últimos anos. Obrigado pelas risadas, que muitas vezes aliviaram o estresse e a irritação, obrigado pelas inúmeras “terapias de grupo” no laboratório (risos). Obrigado por compreender, sempre com bom humor, a necessidade de, algumas vezes, trabalharmos até tarde nos finais de semana. Acima de tudo, muito obrigado pela força na etapa final, em um momento crítico, desse mestrado!

Renata, obrigado por sua paciência ao me ensinar protocolos do laboratório e pela sua disposição em discutir os resultados. O convívio contigo é uma experiência maravilhosa. Obrigado por todo o seu apoio durante o mestrado, pela sua alegria contagiante, pelas ótimas

gargalhadas, sua preocupação constante comigo.

Eduardo (Du), muito obrigado por me ajudar na etapa final deste trabalho e por se preocupar com meus experimentos, como se eles fossem os seus. Você, mesmo recém-chegado ao nosso Laboratório, contribuiu muito no andamento desses experimentos. É muito empolgante ver você trabalhando com tanta energia e disposição, como se fossem 15 pessoas em uma só (risos). Isso é muito empolgante e nos motiva a buscar belos resultados. Além disso, em pouco tempo nos tornamos grandes amigos. Obrigado pelo ombro amigo em momentos difíceis, pelas palavras de conforto, pelos cafés em vários momentos do dia, pelas inúmeras risadas, pelo apoio, enfim, obrigado por tudo, meu amigo!

À Neide, obrigado por ser tão prestativa e por sempre estar pronta para ajudar nos meus experimentos. Obrigado por permitir colaborar em seu estudo de mestrado, foi muito produtivo e gratificante para mim. Espero que possamos trabalhar juntos durante seu doutorado. Obrigado por sempre nos fazer rir e pelas suas incríveis histórias de “Forrest Neide” (risos).

Sílvia, conviver com você no laboratório foi uma experiência maravilhosa. Adorava as conversas que tínhamos durante os nossos intervalos e sempre me diverti muito com a sua “memória de curto prazo” ou a falta dela (risos). Sinto saudade desse tempo.

Obrigado aos inseparáveis amigos Márcio e Sérgio. Devido ao enfoque do nosso estudo não tivemos muitas oportunidades de trabalhar juntos no mestrado, no entanto, não faltaram oportunidades para conversas muito produtivas e muitos risos. Tivemos um ótimo convívio, sempre me fazendo rir de suas piadas e das histórias “quase secretas” da sala do fluxo (risos).

À Vanessa e Polly, embora nosso contato não tenha sido constante, agradeço pelo convívio, pelos risos, pela diversão nos congressos que frequentamos.

À Marcela e Mari, também recém-chegadas ao laboratório. Não tivemos muitas oportunidades de trabalhar juntos. Eu estava correndo para finalizar o mestrado, mas mesmo assim, vocês me acompanharam em experimentos e ouviram o que eu tinha para ensinar. A presença de vocês no laboratório deixou o nosso dia-a-dia muito mais alegre. Obrigado pelos bons momentos que passamos juntos.

Jean, muito obrigado pelos bons momentos e pelos risos francos que você sempre trouxe para o nosso laboratório.

Fábio, muito obrigado por ir à bancada comigo no início do meu mestrado, por sua disposição constante em discutir e por sempre esclarecer minhas dúvidas.

Solange (Sol), sua amizade é muito preciosa para mim. Precisaria te agradecer por

muitas coisas, mas como não tenho tanto espaço assim, te agradeço, de modo especial, pelos ótimos momentos que passamos, por todas as músicas que dançamos e pelo apoio nos momentos difíceis e de estresse. Obrigado por me ensinar como manter a mente e o corpo em equilíbrio.

Olívia (Lí) e Sandrinha, minhas companheiras de dança, obrigado por estarem sempre por perto durante esse mestrado. A alegria que vocês emanam nos faz muito bem.

À Sueli, Marcelle e Vânia, obrigado pelo apoio e carinho, pelas palavras amigas e pelos risos.

À Ana Lu, como é bom ter você como amiga. Desde os tempos da faculdade, você sempre esteve ao meu lado. Obrigado por todo o apoio e por estar sempre disposta a me ouvir e oferecer um ombro amigo. É muito bom ter você como amiga. Gosto muito de você!

Vivian, obrigado por essa amizade tão enriquecedora. Obrigado pelos risos, pelas palavras de conforto e por se preocupar com o meu bem-estar. Obrigado por sempre me enviar e-mails de festas orientais e de festivais gastronômicos (risos)!

Dona Helena e Bruno, mesmo de longe, sei que sempre me apoiaram e incentivaram para seguir em frente. É muito bom saber que tem pessoas que acreditam e torcem por nós.

À Lia, minha “cumadi”, a Brenda e ao meu afilhado Vítor, obrigado por entenderem a minha ausência em alguns momentos e por sempre me fazerem rir.

À Camila Strumm e Profª Sônia Jancar (Imunologia) por abrir seu laboratório para mim e por possibilitar fotografar as minhas lâminas.

Aos meus professores da graduação em Ciências Biológicas (UNINOVE), por me incentivarem a fazer pesquisa e por buscar a pós-graduação, dentre eles, André Paulo (“Kiridão”), Armando Serra, João Carlos David e Adriana Pires. Adoro vocês!

À Dra. Eliana Faquim Mauro por ter sido muito paciente ao me ensinar como trabalhar com a linhagem de mastócitos em cultura, por estar sempre disponível para esclarecer minhas dúvidas, enfim, obrigado por abrir as portas e por contribuir com o meu estudo. Agradeço também às suas alunas Bruna, Renata e Sandriana por me receberem ao laboratório e me ajudarem com os experimentos.

Agradeço ao Dr. Francisco França, médico do Hospital Vital Brazil, pela sua paixão em discutir ciência, por estar sempre disposto a ajudar e a conversar, por nos tratar com todo o respeito e carinho, por nos colocar em contato com a clínica.

A Marcelo Ribeiro, pesquisador do Laboratório de Herpetologia, do Instituto Butantan pela disposição em esclarecer, constantemente, minhas dúvidas zoológicas.

Aos muitos amigos da Pós-graduação, pena que não vou conseguir citar todos mas

dentre eles estão a Lidiane, Karina, Mara, Iana, Ludmila, Tatiana, Débora, Laíra, Paulo Wolf, Renata, Matheus, Zé Alexandre, Pedro, Rafinha, Lucas, Luciana Vismari, Júlia e Maíra. Encontraremos-nos em breve, no doutorado.

À equipe da Biblioteca do Instituto Butantan, Lindalva, Vilma, Renata e Lúcia, muito obrigado pela ajuda na busca de informação, pelas conversas descompromissadas e pelos risos em momentos importantes.

Às funcionárias da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Delza Piruna Martins, Jacinta Carvalho, Maria Socorro Pereira e, em especial, ao Edilson Bernadino e à Renata Maria dos Santos, funcionários do COMUT, o meu muito obrigado. Como “aluguei” meus amigos do COMUT durante esse mestrado, né? Eu estava sempre solicitando artigos que não estavam disponíveis. Renata, amiga, espero que isso não mude no doutorado (risos). A ajuda de todos vocês foi muito significativa para essa dissertação!

Agradeço muito às bibliotecárias do ICB. À Ana Paula e Lany pela gentileza e dedicação ao me atender e esclarecer minhas dúvidas e à Maria José, da qual atrapelei com muitas dúvidas, ligações e com os prazos para a revisão e de entrega da dissertação. Obrigado pela revisão do trabalho, pela boa vontade e por sempre estar disponível para esclarecer minhas dúvidas, mesmo por telefone.

Agradeço a Rosana Duarte Prisco, estaticista do ICB, por ajudar na análise estatística de grande parte dos dados apresentados nessa dissertação, por fazer me apaixonar um pouco mais pela estatística e pelas conversas sempre muito agradáveis e divertidas enquanto analisava os meus dados.

À Márcia e Gilda (“Lindinha”), funcionárias da Divisão Cultural, do Instituto Butantan, obrigado pelo convívio tão agradável e pelas belas palavras sempre mencionadas. “Lindinha” você é incrível! Muito obrigado por tudo!

A todos os amigos e alunos do Laboratório de Farmacologia, dentre eles a Cláudia, Diana, Thalma, Bianca, Drica, Rafaela, Leonardo, Gustavo, Leandro e Simone. Obrigado pelo convívio e pela amizade.

Agradeço o convívio e o apoio dos pesquisadores do Laboratório de Farmacologia, do Instituto Butantan, Regina, Walquíria, Solange, Ana Leonor, Isaltino, Paulo, Fernando, Rosa, Norma, Lanfranco, Benê e Maria Cristina.

Aos atuais funcionários do Laboratório de Farmacologia, do Instituto Butantan, Maria Aparecida (Binha), Elisa, Eleonora, Andréia, Ana Luiza, Valquíria, Joana, Sônia, Antônio, Wilson e Jorge. Aos ex-funcionários Vilma, Cleo (“Florzinha”), Zelma e Valério, saudades de vocês. Agradeço também à Wanda (*in memoriam*), que nos acompanha de longe.

A todos vocês que ajudaram a manter o nosso laboratório e o biotério dentro das condições ideais de trabalho e tiraram essa preocupação dos alunos, que quase não têm tempo. Obrigado, também, pelos risos e pelo convívio sempre agradável.

Agradeço aos professores do meu exame de qualificação, Lourdes Isaac, Eliana Faquim e Carla Lima, pelo cuidado ao lerem meu trabalho, pelas críticas construtivas e pela discussão dos meus dados. À Carla, agradeço também por me fornecer o protocolo para a dosagem da KC, referente ao meu último experimento de mestrado.

Agradeço aos funcionários do Biotério Central, do Instituto Butantan, pelo fornecimento dos animais utilizados nesse estudo, em especial à Juliana e Sônia, por sempre me ajudarem em momentos críticos, à Nice e Ana Paula (*in memoriam*) por estarem sempre dispostas a me atenderem.

Agradeço à Maria Eni, Amarildo e Jotelma, funcionários do Departamento de Imunologia, do ICB. À Eni, secretária da graduação, obrigado pelas dicas e por torcer por mim; Amarildo, atual Secretário da Pós-graduação, agradeço por sempre esclarecer minhas dúvidas; Jotelma, atual Secretária do Departamento, jamais vou esquecer todo o apoio que você me deu quando estava prestando a prova de ingresso ao mestrado, mas principalmente, jamais esquecerei daquele e-mail que você me mandou após a entrevista do mestrado, dizendo que eu havia sido aprovado na seleção.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela exigência na formação crítica dos alunos e aos professores desse Programa, pelas excelentes aulas ministradas, por extrair o melhor de cada aluno e por sempre estarem disponíveis para discutir resultados e esclarecer as dúvidas dos alunos.

Agradeço aos *petits Swiss* que, involuntariamente, se doaram a este estudo. Com vocês aprendi muito mais do que ciência, aprendi o valor da vida! Aprendi que este é um bem inestimável!

"Conseguir um amigo é uma graça, mantê-lo é um dom e amá-lo é uma virtude."

- ✓ Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
pela concessão da Bolsa de Mestrado (processo 06/58333-1).

RESUMO

SAMPAIO, M. C. **Estudo do componente leucocitário e de mediadores quimiotáticos da reação inflamatória induzida pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Participação de mastócitos e da histamina no recrutamento leucocitário.** 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Este estudo teve por objetivos: *i*) caracterizar o influxo leucocitário induzido pela injeção intraperitoneal do veneno de *Bothrops moojeni* (VBm), em camundongos, no que se refere ao número, tipos celulares, cinética e relação dose-efeito; *ii*) avaliar os mecanismos envolvidos no influxo leucocitário induzido, quanto à participação de mastócitos e da histamina, analisando a contribuição dos receptores H₁, H₂ e H₄; *iii*) analisar liberação dos mediadores quimiotáticos TXA₂, LTB₄, MCP-1 e KC e *iv*) avaliar a ação do veneno quanto à capacidade de desgranular mastócitos *in vivo* e *in vitro*. Para tanto, foram usados camundongos Swiss machos (18-20 g). O influxo de leucócitos foi avaliado em lavados peritoneais após injeção do VBm (0,025 a 0,5 µg/g) ou solução fisiológica aprotínica (controle); o número de leucócitos circulantes foi avaliado no sangue periférico, após essas injeções. O número total dos leucócitos foi determinado em câmara de Neubauer, após diluição em líquido de Turk (1:20, v/v) e a contagem diferencial em esfregaços celulares corados com Giemsa, sob microscopia de luz. A concentração dos mediadores inflamatórios foi avaliada por ensaios imunoenzimáticos. A desgranulação de mastócitos *in vivo* foi determinada no tecido mesentérico corado por Giemsa e a desgranulação *in vitro* determinada pela dosagem da β-hexosaminidase, por ensaio colorimétrico, no sobrenadante de culturas de células PT18. Os resultados obtidos mostraram que o VBm causou influxo leucocitário para a cavidade peritoneal, entre a 3^a e a 24^a hora, com polimorfonucleares (PMN) entre a 3^a e 6^a hora e mononucleares (MN) até a 24^a hora, além de aumento de neutrófilos circulantes na 3^a hora. O pré-tratamento dos animais com cromoglicato, inibidor da desgranulação, aboliu o recrutamento de PMN e de MN, na 6^a hora. O tratamento com a difenidramina ou ranitidina ou tioperamida, antagonistas de receptores H₁, H₂ e H₄ da histamina, respectivamente, reduziu significativamente o recrutamento de PMN. Ainda, o veneno acarretou a liberação de TXA₂ (10 minuto a 1 hora), LTB₄ (6 hora), MCP-1 (1 a 3 hora) e de KC (10 minuto a 1 hora). Adicionalmente, o VBm causou a desgranulação dos mastócitos, aos 10 minutos e a liberação de PGD₂, dos 5 aos 30 minutos, de sua injeção. *In vitro*, o VBm causou aumento da liberação de β-hexosaminidase, significativo em relação ao controle. Em conclusão, o VBm induz uma

reação inflamatória aguda, com influxo de leucócitos PMN e MN para o local de sua injeção e aumento do número de neutrófilos circulantes. Esse efeito depende da histamina, via receptores H₁, H₂ e H₄ e da ativação e desgranulação de mastócitos, que decorre, em parte, da ação direta do veneno sobre essas células. A liberação de TXA₂, LTB₄, MCP-1 e a KC deve contribuir para o influxo de leucócitos causado pelo VBm.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*. **Inflamação. Leucócitos. Mastócitos. Histamina. Mediadores quimiotáticos.**

ABSTRACT

SAMPAIO, M. C. **Studies on the leukocyte component and chemotactic mediators of the inflammatory reaction induced by *Bothrops moojeni* venom. Participation of mast cells and histamine in leukocyte recruitment.** 2009. 115 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In this study the effects of *Bothrops moojeni* venom (BmV) on the cellular component of inflammatory responses and the mechanisms involved in this effect were investigated. The effects of venom on peritoneal and circulating leukocyte numbers and on the release of inflammatory mediators, such as LTB₄, TXA₂, PGD₂, MIP-1 and KC, were assessed. The role of both mast cells and histamine receptors in leukocyte recruitment induced by BmV was assessed by selected pharmacological treatments. BmV caused a marked infiltration of leukocytes (3-24 h) when injected into the peritoneal cavity of mice. Neutrophils (PMN) were the predominant cell type in the early stages of response whereas macrophages (MN) were accumulated from 3 up to 24 h. Moreover, BmV increased blood neutrophil numbers at 3 h after injection. The BmV-induced leukocyte influx was abrogated by cromoglicate and significantly reduced either by difenidramine or ranitidine or tioperamide, histamine H₁, H₂ and H₄ receptor antagonists, respectively, at 6 h after injection. Significant increments in peritoneal levels of LTB₄, TXA₂, PGD₂, MIP-1 and KC were detected at distinct periods of time after venom injection. In addition, BmV induced mast cell degranulation both in vivo and in vitro. In conclusion, obtained data demonstrated the ability of BmV induce leukocyte recruitment into the site of its injection. This effect is dependent on mast cell activation and degranulation, which may be due to a direct effect of venom on these cells, and is mediated at least in part by histamine via H₁, H₂ and H₄ receptors. Moreover, the ability of venom to mobilize leukocytes from bone marrow reserve compartments and to release the chemotactic mediators TXA₂, LTB₄, MCP-1 and KC may be relevant for leukocyte infiltration.

Key words: *Bothrops moojeni*. Inflammation. Leukocytes. Mast cells. Histamine. Chemotactic mediators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares na cavidade peritoneal de camundongos após injeção de diferentes concentrações de veneno de <i>B. moojeni</i>	49
Figura 2	Perfil temporal do recrutamento de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i> , na cavidade peritoneal de camundongos.....	51
Figura 3	Efeito do tratamento com o cromoglicato no influxo de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares coletados 6 ou 24 horas após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i> na cavidade peritoneal de camundongos...	56
Figura 4	Efeito do tratamento com a difenidramina no influxo de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i> na cavidade peritoneal de camundongos.....	58
Figura 5	Efeito do tratamento com a ranitidina no influxo de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i> na cavidade peritoneal de camundongos.....	60
Figura 6	Efeito do tratamento com a tioperamida no influxo de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i> na cavidade peritoneal de camundongos.....	62
Figura 7	Desgranulação de mastócitos mesentéricos induzido pelo veneno de <i>B. moojeni in vivo</i>	64
Figura 8	Fotomicrografia do tecido mesentérico evidenciando desgranulação de mastócitos induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	66
Figura 9	Liberação de PGD ₂ induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	67
Figura 10	Efeito do veneno de <i>B. moojeni</i> na viabilidade de mastócitos <i>in vitro</i>	68
Figura 11	Efeito da incubação do veneno de <i>B. moojeni</i> em mastócitos murinos da linhagem PT18.....	70
Figura 12	Liberação de TXB ₂ induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	71
Figura 13	Liberação de LTB ₄ induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	72
Figura 14	Liberação de KC induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	73
Figura 15	Liberação de MCP-1 induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito do VBm no número de leucócitos circulantes no sangue periférico...	53
-----------------	--	-----------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Considerações gerais sobre mediadores quimiotáticos.....	28
1.2 Considerações gerais sobre os mastócitos e a histamina.....	30
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Animais.....	37
3.2 Veneno.....	37
3.3 Injeção intraperitoneal do veneno de <i>Bothrops moojeni</i> (VBm) e obtenção de exsudato e de leucócitos peritoneais.....	37
3.4 Contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade peritoneal.....	38
3.5 Determinação do número de leucócitos circulantes.....	38
3.6 Tratamentos farmacológicos.....	38
3.7 Determinação da desgranulação de mastócitos peritoneais.....	39
3.8 Determinação da concentração de mediadores lipídicos por ensaio imunoenzimático (EIA).....	39
3.9 Determinação da concentração da quimiocina MCP-1.....	40
3.10 Determinação da concentração da quimiocina KC.....	41
3.11 Cultura de mastócitos murinos.....	41
3.11.1 Teste de viabilidade celular.....	42
3.11.2 Avaliação da desgranulação de mastócitos murinos <i>in vitro</i>.....	42
3.12.1 Análise Estatística.....	43
3.13 Soluções utilizadas.....	43
3.14 Drogas e reagentes.....	46
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Recrutamento leucocitário induzido por diferentes concentrações do veneno de <i>B. moojeni</i>.....	48

4.2	Decurso temporal do recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	50
4.3	Determinação do número de leucócitos circulantes após injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	52
4.4	Participação dos mastócitos no influxo leucocitário induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	54
4.5	Participação da histamina, via ativação dos receptores H ₁ , no recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	57
4.6	Participação da histamina, via ativação dos receptores H ₂ , no recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	59
4.7	Participação da histamina, via ativação dos receptores H ₄ , no recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	61
4.8	Efeito do VBM em mastócitos peritoneais <i>in vivo</i> : Indução da desgranulação	63
4.8.1	Análise histológica dos mastócitos mesentéricos após a injeção do veneno de <i>B. moojeni</i>	65
4.9	Liberação de PGD ₂ induzida pelo veneno de <i>Bothrops moojeni</i>	67
4.10	Efeito do veneno de <i>B. moojeni</i> na viabilidade de mastócitos murinos, em cultura.....	68
4.11	Liberação de β-hexosaminidase de mastócitos em cultura após incubação com o veneno de <i>B. moojeni</i>	69
4.12	Liberação de TXB ₂ induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	71
4.13	Liberação de LTB ₄ induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	72
4.14	Liberação de KC induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	73
4.15	Liberação de MCP-1 induzida pelo veneno de <i>B. moojeni</i>	74
5	DISCUSSÃO.....	75
6	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
	ANEXOS.....	112

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes causados por serpentes da Família Viperidae, do gênero *Bothrops*, são os mais numerosos e de maior importância epidemiológica no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2009). As serpentes desse gênero são encontradas em todo o território nacional e compreendem vinte e três espécies descritas (SILVA e RODRIGUES, 2008; BÉRNILS, 2009). Algumas espécies apresentam maior importância por sua extensa distribuição geográfica como, por exemplo, a *Bothrops atrox* na Amazônia, a *Bothrops erythromelas* no Nordeste, a *Bothrops jararaca* na região Sul e Sudeste e a *Bothrops moojeni* na região Centro-Oeste e Sudeste.

A serpente *Bothrops moojeni* é a principal serpente das áreas de mata ciliar das regiões central, norte e sudeste do Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2003). Esta espécie é responsável por cerca de 90 % dos acidentes ofídicos que ocorrem na região de São José do Rio Preto, ao noroeste do Estado de São Paulo (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1990; ROJAS *et al.*, 2007). A importância médica desta espécie de serpente cresceu, nos últimos anos, devido à sua capacidade de adaptar-se, com facilidade, a ambientes modificados, por seu comportamento agressivo e grande porte (MELGAREJO, 2003, 2009). Os relatos clínicos, dos acidentes causados pelas serpentes dessa espécie indicam o desenvolvimento rápido de uma reação inflamatória, expressiva, no local da picada, caracterizada por eritema, dor, de moderada a intensa, edema, podendo atingir até a raiz do membro afetado, além de tempo de coagulação prolongado (KOUYOUMDJIAN e KOUYOUMDJIAN, 1986; KOUYOUMDJIAN e POLIZELLI, 1988). Nos casos considerados moderados e graves, classificados de acordo com a extensão do edema, há relatos de complicações decorrentes do efeito local do veneno de *B. moojeni*, como, por exemplo, a necrose tecidual. Além disso, o número de complicações observadas nos acidentes com a *B. moojeni* foi maior do que aqueles causados pela serpente *B. jararaca* (KOUYOUMDJIAN e POLIZELLI, 1988; KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1990). Os estudos sobre as atividades biológicas do veneno de *B. moojeni*, em modelos experimentais, são escassos. No entanto, estão descritas as atividades miotóxica, coagulante, hemorrágica e neurotóxica do veneno de *B. moojeni* (ZAMUNER *et al.*, 2004; MAIORANO *et al.*, 2005).

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* induzem, de modo geral, um quadro fisiopatológico caracterizado por reações locais imediatas e efeitos sistêmicos. Os efeitos sistêmicos envolvem alterações da coagulação sanguínea e do sistema cardiovascular, levando ao choque hipovolêmico e à insuficiência renal aguda, em casos mais graves (AMARAL *et al.*, 1985). As reações locais são graves e caracterizadas por hemorragia, mionecrose e

inflamação acentuada, com edema proeminente e dor (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; TEIXEIRA *et al.*, 1994; CAMPBELL e LAMAR, 2004; FRANÇA e MÁLAQUE, 2009).

O tratamento utilizado em acidentes botrópicos é a soroterapia com antiveneno poliespecífico (CHIPPAUX e GOYFFON, 1998). Quando a administração do antiveneno é iniciada imediatamente após a picada, os efeitos sistêmicos do veneno botrópico são normalmente revertidos. No entanto, a neutralização dos efeitos locais é dificilmente obtida e, dependendo do grau de envenenamento, o efeito local pode evoluir para necrose, que pode acarretar a perda do membro afetado e a incapacitação do indivíduo picado (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981, 2007). Em decorrência deste fato, as ações locais, induzidas pelos venenos botrópicos, constituem um alvo importante de investigação.

Os venenos de serpentes são misturas complexas de substâncias não-protéicas e protéicas, com diferentes propriedades tóxicas, enzimáticas ou não-enzimáticas (BRAUD *et al.*, 2000). A partir da análise proteômica, inúmeras toxinas foram identificadas nos venenos de serpentes, como proteínas secretórias ricas em cisteína, lectinas, glutaminil-ciclases, disintegrinas, peptídios potencializadores de bradicinina e L-amino-oxidases, além das toxinas enzimáticas clássicas como as metaloproteases, fosfolipases A₂ e serinoproteases (FOX e SERRANO, 2008; GUTIERREZ *et al.*, 2009; PAES LEME *et al.*, 2009).

No caso dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, as manifestações locais são atribuídas à ação de fosfolipases A₂ (FLA₂), metaloproteinases e outras proteases presentes no veneno, bem como à liberação de compostos farmacologicamente ativos, gerados pela ação do mesmo (HOUSSAY, 1930; VIDAL *et al.*, 1972; ROTHSCHILD e ROTHSCHILD, 1979; MANDELBAUM *et al.*, 1982; ASSAKURA *et al.*, 1986; TEIXEIRA *et al.*, 1994; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; PETRICEVICH *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2002; RUCAVADO *et al.*, 2002; ZAMUNER *et al.*, 2005; GUTIERREZ *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009).

A inflamação está frequentemente associada ao envenenamento botrópico (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; FLORES *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 1994). No caso das serpentes *B. jararaca* e *B. asper*, foi demonstrado que a resposta edematogênica local, por eles induzida, é multimediada e envolve a participação de mediadores lipídicos, derivados do ácido araquidônico (eicosanóides) e fator de agregação plaquetária (PAF), mediadores α e β -adrenérgicos, serotonina e histamina, com algumas variações (TREBIEN e CALIXTO, 1989; CHAVES *et al.*, 1995). A participação de eicosanóides e PAF também foi observada no desenvolvimento da hiperalgesia induzida pelos

venenos de *B. jararaca* (TEIXEIRA *et al.*, 1994) e de *B. asper* (CHACUR *et al.*, 2001). Recentemente, foi demonstrado que as prostaglandinas e a histamina estão envolvidas no edema podal induzido pelo veneno de *B. insularis* (BARBOSA *et al.*, 2003). Ainda, foi demonstrado que a reação local inflamatória, desencadeada pelo veneno botrópico, se distingue dos demais processos inflamatórios por não ser modulada, em sua fase aguda, por glicocorticóides (CURY *et al.*, 1997), fato que deve contribuir para a sua expressão exacerbada.

O conjunto de informações descritas exemplifica a complexidade da reação inflamatória, desencadeada por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e demonstra que os estudos existentes são fragmentados. Além disso, verifica-se que não existem estudos detalhados relacionados aos efeitos inflamatórios locais causados pelo veneno das serpentes *B. moojeni*. A gravidade dos efeitos locais, induzidos por essa serpente, justifica estudos a esse respeito.

Os relatos clínicos do envenenamento botrópico evidenciam a formação de exsudato purulento no local da picada. A presença de leucócitos foi identificada no tecido muscular de camundongos após a injeção do veneno de *B. asper* (LOMONTE *et al.*, 1994). De modo similar, foi descrita a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, após a administração de venenos de *B. erythromelas* e *B. alternatus* (FLORES *et al.*, 1993) e no músculo gastrocnêmico, após a injeção de *B. jararaca* da Argentina (ACOSTA DE PÉREZ *et al.*, 1996). Ainda, o componente leucocitário, da reação inflamatória induzida pelos venenos de *B. jararaca* e de *B. asper*, em ratos, foi caracterizado por Farsky *et al.* (1997) e Zamuner *et al.* (2001), respectivamente, sendo que estes últimos autores demonstraram parte do mecanismo envolvido nesse fenômeno. Estas informações, em conjunto, demonstram que a literatura relacionada à participação dos leucócitos nos efeitos locais induzidos pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* é reduzida e que este parâmetro não foi avaliado para muitas espécies desse gênero. Vale ressaltar, que não existem relatos sobre o componente celular envolvido na reação local induzida pelo veneno de *B. moojeni*. O fato do veneno desta serpente induzir uma resposta edematogênica importante, em indivíduos picados, sugere, fortemente, a natureza inflamatória do mesmo e demanda estudos relativos ao componente leucocitário, no local de sua injeção.

Os leucócitos desempenham papel relevante no desenvolvimento e resolução da reação inflamatória. Durante este processo, os leucócitos são ativados e liberam uma grande quantidade de mediadores inflamatórios, que amplificam as suas funções imunológicas e, de modo geral, favorecem a regeneração (MARIANI e PANINA-BORDIGNON, 2003;

DIEGELMANN e EVANS, 2004). No entanto, em situações particulares, em que há ativação descontrolada ou excessiva, estas células tornam-se lesivas ao hospedeiro. Portanto, no caso do envenenamento ofídico, dependendo do estado de ativação, os leucócitos podem contribuir para a evolução de lesões teciduais e/ou vasculares causadas pelos venenos (ZAMUNER *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2005) ou para a regeneração tecidual (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Desse modo, os leucócitos constituem um alvo importante para a investigação das ações pró-inflamatórias de venenos de serpentes, como da *B. moojeni*.

O componente celular da reação inflamatória é representado, primordialmente, por leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (monócitos, linfócitos e mastócitos). Nos primeiros estágios de uma resposta aguda, há predomínio numérico de neutrófilos (RYAN e MAJNO, 1977; KAPLANSKI *et al.*, 2003). Essas células, mobilizadas a partir dos compartimentos de reserva e da corrente sanguínea, marginam à superfície dos vasos da microcirculação da área afetada (inicialmente deslizam sobre o endotélio – comportamento de rolamento – e, posteriormente, aderem à parede do vaso) e migram para o exterior do vaso, através de junções interendoteliais (diapedese). Uma vez no sítio extravascular, locomovem-se em resposta a um gradiente de concentração de mediadores inflamatórios quimiotáticos (quimiotaxia) e acumulam-se no local de lesão, para destruírem o agente lesivo (FLOREY, 1970; WINKLER e LÉVESQUE, 2006; FURZE e RANKIN, 2008).

A ação dos mediadores inflamatórios induz alterações hemodinâmicas e a expressão de receptores glicoprotéicos, na membrana de leucócitos e da célula endotelial, denominados moléculas de adesão, que interagem entre si e acarretam o fenômeno da migração leucocitária (MOSER *et al.*, 2004). Várias famílias de moléculas de adesão, classificadas de acordo com sua estrutura química, foram caracterizadas e, dentre essas, três desempenham papel fundamental na interação leucócito-endotélio: 1) a das selectinas, expressas em leucócitos circulantes e, particularmente, nas células endoteliais, responsáveis, pelo comportamento de rolamento; 2) das integrinas, expressas nas células endoteliais e alguns tipos de leucócitos, importantes para a aderência e diapedese e 3) das imunoglobulinas, expressas na célula endotelial e alguns tipos de leucócitos, também relevantes para a aderência e diapedese. A expressão diferenciada das moléculas de adesão, determinada por diversos mediadores inflamatórios, nos diferentes estágios do desenvolvimento da reação inflamatória é responsável, em parte, pela seletividade e cinética de migração dos leucócitos para o foco de lesão (ALBELDA *et al.*, 1994); para revisão ver (GRANGER e KUBES, 1994; RAMPART, 1994; FARSKY e MELLO, 1995). Os fenômenos de marginação leucocitária e atividades locomotoras permitem que o leucócito alcance o foco de lesão, para posterior destruição do

agente injuriante. A eliminação do agente lesivo, presente no foco inflamatório, ocorre por meio de fagocitose, efetuada por neutrófilos e macrófagos, concomitantemente à produção de agentes microbicidas e liberação do conteúdo de grânulos lisossômicos.

Dentre as células relevantes para os mecanismos imunológicos do organismo está o mastócito, que contém uma quantidade extraordinária de mediadores inflamatórios, que podem ser liberados rapidamente, mediante diversos estímulos. Atribui-se ao mastócito um papel fundamental no desencadeamento da inflamação (QURESHI e JAKSCHIK, 1988; GALLI *et al.*, 1999; KALESNIKOFF e GALLI, 2008).

A literatura mostra que os venenos de algumas espécies de serpente botrópicas, como a *B. jararaca* e a *B. lanceolatus*, causaram a desgranulação de mastócitos *in vitro* (GUIMARÃES *et al.*, 2004; BONAVITA *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que as fosfolipases A₂ isoladas dos venenos de serpentes desse gênero são capazes de induzir a desgranulação de mastócitos *in vitro*, como é o caso das fosfolipases A₂ BthTX-I e II e da Piratoxina-I (PrTX-I), isoladas dos venenos de *B. jararacussu* e *B. pirajai*, respectivamente (LANDUCCI *et al.*, 1998; 2000). Recentemente, foi demonstrado que inibidores da desgranulação de mastócitos e antagonistas de histamina e serotonina reduziram a hiperalgesia causada pelo veneno de *B. jararaca*, sugerindo que este veneno atua sobre mastócitos *in vivo* (BONAVITA *et al.*, 2006). Por outro lado, um estudo mais detalhado, demonstrou que os mastócitos reduziram a morbidade e mortalidade induzida pelo veneno da serpente *Atractaspis engaddensis*, em camundongos. Este fato foi atribuído à degradação do componente mais tóxico desse veneno, a sarafotoxina 6b, pela ação da carboxipeptidase A, liberada pelos mastócitos. Este estudo mostrou, pela primeira vez, que os mastócitos podem aumentar a resistência inata a venenos animais (METZ *et al.*, 2006). No entanto, não há outros relatos na literatura que comprovem a capacidade de toxinas ou venenos de serpentes do gênero *Bothrops* estimularem mastócitos *in vivo*.

Dada a relevância dos mastócitos em processos imunológicos e da sua propriedade de armazenar e sintetizar uma gama de mediadores inflamatórios e de proteases, são necessários estudos que investiguem a sua participação em eventos inflamatórios locais, induzidos por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, como a *B. moojeni*.

Dentre os mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos, está a histamina. Embora a histamina exerça um papel relevante nos mecanismos de migração leucocitária (KUBES e KANWAR, 1994; YAMAKI *et al.*, 1998; JUTEL *et al.*, 2006), não existem dados na literatura relacionados à sua participação no influxo de leucócitos para o foco inflamatório induzido por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Considerando que a inflamação é um

fenômeno multimediado e modulado, o estudo do papel da histamina, na reação inflamatória desencadeada por venenos de serpentes botrópicas, é de extrema relevância para a melhor compreensão dos efeitos locais causadas pelos mesmos.

Por outro lado, é conhecido que a distribuição de algumas toxinas não é uniforme entre os venenos das diferentes espécies do gênero *Bothrops*. Variações na composição química e atividades biológicas dos venenos podem ocorrer entre famílias, gêneros, espécies e subespécies desse gênero (CHIPPAUX *et al.*, 1991; MOURA DA SILVA *et al.*, 1991; FOX e SERRANO, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2008; PAES LEME *et al.*, 2009). Este fato pode determinar diferenças na evolução clínica dos indivíduos picados, particularmente no que se refere às ações locais e determinar, assim, condutas terapêuticas distintas. Desse modo, o estudo dos efeitos e mecanismos pró-inflamatórios dos venenos das espécies mais importantes de serpentes do gênero *Bothrops* é justificado.

1.1 Considerações gerais sobre mediadores quimiotáticos

O processo de transmigração dos leucócitos, da circulação para o tecido adjacente, é dependente da expressão de moléculas de adesão, determinada pela ação de mediadores quimiotáticos.

Os mediadores clássicos, envolvidos na quimiotaxia de leucócitos, incluem fragmentos peptídicos do sistema complemento, conhecidos como anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a) e mediadores lipídicos, como os leucotrienos (LTs), prostaglandinas (PGs), tromboxano A₂ (TXA₂) e o Fator Ativador de Plaquetas (PAF) (MURDOCH e FINN, 2000).

Os mediadores lipídicos são produzidos em condições fisiológicas e têm a sua síntese aumentada em processos inflamatórios e infecciosos. Sua síntese é obtida a partir da clivagem de fosfolipídios de membrana pela ação enzimática de fosfolipases A₂, resultando na liberação de ácido araquidônico (AA) e de ácido liso-fosfatídico. Uma vez liberado no citoplasma celular, o AA pode ser metabolizado pelos sistemas enzimáticos das ciclooxigenases, dando origem às prostaglandinas, como a PGD₂, E₂, I₂ e o TXA₂. O AA também pode ser metabolizado por enzimas do sistema das lipoxigenases, resultando na formação dos leucotrienos B₄, C₄, D₄ e E₄ (RÅDMARK e SAMUELSSON, 2009). O ácido liso-fosfatídico, por sua vez, pode ser acetilado pela enzima PAF-acetil hidrolase e resultar na formação do PAF (SNYDER, 1989; KUIJPERS *et al.*, 2001).

Mediadores lipídicos, como o TXA₂, contribuem para o influxo leucocitário por induzir a expressão de moléculas de adesão da família das β_2 integrinas e da grande família

das imunoglobulinas, como a VCAM-1 e a ELAM-1 (WILES *et al.*, 1991; ISHIZUKA *et al.*, 1996, 1998; SCOTT *et al.*, 1999; NAKAHATA, 2008). Outros mediadores, como o PAF, induzem a ativação e o recrutamento de leucócitos (KUIJPERS *et al.*, 2001). Dentre os mediadores lipídicos quimiotáticos, o LTB₄ é reconhecido como o mais potente. Este mediador aumenta a síntese de moléculas de adesão da família das β_2 integrinas, responsáveis pela firme adesão do leucócito ao endotélio e a afinidade dessas moléculas com o seu ligante no endotélio, a molécula de adesão intracelular (ICAM-1). Além disso, a ação quimiotática do LTB₄ é exercida sobre monócitos, mastócitos, células T e, principalmente, neutrófilos (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980; SMITH *et al.*, 1980; TONNENSEN, 1989; FORD-HUTCHINSON, 1990; VAN PELT *et al.*, 1997; GOODARZI *et al.*, 2003; TAGER *et al.*, 2003; KITAURA *et al.*, 2005; WELLER *et al.*, 2005). Até o momento, foram identificados dois receptores específicos para este mediador, o BLT1, de alta afinidade e o BLT2, de baixa afinidade (YOKOMIZO *et al.*, 1997, 2000). Embora a via de sinalização desencadeada por estes receptores ainda não tenha sido completamente elucidada (TAGER e LUSTER, 2003), sabe-se que a sua ativação causa aumento dos níveis intracelulares de inositol-trifosfato (IP₃), resultando em aumento do cálcio intracelular e do influxo de cálcio bem como a ativação das vias das ERK 1/2, PI3K e AKT (YOKOMIZO *et al.*, 2001; OHNISHI *et al.*, 2008).

Outro grupo de agentes quimiotáticos potentes é constituído pelas quimiocinas, que são citocinas quimiotáticas, de 8 a 17 kDa. Estas quimiocinas são agrupadas de acordo com a localização dos resíduos de cisteína e por sua homologia estrutural. As principais classes de quimiocinas possuem 4 resíduos de cisteína e são classificadas como quimiocinas da classe CC (ou β -quimiocinas) e da classe CXC (ou α -quimiocinas). A principal característica estrutural das quimiocinas da classe CC é a de não apresentar nenhum aminoácido entre os resíduos de cisteína, enquanto as da classe CXC possuem um aminoácido entre dois resíduos de cisteína. Existem, ainda, outras duas classes de quimiocinas que, no entanto, foram pouco estudadas. Estas são as quimiocinas da classe CX₃C (com três aminoácidos entre os dois resíduos de cisteína) e as quimiocinas dos grupos XC (que, ao invés de apresentarem quatro resíduos de cisteína em sua estrutura, possuem apenas dois resíduos, que são adjacentes) (LUSTER, 1998; VIOLA e LUSTER, 2008).

Dentre as quimiocinas melhor caracterizadas, aquelas pertencentes à classe CC possuem elevada seletividade para recrutar leucócitos mononucleares (monócitos/macrófagos e células T). As principais representantes deste grupo são as quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5, que representam, respectivamente, as quimiocinas *macrophage chemotactic protein-1*

(MCP-1), *monocyte inflammatory protein-1* (MIP-1) e *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES). Já as quimiocinas da classe CXC são seletivas para o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. As principais representantes deste grupo são a CXCL1 e a CXCL8, também conhecidas como *keratinocyte-derived chemokine* (KC)/*growth related oncogen* (GRO) e a interleucina-8 (IL-8), respectivamente (LUSTER, 1998). Os mecanismos de ação da KC para o recrutamento de neutrófilos circulantes, não estão completamente esclarecidos, porém sabe-se que este mediador induz o aumento de leucócitos em fase de rolamento, de adesão e de transmigração, de modo dependente da expressão de P-selectina (ZHANG *et al.*, 2001). Estudos recentes demonstraram também que a KC participa da saída de neutrófilos dos compartimentos centrais, via ativação do receptor CXCR2, expresso nessas células, acarretando aumento do número desse tipo celular na circulação periférica (WENGER *et al.*, 2008).

As quimiocinas exercem suas funções biológicas ao se ligarem a receptores de membrana, todos eles acoplados a proteína G (GPCR). Até o presente, já foram identificados 18 receptores, a maioria dos quais contendo uma subunidade $G_{\alpha i}$, acoplada à cauda citoplasmática, embora as subunidades $G_{\alpha q}$ e $G_{\alpha 12-13}$ também tenham sido descritas. A ativação desses receptores leva ao aumento do influxo de cálcio, ativação de PI3K, IP3 e proteína cinase C (PKC), além da via das Ras e Rho GTPases (LUSTER, 1998; VIOLA e LUSTER, 2008). Após a ativação, os receptores de quimiocinas tornam-se parcialmente ou completamente desensibilizados, por fosforilação dos resíduos de serino e treonina da porção C-terminal. Acredita-se que a desensibilização seja necessária para que a célula não perca sua capacidade de migrar em um ambiente com gradiente quimiotático (PROUDFOOT *et al.*, 2000). Em adição, foi identificada uma nova classe de receptores denominados “receptores atípicos” que ligam-se sem seletividade a diferentes quimiocinas, incapazes de desencadear sinalização intracelular após sua ativação (MURDOROF e FINN, 2000; LOCATI *et al.*, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2006; GRAHAM, 2009). Acredita-se que estes receptores exerçam um papel importante na modulação negativa da quimiotaxia de leucócitos durante processos inflamatórios (LOCATI *et al.*, 2005; MANTOVANI *et al.*, 2006; GRAHAM, 2009).

1.2 Considerações gerais sobre os mastócitos e a histamina

Os mastócitos são células secretoras multifuncionais, caracterizadas pela presença de numerosos grânulos citoplasmáticos, metacromáticos, que contém aminas biogênicas, proteoglicanos, citocinas e serinoproteínases neutras e foram descritas por Paul Ehrlich, em

1878. Inicialmente, os mastócitos foram denominados de *mastzellen*, que significa “células bem alimentadas”, devido a grande quantidade de grânulos citoplasmáticos (CRIVELLATO *et al.*, 2004; GALLI e TSAI, 2008).

O processo ontogenético dos mastócitos ainda não foi completamente elucidado, contudo, sabe-se que estas células, assim como os demais leucócitos, originam-se de precursores hematopoiéticos pluripotentes, que expressam o fenótipo CD13⁺, CD34⁺, CD117⁺ e FcεRI (GILFILLAN e TKACZYK, 2006; ARINOBU *et al.*, 2009). A teoria mais aceita é de que as células precursoras deixam a medula óssea ainda imaturas e migram para o tecido periférico, local onde permanecem indiferenciadas. As células precursoras dos mastócitos são recrutadas para os tecidos, onde se diferenciam e completam a sua maturação. Este processo é regulado pelas características do microambiente e pela liberação de mediadores, especialmente o SCF (*Stem Cell Factor*), secretado por fibroblastos, estroma e células endoteliais. Ainda, uma população de células progenitoras permanece indiferenciada nos tecidos periféricos e constitui uma reserva celular, que se diferencia e amadurece somente após estímulo inflamatório (GALLI, 1993; CRIVELLATO *et al.*, 2004; GILFILLAN e TKACZYK, 2006; ARINOBU *et al.*, 2009).

Os mastócitos maduros estão amplamente distribuídos no organismo e são encontrados, principalmente, em superfícies de contato com o meio externo, como os epitélios intestinal e pulmonar e no tecido conjuntivo, intimamente associados a vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (PEARCE, 1982; DVORAK *et al.*, 1983; LONGLEY *et al.*, 1995). No homem e roedores, essas células são heterogêneas e, nas diferentes regiões anatômicas, as populações de mastócitos apresentam características fenotípicas, morfológicas, bioquímicas e funcionais distintas (METCALFE *et al.*, 1997; CRIVELLATO *et al.*, 2004). A localização peculiar dos mastócitos sugere que eles estejam entre as primeiras células a iniciarem os processos imunológicos do organismo (QURESHI e JAKSCHIK, 1988; CRIVELLATO *et al.*, 2004).

Os mastócitos são conhecidos como células efetoras locais, que desempenham papel relevante em reações alérgicas, infecções parasitárias e bacterianas, angiogênese, remodelamento tecidual, fibrose, proteção neuronal de doenças degenerativas, como a doença de Parkinson, na artrite reumatóide e no controle da homeostasia do hospedeiro através da imunidade adquirida e inata, como a inflamação (RIBATTI *et al.*, 1987; DVORAK e KISSELL, 1991; CHURCH e LEVI-SCHAFFER, 1997; GALLI *et al.*, 1999; MEKORI e METCALFE, 2000; OLSSON *et al.*, 2001; STASSEN *et al.*, 2002; CRIVELLATO *et al.*, 2004; TUNCEL *et al.*, 2005; METZ e MAURER, 2007; WEISLER *et al.*, 2008).

Como mencionado anteriormente, os grânulos citoplasmáticos dos mastócitos contêm uma grande variedade de mediadores inflamatórios, como a histamina, serotonina, heparina, sulfato de condroitina, proteases e citocinas. Os mastócitos também sintetizam mediadores lipídicos como os leucotrienos, prostaglandinas e o fator ativador de plaquetas. Além disso, após ativação, estas células produzem e secretam citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), o SCF, as interleucinas (IL) -3, -4, -6, -10, -13, -14 e -16 e expressam algumas quimiocinas como a linfotaxina, a MCP-1 e as MIP-1 α e -1 β (GALLI *et al.*, 1991; ABRAHAM e MALAVIYA, 1997; AJUEBOR *et al.*, 1999; WEDEMEYER *et al.*, 2000; METZ e MAURER, 2007). Até o presente, cerca de 30 tipos de citocinas foram descritas serem liberadas por mastócitos humanos (CRIVELLATO *et al.*, 2004). A grande variedade de mediadores pré- e neoformados, que o mastócito é capaz de liberar, indica que esta célula pode influenciar outras células do microambiente em que se localiza, bem como o seu papel central no processo inflamatório e em funções não imunológicas.

Os mastócitos são células heterogêneas e apresentam diferenças quanto ao conteúdo de proteases intragranulares, marcadores de superfície, liberação de citocinas e resposta a alguns estímulos externos (GALLI, 1990; BRADDING *et al.*, 1993). Atualmente, são aceitas duas subpopulações de mastócitos, classificadas de acordo com a sua distribuição anatômica e as enzimas estocadas em seus grânulos: 1) mastócitos que contêm triptase e quimase, encontrados predominantemente nos tecidos conjuntivos, na pele, submucosa do estômago e intestino, linfonodo, sinóvia e miocárdio, os grânulos destas células contêm, também, carboxipeptidase A, catepsina G e a heparina, como principal proteoglicano estocado e 2) mastócitos que contêm apenas triptase, encontrados, predominantemente, na mucosa intestinal e pulmonar. Uma terceira subpopulação de mastócitos, contendo apenas a quimase nos grânulos, foi descrita e se localiza, principalmente, nas mucosas e submucosas do estômago e do intestino delgado (IRANI *et al.*, 1986; IRANI e SCHWARTZ, 1994). Contudo, os artigos mais recentes não mencionam essa subpopulação (CRIVELLATO *et al.*, 2004; GALLI e TSAI, 2008).

Os mastócitos apresentam inúmeros receptores de reconhecimento de antígenos, na superfície de membrana, como o receptor de alta afinidade para IgE (Fc ϵ RI), os receptores para IgG (Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII) e receptores para peptídios do sistema complemento (C3aR, C5aR, CR3 e CR5), que favorecem a sua ativação por bactérias ou partículas opsonizadas (ABRAHAM *et al.*, 1997; GILFILLAN e TKACZYK, 2006; GALLI e TSAI, 2008). Além disso, estas células expressam uma gama de moléculas de adesão e receptores

para fatores quimiotáticos, para tirosina-cinases e urocinases, que favorecem a sua distribuição nos tecidos, ativação, diferenciação, sobrevivência e função pró-angiogênica, respectivamente. Ainda, foram descritos receptores para várias citocinas e mediadores inflamatórios como a triptase, o SCF, IL-1 e -12, PGE₂, TNF e adenosina. O reconhecimento de microorganismos é mediado, principalmente, pelos *toll-like receptors* (TLR) 2, 3, 4, 5, 7 e 9. Os mastócitos também podem ser ativados por diferentes componentes de venenos animais como a sarafotoxina 6b, fosfolipases A₂ e peptídios desgranuladores de mastócitos (ABRAHAM e AROCK, 1998; MALAVIYA *et al.*, 1999; STASSEN *et al.*, 2001; SUPAJATURA *et al.*, 2001; GALLI e NAKAE, 2003; WEISSLER *et al.*, 2008).

A ativação dos mastócitos pode ser iniciada por duas vias distintas, associadas ou não a anticorpos. Uma das vias de ativação ocorre quando um antígeno multivalente (alergênico) se liga a anticorpos anafiláticos da classe IgE, previamente ligados a receptores de membrana específicos FcεRI ou a receptores de IgG (FcγRII/RIII), presentes na membrana dos mastócitos. A outra via, sem a participação de anticorpos, pode ocorrer por ativação de receptores para patógenos, como os TLRs ou receptores para citocinas, como o de SCF, IL-1e TNF-α. Além disso, toxinas animais e peptídios desgranuladores também causam a ativação dos mastócitos e, conseqüentemente, a desgranulação dos mediadores estocados (GALLI *et al.*, 1999; WEISSLER *et al.*, 2008; GILFILLAN e TKACZYK, 2006; GALLI e TSAI, 2008).

A desgranulação dos mastócitos pode ocorrer por dois processos morfológicamente distintos. O primeiro processo é denominado exocitose e decorre da fusão dos grânulos citoplasmáticos e destes com a membrana celular, resultando na liberação rápida de mediadores. Este mecanismo está associado a processos imunológicos, como a reação de hipersensibilidade imediata e à inflamação aguda. O segundo processo é conhecido por desgranulação lenta (*piecemeal degranulation*). Neste caso, ocorre a secreção dos mediadores estocados nos grânulos sem que estes se fundam entre si ou com a membrana celular. Este processo está associado a condições de inflamação crônica, alergias e tumores (DVORAK, 1991; CRIVELLATO *et al.*, 2002, 2003, 2004).

As manifestações desencadeadas pelos mastócitos, independentemente da natureza do estímulo, são atribuídas à ação dos mediadores liberados destas células. Dentre eles, a histamina é considerada um importante mediador da resposta inflamatória aguda e da hipersensibilidade imediata. Além disso, este mediador regula vários eventos essenciais da resposta imune e influencia numerosas funções de células do sistema imunológico (JUTEL *et al.*, 2006).

A histamina é uma amina vasoativa, sintetizada a partir da descarboxilação do

aminoácido L-histidina, pela ação da enzima histidina descarboxilase (EHD) e constitui o principal componente dos grânulos de mastócitos (HILL, 1990). Esta enzima é expressa de forma constitutiva em mastócitos e basófilos (KURAMASU *et al.*, 1998). Por este motivo, observa-se uma elevada atividade da EHD e produção de histamina nestas células, embora a expressão da enzima e a liberação desta amina também tenham sido detectadas em diversos tipos celulares e tecidos. Em tecidos inflamados, foi observado que 90 % das células expressavam RNA mensageiro para a EHD, sendo que esta porcentagem correlacionou-se ao número de neutrófilos encontrados neste micro-ambiente (SHIRAISHI *et al.*, 2000a). Além disso, outros tipos celulares, como os macrófagos (TAKAMATSU *et al.*, 1996) e células T (KUBO e NAKANO, 1999) são capazes de expressar a EHD e sintetizar histamina, dependendo do estágio de diferenciação ou ativação celular. Entretanto, enquanto os mastócitos e basófilos liberam a histamina intragranular, imediatamente após estímulo antigênico, outros tipos celulares, como os macrófagos, células T e neutrófilos, produzem e liberam este mediador continuamente após o estímulo inflamatório (SHIRAISHI *et al.*, 2000b; AOI *et al.*, 1989).

A atividade biológica da histamina ocorre a partir de sua interação a pelo menos quatro subtipos de receptores, acoplados à proteína G, denominados H₁, H₂, H₃ e H₄ (HOUGH, 2001; ZHANG *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2008). As ações desencadeadas pela histamina, mediadas pelo receptor H₁, estão relacionadas a processos inflamatórios e alérgicos, tais como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, secreção de muco e broncoconstrição (HOWARTH, 1990; WHITE, 1990; 1999). Além disso, a histamina pode atuar como neurotransmissor no sistema nervoso central, inibindo o apetite e aumentando o estado de sonolência, via ativação dos receptores H₁ (PANULA *et al.*, 1990). A ativação dos receptores H₂ está relacionada, preferencialmente, ao aumento de secreção gástrica, por células parietais. No entanto, o efeito da histamina, mediado por estes receptores, também ocasiona relaxamento da musculatura lisa e aumento da resistência das vias aéreas inferiores (KNIGHT *et al.*, 1992; TAMAOKI *et al.*, 1997). Em contraste, os receptores H₃ funcionam como receptores pré-sinápticos, envolvidos na regulação autócrina negativa de histamina e de outros neurotransmissores do SNC (LOVENBERG *et al.*, 1999). Por outro lado, há poucos estudos sobre os efeitos do receptor H₄. A literatura sugere que este receptor esteja envolvido na indução de prurido (HAGERMARK *et al.*, 1992; BELL *et al.*, 2004) e na inflamação alérgica (LING *et al.*, 2004; GUTZMER *et al.*, 2005; DUNFORD *et al.*, 2006). Recentemente, foi descrito um importante papel desse receptor no recrutamento de células precursoras de mastócitos humanos, em processos alérgicos (GODOT *et al.*, 2007). Estudos

recentes têm demonstrado o papel imunomodulador dos receptores H₄, em modelos de alergia. Nesse sentido, foi demonstrado que a ativação dos receptores H₄, expressos por células dendríticas, modulou a resposta Th₂, inibindo a liberação de citocinas e de quimiocinas importantes para a ativação de células T (DUNFORD *et al.*, 2006; DIJKSTRA *et al.*, 2008). Ainda, agonistas dos receptores H₄ causaram um aumento de células T regulatórias e de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o TGF- β (MORGAN *et al.*, 2007; ZAMPELI e TILIGADA, 2009). Por outro lado, o receptor H₄ da histamina também participa de respostas do tipo Th₁, favorecendo a quimiotaxia de células inflamatórias, como neutrófilos, células dendríticas e mastócitos (TAKESHITA *et al.*, 2003; THURMOND *et al.*, 2004; GUTZMER *et al.*, 2005; BÄUMER *et al.*, 2008; HUANG e THURMOND, 2008).

Em adição às atividades biológicas clássicas da histamina, acima referidas, foi demonstrado que os receptores de histamina são expressos em diferentes células do contingente leucocitário, como os neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos, sugerindo que este mediador, de forma direta ou indireta, pode influenciar a capacidade efetora das mesmas (BACHERT *et al.*, 2001; ZAMPELI e TILIGADA, 2009). As evidências da literatura apontam uma ação da histamina na quimiotaxia de leucócitos. Nesse sentido, foi demonstrado que esta amina induz a expressão de moléculas de adesão, envolvidas na migração leucocitária para o foco inflamatório. A histamina promove, rapidamente, a expressão de P-selectina, pelo endotélio, favorecendo o rolamento e a firme adesão de leucócitos sobre este tecido, durante a inflamação (JONES *et al.*, 1993; THORLACIUS *et al.*, 1994). Além disso, esse mediador induz a expressão das moléculas E-selectina e ICAM-1, que também contribuem para o rolamento de leucócitos (JONES *et al.*, 1993; GILL *et al.*, 2005). Estes efeitos da histamina são mediados por receptores H₁ (KUBES e KANWAR, 1994; MIKI *et al.*, 1996; YAMAKI *et al.*, 1998; CIPRANDI *et al.*, 2003).

Em síntese, dada a relevância dos mastócitos e da histamina na resposta imune e na migração leucocitária, a análise da participação destes elementos no desenvolvimento de eventos inflamatórios locais, induzidos pelo veneno de *B. moojeni*, particularmente o influxo leucocitário, reveste-se de importância.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivos:

- 1) Caracterizar o influxo leucocitário induzido pela injeção intraperitoneal do veneno de *Bothrops moojeni* em camundongos, no que se refere ao número, tipos celulares, cinética e relação dose-efeito;
- 2) Avaliar mecanismos envolvidos no influxo leucocitário induzido pelo veneno de *B. moojeni*, na cavidade peritoneal de camundongos, quanto à:
 - a) participação de mastócitos,
 - b) participação da histamina, analisando a contribuição dos receptores do tipo H₁, H₂ e H₄,
 - c) liberação dos mediadores quimiotáticos tromboxano A₂, leucotrieno B₄, MCP-1 e KC;
- 3) Avaliar a ação desse veneno quanto à capacidade de desgranular mastócitos *in vivo* e *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, de peso compreendido entre 18 e 20 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan, mantidos em condições padronizadas de biotério, com água e alimentação *ad libitum* até o momento dos experimentos.

3.2 Veneno

Foi utilizado veneno total, extraído de vários exemplares adultos de serpentes da espécie *Bothrops moojeni*, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia, do Instituto Butantan. O veneno, liofilizado, foi mantido a -20°C até o momento de sua utilização.

Antes da realização dos experimentos, a concentração de endotoxina bacteriana (Lipopolissacarídeo - LPS), presente no veneno ou em seu diluente, foi determinada pela utilização do *kit* de Ensaio Imunoenzimático LAL (Fabricante: Cambrex/Lonza). O laudo técnico resultante desta análise demonstrou uma quantidade de LPS inferior ao limite mínimo de detecção do ensaio (0,125 VE/mL), indicando ausência de LPS no veneno e em seu diluente (anexo). A partir desta análise inicial, todos os experimentos propostos neste estudo foram conduzidos utilizando-se o mesmo lote do veneno.

3.3 Injeção intraperitoneal do veneno de *Bothrops moojeni* (VBm) e obtenção de exsudato e de leucócitos peritoneais.

O veneno bruto, diluído em solução fisiológica, foi filtrado em filtros esterilizantes, de poro de 0,22 μm de diâmetro e injetado na cavidade peritoneal dos animais, por via intraperitoneal (i.p.), em diferentes doses (0,025 a 0,5 $\mu\text{g/g}$), em volume constante de 0,5 mL/cavidade. Os animais dos grupos controles receberam injeção i.p. de volume equivalente de solução fisiológica apirogênica. Decorridos diferentes períodos de tempo, estabelecidos para os diferentes protocolos experimentais, os animais foram mortos em atmosfera de gás carbônico e a cavidade peritoneal lavada com 2,0 mL de tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,2, contendo heparina (10 UI/mL). O líquido coletado foi centrifugado a 500 g, por 6 minutos. O precipitado celular foi utilizado para a contagem e tipagem de leucócitos e o sobrenadante foi

utilizado para determinação da concentração de mediadores inflamatórios (prostaglandina D₂, tromboxano A₂, leucotrieno B₄, MCP-1 e KC).

3.4 Contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade peritoneal

Os leucócitos foram obtidos da cavidade peritoneal dos animais 1, 3, 6, 24, 48 e 72 horas, após a injeção i.p. do VBm ou solução fisiológica apirogênica, como descrito no item anterior. Uma alíquota do lavado peritoneal coletado foi diluída em solução de Turk (1:20 v/v), para a contagem do número total de leucócitos, em câmara de Neubauer, sob microscópio de luz. A contagem diferencial foi realizada a partir de esfregaços celulares, obtidos em citocentrífuga e corados por corante Giemsa. Foram contadas pelo menos 100 células e classificadas como polimorfonucleares (PMNs) ou mononucleares (MNs), com base em critérios de morfologia convencional.

3.5 Determinação do número de leucócitos circulantes

Grupos de animais receberam injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou solução fisiológica apirogênica (controle), como descrito no item 3.3. Por meio de uma incisão na extremidade caudal dos animais, alíquotas de sangue foram coletadas 24 horas antes (basal) e 1, 3 e 6 horas após as injeções i.p. do veneno ou de solução fisiológica apirogênica. Uma alíquota do sangue foi diluída em Líquido de Turk, na proporção 1:20 (v/v), para a contagem do número total de leucócitos, em câmara de Neubauer, sob microscopia de luz. Outra alíquota do sangue foi utilizada para a contagem diferencial dos leucócitos, a partir de extensões sanguíneas, coradas por Giemsa. Pelo menos 100 células por lâmina foram analisadas e tipadas, com base em critérios de morfologia convencional para leucócitos.

3.6 Tratamentos farmacológicos

A participação dos mastócitos ou da histamina, no influxo leucocitário induzido pelo veneno de *Bothrops moojeni*, foi determinada por diferentes intervenções farmacológicas. A dose dos fármacos e os tempos de latência empregados basearam-se em dados da literatura. Todos os fármacos foram solubilizados em solução fisiológica apirogênica (veículo) e administrados pela via intravenosa (i.v.), a partir da veia caudal. Os animais controles receberam volumes equivalentes do veículo. Os protocolos dos tratamentos farmacológicos

utilizados estão discriminados abaixo:

- ✓ Cromoglicato de sódio, inibidor da desgranulação de mastócitos (25 mg/kg), administrado 30 minutos antes da injeção do veneno;
- ✓ Difenidramina, antagonista do receptor H₁ da histamina (10 mg/kg), administrada 10 minutos antes da injeção do veneno;
- ✓ Ranitidina, antagonista do receptor H₂ da histamina (10 mg/kg), administrada 10 minutos antes da injeção do veneno;
- ✓ Tioperamida, antagonista dos receptores H₃/H₄ da histamina (10 mg/kg), administrada 20 minutos antes da injeção do veneno.

3.7 Determinação da desgranulação de mastócitos peritoneais

A indução da resposta inflamatória foi realizada como descrito no item 3.3. Decorridos diferentes períodos de tempo, os animais foram mortos em atmosfera de gás carbônico e o mesentério foi retirado e lavado com tampão fosfato. Após fixação com tampão paraformaldeído, a 4 %, por 2 horas, o tecido foi lavado com tampão fosfato por 3 vezes, e corado com Giemsa. Após secagem do mesentério, os mastócitos foram contados sob microscopia de luz e classificados em desgranulados ou não desgranulados, com base em padrões morfológicos e na dispersão de grânulos. Foram contados, pelo menos, 100 mastócitos por amostra e considerados desgranulados os mastócitos que apresentavam 10 ou mais grânulos externalizados. Os dados estão representados em porcentagem de células desgranuladas.

3.8 Determinação da concentração de mediadores lipídicos por ensaio imunoenzimático (EIA)

Os sobrenadantes, obtidos segundo a descrição do item 3.3, passaram, inicialmente, por um processo de extração de eicosanóides, por meio de Colunas Sep Pak C-18. Estas colunas foram previamente ativadas com 10 mL de etanol absoluto, seguido de 20 mL de água deionizada. Em seguida, os sobrenadantes foram acidificados (pH 3,5) com solução de HCl 0,1 N e adicionados às colunas. Posteriormente, as colunas foram lavadas com uma solução de etanol a 35 % e, finalmente, com etanol absoluto, para a eluição das

prostaglandinas (PRADELLES *et al.*, 1985). Os eluatos foram concentrados por um sistema de centrifugação a vácuo (Savant) e, posteriormente, ressuspensos em tampão específico e analisados por ensaio imunoenzimático (EIA), utilizando-se um *kit* comercial (Cayman Chemical, USA). O teor de recuperação de PGD₂, TXB₂ e LTB₄ (>95 %) foi confirmado com aplicação do padrão específico para estes mediadores. Para a determinação da concentração da PGD₂, as amostras correspondentes passaram por um processo de derivatização após sua extração. Para esta etapa, foi adicionado o reagente para derivatização (metil-oximação), seguido de aquecimento a 60°C, por 30 minutos e centrifugação por 10 minutos, a 200 g, para a obtenção da PGD₂ - metoxima (PGD₂-MOX), que é mais estável para o EIA.

Alíquotas, contendo 50 µL de cada amostra, foram adicionadas às placas de 96 poços, pré-tratadas com anticorpos específicos para cada mediador avaliado e incubadas com igual volume do prostanóide conjugado à acetilcolinesterase e antisoro específico de coelho. Após a adição do substrato, a absorbância das amostras foi determinada em leitor de microplacas (Labsystem Multiscan®), a 405 nm e as concentrações foram estimadas a partir da curva padrão específica, em concentrações expressas em pg/mL.

3.9 Determinação da concentração da quimiocina MCP-1

A concentração desta quimiocina foi mensurada pela técnica de ensaio imunoenzimático (EIA), utilizando *kits* comerciais, específico para quantificação de MCP-1 (eBioscience, EUA). As dosagens foram realizadas a partir dos exsudatos peritoneais coletados como descrito no item 3.3.

Para a determinação da MCP-1, placas de 96 poços (Corning Costar 9018), foram sensibilizadas com o anticorpo monoclonal específico para essa quimiocina, diluído em tampão específico, fornecido pelo fabricante, e incubadas por 18 horas, a 4 °C. A seguir, as placas foram lavadas com 300 µL/poço de tampão de lavagem (PBS, 0,05 % Tween-20). Alíquotas de 100 µL de cada amostra foram, então, adicionadas aos poços e incubadas por 18 horas, a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas e adicionadas de 100 µL do anticorpo secundário biotilado/poço e incubadas, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após nova lavagem das placas, foram adicionadas de 100 µL de avidina-peroxidase em cada poço e após 30 minutos de incubação, em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e adicionadas de 100 µL da solução substrato de tetrametil-benzidina (TMB). As placas, protegidas da luz, foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi

interrompida pela adição de 50 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) 1 M e a absorbância das amostras foi determinada em leitor de microplacas (Labsystem Multiscan®), a 450 nm.

As concentrações de MCP-1, expressas em pg/mL, foram estimadas a partir da curva padrão específica para essa quimiocina.

3.10 Determinação da concentração da quimiocina KC

Os níveis de KC foram mensurados pela técnica de ensaio imunoenzimático (EIA), utilizando *kit* comercial, específico para quantificação desta quimiocina (Antigenix América, EUA). As dosagens foram realizadas a partir dos exsudatos peritoneais coletados como descrito no item 3.3. Com esta finalidade, placas de 96 poços (Corning Costar 9018), foram sensibilizadas com o anticorpo de captura específico para KC murina, diluído em tampão carbonato de sódio (pH 9,6) e incubadas por 3 horas, a 37 °C. A seguir, as placas foram lavadas com 300 µL/poço de tampão de lavagem (PBS, 0,05 % Tween-20) e incubadas com 200 µL de tampão de bloqueio (PBS, 0,05 % Tween-20, gelatina 10 %), por 18 horas, a 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e alíquotas de 100 µL de cada amostra foram adicionadas e incubadas por 18 horas, a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas, seguida da adição de 100 µL/poço do anticorpo secundário conjugado a biotina e incubadas, protegidas da luz, à temperatura ambiente, por 1 hora. Após nova lavagem das placas, foram adicionados 100 µL de estreptoavidina-peroxidase em cada poço. Após 1 hora de incubação, em ambiente protegido da luz e à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e adicionadas de 100 µL da solução substrato, de tetrametil-benzidina (TMB). As placas, protegidas da luz, foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido cítrico 0,2 M e a absorbância das amostras foi determinada em leitor de microplacas (Labsystem Multiscan®), a 450 nm. As concentrações de KC foram estimadas a partir da curva padrão específica para essa quimiocina e expressas em ng/mL.

3.11 Cultura de mastócitos murinos

Mastócitos murinos, da linhagem imortalizada PT18, foram cultivados em garrafas de poliestireno de 75 mm², em meio RPMI-1640, suplementado com gentamicina (40 µg/mL), L-glutamina (2 mM), soro fetal bovino (SFB) a 10 % e 5 % do sobrenadante de cultura de células WEHI-3B, rico em IL-3. Os mastócitos foram mantidos em incubadora, sob atmosfera

de CO₂ a 5 %, a 37 °C, até sua utilização. Os mastócitos, da linhagem PT18, foram gentilmente cedidos pelos Drs. Eliana Faquim de Lima Mauro (Laboratório de Imunopatologia - Instituto Butantan) e João Gustavo Amarante-Mendes (Departamento de Imunologia - Instituto de Ciências Biomédicas/USP).

3.11.1 Teste de viabilidade celular

Para avaliar o efeito citotóxico do VBm em mastócitos murinos, foi empregado o teste de exclusão pelo azul de Tripán. Os mastócitos foram centrifugados a 500 g por 6 minutos e o precipitado resultante foi resuspendido em tampão Tyrodes, para obter-se a concentração de 4 x10⁶ células/mL. Foram semeados 8 x10⁵ mastócitos/poço, em placas de 96 poços e incubados com diferentes concentrações do VBm (1 - 50 µg/mL), por 1 hora, em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Após este período de tempo, uma alíquota de 10 µL dos mastócitos em suspensão foi diluída em 90 µL de azul de Tripán, a 0,2% (1:10, v/v). A viabilidade dos mastócitos foi determinada pela contagem de células viáveis e mortas, em câmara de Neubauer, sob microscopia de luz. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células, que foi tomado como 100 %. Todos os testes foram feitos em duplicata.

3.11.2 Avaliação da desgranulação de mastócitos murinos *in vitro*

A desgranulação dos mastócitos foi determinada pela dosagem da enzima β-hexosaminidase, um marcador da desgranulação de mastócitos, liberada no sobrenadante da cultura (HOHMAN e DRESKIN, 2001). Após a centrifugação dos mastócitos, como descrito no item 3.9.1, as células foram resuspendidas na concentração de 4 x10⁶ células/mL, em tampão Tyrodes, específico para ensaio de liberação de β-hexosaminidase. Foram semeadas 8 x10⁵ células/poço, em um volume final de 200 µL. As placas foram incubadas por 1 hora em atmosfera de CO₂ a 5 %, a 37 °C. A seguir, foi adicionado o VBm, em concentrações não citotóxicas (1 – 10 µg/mL), por 1 hora. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 500 g por 6 minutos e o sobrenadante foi coletado e utilizado para determinação da concentração de β-hexosaminidase liberada no sobrenadante. As células foram lisadas com adição de tampão citrato 0,1 M, Triton X-100 0,5 % e uma alíquota do lisado celular foi utilizada para a determinação da concentração de β-hexosaminidase residual. As alíquotas do sobrenadante ou

do lisado celular (10 µL) foram incubadas em placas de 96 poços com 90 µL de tampão citrato 0,1 M, contendo 1,3 mg/mL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina. As placas, protegidas da luz, foram incubadas por 18 horas, a 37 °C. A reação enzimática foi parada com a adição de 100 µL de solução de glicina a 0,2 M e as absorbâncias foram mensuradas em leitor de ELISA a 405 nm. A liberação da enzima foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ liberação} = \frac{\text{DO do sobrenadante}}{\text{DO do sobrenadante} + \text{DO extrato do lisado celular}} \times 100$$

Os resultados foram expressos em porcentagem β-hexosaminidase liberada no sobrenadante. Cada valor representa a média da quadruplicata de cada amostra, com um *n* amostral igual a 3.

3.12 Análise Estatística

Os dados estão representados como média ± erro padrão da média (E.P.M.) e, após o teste de homocedasticidade, foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, nas comparações múltiplas. Em todos os cálculos, foi fixado o nível crítico igual ou menor que 0,05 ($p \leq 0,05$). Em determinados protocolos experimentais, os valores de porcentagem foram transformados em arco-seno para a análise estatística. Os dados foram analisados estatisticamente a partir de programas computacionais.

3.13 Soluções utilizadas

3.13.1 Tampão Fosfato-Salina (PBS)

Solução estoque de Salina

NaCl	81,82 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Solução estoque de Fosfato

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3,58 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	26,5 g
Água destilada	q.s.p. 1000 mL

Solução Fosfato-Salina

Solução estoque de Fosfato	100 mL
Solução estoque de Salina	100 mL
Água destilada	800 mL

Solução Salina (0,9 %)

Solução estoque de Salina	100 mL
Água destilada	900 mL

3.13.2 Tampão Fosfato (pH 7,4)

Fosfato de Sódio Monobásico	3,4 g
Fosfato de Sódio Dibásico	2,3 g
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL

3.13.3 Tampão Paraformaldeído 4 % (pH 7,4)

Paraformaldeído	4 g
NaOH	1 pastilha
Água deionizada	5 mL
Tampão Fosfato	q.s.p. 100 mL

3.13.4 Tampão de Lavagem

Tween-20	500 µL
Tampão Fosfato-Salina (PBS)	1000 mL

3.13.5 Tampão de Bloqueio

Gelatina	10 g
Tween-20	50 µL
Tampão Fosfato-Salina (PBS)	q.s.p. 100 mL

3.13.6 Tampão Tyrodes

NaCl	7,6 g
KCl	373 g
CaCl ₂ 1 M	1,4 mL
MgCl ₂	203 g
glucose	1,01 g
HEPES 1 M	10 mL
Albumina Sérica Bovina (BSA) 0,1 %	10 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

3.13.7 Tampão Citrato 0,1 M (pH 4,5)

Ácido Cítrico 0,1 M	300 mL
Citrato de Sódio 0,1 M	600 mL

3.13.8 Tampão Carbonato de sódio pH 9,6

NaHCO ₃	8,4 g
NaCl	5,8 g
Água destilada	1000 mL

3.13.9 Solução de Turk

Ácido acético glacial	1 mL
Violeta de genciana	1 mL
Água destilada	q.s.p. 100 mL

3.13.10 Corante Giemsa

Giemsa metileno azul-eosina	0,97 g
May-Grünwald metileno azul-eosina	0,53 g
Metanol p.a.	q.s.p. 1000 mL

3.13.11 Azul de Tripan

Solução estoque (100 %)

Azul de Tripan	100 mg
Tampão fosfato salina (PBS)	100 mL

Solução de trabalho (0,2 %)

Solução estoque azul de Tripan	200 µL
Tampão fosfato salina (PBS)	q.s.p. 100 mL

3.13.12 Solução Ácido fosfórico (H₃PO₄) 1 M

H ₃ PO ₄	5,76 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

3.13.13 Solução de Ácido Cítrico 0,2 M

Ácido Cítrico 0,1 M	300 mL
Citrato de sódio 0,1 M	600 mL

3.13.14 Solução de parada de Glicina 0,2 M

Glicina	3,26 g
NaCl	2,53 g
NaOH 10 N	3,62 mL
Água destilada	q.s.p. 200 mL

3.14 Drogas e reagentes

Ácido acético glacial (Merck, Brasil)

Ácido fosfórico (Sigma Chemical Company, EUA)

Albumina Sérica Bovina (Amersham Biosciences, EUA)

Ácido Cítrico (Sigma Chemical Company, EUA)

Citrato de Sódio (Sigma Chemical Company, EUA)

Composto 48/80 (Sigma Chemical Company, EUA)

Cloreto de Cálcio (Sigma Chemical Company, EUA)

Cloreto de Magnésio (Sigma Chemical Company, EUA)
Cloreto de Potássio (Sigma Chemical Company, EUA)
Cloreto de Sódio (Sigma Chemical Company, EUA)
Cromoglicato de sódio (Sigma Chemical Company, EUA)
Difenidramina (Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA.)
Etanol p.a. (Merck, Brasil)
Gelatina (Labsynth, Brasil)
Giemsa metileno azul-eosina (Merck, Brasil)
Glicina (Amersham Biosciences, EUA)
Glucose (Sigma Chemical Company, EUA)
Heparina (Roche, Brasil)
Hidróxido de sódio (Sigma Chemical Company, EUA)
May-Grünwald metileno azul-eosina (Merck, Brasil)
Metanol (Merck, Brasil)
p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosamina (Sigma Chemical Company, EUA)
Paraformaldeído (Sigma Chemical Company, EUA)
Ranitidina (Sigma Chemical Company, EUA)
RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, EUA)
Sais (Merck, Alemanha)
Soro Fetal Bovino (Invitrogen, Brasil)
Tioperamida (Sigma Chemical Company, EUA)

4 RESULTADOS

4.1 Recrutamento leucocitário induzido por diferentes doses do veneno de *B. moojeni*

A atividade inflamatória do veneno de *Bothrops moojeni* (VBm) foi avaliada quanto ao recrutamento de leucócitos totais (**A**), de polimorfonucleares (**B**) e de mononucleares (**C**), para a cavidade peritoneal de camundongos, 6 horas após a sua injeção i.p., em diferentes doses, ou de solução fisiológica apirogênica (controle).

A Figura 1-A mostra o número de leucócitos totais na cavidade peritoneal dos animais. Em animais injetados com solução fisiológica apirogênica (controle), detectou-se um número médio de $5,4 \pm 0,7 \times 10^5$ leucócitos/mL. O VBm, na dose de $0,025 \mu\text{g/g}$, não causou alteração significativa do número de leucócitos, em comparação ao controle. Por outro lado, este veneno, nas doses de $0,1 \mu\text{g/g}$, $0,25 \mu\text{g/g}$ ou $0,5 \mu\text{g/g}$, causou um aumento do número dos leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal dos animais com valores médios de $19,5 \pm 1,9$, $18,7 \pm 1,8$ e $23,8 \pm 1,3 \times 10^5$ leucócitos/mL, respectivamente. Estes valores foram significativamente maiores quando comparados ao controle ou ao VBm, na dose de $0,025 \mu\text{g/g}$. Ainda, não houve diferença estatística entre estas três doses estudadas, quanto ao número de leucócitos totais recrutados. Por outro lado, na dose de $1 \mu\text{g/g}$, o veneno causou hemorragia local (dado não demonstrado) e, deste modo, o influxo de leucócitos, induzido por esta dose de veneno, não foi mensurado. Na Figura 1-B estão demonstrados os números de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), recrutados para a cavidade peritoneal dos camundongos, após a injeção i.p. do VBm, nas doses descritas acima ou de solução fisiológica apirogênica. Após 6 horas da injeção de solução fisiológica apirogênica, foi observado um número médio de $0,3 \pm 0,1 \times 10^5$ polimorfonucleares/mL, nos lavados peritoneais dos animais. O VBm, nas doses de $0,025$ e $0,1 \mu\text{g/g}$, não causou alteração significativa do número de PMNs, se comparado aos controles. Por outro lado, nas doses de $0,25$ e $0,5 \mu\text{g/g}$, o veneno causou um aumento significativo do influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN), com valores médios de $9,3 \pm 1$ e $11,7 \pm 3,1 \times 10^5$ PMN/mL, respectivamente, se comparados ao controle. Com relação ao número de leucócitos mononucleares (MNs), a Figura 1-C mostra que os animais controles apresentaram um número médio de $4,6 \pm 0,6 \times 10^5$ mononucleares/mL. A injeção do veneno causou um aumento significativo do número deste tipo celular na cavidade peritoneal, em todas as doses estudadas, se comparado ao controle. Não houve diferença estatística entre as doses do veneno analisadas.

A partir destes resultados, foi utilizada a dose de 0,25 μg de VBm/g para os estudos subsequentes, relacionadas ao recrutamento leucocitário induzido por este veneno.

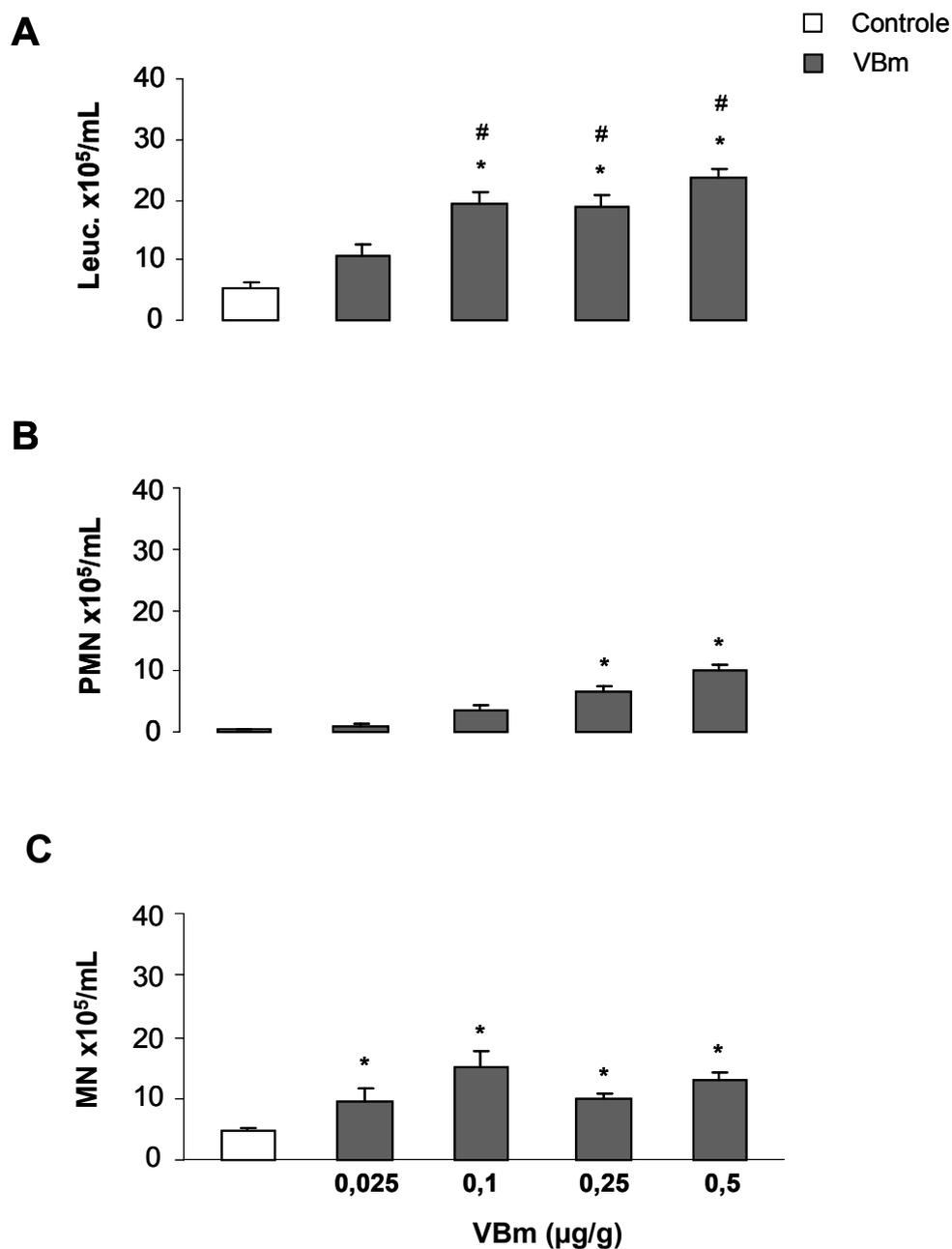


Figura 1. Número de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) na cavidade peritoneal de camundongos após injeção de diferentes doses de veneno de *B. moojeni*. O VBm, nas doses indicadas acima, ou solução fisiológica apirogênica (controle), em volume constante de 0,5 mL, foram injetados por via i.p., em camundongos. Decorridas 6 horas dessas injeções, os animais foram mortos e o lavado peritoneal foi coletado para contagem dos leucócitos totais, polimorfonucleares e mononucleares, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 – 6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ em relação ao VBm 0,025 $\mu\text{g}/\text{g}$ (ANOVA).

4.2 Decurso temporal do recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de *B. moojeni*

O recrutamento leucocitário, para a cavidade peritoneal de camundongos, foi avaliado em diferentes períodos de tempo (1 – 72 horas) após a injeção de VBm (0,25 µg/g, i.p.) ou de solução fisiológica apirogênica (controle).

A Figura 2 mostra o número de leucócitos totais (**A**), de polimorfonucleares (**B**) e de mononucleares (**C**) presentes na cavidade peritoneal dos camundongos, em diferentes períodos de tempo após a injeção do VBm ou de solução fisiológica apirogênica. Nos animais controles (Figura 2-A), detectou-se um número médio de $4,4 \pm 0,4 \times 10^5$ leucócitos totais /mL, entre 1 e 24 horas e de $13,2 \pm 1,2 \times 10^5$ leucócitos totais /mL, entre 48 e 72 horas. A injeção i.p. de VBm induziu um aumento significativo do número global de leucócitos, na cavidade peritoneal dos camundongos, entre a 3^a e a 24^a hora de sua injeção. O influxo máximo ocorreu na 6^a hora após a injeção do veneno, período em que houve um aumento de cerca de 680 % do número de células, em relação ao respectivo controle. Com relação aos leucócitos PMNs, a Figura 2-B mostra que a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica causou o influxo médio de $0,32 \pm 0,04 \times 10^5$ PMN/mL, nos períodos de tempo avaliados. A injeção do VBm causou um aumento significativo do número dessas células entre a 3^a e a 6^a hora de sua injeção, se comparado aos controles, entretanto, não houve diferença estatística entre estes dois períodos de tempo, quando comparados entre si. A figura 2-C mostra que o grupo controle apresentou um número médio de $6,1 \pm 0,7 \times 10^5$ MN/mL, ao longo do tempo. A injeção do VBm causou um aumento significativo do número deste tipo celular, entre a 3^a e a 24^a hora de sua injeção, se comparado aos controles.

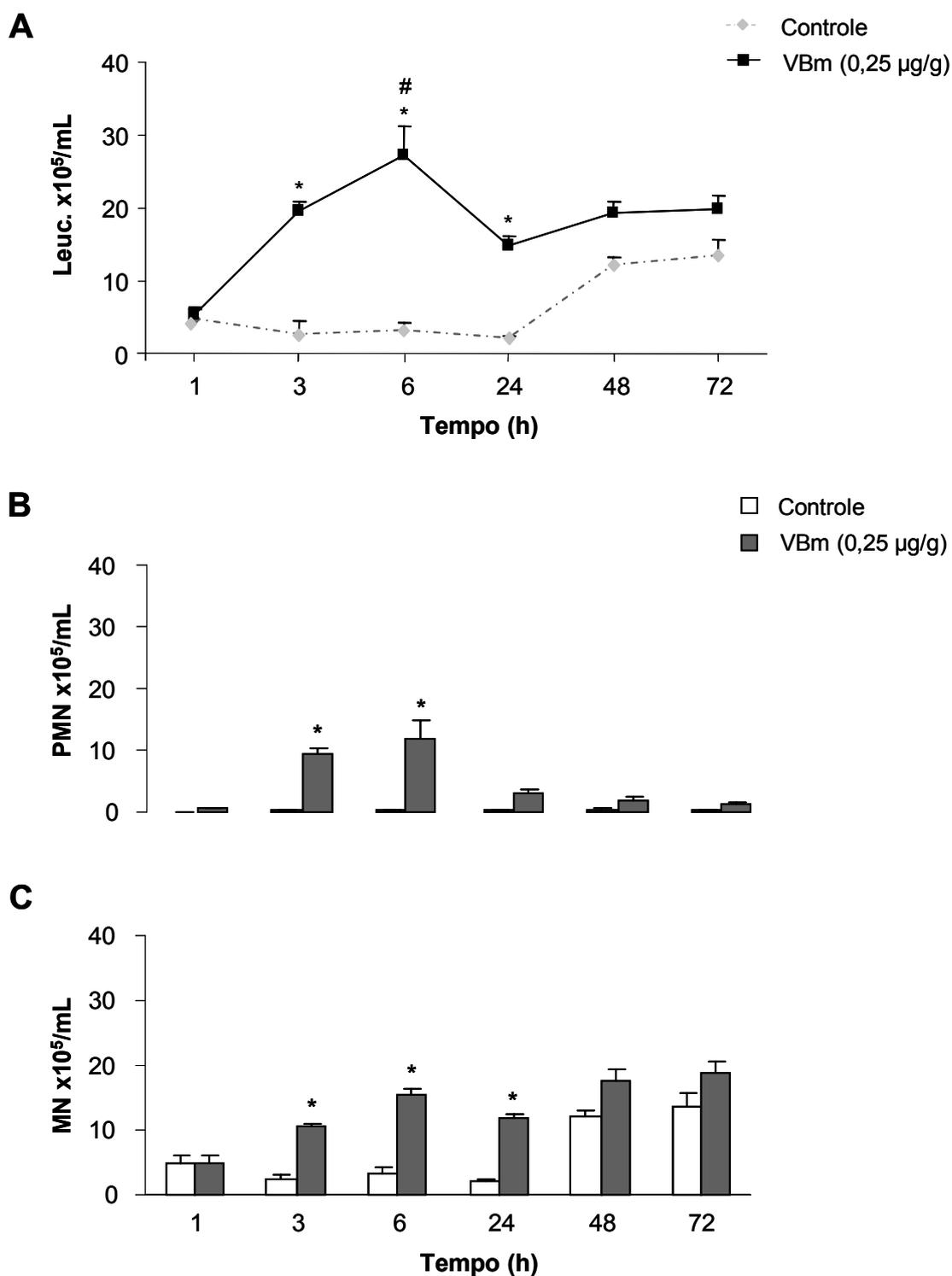


Figura 2. Perfil temporal do recrutamento de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) induzido pelo veneno de *B. moojeni*, na cavidade peritoneal de camundongos. O VBm, na dose de 0,25 µg/g, ou solução fisiológica apirogênica (controle), foram injetados nos animais, por via i.p., em volume constante de 0,5 mL. Decorrido os períodos de tempo indicados acima, realizou-se a coleta dos leucócitos por lavagem da cavidade peritoneal e as células foram contadas como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 – 6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo VBm 3 h (ANOVA).

4.3 Determinação do número de leucócitos circulantes após injeção do veneno de *B. moojeni*

O número de leucócitos circulantes, no sangue periférico dos animais foi avaliado em diferentes períodos de tempo após a injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (controle).

A Tabela 1 mostra a contagem total e diferencial de leucócitos circulantes, em diferentes períodos de tempo após a injeção i.p. do VBm. Os animais controles apresentaram valores médios de $48,6 \pm 1,0$, $57,7 \pm 2,1$ e $52,4 \pm 3,2 \times 10^5$ leucócitos totais/mL, após 1, 3 e 6 horas, respectivamente, da injeção de solução fisiológica apirogênica. Os animais que foram injetados com o VBm (0,25 µg/g) apresentaram valores médios de $55,7 \pm 1,4$, $68,5 \pm 2,8$ e $58,7 \pm 3,6 \times 10^5$ leucócitos totais/mL, nos períodos de 1, 3 e 6 horas, respectivamente, que não diferiram estatisticamente dos respectivos controles. Também não houve diferença estatística entre o número basal de leucócitos e aqueles obtidos após as injeções de solução fisiológica apirogênica ou do VBm (dados não demonstrados). Com relação ao número de neutrófilos, os animais controles apresentaram valores médios de $9 \pm 0,8$, $6,9 \pm 0,3$ e $8 \pm 1,5 \times 10^5$ células/mL, nos períodos de 1, 3 e 6 horas, respectivamente, após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica. Quando os animais receberam injeção i.p. do VBm, houve um aumento marcante do número deste tipo celular, na 3ª hora após a injeção do veneno ($27,2 \pm 3,5 \times 10^5$ neutrófilos/mL), que foi estatisticamente significativo, se comparado ao controle ou ao seu basal. A injeção do VBm não afetou o número de neutrófilos circulantes após 1 e 6 horas de sua injeção, em comparação aos controles ou aos respectivos valores basais. Quanto ao número de macrófagos, os animais controles apresentaram uma média de $38,2 \pm 2$, $48,5 \pm 6$ e $41,6 \pm 9$, nos períodos de 1, 3 e 6 horas, respectivamente, após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica. Quanto ao número de células T, os animais apresentaram uma média de $1,4 \pm 0,4$, $2,3 \pm 0,8$, $2,8 \pm 1$, nos períodos de 1, 3 e 6 horas, respectivamente, após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica. A injeção i.p. do VBm não afetou o número de macrófagos ou de células T circulantes em nenhum dos períodos de tempo avaliados, quando comparados aos controles e aos respectivos valores basais. A presença de eosinófilos e basófilos não foi detectada nos esfregaços dos animais controles nem dos animais injetados com o VBm.

Tabela 1. Efeito do VBm no número de leucócitos circulantes no sangue periférico.

Tempo		Leucócitos (x10 ⁵ /mL)					
		Total	Neutrófilos	Basófilos	Eosinófilos	Macrófagos	Células T
1 h	Controle	48,6 ± 1,0	9,0 ± 0,8	0	0	38,2 ± 2,0	1,4 ± 0,4
	VBm	55,7 ± 1,4	7,0 ± 0,6	0	0	46,5 ± 3,1	2,2 ± 0,5
3 h	Controle	57,7 ± 2,1	6,9 ± 0,3	0	0	48,5 ± 6,0	2,3 ± 0,8
	VBm	68,5 ± 2,8	27,2 ± 3,5 *	0	0	40 ± 5,0	1,3 ± 0,7
6 h	Controle	52,4 ± 3,2	8,0 ± 1,5	0	0	41,6 ± 9,0	2,8 ± 1,0
	VBm	58,7 ± 3,6	13 ± 2,7	0	0	44,5 ± 9,2	1,2 ± 0,9

O VBm, na dose de 0,25 µg/g, ou solução fisiológica apirogênica (controle), em volume constante de 0,5 mL, foram injetados nos animais, por via i.p. A determinação dos leucócitos circulantes foi realizada 24 h antes (basal) e 1, 3 ou 6 horas após essas injeções, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA).

4.4 Participação dos mastócitos no influxo leucocitário induzido pelo veneno de *B. moojeni*

Para este estudo, grupos de animais foram pré-tratados com cromoglicato (25 mg/kg, i.v.), um inibidor da desgranulação de mastócitos, ou seu veículo (controle), 30 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (controle basal). Adicionalmente, um grupo de animais foi tratado cromoglicato, 30 minutos antes da injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle do fármaco).

A Figura 3 mostra o número de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares, recrutados para a cavidade peritoneal de camundongos após 6 (A, B e C) ou 24 horas (D, E e F) da injeção i.p. do VBm, em animais tratados ou não com o cromoglicato. Após 6 horas da injeção i.p. do VBm, os animais, apresentaram um aumento do número de leucócitos totais ($21,3 \pm 1,4 \times 10^5$ leucócitos/mL), que foi estatisticamente significativo, em relação ao basal ($8,3 \pm 0,2 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com cromoglicato aboliu o recrutamento de leucócitos totais ($8,1 \pm 0,6 \times 10^5$ leucócitos/mL), induzido pelo VBm, se comparado ao controle e atingiu valores basais. Quanto ao número de PMNs, os animais injetados com VBm apresentaram um aumento significativo deste tipo celular ($8,7 \pm 1,2 \times 10^5$ PMNs/mL), em relação ao basal ($1,7 \pm 0,5 \times 10^5$ PMNs/mL). O pré-tratamento dos animais com o cromoglicato aboliu o recrutamento de PMNs ($1,4 \pm 0,7 \times 10^5$ PMN/mL), induzido pelo VBm, em relação ao controle, atingindo os níveis basais. Em relação aos leucócitos mononucleares, os animais injetados com VBm apresentaram um aumento do número de MNs ($9,6 \pm 0,3 \times 10^5$ leucócitos/mL), que foi estatisticamente significativo, em relação ao basal ($6,9 \pm 0,6 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com cromoglicato inibiu, de forma significativa, o recrutamento de MNs ($6,6 \pm 0,4 \times 10^5$ leucócitos/mL), induzido pelo VBm, se comparado ao controle, atingindo valores basais. O tratamento dos animais com o cromoglicato não alterou o número de células residentes (leucócitos totais, PMNs e MNs), de animais injetados i.p. com solução fisiológica apirogênica, em relação ao controle basal.

No período de 24 horas após a injeção i.p. do VBm, os animais apresentaram um aumento significativo do número de leucócitos ($20,2 \pm 1,7 \times 10^5$ leucócitos/mL), se comparado ao controle basal ($9,3 \pm 4 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com o cromoglicato não alterou o número de leucócitos totais ($20,6 \pm 2,5 \times 10^5$ leucócitos/mL), induzido pelo VBm, se comparado ao controle. O número basal de leucócitos PMNs foi de $0,9 \pm 0,6 \times 10^5$ leucócitos/mL. O VBm não alterou o número deste tipo celular 24 horas após

sua injeção, como já descrito anteriormente. Por outro lado, a injeção do VBm causou um recrutamento de MNs, de $18,7 \pm 1,7 \times 10^5$ leucócitos/mL, que foi estatisticamente significativo em relação ao controle basal ($8,4 \pm 3,5 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com o cromoglicato não alterou o número de MNs recrutados pelo VBm, 24 horas após a sua injeção. Os animais tratados com cromoglicato apenas não apresentaram diferenças do número de leucócitos totais, PMNs e MNs, se comparados aos controles basais.

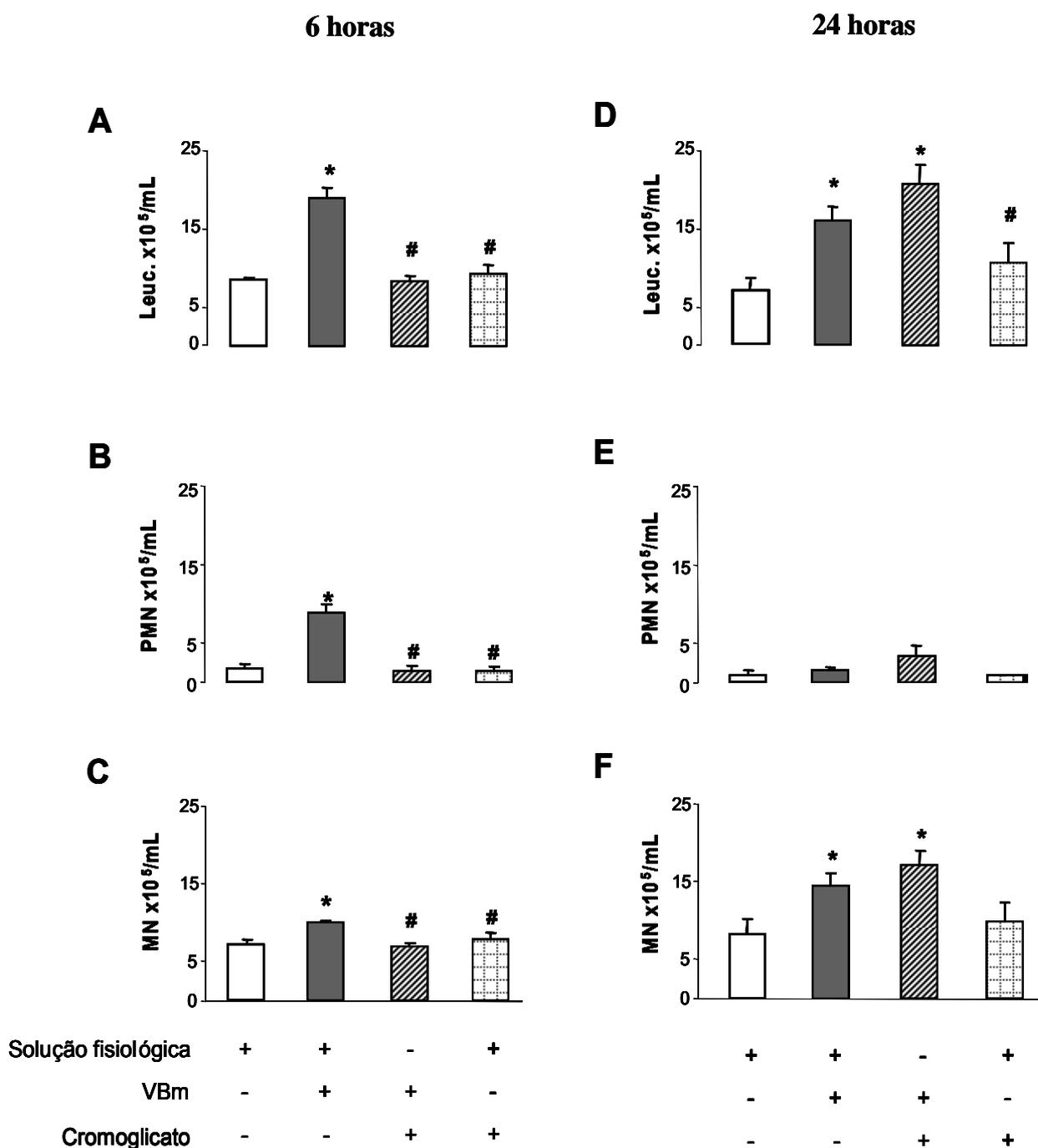


Figura 3. Efeito do tratamento com o cromoglicato no influxo de leucócitos totais, de polimorfonucleares e de mononucleares coletados 6 (A, B e C) ou 24 horas (D, E e F) após a injeção do veneno de *B. moojeni* na cavidade peritoneal de camundongos. Grupos de animais foram tratados com cromoglicato de sódio (25 mg/kg, i.v.) ou solução fisiológica apirogênica (controle), 30 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (basal). O número total de leucócitos foi determinado em lavados peritoneais coletados 6 (A, B e C) ou 24 horas (D, E e F) após a injeção do VBm, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 – 6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo basal; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo VBm (ANOVA).

4.5 Participação da histamina, via ativação dos receptores H₁, no recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de *B. moojeni*

Para este estudo, grupos de animais foram pré-tratados com a difenidramina (10 mg/kg, i.v.), um antagonista dos receptores H₁, ou seu veículo (controle), 10 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (controle basal). Adicionalmente, um grupo de animais foi tratado a difenidramina, 10 minutos antes da injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle do fármaco).

A Figura 4 mostra o número de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) recrutados para a cavidade peritoneal de camundongos, após 6 horas da injeção i.p. do VBm, em animais tratados ou não com a difenidramina. Os animais injetados com o VBm, 10 minutos após o tratamento com solução fisiológica apirogênica, apresentaram um aumento do número de leucócitos na cavidade peritoneal ($17,9 \pm 1,4 \times 10^5$ leucócitos/mL), que foi estatisticamente significante, em relação ao basal ($6 \pm 0,7 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com a difenidramina reduziu, significativamente, o recrutamento de leucócitos totais ($12 \pm 1,1 \times 10^5$ leucócitos/mL), induzido pelo VBm, se comparado ao controle. Com relação ao número de PMNs, os animais que receberam a injeção i.p. do VBm, 10 minutos após a administração de solução fisiológica apirogênica, apresentaram um aumento, estatisticamente significativo, do número de células ($6,1 \pm 0,9 \times 10^5$ PMN/mL), se comparado ao valor basal ($1,1 \pm 0,3 \times 10^5$ PMN/mL). O pré-tratamento dos animais com a difenidramina reduziu, significativamente, o recrutamento deste tipo celular ($2,8 \pm 0,4 \times 10^5$ leucócitos/mL). Quanto aos leucócitos MNs, a injeção i.p. do VBm, em animais tratados com solução fisiológica apirogênica, causou um aumento significativo do recrutamento deste tipo celular ($11,8 \pm 1,1 \times 10^5$ MN/mL), se comparado ao basal ($4,8 \pm 0,4 \times 10^5$ MN/mL). O tratamento dos animais com a difenidramina não afetou o número de MNs ($9,2 \pm 0,8 \times 10^5$ MN/mL), recrutado pelo VBm, se comparado ao controle. O tratamento dos animais com a difenidramina, em animais injetados i.p. com solução fisiológica apirogênica, não alterou o número de leucócitos totais, PMN e MN, em relação ao valor basal.

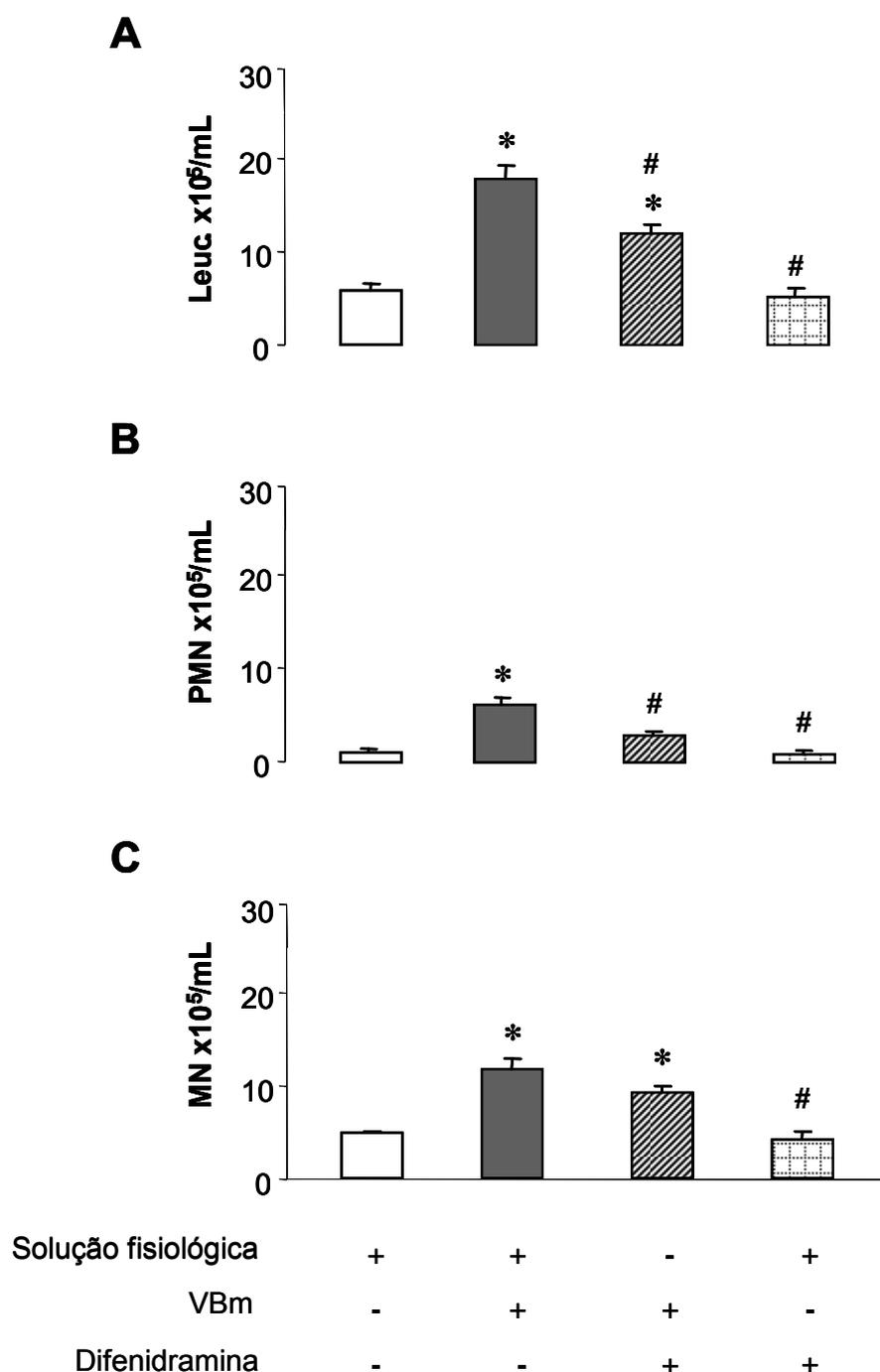


Figura 4. Efeito do tratamento com a difenidramina no influxo de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) induzido pelo veneno de *B. moojeni* na cavidade peritoneal de camundongos. Grupos de animais foram tratados com difenidramina (10 mg/kg, i.v.) ou com solução fisiológica apirogênica (10 mL/kg, i.v.), 10 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (controle basal). O número total de leucócitos foi determinado em lavados peritoneais coletados 6 horas após a injeção do VBm, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 – 6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo basal; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo VBm (ANOVA).

4.6 Participação da histamina, via ativação dos receptores H₂, no recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de *B. moojeni*

Neste estudo, grupos de animais foram pré-tratados com a ranitidina (10 mg/kg, i.v.), um antagonista dos receptores H₂, ou seu veículo (controle), 10 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (controle basal). Adicionalmente, um grupo de animais foi tratado a ranitidina, 10 antes da injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle do fármaco).

A Figura 5 mostra o número de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) recrutados para a cavidade peritoneal de camundongos, após 6 horas da injeção i.p. do VBm, em animais tratados ou não com a ranitidina. Com relação ao número de leucócitos totais, os animais controles, injetados com o VBm, 10 minutos após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica, apresentaram um aumento do número de leucócitos ($21,1 \pm 1,1 \times 10^5$ leucócitos/mL), que foi estatisticamente significante, se comparado ao grupo basal ($10 \pm 0,4 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com a ranitidina não afetou o influxo de leucócitos totais ($16,5 \pm 1,6 \times 10^5$ leucócitos/mL), induzido pelo VBm, se comparado ao controle. Com relação ao número de leucócitos PMNs, os animais que receberam a injeção i.p. do VBm, após o pré-tratamento com solução fisiológica apirogênica, apresentaram um aumento, estatisticamente significante, do número destas células ($9,2 \pm 0,5 \times 10^5$ PMN/mL), se comparado ao valor basal ($1,7 \pm 0,5 \times 10^5$ PMN/mL). O tratamento dos animais com a ranitidina causou uma redução, estatisticamente significativa, do número de leucócitos PMNs ($4,9 \pm 0,7 \times 10^5$ PMN/mL), induzido pelo VBm, em relação ao controle. Quanto aos leucócitos MNs, a injeção i.p. do VBm, após administração de solução fisiológica apirogênica causou um aumento significativo do recrutamento deste tipo celular ($11,9 \pm 1,2 \times 10^5$ MN/mL), se comparado ao basal ($8 \pm 0,1 \times 10^5$ MN/mL). O tratamento dos animais com a ranitidina não afetou o recrutamento de MNs ($11,6 \pm 1,4 \times 10^5$ MN/mL), induzido pelo VBm, em relação ao controle. O número de leucócitos totais, PMNs e MNs, em animais pré-tratados com a ranitidina e injetados i.p. com solução fisiológica apirogênica, não diferiu do número basal de leucócitos.

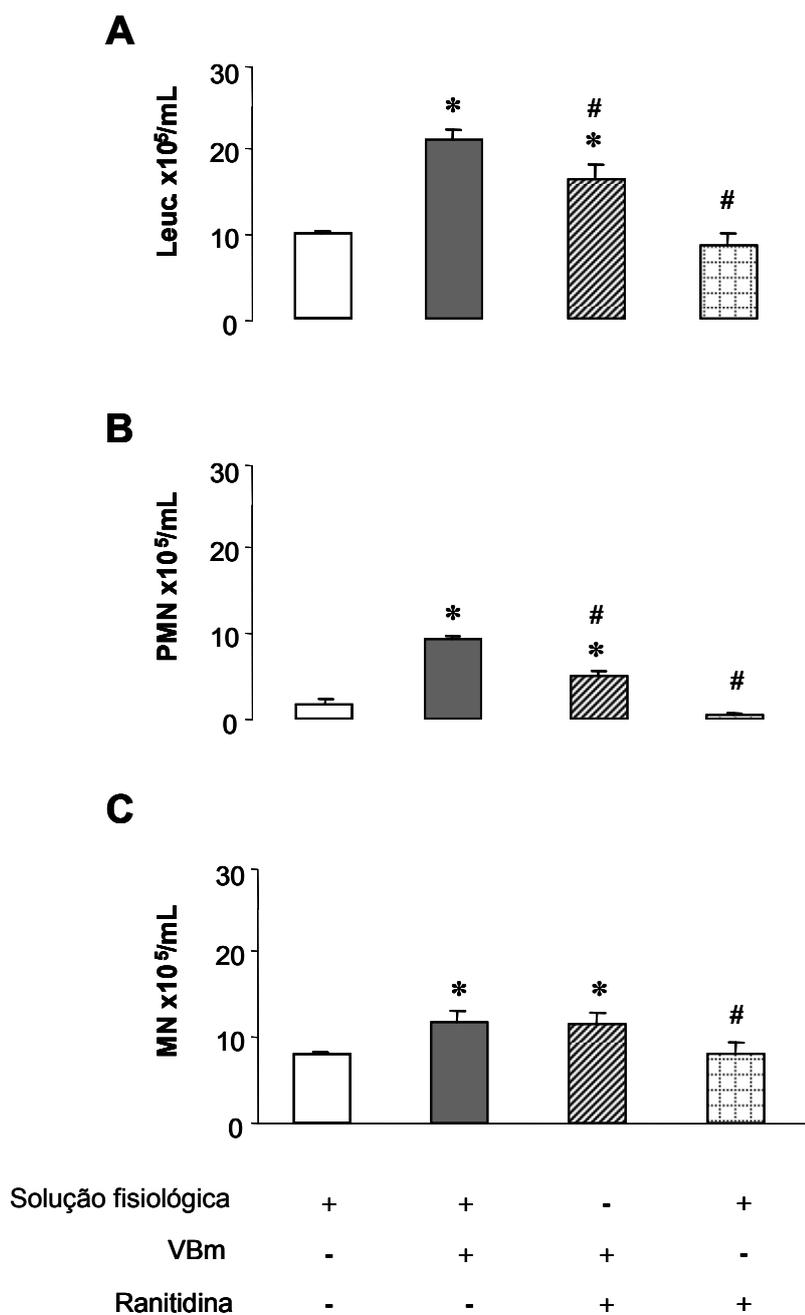


Figura 5. Efeito do tratamento com a ranitidina no influxo de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) induzido pelo veneno de *B. moojeni* na cavidade peritoneal de camundongos. Grupos de animais foram tratados com ranitidina (10 mg/kg, i.v.) ou com solução fisiológica apirogênica (10 mL/kg, i.v.), 10 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (basal). O número total de leucócitos foi determinado em lavados peritoneais coletados 6 horas após a injeção do VBm, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5 – 6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo basal; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo VBm (ANOVA).

4.7 Participação da histamina, via ativação dos receptores H₄, no recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de *B. moojeni*

Neste estudo, grupos de animais foram pré-tratados com a tioperamida (10 mg/kg, i.v.), um antagonista dos receptores H₃/H₄, ou seu veículo (controle), 20 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (controle basal). Ainda, um grupo de animais foi tratado a tioperamida, 20 antes da injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle do fármaco).

A Figura 6 mostra o número de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) recrutados para a cavidade peritoneal de camundongos após 6 horas da injeção i.p. do VBm, em animais tratados ou não com a tioperamida. A injeção i.p. do VBm, após o pré-tratamento dos animais com solução fisiológica apirogênica, causou um aumento do influxo leucocitário para a cavidade peritoneal dos animais ($46,1 \pm 6 \times 10^5$ leucócitos/mL), que foi estatisticamente significativa, quando comparado ao valor basal ($12 \pm 2,9 \times 10^5$ leucócitos/mL). O pré-tratamento dos animais com a tioperamida não afetou o recrutamento de leucócitos totais ($37,5 \pm 3 \times 10^5$ leucócitos/mL), induzido pelo VBm, se comparado ao grupo controle. Com relação ao número de leucócitos PMNs, os animais que receberam a injeção i.p. do VBm, após a administração de solução fisiológica apirogênica, apresentaram um aumento do número de polimorfonucleares ($22,1 \pm 3,6 \times 10^5$ PMN/mL), que foi estatisticamente significativo, se comparado ao valor basal ($1,5 \pm 0,8 \times 10^5$ PMN/mL). Quando os animais foram pré-tratados com a tioperamida ocorreu uma diminuição, marcante, no número de PMNs ($4,9 \pm 0,7 \times 10^5$ PMN/mL), induzido pelo VBm, se comparado ao controle. Quanto ao número de leucócitos MNs, a injeção i.p. do VBm, após administração de solução fisiológica apirogênica causou um aumento significativo do recrutamento deste tipo celular ($24 \pm 2,8 \times 10^5$ MN/mL), se comparado ao basal ($10,5 \pm 2,1 \times 10^5$ leucócitos/mL). O tratamento dos animais com a tioperamida não afetou o número de MNs ($26 \pm 1,2 \times 10^5$ leucócitos/mL), recrutado pelo VBm, em comparação ao controle. O número de leucócitos totais, PMNs e MNs, em animais pré-tratados com a tioperamida e injetados i.p. com solução fisiológica apirogênica, não diferiu do número basal de leucócitos.

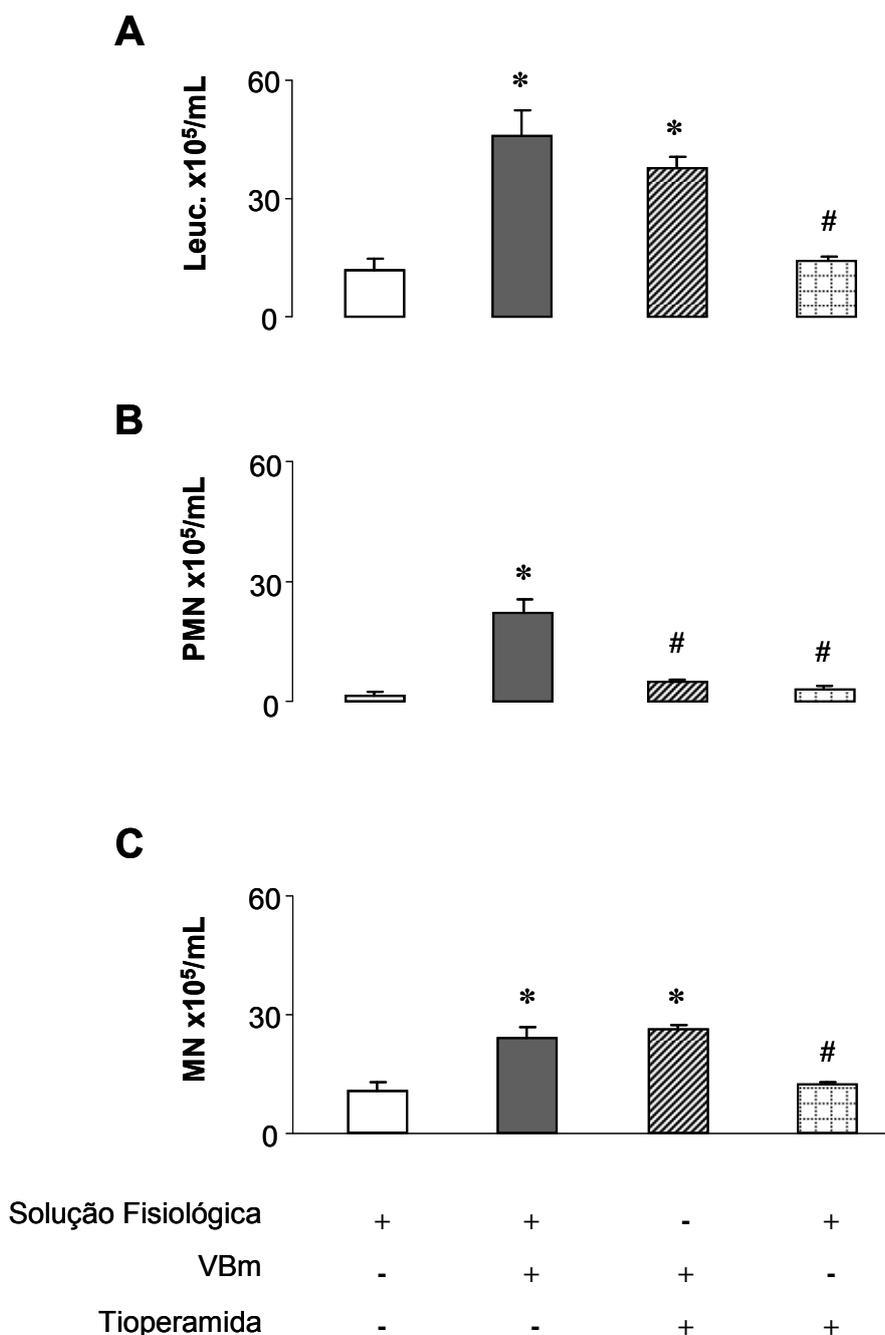


Figura 6. Efeito do tratamento com a tioperamida no influxo de leucócitos totais (A), de polimorfonucleares (B) e de mononucleares (C) induzido pelo veneno de *B. moojeni* na cavidade peritoneal de camundongos. Grupos de animais foram tratados com tioperamida (10 mg/kg, i.v.) ou com solução fisiológica apirogênica (10 mL/kg, i.v.), 20 minutos antes da injeção i.p. do VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (basal). O número total de leucócitos foi determinado em lavados peritoneais coletados 6 horas após a injeção do VBm, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo basal; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo VBm (ANOVA).

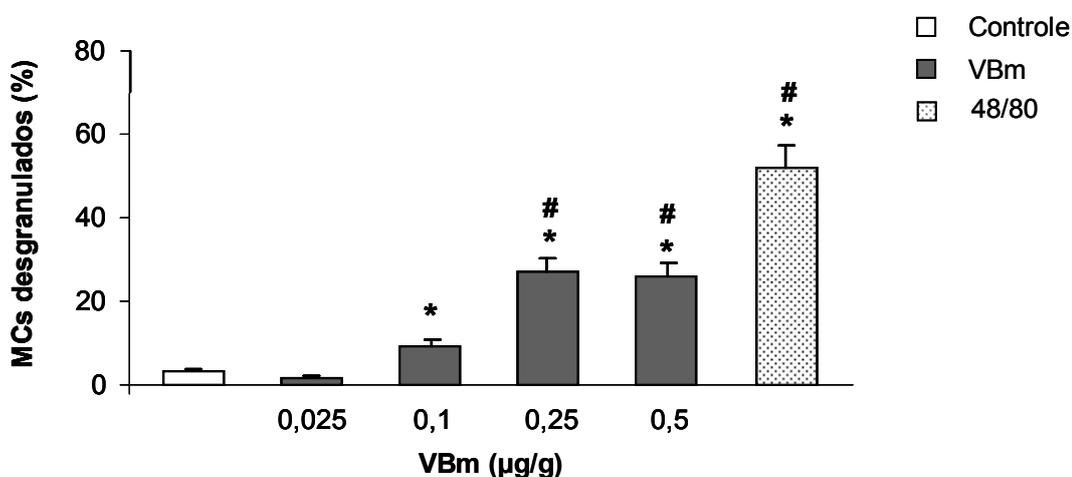
4.8 Efeito do VBm em mastócitos peritoneais *in vivo*: Indução da desgranulação

A capacidade do VBm induzir a desgranulação dos mastócitos (MCs) peritoneais *in vivo* foi avaliada após a sua injeção i.p., em diferentes doses, ou de solução fisiológica apirogênica (controle).

A Figura 7 mostra a desgranulação de mastócitos mesentéricos, induzida por doses crescentes do VBm, 10 minutos após sua injeção i.p. (A) e a cinética temporal deste efeito (B), induzido por uma dose única desse veneno. Os animais injetados com solução fisiológica apirogênica, 10 minutos após esta injeção, apresentaram uma porcentagem média de $3,3 \pm 0,3$ mastócitos desgranulados. Já a injeção i.p. do VBm causou um aumento da desgranulação dos mastócitos mesentéricos, a partir da dose de $0,1 \mu\text{g/g}$, com um percentual médio de $9,3 \pm 1,8$ MCs desgranulados. Este aumento foi estatisticamente significativo, se comparado ao controle. O efeito máximo do veneno, quanto à desgranulação dos mastócitos, ocorreu com a dose de $0,25 \mu\text{g/g}$, com um percentual médio de $27,2 \pm 3,1$ MCs desgranulados, se comparado ao controle. Entre as doses de $0,025$, $0,1$ e $0,25 \mu\text{g/g}$ do VBm, observou-se uma relação dose-efeito para a desgranulação dos mastócitos mesentéricos. Estas doses diferiram estatisticamente, quando comparadas entre si. O efeito do VBm, na dose de $0,025 \mu\text{g/g}$, não diferiu, estatisticamente, do controle. Ainda, como controle positivo da desgranulação dos mastócitos, grupos de animais foram injetados, por via i.p., com o composto 48/80 ($1 \mu\text{g/g}$), um polímero amplamente utilizado como desgranulador de mastócitos. Este composto causou a desgranulação percentual de $52 \pm 5,3$ MCs. Este efeito foi estatisticamente maior quando comparado ao controle e às diferentes doses do veneno.

A partir dos dados descritos anteriormente, foi escolhida a menor dose do VBm ($0,25 \mu\text{g/g}$), que causou o máximo efeito observado, para a avaliação do perfil temporal. Assim sendo, a desgranulação dos mastócitos foi avaliada em diferentes períodos de tempo após a injeção i.p. do VBm ou de solução fisiológica apirogênica (controle). A Figura 7-B mostra que animais controles, injetados com solução fisiológica apirogênica, apresentaram um percentual médio de $8,5 \pm 0,7$ MCs desgranulados, ao longo do tempo. A injeção i.p. do VBm causou um aumento da desgranulação dos mastócitos, que foi estatisticamente significativa, somente aos 10 minutos após sua injeção ($30,7 \pm 3,1$ MCs desgranulados), se comparado aos controles.

A



B

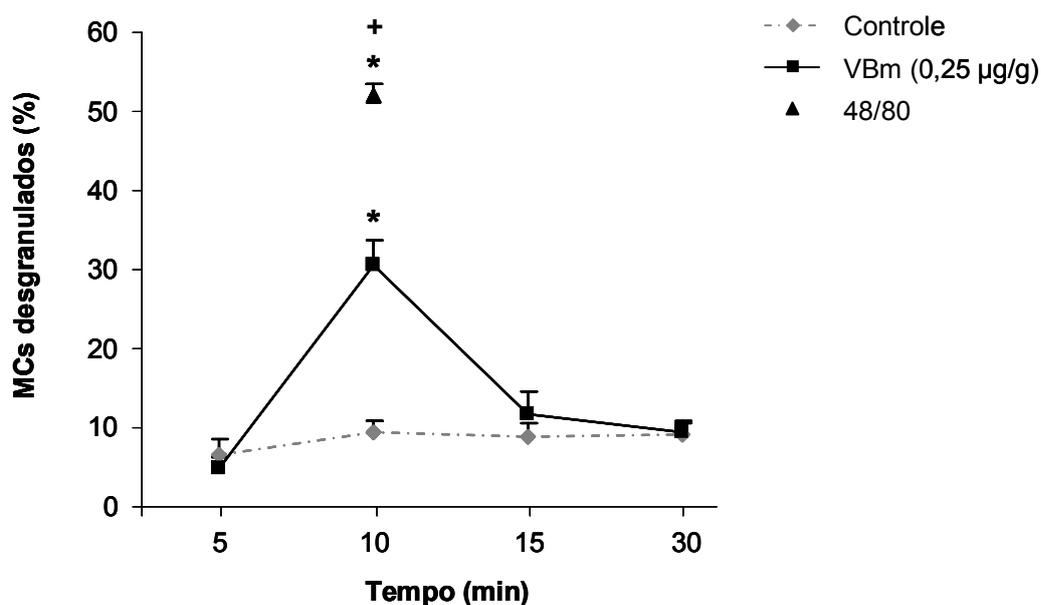
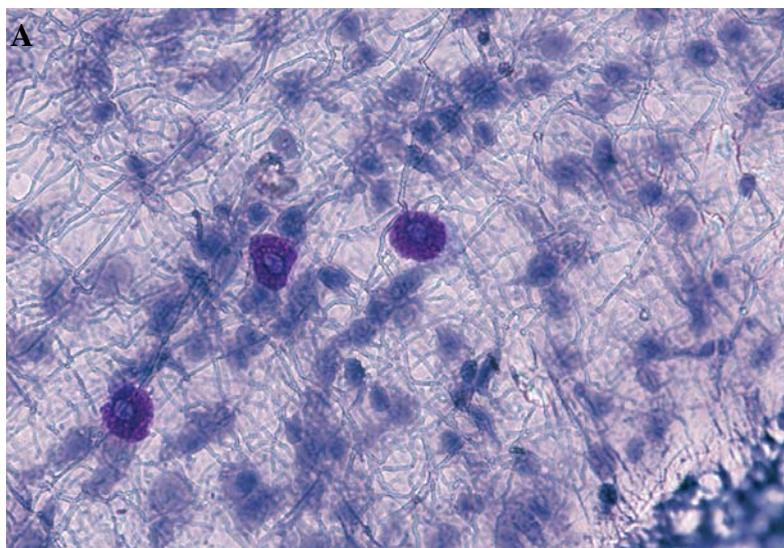


Figura 7. Desgranulação de mastócitos mesentéricos induzido pelo veneno de *B. moojeni* *in vivo*. O VBm, em doses crescentes (A), ou em dose única (B) ou solução fisiológica apirrogênica (controle), foram injetados, em volume constante de 0,5 mL, por via i.p.. Decorrido os períodos de tempo acima indicados, o mesentério dos animais foi retirado e processado para análise histológica. A desgranulação dos mastócitos mesentéricos foi avaliada sob microscopia de luz, como descrito em Material e Métodos. Em (A): a relação dose-efeito do VBm, nas doses indicadas acima e em (B): a cinética deste efeito, induzido por uma única dose do veneno. Os dados estão apresentados como porcentagem de mastócitos desgranulados e representam a média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao VBm 0,025 µg/g; + $p < 0,05$ em relação ao VBm 5 min (ANOVA dos valores percentuais convertidos em arco-seno).

4.8.1 Análise histológica dos mastócitos mesentéricos após a injeção do veneno de *B. moojeni*

A Figura 8 ilustra mastócitos mesentéricos 10 minutos após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle) ou de VBm, (0,25 µg/g). A fotomicrografia do tecido mesentérico dos animais controles (**A**) mostra a presença de mastócitos íntegros, de contorno bem delimitado e presença de grânulos basofílicos e metacromáticos, abundantes, no citoplasma destas células. Pode-se observar, ainda, ausência destes grânulos ao redor das células. Em contrapartida, o mesentério de animais injetados com o VBm (**B**) apresentou mastócitos com morfologia irregular e a presença de grânulos citoplasmáticos basofílicos externalizados, evidenciados principalmente ao redor dessas células.

CONTROLE



VBm (0,25 µg/g)

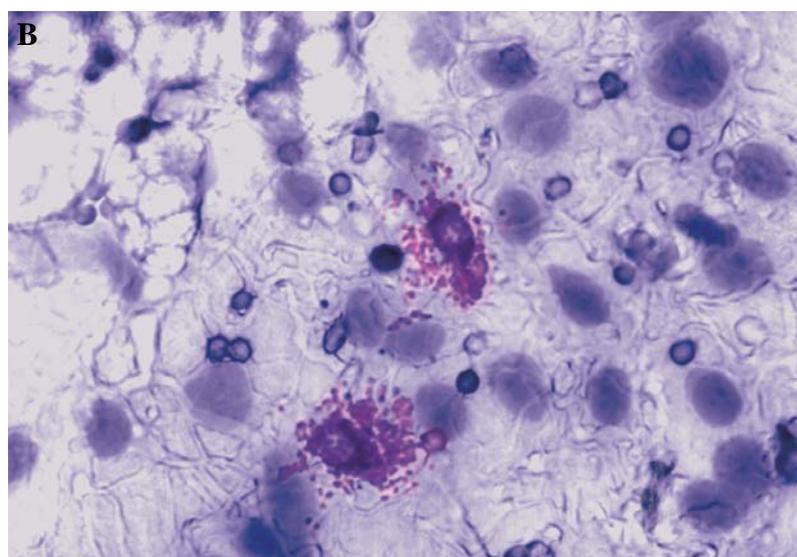


Figura 8. Fotomicrografia do tecido mesentérico evidenciando desgranulação de mastócitos induzida pelo veneno de *B. moojeni*. A desgranulação dos mastócitos mesentéricos foi avaliada 10 minutos após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle) ou do VBm (0,25 µg/g). O mesentério dos animais foi processado para análise histológica e a avaliação da desgranulação foi realizada sob microscopia de luz, como descrito em Material e Métodos. (A) controle: observa-se a presença de mastócitos não desgranulados; (B) animais injetados com VBm: nota-se a presença de mastócitos desgranulados. Figura representativa de 5 animais. Aumento: 200x

4.9 Liberação de PGD₂ induzida pelo veneno de *B. moojeni*

A concentração de PGD₂, um marcador da ativação de mastócitos (REDDY e HERSCHMAN, 1997), foi determinada no lavado peritoneal de animais, desde 5 até 60 minutos após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle) ou do VBm (0,25 µg/g). A Figura 9 mostra que animais controles apresentaram uma concentração de média de PGD₂ de 222 ± 24 pg/mL, no lavado peritoneal, entre 5 e 30 minutos após a injeção de solução fisiológica apirogênica. Após 60 minutos dessa injeção, a concentração média deste prostanóide foi de 567 ± 132 pg/mL. A injeção i.p. do VBm causou um aumento marcante da concentração da PGD₂, entre 5 e 30 minutos após sua injeção (concentração média de 861,1 ± 76 pg/mL). Este aumento na liberação da PGD₂, foi de 288 % e estatisticamente significativo em relação ao controle. Embora aos 60 minutos após a injeção do VBm tenha ocorrido uma tendência de aumento dos níveis de PGD₂, não houve diferença estatística em comparação ao respectivo controle.

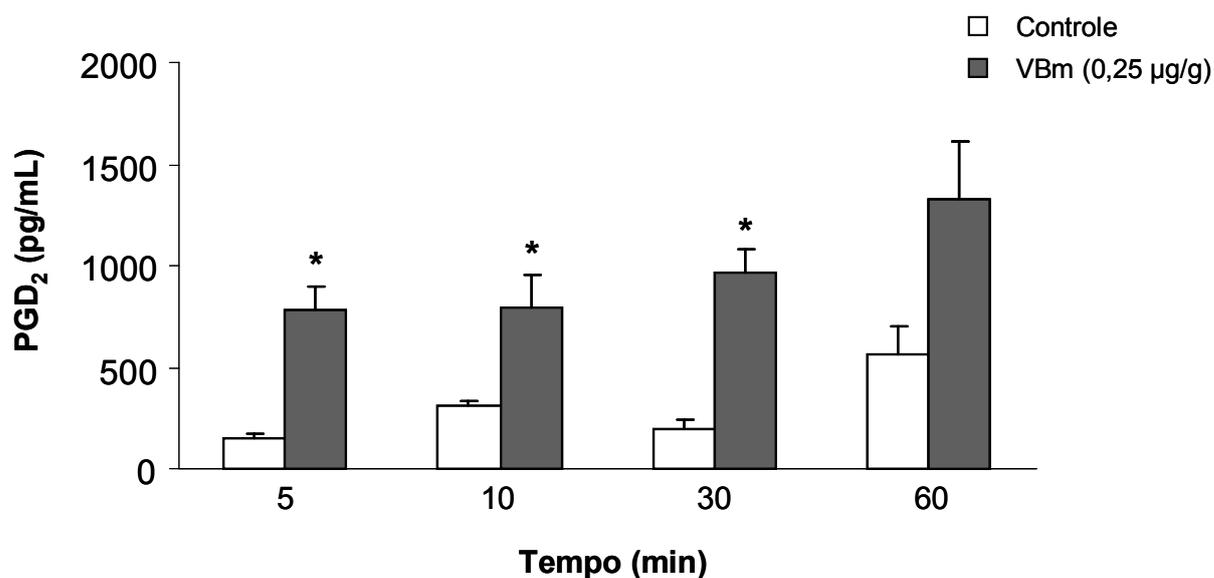


Figura 9. Liberação de PGD₂ induzida pelo veneno de *B. moojeni*. Os animais receberam injeção i.p. de VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (Controle). Decorridos os períodos de tempo indicados acima, realizou-se a coleta dos lavados peritoneais, para a determinação da concentração de PGD₂, por ensaio imunoenzimático (EIA), como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5-6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA).

4.10 Efeito do veneno de *B. moojeni* na viabilidade de mastócitos murinos, em cultura

A viabilidade dos mastócitos murinos, da linhagem PT18, em cultura, foi determinada após incubação das células com diferentes concentrações do VBm ou de seu veículo (controle), por 1 hora.

A Figura 10 mostra que o VBm, nas concentrações de 1, 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$, não alterou a viabilidade dos mastócitos (média de 92 % de viabilidade), se comparado ao controle (média de 93 % de viabilidade). No entanto, esse veneno, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, causou diminuição significativa da viabilidade celular em cerca de 30 % dessas células.

A partir destes resultados, a dose de 50 $\mu\text{g/mL}$ do VBm foi descartada para os ensaios subsequentes.

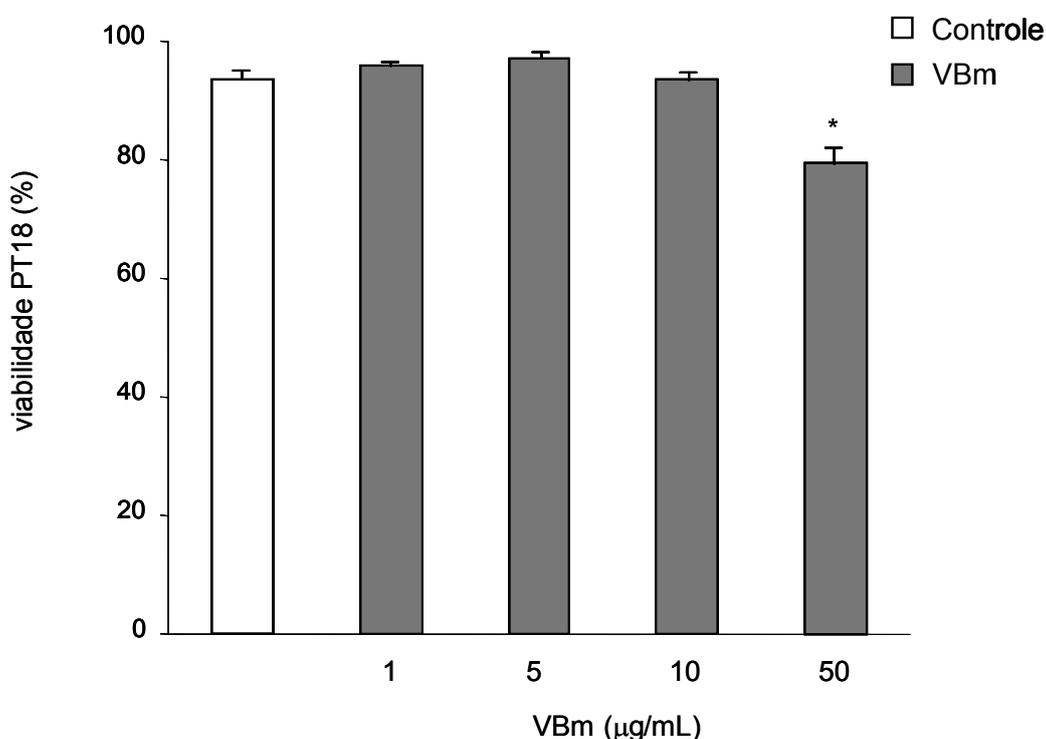


Figura 10. Efeito do veneno de *B. moojeni* na viabilidade de mastócitos *in vitro*. Os mastócitos (8×10^5 células/poço) foram mantidos em meio de cultura, em placas de 96 poços. O VBm, em diferentes concentrações (1, 5, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) ou seu veículo, tampão Tyrodes (controle), foram incubados com os mastócitos, a 37 °C, por 1 hora. A viabilidade dos mastócitos foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripán, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA).

4.11 Liberação de β -hexosaminidase de mastócitos em cultura após incubação com o veneno de *B. moojeni*

A desgranulação de mastócitos da linhagem PT18 foi avaliada pela liberação da enzima β -hexosaminidase, um marcador da desgranulação de mastócitos (HOHMAN e DRESKIN, 2001), a partir de culturas de mastócitos PT18 1 hora após a incubação com concentrações não citotóxicas do VBm (1, 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$) ou com tampão Tyrodes (controle). Neste ensaio, o composto 48/80 (10 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como controle positivo da desgranulação das células.

A Figura 11 mostra que as células controles, incubadas somente com tampão apresentaram uma liberação de β -hexosaminidase de $11,3 \pm 0,3 \%$. A incubação das células com o VBm causou um aumento da liberação dessa enzima, a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ ($19,9 \pm 1,3 \%$), que foi estatisticamente significativo, se comparado ao controle. Essa concentração do VBm foi a que causou efeito máximo na desgranulação dos mastócitos. A incubação dos mastócitos com o composto 48/80 resultou em aumento da liberação da β -hexosaminidase, que foi estatisticamente significativo se comparado ao controle ou ao VBm.

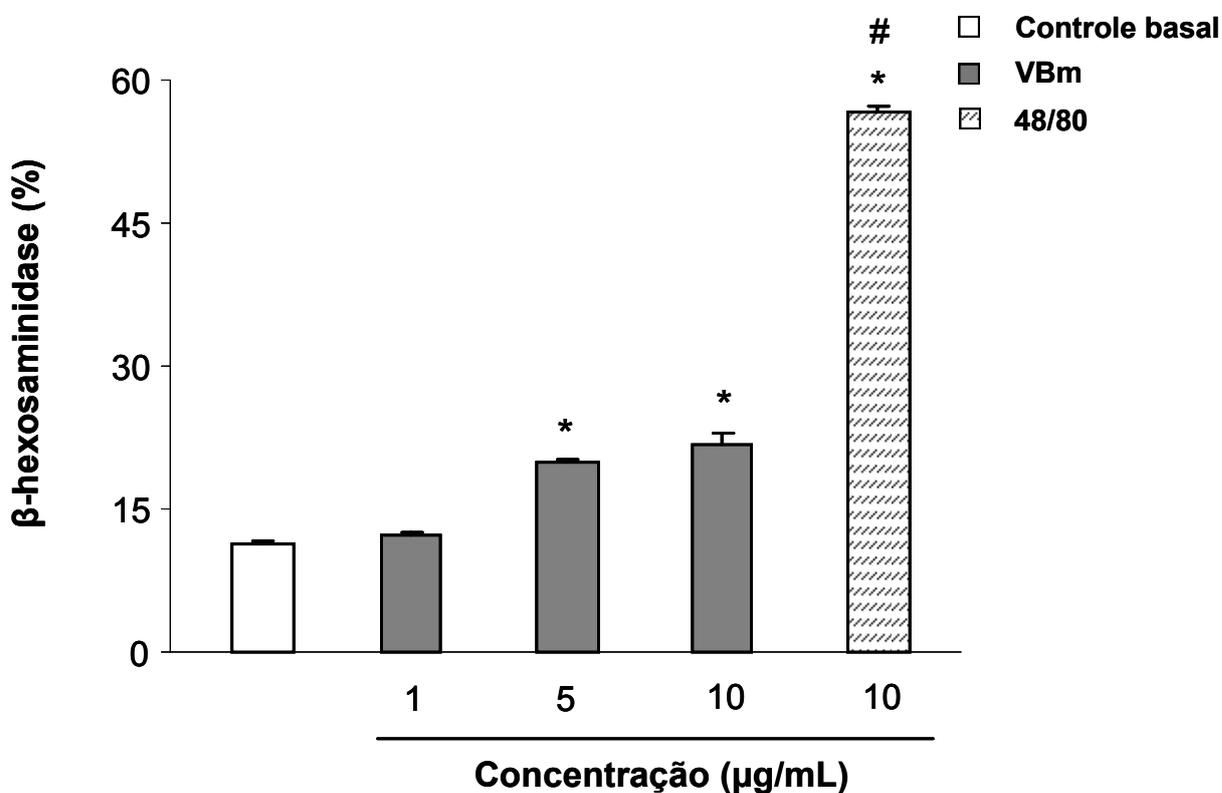


Figura 11. Efeito da incubação do veneno de *B. moojeni* em mastócitos murinos da linhagem PT18. Os mastócitos (8×10^5 células/poço) foram incubados em placas de 96 poços. O VBm, em diferentes concentrações (1, 5, 10 µg/mL), o composto 48/80 (10 µg/mL) ou o tampão Tyrode (controle basal) foram incubados com os mastócitos por 1 hora. Decorrido este período de tempo, a liberação de β-hexosaminidase foi avaliada por ensaio colorimétrico, como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao VBm 5 µg/mL (ANOVA).

4.12 Liberação de TXB₂ induzida pelo veneno de *B. moojeni*

A concentração do tromboxano B₂ (metabólito estável do tromboxano A₂) foi avaliada no lavado peritoneal dos animais, desde 10 minutos até 24 horas após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle) ou do VBm (0,25 µg/g). A Figura 12 mostra que os animais do grupo controle apresentaram uma concentração média de 1278 ± 96,2 pg/mL de TXB₂, entre 10 minutos e 24 horas após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica. A injeção i.p. do VBm causou um aumento da concentração de TXB₂, dos 10 aos 60 minutos após sua injeção (2364 ± 170,2 e 2828,5 ± 112,6 pg/mL, aos 10 e 30 minutos, respectivamente), que foi significativo em relação aos respectivos controles, máximo na 1ª hora (3953,3 ± 228,3 pg/mL). A partir da 3ª hora de injeção do veneno, a concentração de TXB₂ não diferiu, estatisticamente, dos valores controles.

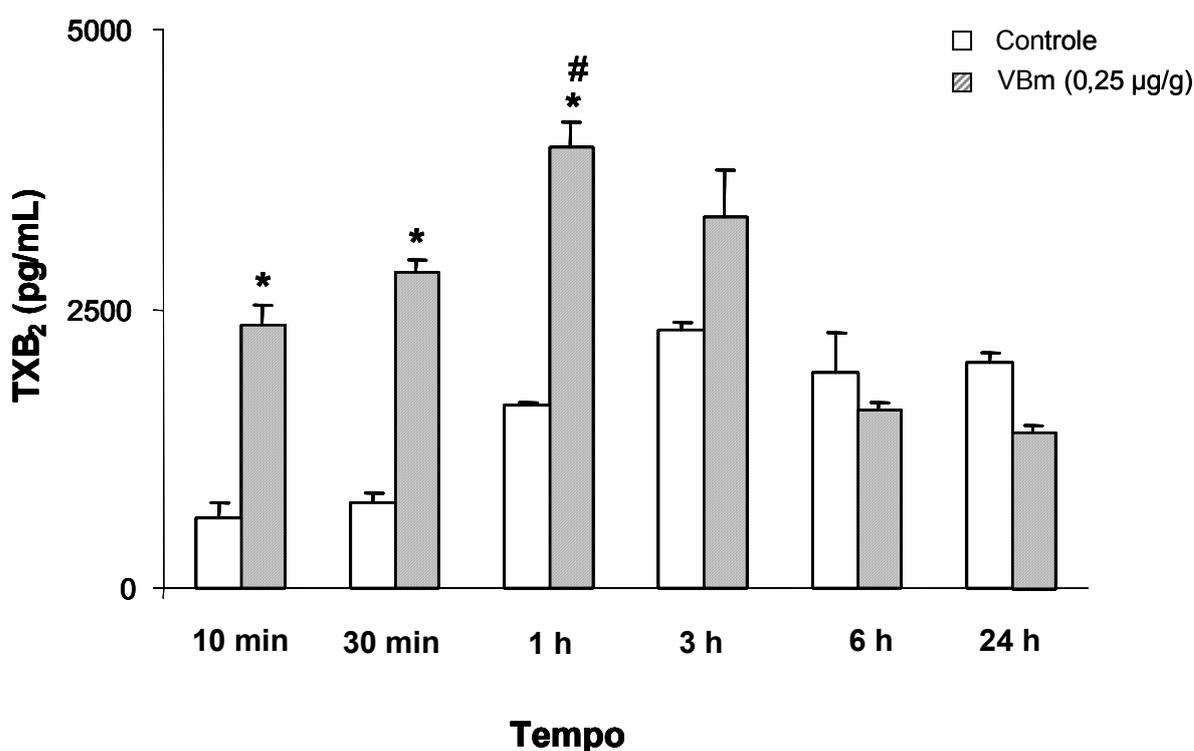


Figura 12. Liberação de TXB₂ induzida pelo veneno de *B. moojeni*. Os animais receberam injeção i.p. de VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (Controle). Decorridos os períodos de tempo indicados acima, realizou-se a coleta dos lavados peritoneais para a determinação da concentração de TXB₂, por ensaio imunoenzimático (EIA), como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5-6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ em relação ao grupo VBm 30 min. (ANOVA).

4.13 Liberação de LTB₄ induzida pelo veneno de *B. moojeni*

Os níveis de LTB₄ foram mensurados no lavado peritoneal dos animais desde 30 minutos até 24 horas após injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle) ou do VBm (0,25 µg/g). A Figura 13 mostra que os animais do grupo controle apresentaram uma concentração média de 451,4 ± 63,7 pg/mL de LTB₄, ao longo do período do tempo estudado. A injeção i.p. de VBm causou um aumento significativo da liberação de LTB₄ na 6ª hora após sua injeção (2368,2 ± 353,7 pg/mL), se comparado ao controle. Nos demais períodos de tempo avaliados, a liberação desse mediador, pelo VBm, não foi estatisticamente diferente dos controles.

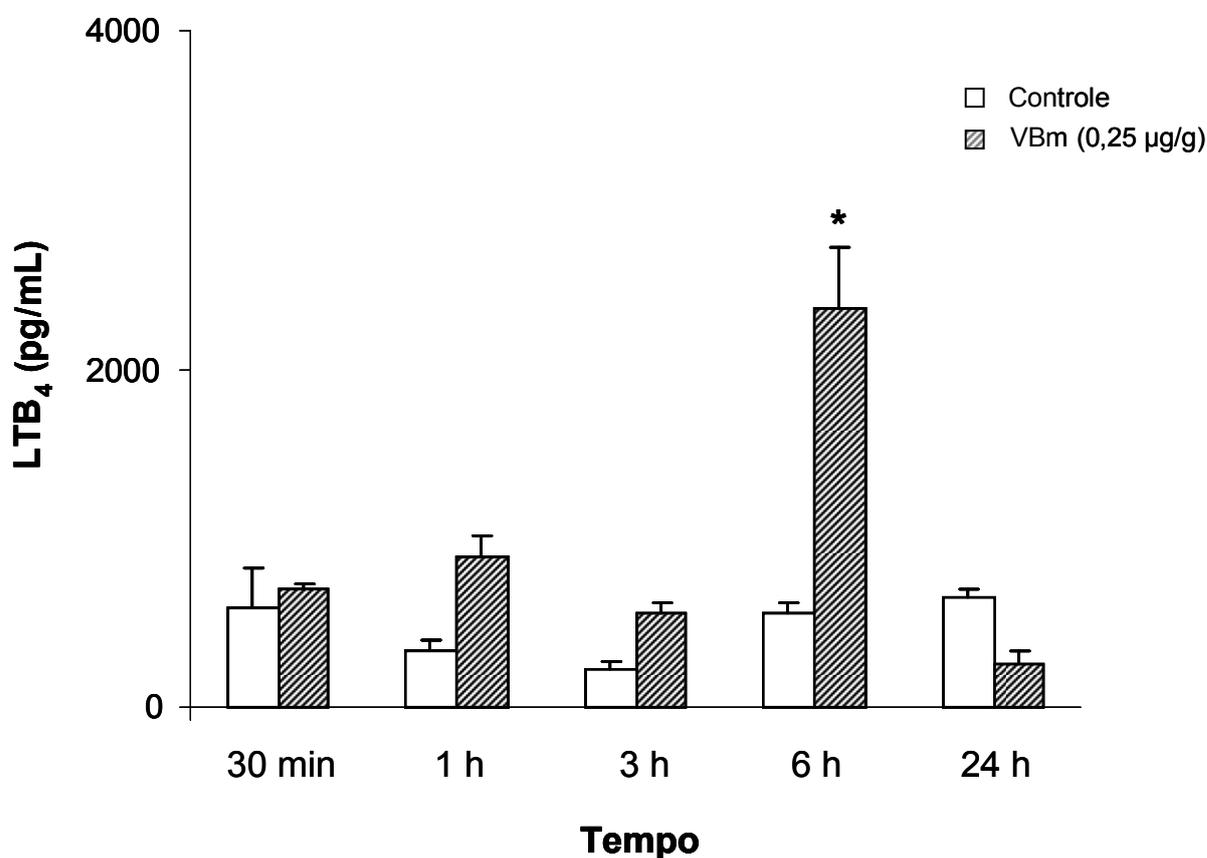


Figura 13. Liberação de LTB₄ induzida pelo veneno de *B. moojeni*. Os animais receberam injeção i.p. de VBm (0,25 µg/g) ou solução fisiológica apirogênica (Controle). Decorridos os períodos de tempo indicados acima, realizou-se a coleta dos lavados peritoneais para a determinação da concentração de LTB₄, por ensaio imunoenzimático (EIA), como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 4-5 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA).

4.14 Liberação de KC induzida pelo veneno de *B. moojeni*

Os níveis de KC (*Keratinocyte derived Chemokine* ou CXCL1) foram mensurados no lavado peritoneal dos animais desde 10 minutos até 24 horas após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle) ou do VBm (0,25 µg/g). A Figura 14 mostra que os animais do grupo controle apresentaram uma concentração média de $1,8 \pm 0,2$ ng/mL de KC, ao longo do período do tempo estudado. A injeção i.p. de VBm causou um aumento significativo da liberação dessa quimiocina entre 30 minutos e 1 hora de sua injeção, com efeito máximo aos 30 minutos ($43,8 \pm 3,1$ ng/mL), se comparado ao controle. Nos demais períodos de tempo avaliados, a liberação desse mediador, pelo VBm, não foi estatisticamente diferente dos controles.

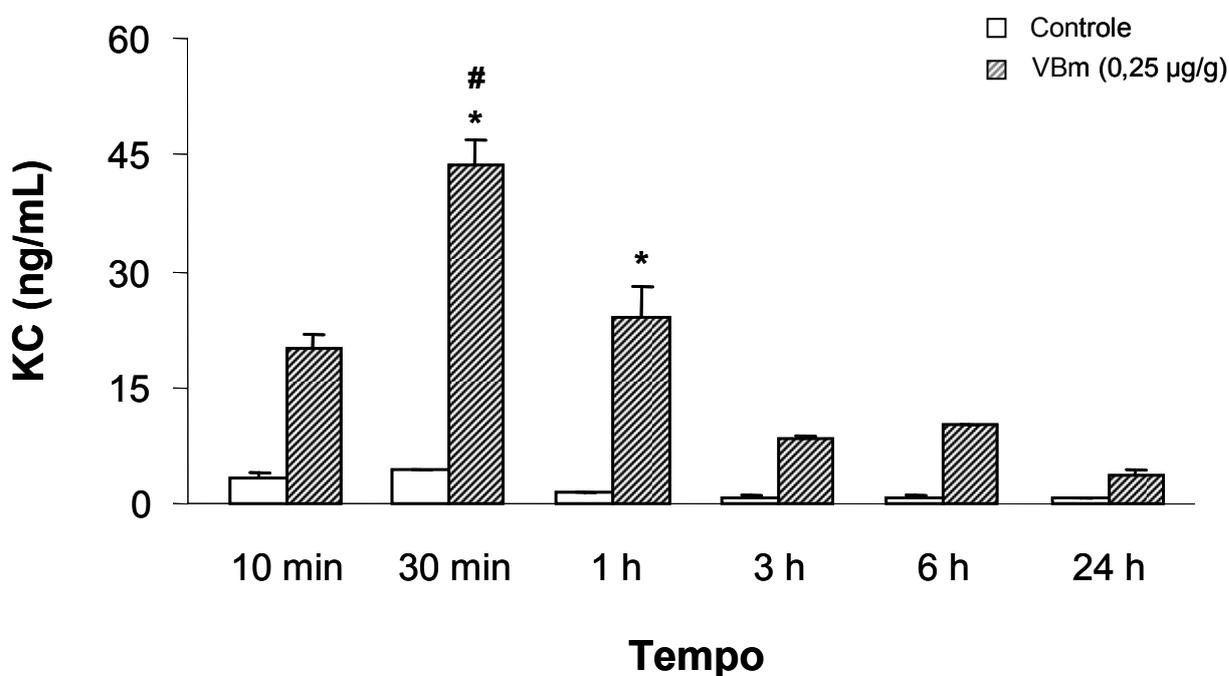


Figura 14. Liberação de KC induzida pelo veneno de *B. moojeni*. Os animais receberam injeção i.p. de VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (Controle). Decorridos os períodos de tempo indicados acima, realizou-se a coleta dos lavados peritoneais para a determinação da concentração de KC, por ensaio imunoenzimático (EIA), como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 5 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao VBm 1 h (ANOVA).

4.15 Liberação de MCP-1 induzida pelo veneno de *B. moojeni*

A liberação da quimiocina *MonocyteChemoatctic Protein – 1* (MCP-1 ou CCL2) foi avaliada no lavado peritoneal dos animais desde 30 minutos até 24 horas após a injeção i.p. de solução fisiológica apirogênica (controle) ou do VBm (0,25 µg/g). A Figura 15 mostra que os animais do grupo controle apresentaram uma concentração média de $578,3 \pm 90,7$ pg/mL de MCP-1, ao longo do tempo estudado. A injeção do VBm causou um aumento dos níveis de desta quimiocina, a partir da 1ª hora ($2142,3 \pm 117$ pg/mL), com liberação máxima na 3ª hora de injeção ($5924,4 \pm 911$ pg/mL). Estes valores foram estatisticamente significantes se comparados aos seus respectivos controles ou quando comparados entre si.

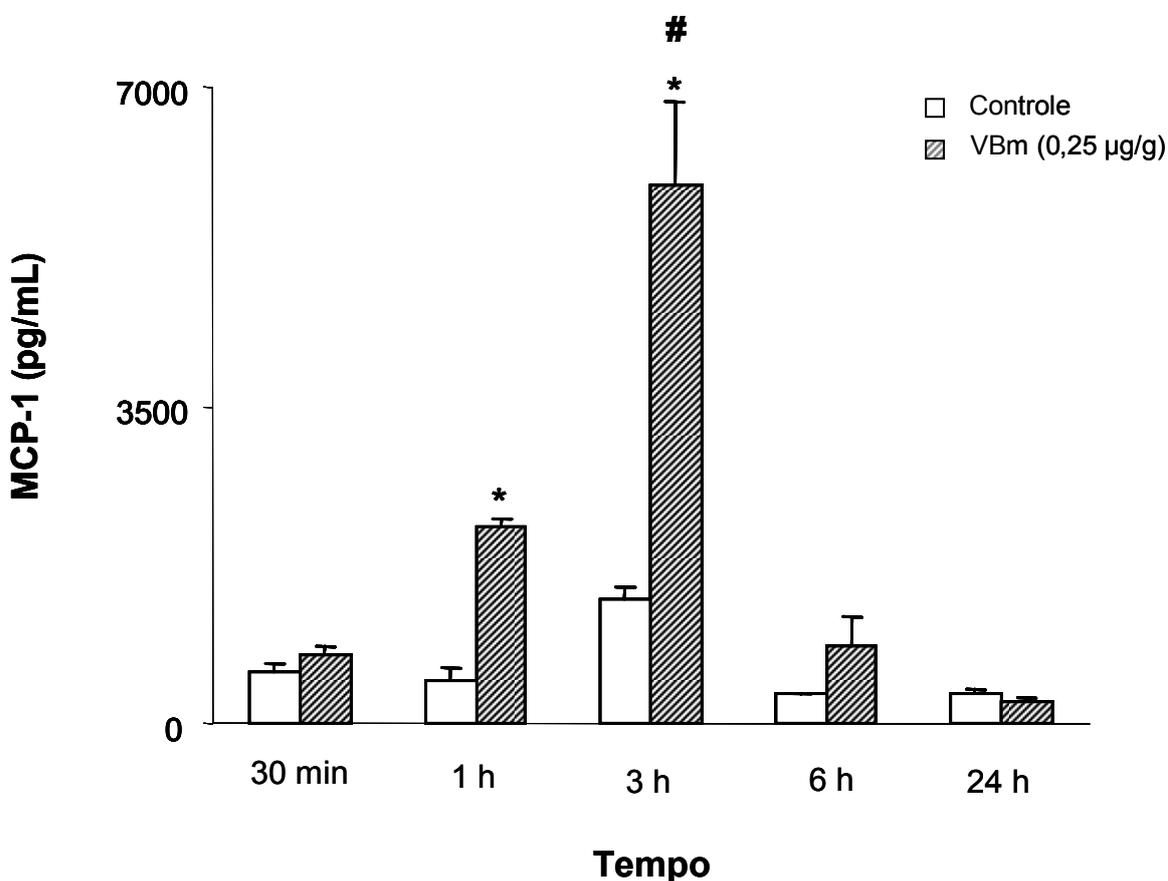


Figura 15. Liberação de MCP-1 induzida pelo veneno de *B. moojeni*. Os animais receberam injeção i.p. de VBm (0,25 µg/g) ou de solução fisiológica apirogênica (Controle). Decorridos os períodos de tempo indicados acima, realizou-se a coleta dos lavados peritoneais para a determinação da concentração de MCP-1, por ensaio imunoenzimático (EIA), como descrito em Material e Métodos. Os dados representam a média \pm E.P.M. de 5-6 animais. * $p \leq 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ em relação ao VBm 1 h (ANOVA).

5 DISCUSSÃO

Os envenenamentos causados pela serpente *Bothrops moojeni*, apresentam uma reação inflamatória local intensa, que necessita de estudos mais detalhados.

No presente estudo, avaliou-se, inicialmente, a capacidade do veneno de *Bothrops moojeni* (VBm) induzir influxo leucocitário para o local de sua injeção. Os resultados obtidos demonstraram que este veneno causou o influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal dos camundongos, a partir da dose de 0,025 µg/g, após a sua injeção i.p.. Não foi observada uma relação dose-efeito, no período de tempo avaliado. O máximo recrutamento de leucócitos ocorreu com a dose de 0,25 µg/g do veneno e o perfil de células recrutadas mostrou predomínio de leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, nas primeiras horas, em relação aos macrófagos. O VBm, na dose de 1,0 µg/g, causou hemorragia intensa na cavidade peritoneal dos animais. Uma vez que este fenômeno impossibilita a análise do recrutamento leucocitário, decorrente apenas da reação inflamatória local, utilizou-se a dose de 0,25 µg/g para os estudos subsequentes. Esta foi a menor dose do veneno que causou o máximo recrutamento de leucócitos, sem a ocorrência de hemorragia peritoneal. Ao contrário do VBm, os venenos das serpentes *Bothrops lanceolatus*, *B. alternatus* e *B. lanceolatus*, apresentaram uma relação dose-efeito para o recrutamento de neutrófilos, em modelo experimental murino (FLORES *et al.*, 1993; ARRUDA *et al.*, 2003). Essas divergências entre os venenos de diferentes espécies de *Bothrops* devem-se, provavelmente, aos diferentes modelos experimentais utilizados e às diferenças na composição desses venenos.

No que se refere à cinética do influxo leucocitário induzido pelo VBm, observou-se o predomínio de neutrófilos entre a 3ª e a 6ª hora e de mononucleares entre a 3ª e a 24ª hora, que é característico de uma resposta inflamatória aguda. Estes dados em conjunto, representam a primeira demonstração do componente celular da inflamação local induzida pelo veneno de *B. moojeni* e estão de acordo com a literatura, que mostra que os venenos botrópicos induzem uma reação inflamatória aguda, marcante, em diferentes modelos experimentais (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986; LOMONTE *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 2003, 2005; FARSKY *et al.*, 2005). O perfil temporal do recrutamento de neutrófilos induzido pelo veneno de *B. moojeni*, apresentou similaridade àquele demonstrado para os venenos de *B. erythromelas*, *B. alternatus* e *B. lanceolatus*, em ratos e camundongos, respectivamente (FLORES *et al.*, 1993; ARRUDA *et al.*, 2003). Da mesma forma, os dados obtidos estão de acordo com o observado com os venenos de *B. jararaca* e *B. asper*, em modelo experimental semelhante, embora o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, causado por estes

venenos, tenha apresentado um perfil temporal mais longo (até 24 horas). Em relação aos leucócitos mononucleares, os venenos de *B. jararaca* e de *B. asper* induziram aumento de deste tipo celular apenas na 48^a hora (ZAMUNER *et al.*, 2001), o que difere do observado neste estudo (a partir da 3^a hora). Esta é a primeira demonstração da capacidade de um veneno botrópico induzir o acúmulo precoce de leucócitos mononucleares no sítio inflamatório. Curiosamente, em animais do grupo controle, foi observado um aumento do número de leucócitos mononucleares (macrófagos), nos períodos mais tardios (48 e 72 horas) após injeção de solução fisiológica aprotínica. Este fato deve estar relacionado à uma resposta do organismo à lesão física, causada pela perfuração do tecido abdominal, pela agulha. Neste sentido, é importante considerar a ausência de neutrófilos, nesse mesmo grupo de animais, em todos os períodos de tempo avaliados, sugerindo que o aumento do número de macrófagos não decorreu de uma resposta fisiopatológica ou infecciosa.

Em determinadas condições inflamatórias e/ou infecciosas o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório está associado a um aumento prévio do número de leucócitos circulantes (GARCIA-LEME, 1989; TAKESHITA *et al.*, 2004). Desse modo, investigou-se a possibilidade do recrutamento de leucócitos induzido pelo VBm, para o local de sua injeção, estar relacionado a uma alteração do número de leucócitos circulantes. Os resultados deste estudo demonstram que o VBm causou um aumento do número neutrófilos, na circulação dos animais, na 3^a hora após a sua injeção, sem alterar o número de células indiferenciadas (dado não demonstrado). Estes dados indicam que este veneno é capaz de afetar os processos envolvidos na mobilização de leucócitos, a partir dos compartimentos de reserva (medula óssea), para a circulação sanguínea. Este fato sugere que o VBm diminua, de alguma forma, o tempo de permanência dos leucócitos maduros no compartimento medular, de modo a aumentar o seu número na circulação sanguínea. A mobilização de leucócitos a partir da medula óssea é um processo complexo, que ainda não foi completamente elucidado. Contudo, sabe-se que este processo depende da natureza do estímulo, bem como da liberação de fatores e citocinas específicas, como o GM-CSF, o Fator Estimulador de Colônias-Granulócitos (G-CSF), o TNF- α e a IL-1 β (HAMILTON, 2008; METCALF, 2008). Além disso, algumas quimiocinas, como a MIP-2 e a KC contribuem também para esse processo (WENGNER *et al.*, 2008). Com base nessas informações, é possível supor que a KC, liberada 30 minutos após a injeção do VBm, contribua para neutrofilia observada nos animais. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a participação dessa quimiocina e de outros fatores hematopoiéticos, na mobilização de neutrófilos, induzida pelo VBm.

Ao contrário dos dados aqui obtidos, o veneno da serpente *Bothrops jararaca* não

afetou o número de leucócitos circulantes, em modelo experimental de pleurisia (BÚRIGO *et al.*, 1996). Esta divergência de ação, entre estes dois venenos botrópicos, pode ser atribuída aos diferentes modelos animais e experimentais utilizados e/ou a componentes distintos em cada veneno.

Os leucócitos desempenham um papel relevante no desenvolvimento e resolução da reação inflamatória (HERSH e BODEY, 1970; FLOREY, 1970; WEDMORE e WILLIAMS, 1981). Após ativação, estas células liberam grandes quantidades de mediadores inflamatórios, que contribuem para o desenvolvimento da inflamação e, de modo geral, favorecem a resolução deste processo (CRIVELLATO *et al.*, 2004, 2005; KOBAYASHI *et al.* 2003, 2005; TSIROGIANNI *et al.*, 2006). Contudo, em condições que propiciem uma ativação descontrolada ou excessiva, os leucócitos podem causar danos e lesões teciduais e/ou vasculares ao organismo (JAESCHKE e SMITH, 1997; TAILOR e GRANGER, 2000). Nesse sentido, foi demonstrado que os neutrófilos são importantes para a regeneração das lesões teciduais causadas pelos venenos de *B. asper* em camundongos (TEIXEIRA *et al.*, 2003). No entanto, os dados ora apresentados não permitem inferir sobre o papel dos leucócitos infiltrados, nas ações locais induzidas pelo VBm. Estudos adicionais deverão ser realizados com esse intuito.

Os mecanismos pelos quais os leucócitos circulantes migram para o foco inflamatório é bem conhecido (FLOREY, 1970). Estes mecanismos envolvem a interação entre diferentes moléculas de adesão, expressas tanto pelas células endoteliais quanto por leucócitos ativados, acarretando a passagem destas células através das junções interendoteliais, em direção ao tecido adjacente (ALBELDA *et al.*, 1994; GRANGER e KUBES, 1994; RAMPART, 1994; MOSER *et al.*, 2004). A expressão de moléculas de adesão, por sua vez, é dependente da ação de diversos mediadores inflamatórios, que são produzidos e liberados no decorrer desse processo e determinam os diferentes eventos envolvidos na migração leucocitária (SAMUELSSON *et al.*, 1987; FORD-HUTCHINSON, 1990; GERRITSEN, 1996; ISHIZUKA *et al.*, 1996; LUSTER, 1998; OLSON e LEY, 2002).

Como mencionado na introdução, os mediadores inflamatórios são produzidos por células circulantes e teciduais e, dentre estas, estão os mastócitos. De acordo com Tannenbaum *et al.* (1980), o mastócito é uma “farmacopéia virtual de materiais biologicamente ativos”. Esta célula desempenha um papel importante no recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório, por liberar mediadores quimiotáticos que atuam em leucócitos e no endotélio, induzindo a expressão de moléculas de adesão (TANNENBAUM *et al.*, 1980; QURESHI e JAKSCHIK, 1988; KUBES e GRANGER, 1996; GALLI *et al.*, 1999;

MEKORI e METCALFE, 2000; MARSHALL e JAWDAT, 2004; WANG e THORLACIUS, 2005). Desse modo, avaliou-se, neste estudo, a participação dos mastócitos no recrutamento leucocitário induzido pelo VBm. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento prévio dos animais com cromoglicato, um inibidor da desgranulação de mastócitos, aboliu o influxo de leucócitos PMNs e MNs até a 6ª hora de ação do veneno, mas não na 24ª hora. Estes dados apontam os mastócitos, de tecido conjuntivo, como células centrais para o recrutamento de leucócitos induzido pelo VBm e indicam que a estimulação inicial dessas células tem repercussão por um período relativamente longo (até 6 horas). Os dados da literatura mostram que camundongos depletados dos mastócitos mesentéricos, pela injeção do composto 48/80, apresentaram inibição do influxo de leucócitos PMN, na 4ª hora após a injeção de zimosan ou de tioglicolato (AJUEBOR *et al.*, 1999), o que corrobora os dados obtidos neste estudo e demonstra o papel central dos mastócitos de tecido conjuntivo no recrutamento leucocitário induzido por diferentes estímulos inflamatórios. Os dados do presente estudo representam a primeira evidência da participação de mastócitos de tecido conjuntivo no recrutamento leucocitário induzido pelo veneno de uma serpente da família Viperidae.

A partir dos resultados obtidos, avaliou-se a desgranulação de mastócitos peritoneais *in vivo*, na vigência de ação do veneno de *B. moojeni*. Os resultados demonstraram que a injeção intraperitoneal do VBm causou a desgranulação de mastócitos mesentéricos, de modo dose-dependente. Neste estudo, o composto 48/80 foi utilizado como controle positivo da desgranulação dos mastócitos. Este polímero sintético é amplamente empregado como padrão da indução da desgranulação de mastócitos e atua por um mecanismo dependente da ativação de canais de cálcio destas células (PATON, 1951; LORENZ *et al.*, 1998). A desgranulação dos mastócitos foi observada apenas aos 10 minutos após a injeção i.p. do veneno, indicando uma ação rápida e transitória do mesmo. Estes dados estão de acordo com a literatura, que demonstra que a desgranulação de mastócitos pode ser induzida em poucos minutos por estímulos não antigênicos (TANNENBAUM *et al.*, 1980; KANWAR e KUBES, 1994; LORENZ *et al.*, 1998). Até onde pode-se verificar na literatura, os resultados aqui obtidos representam a primeira demonstração de que um veneno de serpente do gênero *Bohtrops* induz a desgranulação de mastócitos *in vivo*. De outra parte, foi demonstrado que o veneno da serpente *Trimeresurus mucrosquamatus* induziu a desgranulação de mastócitos peritoneais de ratos *in vivo* (CHEN *et al.*, 1984).

Com o intuito de confirmar os dados que indicaram a ação do VBm em mastócitos *in vivo*, avaliou-se a liberação de PGD₂. Este mediador é considerado um marcador da ativação de mastócitos, sendo o principal prostanóide sintetizado por estas células (LEWIS *et al.*,

1982; SCHLEIMER *et al.*, 1985; REDDY e HERSCHMAN, 1997; ROYER *et al.*, 2008). Os resultados obtidos demonstram que o VBm causou um aumento na concentração de PGD₂ entre 5 e 30 minutos de sua injeção, indicando a capacidade deste veneno em ativar os mastócitos e induzir a síntese de mediadores inflamatórios não estocados em grânulos. Estes resultados indicam que, em mastócitos, o VBm ativa vias de sinalização envolvidas tanto na desgranulação quanto na síntese de mediadores inflamatórios. Ainda, o efeito rápido do VBm, para a desgranulação dos mastócitos mesentéricos e a ativação de vias biosintéticas sugerem uma ação direta deste veneno sobre os mastócitos.

As evidências da literatura apontam a participação de prostanóides na reação edematogênica induzida pelos venenos de *Bothrops asper*, *B. insularis* e de *B. jararaca* (TREBIEN e CALIXTO, 1989; CHAVES *et al.*, 1995; BARBOSA *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que o veneno da serpente *B. jararaca* induziu a liberação de PGD₂ em camundongos após a sua injeção intraperitoneal (MOREIRA *et al.*, 2007). Neste contexto, a literatura mostra que a PGD₂, além de ações importantes no sistema nervoso central (GILES e LEFF, 1988; ITO *et al.*, 1989; MIZOGUCHI *et al.*, 2001), contribui para o desenvolvimento de eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e deve contribuir para o recrutamento de leucócitos causado pelo VBm. Este prostanóide pode atuar, de modo sinérgico, com outros mediadores inflamatórios, como o TNF- α e acarretar o recrutamento de leucócitos, via liberação de IL-8 e da quimiocina MCP-1 (HIRANO *et al.*, 2007). Em adição, devido à rápida degradação (SCHULIGOI *et al.*, 2007), a PGD₂ dá origem a subprodutos, como a PGJ₂, que também participa, do recrutamento de leucócitos, via liberação de quimiocinas (KIM *et al.*, 2005; KIM e KIM, 2007; ITO *et al.*, 1989; HERSCHMAN, 1999; KANAOKA e URADE, 2003; LUSTER e TAGER, 2004; CHIBA *et al.*, 2006; HIRANO *et al.*, 2007; SCHRATL *et al.*, 2007). Considerando essas informações e a magnitude da liberação de PGD₂, no local de injeção do VBm, é plausível sugerir que este prostanóide contribua para o recrutamento leucocitário causado pelo veneno de *B. moojeni*.

A seguir, com o intuito de detalhar o efeito do VBm em mastócitos, avaliou-se a repercussão do estímulo por este veneno na desgranulação de mastócitos murinos *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que o VBm, em concentrações não citotóxicas, causou um aumento da liberação da β -hexosaminidase, indicando uma ação direta desse veneno para a desgranulação dos mastócitos. A enzima β -hexosaminidase é estocada nos grânulos dos mastócitos e reconhecida como um marcador da desgranulação dessas células (HOHMAN e DRESKIN, 2001). Esses dados estão de acordo com a literatura que demonstraram que os venenos das serpentes *B. jararaca* e de *B. lanceolatus* induziram a liberação de histamina a

partir de mastócitos isolados do peritônio de ratos (BONAVITA *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2004). Embora não se conheçam os mecanismos pelos quais os venenos de serpentes causam a desgranulação de mastócitos, acredita-se que a interação de componentes do veneno com receptores e/ou aceptores da membrana celular desencadeiem vias de desgranulação específicas (GALLI e TSAI, 2008). Neste contexto, é possível supor que as fosfolipases A₂, presentes no veneno de *B. moojeni* sejam componentes importantes para a ação deste veneno sobre os mastócitos. Esta hipótese tem por base a demonstração de que fosfolipases A₂, purificadas de venenos de diferentes espécies de serpentes do gênero *Bothrops* e de *Crotalus durissus terrificus*, causaram a desgranulação de mastócitos murinos *in vitro*, por mecanismos ainda não esclarecidos (LLORET e MORENO, 1993; LANDUCCI *et al.*, 1998, 2000; KANASHIRO *et al.*, 2002). Adicionalmente, a literatura mostra que peptídios desgranuladores de mastócitos, como o mastoparan, isolado do veneno de vespas (HIGASHIJIMA *et al.*, 1990), podem se difundir pela membrana celular dos mastócitos e ativar diretamente proteínas G, dando início a uma cascata de sinalização intracelular (FERRY *et al.*, 2002). Uma vez que os venenos botrópicos também contém diversos peptídios de ação ainda desconhecida (FOX e SERRANO, 2008), é possível que o VBm contenha componentes que ativem diretamente as proteínas G de mastócitos, à semelhança do mastoparan.

Em síntese, o conjunto de dados até aqui obtidos indicam que o VBm induz a desgranulação de mastócitos de tecido conjuntivo, decorrente, ao menos em parte, de uma ação direta sobre mastócitos. Ainda, este veneno estimula, nestas células, a síntese de mediadores inflamatórios. Os mecanismos destes efeitos do veneno, em mastócitos, necessitam ser investigados.

Dentre os mediadores liberados pelos mastócitos ativados, está a histamina, um importante mediador inflamatório, estocado em grânulos citoplasmáticos, indutor de eventos inflamatórios, dentre os quais o recrutamento leucocitário. Deste modo, investigou-se a participação deste mediador no influxo leucocitário induzido pelo VBm. O tratamento dos animais com um antagonista do receptor H₁ da histamina, a difenidramina, causou uma redução significativa do influxo de leucócitos polimorfonucleares induzido pelo VBm, indicando que este mediador está envolvido no recrutamento de leucócitos induzido por esse veneno. Estes dados estão de acordo com a literatura que demonstra que a histamina, via ativação dos receptores H₁, promove o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, em diferentes modelos experimentais (GABOURY *et al.*, 1994; KUBES e KANWAR, 1994). A ativação do receptor H₁, em células endoteliais, acarreta a expressão de moléculas de adesão,

como a P-selectina e a integrina CD18, importantes para os fenômenos de rolamento e firme adesão, respectivamente, de neutrófilos (GABOURY *et al.*, 1994, 1995; KUBES e KANWAR, 1994; KUBES e GRANGER, 1996). De modo similar, os resultados deste estudo mostraram que a ranitidina, antagonista dos receptores H₂, inibiu o influxo dos leucócitos polimorfonucleares induzido pelo VBm, demonstrando que a ativação deste receptor também contribui para este efeito do veneno. A ativação destes receptores está associada, classicamente, à regulação da secreção de ácido gástrico pelas células parietais (SCHUBERT e PEURA, 2008). Entretanto, foi demonstrado que este receptor também está envolvido no recrutamento de leucócitos induzido para o foco inflamatório (GABOURY *et al.*, 1994; DESOUZA e RIBEIRO-DASILVA, 1998; KIM *et al.*, 2005). Deste modo, os dados aqui obtidos corroboram a literatura, sendo esta a primeira demonstração do envolvimento dos receptores H₂ no recrutamento de leucócitos induzido por um veneno de serpente.

Em adição, avaliou-se a participação dos receptores H₄, da histamina, no efeito do veneno. Este receptor foi recentemente identificado e clonado (ODA e MATSUMOTO, 2001; LIU *et al.*, 2001). Embora suas funções biológicas sejam pouco conhecidas, até o momento, a expressão do receptor H₄ foi demonstrada exclusivamente em células inflamatórias, como neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e células T e sua ativação acarreta a quimiotaxia destas células (O'REILLY *et al.*, 2002; HOSFTRA *et al.*, 2003; TAKESHITA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2007; BAUMER *et al.*, 2008; HUANG e THURMOND, 2008). Ainda, a participação desse subtipo de receptor foi demonstrada em processos alérgicos e na quimiotaxia de eosinófilos, em modelos experimentais de alergia (HOFSTRA *et al.*, 2003; DUNFORD *et al.*, 2006; THURMOND *et al.*, 2008). No presente estudo, verificou-se que o pré-tratamento dos animais com a tioperamida, um antagonista dos receptores H₃/H₄ da histamina, causou uma redução marcante do influxo de neutrófilos causado pelo VBm, sugerindo a participação do receptor H₄ neste efeito. Além disso, dentre os antagonistas de histamina, empregados neste estudo, a tioperamida causou a inibição mais intensa do influxo de polimorfonucleares sugerindo que a ativação dos receptores H₄, pela histamina, seja primordial para o efeito do VBm. Por outro lado, o receptor H₃ não é encontrado em células hematopoiéticas, mas é expresso, em abundância, em neurônios do sistema nervoso central e periférico (ISHIKAWA e SPERELAKIS, 1987; DIMITRIADOU *et al.*, 1994; LOVENBERG *et al.*, 1999). Nestes sistemas, a ativação do receptor H₃ inibe a liberação de histamina, a partir de neurônios histaminérgicos e de outros neurotransmissores, acarretando a inibição da reação inflamatória (ARRANG *et al.*, 1983; DIMITRIADOU *et al.*, 1994; LEURS *et al.*, 1998). Essas informações, portanto, descartam a possibilidade de que o

receptor H₃ esteja envolvido neste efeito do VBm. Deste modo, estes resultados representam a primeira evidência da participação do receptor H₄ da histamina, no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, induzido por um veneno animal e implica o seu envolvimento na resposta inflamatória não alérgica.

Para ampliar o conhecimento dos efeitos do VBm quanto ao influxo leucocitário, avaliou-se a liberação dos mediadores quimiotáticos, como o TXA₂, o LTB₄, a MCP-1 e o KC por esse veneno. Os resultados obtidos demonstraram que o VBm causou uma liberação marcante de TXA₂, entre 10 minutos e 1 hora de sua injeção, com efeito máximo na 1ª hora. Esses dados sugerem que o TXA₂ contribua para recrutamento de leucócitos induzido pelo VBm. O TXA₂ é um metabólito do ácido araquidônico, resultante da ação enzimática do sistema das ciclooxigenases (COXs) e da tromboxano-sintase e pode ser sintetizada por diversos tipos celulares, como plaquetas, mastócitos e macrófagos (SMITH *et al.*, 2000). Este mediador causa aumento da permeabilidade vascular e induz o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório, por induzir a expressão de moléculas de adesão da família das β_2 integrinas e das imunoglobulinas, pelo endotélio (WILES *et al.*, 1991; ISHIZUKA *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 1999). Neste contexto, dados da literatura mostram que a injeção dos venenos das serpentes *Bothrops asper* e *B. jararaca* induziu, rapidamente, a liberação de TXA₂ (FARSKY *et al.*, 1997; ZAMUNER *et al.*, 2005). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com aqueles descritos para outras espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. Considerando que os mastócitos respondem a diferentes estímulos com a síntese de mediadores lipídicos inflamatórios (HISHINUMA *et al.*, 2007; MIYAGAWA *et al.*, 2008), a liberação do TXA₂, logo após a injeção do VBm, sugere que os mastócitos de tecido conjuntivo sejam uma fonte importante deste mediador, no local de injeção do veneno. Contudo, a participação dos macrófagos residentes, neste efeito, não pode ser descartada. Estudos adicionais são necessários para esclarecer o envolvimento destes tipos celulares na liberação deste mediador. No que se refere ao leucotrieno B₄ (LTB₄), os dados obtidos neste estudo demonstraram que o VBm causou um aumento significativo da liberação de LTB₄, na 6ª hora de sua injeção. Estes dados apontam a capacidade deste veneno induzir a liberação de produtos derivados da via da 5-lipoxigenase e sugerem a participação do LTB₄ no recrutamento de leucócitos causado por esse veneno. Este mediador lipídico tem um papel importante na aderência e transmigração de neutrófilos e de monócitos, a partir do endotélio, para o tecido adjacente. Esta ação deve-se ao aumento da expressão de moléculas de adesão da família das β_2 integrinas e de sua afinidade pelo ligante endotelial, a imunoglobulina ICAM-1 (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980; WILLIAMS e HIGGS, 1988; FORD-

HUTCHINSON, 1990; LAM *et al.*, 1990; WILES *et al.*, 1991; ZIMMERMAN *et al.*, 1992). Adicionalmente, o LTB₄ ativa funções importantes de leucócitos como a capacidade microbicida e a desgranulação de enzimas lisossomais de neutrófilos (SMITH *et al.*, 1980; SAMUELSSON, 1991; CROOKS e STOCKLEY, 1998). A liberação de LTB₄, induzida pelo VBm, corrobora os dados da literatura, que mostram um aumento dos níveis deste mediador lipídico após a injeção dos venenos das serpentes *B. asper* e *B. jararaca*, em modelo experimental murino (FARSKY *et al.*, 1997; ZAMUNER *et al.*, 2005). No entanto, os venenos dessas serpentes induziram a liberação desse mediador em um período de tempo anterior (até 4 horas após a injeção) àquele observado com o VBm (6^a hora). Essa divergência na cinética de liberação do LTB₄, entre os venenos botrópicos, pode estar relacionada a diferenças na composição destes venenos. Vale ressaltar, contudo, que a liberação do mediador, induzida pelo VBm, ocorreu na fase de máximo acúmulo de leucócitos totais na cavidade peritoneal dos animais, sugerindo, fortemente, que as células recrutadas sejam as principais fontes do LTB₄. Este fato sugere também, que este mediador seja importante para a manutenção da resposta inflamatória do VBm, do ponto de vista do recrutamento e ativação de leucócitos polimorfonucleares. No entanto, embora, classicamente, o LTB₄ seja considerado um potente mediador para a quimiotaxia e ativação de neutrófilos (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980; TAGER *et al.*, 2003; KITAURA *et al.*, 2005), também foi demonstrado o seu envolvimento no recrutamento de monócitos circulantes para o tecido adjacente (WERINGER *et al.*, 1999; AIELLO *et al.*, 2002; FRIEDRICH *et al.*, 2003). A partir da ativação do receptor BLT1 de monócitos, o LTB₄ induz aumento da expressão e, principalmente, da afinidade e avidéz das moléculas da família β_2 integrinas por seus ligantes endoteliais, a VCAM-1 e a ICAM-1, levando à adesão dessas células ao endotélio (VADDI e NEWTON, 1994). Considerando essas informações e a liberação tardia do LTB₄ (6^a hora), após a injeção do VBm, é possível supor que este mediador lipídico também contribua para o acúmulo de macrófagos, no sítio inflamatório. Por outro lado, análise conjunta dos perfis temporais da liberação do TXA₂ e do LTB₄ sugere que estes mediadores atuam de modo sinérgico, para o desencadeamento e a manutenção do influxo de leucócitos, respectivamente, para o local de injeção do VBm. Ainda, considerando que o TXA₂ é capaz de induzir a liberação do LTB₄ (GOLDMAN *et al.*, 1991), é possível que, na presente condição experimental, o TXA₂ induza a liberação do LTB₄ por células residentes, como os macrófagos e mastócitos. Estas hipóteses, contudo, necessitam de estudos adicionais para a sua confirmação.

Quanto às quimiocinas, os resultados obtidos demonstraram que o VBm causou o

aumento significativo de KC entre 30 minutos e 1 hora de sua injeção. Estes dados apontam a capacidade do VBm induzir a liberação de uma quimiocina seletiva para neutrófilos (LUSTER, 1998) e sugerem que a mesma contribui para o influxo de neutrófilos causado pelo veneno. Neste contexto, os dados do presente estudo, demonstrando um aumento de neutrófilos circulantes, após a injeção i.p. do VBm, apóiam esta hipótese. No entanto, os mecanismos pelos quais esta quimiocina contribui para o influxo leucocitário, ora evidenciado, necessitam de estudos mais detalhados, levando em conta também a sua capacidade de induzir a expressão da P-selectina. De outra parte, os dados do presente estudo representam a primeira evidência da liberação de uma quimiocina, da classe CXC, induzida por um veneno de serpente. A liberação rápida de KC, a partir de 30 minutos após a injeção do VBm, pode ser explicada pelo fato do gene *JE*, que expressa esta quimiocina e a MCP-1, ser de rápida indução (COCHRAN *et al.*, 1983; ROLLINS *et al.*, 1988, 1989; ROLLINS, 1996). A liberação rápida de KC (1 hora) também foi observada após a injeção intraperitoneal de outros agentes inflamatórios como o zimosan e o LPS, tendo sido acompanhada do influxo de neutrófilos (AJUEBOR *et al.*, 1998). Por outro lado, as células envolvidas na liberação de KC, sob a ação do veneno não foram investigadas no presente estudo e merecem estudos adicionais e a participação dos mastócitos e macrófagos, residentes, pode ser sugerida (AJUEBOR *et al.*, 1999; SCHRAMM *et al.*, 2002).

No presente estudo, chamou a atenção o fato do recrutamento de leucócitos mononucleares ter ocorrido em período precoce da ação do VBm (3ª hora). Desse modo, avaliou-se a liberação da quimiocina MCP-1, no local da injeção do VBm. De acordo com a literatura, a MCP-1 é um dos principais mediadores quimiotáticos, seletivos para monócitos (JIANG *et al.*, 1992; VADDI e NEWTON, 1994; LUSTER, 1998; ROLLINS, 1996; AJUEBOR *et al.*, 1999; HENDERSON *et al.*, 2003). Os resultados obtidos demonstraram que o VBm causou a liberação desta quimiocina, a partir da 1ª hora de sua injeção, com um pico na 3ª hora. Estes resultados sugerem que a MCP-1 seja relevante para o influxo precoce de monócitos, induzido pelo VBm. Considerando que a inibição da desgranulação dos mastócitos aboliu o influxo de leucócitos induzido pelo VBm, os mastócitos podem representar a principal fonte da MCP-1, na vigência de ação do veneno. Esta hipótese encontra apoio em dados que mostraram que mastócitos de tecido conjuntivo são as células responsáveis pela liberação de MCP-1, em modelo de peritonite induzido por zimosan (AJUEBOR *et al.*, 1999). Além disso, a injeção de tioglicolato ou do zimosan, em camundongos, induziu o influxo precoce de monócitos, coincidente com a liberação de MCP-1 (AJUEBOR *et al.*, 1998; HENDERSON *et al.*, 2003). Embora os resultados obtidos no

presente estudo apontem os mastócitos como as principais células responsáveis pela liberação da MCP-1, a participação dos macrófagos residentes, neste efeito do VBm, não pode ser descartada. A síntese e liberação de MCP-1 por macrófagos e neutrófilos também foi descrita (BURN *et al.*, 1994; BONECCHI *et al.*, 2009). De outra parte, foi demonstrado que a MCP-1 induziu a liberação de LTB₄ a partir de macrófagos murinos (PACHECO *et al.*, 2007). Desse modo, é possível supor que a MCP-1, liberada pelo veneno de *B. moojeni*, nos períodos iniciais, contribua para a liberação de LTB₄, mantendo, assim, o recrutamento de leucócitos, induzido por este veneno. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar esta hipótese. Até o presente, a capacidade do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* induzir a liberação de MCP-1 não havia sido demonstrada.

Em síntese, os resultados ora apresentados indicam que o veneno de *B. moojeni* induz uma reação inflamatória aguda, com influxo de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares para o local de sua injeção e aumento do número de neutrófilos circulantes. O recrutamento leucocitário é dependente da desgranulação de mastócitos e decorre, ao menos em parte, de uma ação direta do veneno sobre estas células. A histamina, liberada após a injeção do VBm, contribui para o influxo leucocitário, via ativação dos receptores do tipo H₁, H₂ e H₄. Além disso, o VBm induz a liberação de mediadores quimiotáticos, como o TXA₂, o LTB₄, a MCP-1 e a KC, para o local de sua injeção. Estes mediadores devem contribuir para o influxo de leucócitos causado pelo VBm.

O conjunto de dados, obtidos neste estudo, contribui para o melhor entendimento das ações locais desencadeados pelo veneno de *B. moojeni*, em particular a resposta inflamatória local e evidenciam os mastócitos como elementos centrais a resposta inflamatória desencadeada por este veneno. Desse modo, este estudo poderá contribuir, futuramente, para novas abordagens farmacológicas, complementares à soroterapia, para o tratamento do efeito local induzido pelo VBm.

6 CONCLUSÕES

1 - A injeção intraperitoneal do veneno da serpente *Bothrops moojeni*, em camundongos, causou:

- a) o recrutamento de leucócitos totais, com neutrófilos até a 6ª hora e de mononucleares em todos os períodos de tempo;
- b) aumento de neutrófilos circulantes no sangue;
- c) liberação dos mediadores quimiotáticos LTB₄, TXA₂, MCP-1 e KC;
- d) ativação e desgranulação de mastócitos de tecido conjuntivo. Este efeito deve-se, ao menos em parte, de uma ação direta sobre estas células pois, *in vitro*, o veneno causou a desgranulação de mastócitos murinos, em cultura.

2 - O recrutamento de leucócitos induzido pelo VBm:

- a) depende da ativação dos receptores H₁, H₂ e H₄ da histamina e da desgranulação de mastócitos;
- b) deve envolver a participação dos mediadores lipídicos LTB₄ e TXA₂ e das quimiocinas MCP-1 e KC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAHAM, S. N.; AROCK, M. Mast cells and basophils in innate immunity. **Semin. Immunol.**, v. 10, p. 373-381, 1998.

ABRAHAM, S. N.; MALAVIYA, R. Mast cell in infections and immunity. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 3501-3508, 1997.

ABRAHAM, S.N.; THANKAVEL, K.; MALAVIYA, R. Mast cells as modulators of host defense in the lung. **Front. Biosc.**, v. 15, p. d78-87, 1997.

ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLER, P.; KOSCINCZUK, P.; NEGRETE, M. S.; TRULLS, H.; MARUÑAK, S. Edema y mionecrosis inducidos por veneno de *Bothrops jararaca* de Argentina en ratones. **APPTLA**, v. 46, p. 233-238, 1996.

AIELLO, R. J.; BOURASSA, P. A.; LINDSEY, S.; WENG, W.; FREEMAN, A.; SHOWELL, H. J. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 22, p. 443-449, 2002.

AJUEBOR, M. N.; DAS, A. M.; VIRÁG, L.; FLOWER, R. J.; SZABÓ, C.; PERRETTI, M. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. **J. Immunol.**, v. 162, p. 1685-1691, 1999.

AJUEBOR, M. N.; FLOWER, R. J.; HANNON, R.; CHRISTIE, M.; BOWERS, K.; VERITY, A.; PERRETTI, M. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. **J. Leukoc. Biol.**, v. 63, p. 108-116, 1998.

ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammation injury. **FASEB J.**, v. 8, p. 504-12, 1994.

AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, p. 877-885, 1985.

AOI, R.; NAKASHIMA, I.; KITAMURA, Y.; ASAI, Y.; NAKANO, K. Histamine synthesis

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

by mouse T lymphocytes through induced histidine decarboxylase. **Immunology**, v. 66, p. 219-23, 1989.

ARINOBU, Y.; IWASAKI, H.; AKASHI, K. Origin of basophils and mast cells. **Allergol. Int.**, v. 58, p. 21-28, 2009.

ARRANG, J.M.; GARBARG, M.; SCHWARTZ, J.C. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. **Nature**, v. 302, p. 832-837, 1983.

ARRUDA, V. A.; DE QUEIROZ GUIMARÃES, A.; HYSLOP, S.; DE ARAÚJO, P. M.; BON, C.; DE ARAÚJO, A. L. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. **Toxicon**, v. 41, p. 99-107, 2003.

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUN, F. R. Comparison of immunological biochemical and biophysical properties of the three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 24, p. 943-46, 1986.

BACHERT, C.; GEVAERT, P.; HOLTAPPELS, G.; JOHANSSON, S. G.; VAN CAUWENBERGE, P. Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 107, p. 607-14, 2001.

BARBOSA, A. M.; AMARAL, R. O.; TEIXEIRA, C. F. P.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515-23, 2003.

BÄUMER, W.; WENDORFF, S.; GUTZMER, R.; WERFEL, T.; DIJKSTRA, D.; CHAZOT, P.; STARK, H.; KIETZMANN, M. Histamine H4 receptors modulate dendritic cell migration through skin--immunomodulatory role of histamine. **Allergy**, v. 63, p. 1387-94, 2008.

BELL, J. K.; MCQUEEN, D. S.; REES, J. L. Involvement of histamine H4 and H1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 374-80, 2004.

BÉRNILS, R. S. Brazilian reptiles: List of species. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 06 jun. 2009.

BONAVITA, A. G.; DA COSTA, A. S.; PIRES, A. L.; NEVES-FERREIRA, A. G.; PERALES, J.; CORDEIRO, R. S.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. Contribution of mast

cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 47, p. 885-893, 2006.

BONECCHI, R.; GALLIERA, E.; BORRONI, E.M.; CORSI, M.M.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 540-551, 2009.

BRADDING, P.; FEATHER, I. H.; WILSON, S.; BARDIN, P. G.; HEUSSER, C. H.; HOLGATE, S. T.; HOWARTH, P. H. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. **J. Immunol.**, v. 151, p. 3853-3865, 1993.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostases. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

BÚRIGO, A.C.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, p. 106-111, 1996.

BURN, T.C.; PETROVICK, M.S.; HOHAUS, S.; ROLLINS, B.J.; TENEN, D.G. Monocyte chemoattractant protein-1 gene is expressed in activated neutrophils and retinoic acid-induced human myeloid cell lines. **Blood**, v. 84, p. 2776-2783, 1994.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere.** China: Cornell University Press, 2004.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, p. 31-39, 1995.

CHEN, I. J.; CHIU, H. F.; HUANG, H. T.; TENG, C. M. Edema formation and degranulation of mast cells by *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon**, v. 22, p. 17-28, 1984.

CHIBA, T.; KANDA, A.; UEKI, S.; ITO, W.; KAMADA, Y.; OYAMADA, H.; SAITO, N.; KAYABA, H.; CHIHARA, J. Prostaglandin D₂ induces IL-8 and GM-CSF by bronchial epithelial cells in a CRTH2-independent pathway. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 141, p. 300-307, 2006.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, p. 823-846, 1998.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-303, 1991.

CHURCH, M. K.; LEVI-SCHAFFER, F. The human mast cell. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 99, p. 155-160, 1997.

CIPRANDI, G.; TOSCA, M. A.; COSENTINO, C.; RICCIO, A. M.; PASSALACQUA, G.; CANONICA, G. W. Effects of fexofenadine and other antihistamines on components of the allergic response: adhesion molecules. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 112, p. S78-82, 2003.

COCHRAN, B. H.; REFFEL, A. C.; STILES, C. D. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. **Cell**, v. 33, p. 939-947, 1983.

COSTA, E. P.; CLISSA, P. B.; TEIXEIRA, C. F. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venoms induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, p. 13-17, 2002.

CRIVELLATO, E.; BELTRAMI, C. A.; MALLARDI, F.; RIBATTI, D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? **Histol. Histopathol.**, v. 19, p. 259-270, 2004.

CRIVELLATO, E.; FINATO, N.; RIBATTI, D.; BELTRAMI, C. A. Do mast cells affect villous architecture? Facts and conjectures. **Histol. Histopathol.**, v. 20, p. 1285-1293, 2005.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; MALLARDI, F.; BELTRAMI, C. A.; RIBATTI, D.; Piecemeal degranulation as a general secretory mechanism? **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.**, v. 274, p. 778-784, 2003.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; VACCA, A.; DAMMACCO, F.; RIBATTI, D. Mast cell heterogeneity in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: an ultrastructural study. **Leuk. Lymphoma**, v. 43, p. 2201-15, 2002.

CROOKS, S. W.; STOCKLEY, R. A. Leukotriene B4. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, p. 173-78, 1998.

CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P.; FARSKY, S. H. P. Lack of effect of endogenous corticosteroids on the acute inflammatory reaction (edema) induced by *Bothrops jararaca* venom (BjV) in rats. **Toxicon**, v. 35, p. 773-776, 1997.

DESOUZA, I.A. E RIBEIRO-DASILVA, G. Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 363, p. 189-95, 1998.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 283-89, 2004.

DIJKSTRA, D.; STARK, H.; CHAZOT, P. L.; SHENTON, F. C.; LEURS, R.; WERFEL, T.; GUTZMER, R. Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H4 receptor. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, p. 1696-1703, 2008.

DIMITRIADOU, V.; ROULEAU, A.; DAM TRUNG TUONG, M.; NEWLANDS, G. J.; MILLER, H. R.; LUFFAU, G.; SCHWARTZ, J. C.; GARBARG, M. Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibers evidenced by histamine H3-receptor modulation in rat lung and spleen. **Clin. Sci.**, v. 87, p. 151-163, 1994.

DUNFORD, P. J.; O'DONNELL, N.; RILEY, J. P.; WILLIAMS, K. N.; KARLSSON L.; THURMOND, R. L. The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. **J. Immunol.**, v. 176, p. 7062-7070, 2006.

DVORAK, A. M. Basophil and mast cell degranulation and recovery. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum Press, 1991.

DVORAK, A. M.; KISSELL, S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing *in situ*. **J. Leukoc. Biol.**, v. 49, p. 197-210, 1991.

DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F.; GALLI, S. J. Ultrastructural criteria for identification of mast cells and basophils in humans, guinea pigs, and mice. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 128, p. S49-52, 1983.

FARSKY, S. H. P.; MELLO, S. B. V. Participação de moléculas de adesão no desenvolvimento da resposta inflamatória. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo**, v. 50, p. 80-89, 1995.

FARSKY, S. H.; ANTUNES, E.; MELLO, S. B. Pro and antiinflammatory properties of toxins from animal venoms. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy**, v. 4, p. 401-411, 2005.

FARSKY, S. H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, v. 35, p. 185-93, 1997.

FERRY, X.; BREHIN, S.; KAMEL, R.; LANDRY, Y. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. **Peptides**, v. 23, p. 1507-1515, 2002.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 1551-59, 1993.

FLOREY, H. W. Inflammation. *In*: FLOREY, H.W. (Ed.). **General Pathology**. Philadelphia: Saunders, 1970. p.1-174.

FORD-HUTCHINSON, A. W. Leukotriene B4 in inflammation. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 1-12, 1990.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHIPLEY, M. E.; SMITH, M. J. Leukotriene B4, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, v. 286, p. 264-65, 1980.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909-920, 2008.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil** – Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 81-95.

FRIEDRICH, E. B.; TAGER, A. M.; LIU, E.; PETTERSSON, A.; OWMAN, C.; MUNN, L.; LUSTER, A. D.; GERSZTEN, R. E. Mechanisms of leukotriene B4--triggered monocyte adhesion. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 1761-1767, 2003.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology**, v. 125, p. 281-288, 2008.

GABOURY, J.P.; ANDERSON, D.C.; KUBES, P. Molecular mechanisms involved in superoxide-induced leukocyte-endothelial cell interactions *in vivo*. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. H637-42, 1994.

GABOURY, J.P.; JOHNSTON, B.; NIU, X.F.; KUBES, P. Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 154, p. 804-13, 1995.

GALLI, S. J. New concepts about the mast cell. **N. Engl. J. Med.**, v. 328, p. 257-65, 1993.

GALLI, S. J. New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Invest.**, v. 62, p. 5-33, 1990.

GALLI, S. J.; GORDON, J. R.; WERSHIL, B. K. Cytokine production by mast cell and basophils. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 3, p. 865-72, 1991.

GALLI, S. J.; MAURER, M.; LANTZ, C. S. Mast cells as sentinels of innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 53-59, 1999.

GALLI, S. J.; NAKAE, S. Mast cells to the defense. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 1160-1162, 2003.

GALLI, S.J.; TSAI, M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. **J. Dermatol. Sci.**, v. 49, p. 7-19, 2008.

GARCIA-LEME, J. **Hormones and inflammation**. Florida: Boca Raton, 1989. p. 165.

GERRITSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. **Cardiovasc. Res.**, v. 32, p. 720-32, 1996.

GILES, H.; LEFF, P. The biology and pharmacology of PGD₂. **Prostaglandins**, v. 35, p. 277-300, 1988.

GILFILLAN, A. M.; TKACZYK, C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 218-30, 2006.

GILL, V.; DOIG, C.; KNIGHT, D.; LOVE, E.; KUBES, P. Targeting adhesion molecules as a potential mechanism of action for intravenous immunoglobulin. **Circulation**, v. 112, p. 2031-39, 2005.

GODOT, V.; AROCK, M.; GARCIA, G.; CAPEL, F.; FLYS, C.; DY, M.; EMILIE, D.; HUMBERT, M. H4 histamine receptor mediates optimal migration of mast cell precursors to CXCL12. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, p. 827-834, 2007.

GOLDMAN, G.; WELBOURN, R.; VALERI, C. R.; SHEPRO, D.; HECHTMAN, H. B. Thromboxane A₂ induces leukotriene B₄ synthesis that in turn mediates neutrophil diapedesis via CD 18 activation. **Microvasc. Res.**, v. 41, p. 367-375, 1991.

GOODARZI, K.; GOODARZI, M.; TAGER, A. M.; LUSTER, A. D.; VON ANDRIAN, U. H. Leukotriene B₄ and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 965-973, 2003.

GRAHAM, G. J. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, p. 342-351, 2009.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, p. 662-675, 1994.

GUIMARÃES, A.Q.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FERREIRA DE ARAÚJO, P.M.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm Res.**, v. 53, p. 284-291, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom A₂ Enzymes Structure, Function and Mechanism**. United Kindgon: Wiley, 1997. p. 321-52.

GUTIERREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ROJANS. E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralization of local effects of *Bothrops asper* venom by polyvalent antivenon. **Toxicon**, v. 19, p. 493-500, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; MATA, E.; CERDAS, L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. **Toxicon**, v. 24, p. 223-231, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ALAPE-GIRÓN, A.; FLORES-DÍAZ, M.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; CALVETE, J. J. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **J. Proteomics**, v. 72, p. 165-182, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 2935-50, 2007.

GUTZMER, R.; DIESTEL, C.; MOMMERT, S.; KOTHER, B.; STARK, H.; WITTMANN, M.; WERFEL, T. Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 174, p. 5224-5232, 2005.

HAGERMARK, O.; WAHLGREN, C. F.; GIOS, I. Inhibitory effect of loratadine and clemastine on histamine release in human skin. **Skin Pharmacol.**, v. 5, p. 93-98, 1992.

HAMILTON, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 533-544, 2008.

HENDERSON, R. B.; HOBBS, J. A.; MATHIES, M.; HOGG, N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. **Blood**, v. 102, p. 328-335, 2003.

HERSCHMAN, H. R. Function and regulation of prostaglandin synthase 2. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 469, p. 3-8, 1999.

HERSH, E. M.; BODEY, G. P. Leukocytic mechanisms in inflammation. **Annu. Rev. Med.**, v. 21, p. 105-132, 1970.

HIGASHIJIMA, T.; BURNIER, J.; ROSS, E. M. Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 14176-14186, 1990.

HILL, S. J. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. **Pharmacol. Rev.**, v. 42, p. 45-83, 1990.

HIRANO, Y.; SHICHIJO, M.; DEGUCHI, M.; NAGIRA, M.; SUZUKI, N.; NISHITANI, Y.; HATTORI, M.; ARIMURA, A. Synergistic effect of PGD2 via prostanoid DP receptor on TNF-alpha-induced production of MCP-1 and IL-8 in human monocytic THP-1 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 560, p. 81-88, 2007.

HISHINUMA, T., SUZUKI, K., SAITO, M., YAMAGUCHI, H., SUZUKI, N., TOMIOKA, Y., KANEKO, I., ONO, M., GOTO, J. Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid chromatography/tandem mass spectrometry: the effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells. **Prostaglandins Leukot.**

Essent. Fatty Acids, v. 76, p. 321-329, 2007.

HOFSTRA, C.L.; DESAI, P.J.; THURMOND, R.L.; FUNG-LEUNG, W.P. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, p. 1212-1221, 2003.

HOHMAN, R. J.; DRESKIN, S. C. Measuring degranulation of mast cells. *In: Current Protocols Immunology*. New York: Wiley and Sons, Inc., 2001. p. 7.26.1-7.26.7.

HOUGH, L. B. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, p. 415-419, 2001.

HOUSSAY, B. A. Classification des actions des venis de serpents sur organisme animal. **C. R. Soc. Paris**, v. 105, p. 308-310, 1930.

HOWARTH, P. H. Histamine and asthma: an appraisal based on specific H1-receptor antagonism. **Clin. Exp. Allergy**, v. 20, p. 31-41, 1990.

HUANG, J. F.; THURMOND, R. L. The new biology of histamine receptors. **Curr. Allergy Asthma Rep.**, v. 8, p. 21-27, 2008.

IRANI, A. A.; SCHECHTER, N. M.; CRAIG, S. S.; DEBLOIS, G.; SCHWARTZ, L. B. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 83, p. 4464-4468, 1986.

IRANI, A. M.; SCHWARTZ, L. B. Human mast cell heterogeneity. **Allergy Proc.**, v. 15, p. 303-338, 1994.

ISHIKAWA, S.; SPERELAKIS, N. A novel class (H3) of histamine receptors on perivascular nerve terminals. **Nature**, v. 327, p. 158-160, 1987.

ISHIZUKA, T.; KAWAKAMI, M.; HIDAKA, T.; MATSUKI, Y.; TAKAMIZAWA, M.; SUZUKI, K.; KURITA, A.; NAKAMURA, H. Stimulation with thromboxane A₂ (TXA₂) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 112, p. 464-470, 1998.

ISHIZUKA, T.; SUZUKI, K.; KAWAKAMI, M.; HIDAKA, T.; MATSUKI, Y.; NAKAMURA, H. Thromboxane A₂ receptor blockade suppresses intercellular adhesion

molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, p. 367-377, 1996.

ITO, S.; NARUMIYA, S.; HAYAISHI, O. Prostaglandin D2: a biochemical perspective. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 37, p. 219-234, 1989.

JAESCHKE, H.; SMITH, C. W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. **J. Leukoc. Biol.**, v. 61, p. 647-653, 1997.

JIANG, Y.; BELLER, D. I.; FREN DL, G.; GRAVES, D. T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 148, p. 2423-2428, 1992.

JONES, D. A.; ABBASSI, O.; MCINTIRE, L. V.; MCEVER, R. P.; SMITH, C. W. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. **Biophys. J.**, v. 65, p. 1560-1569, 1993.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. The role of histamine in regulation of immune responses. **Chem. Immunol. Allergy**, v. 91, p. 174-187, 2006.

KALESNIKOFF, J.; GALLI, S. J. New developments in mast cell biology. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 1215-1223, 2008.

KANAOKA, Y.; URADE, Y. Hematopoietic prostaglandin D synthase. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 69, p. 163-167, 2003.

KANASHIRO, M. M.; DE CÁSSIA, M.; ESCOCARD, R.; PETRETSKI, J. H.; PRATES, M. V.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L.; DA SILVA, W. D.; KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipases A(2) from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 64, p. 1179-1186, 2002.

KANWAR, S.; KUBES, P. Ischemia/reperfusion-induced granulocyte influx is a multistep process mediated by mast cells. **Microcirculation**, v. 1, p. 175-182, 1994.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 25-29, 2003.

KIM, H. Y.; KIM, H. S. Upregulation of MIP-2 (CXCL2) expression by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in mouse peritoneal macrophages. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 85, p. 60-67, 2007.

KIM, S.; BELLONE, S.; MAXEY, K. M.; POWELL, W. S.; LEE, G. J.; ROKACH, J. Synthesis of 15R-PGD2: a potential DP2 receptor agonist. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 1873-1876, 2005.

KIM, T.H.; YOON, H.J.; LIM, C.M.; KIM, E.K.; KIM, M.J.; KOH, Y. The role of endogenous histamine on the pathogenesis of the lipopolysaccharide (LPS)-induced, acute lung injury: a pilot study. **Inflammation**, v. 29, p. 72-80, 2005.

KITAURA, J.; KINOSHITA, T.; MATSUMOTO, M.; CHUNG, S.; KAWAKAMI, Y.; LEITGES, M.; WU, D.; LOWELL, C. A.; KAWAKAMI, T. IgE- and IgE+Ag-mediated mast cell migration in an autocrine/paracrine fashion. **Blood**, v. 105, p. 3222-3229, 2005.

KNIGHT, D. A.; STEWART, G. A.; THOMPSON, P. J. Histamine tachyphylaxis in human airway smooth muscle. The role of H2-receptors and the bronchial epithelium. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 146, p. 137-140, 1992.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; BURLAK, C e DELEO, F. R. Neutrophils in the innate immune response. **Arch. Immunol. Ther. Exp., Warsz**, v. 53, p. 505-517, 2005.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes Infect.**, v. 5, p. 1337-1344, 2003.

KOUYOUMDJIAN, J. A. E.; POLIZELLI, C. Snake bites caused by *Bothrops moojeni*: report of 37 cases. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 30, p. 624-632, 1988.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; KOUYOUMDJIAN, N. C. V. Acidentes ofídicos: estudo de 46 casos na região de São José do Rio Preto. **Ars. Curandi.**, v. 19, p. 55-92, 1986.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C.; LOBO, S. M.; GUIMARÃES, S. M. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni* na região de São José do Rio Preto – São Paulo. **Arq. Bras. Med.**, v. 64, p. 167-171, 1990.

KUBES, P.; GRANGER, D. N. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. **Cardiovasc. Res.**, v. 32, p. 699-708, 1996.

KUBES, P.; KANWAR, S. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. **J. Immunol.**, v. 152, p. 3570-3577, 1994.

KUBO, Y.; NAKANO, K. Regulation of histamine synthesis in mouse CD4+ and CD8+ T lymphocytes. **Inflamm. Res.**, v. 48, p. 149-153, 1999.

KUIJPERS, T.W.; VAN DEN BERG, J.M.; TOOL, A.T.; ROOS, D. The impact of platelet-activating factor (PAF)-like mediators on the functional activity of neutrophils: anti-inflammatory effects of human PAF-acetylhydrolase. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 123, p. 412-20, 2001.

KURAMASU, A.; SAITO, H.; SUZUKI, S.; WATANABE, T.; OHTSU, H. Mast cell-/basophil-specific transcriptional regulation of human L-histidine decarboxylase gene by CpG methylation in the promoter region. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 31607-31614, 1998.

LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 343, p. 257-263, 1998.

LANDUCCI, E. C.; DE CASTRO, R. C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by the lys-49 phospholipase A(2) homologue piratoxin-i in the rat and rabbit. Effect of polyanions and *p*-bromophenacyl bromide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, p. 1289-1294, 2000.

LEURS, R.; BLANDINA, P.; TEDFORD, C.; TIMMERMAN, H.; Therapeutic potential of histamine H3 receptor agonists and antagonists. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 19, p. 177-183, 1998.

LEWIS, R.A.; SOTER, N.A.; DIAMOND, P.T.; AUSTEN, K.F.; OATES, J.A.; ROBERTS II, L.J. Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE. **J. Immunol.**, v. 129, p. 1627-1631, 1982.

LING, P.; NGO, K.; NGUYEN, S.; THURMOND, R. L.; EDWARDS, J. P.; KARLSSON, L.; FUNG-LEUNG, W. P. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 161-171, 2004.

LIU, C.; MA, X.; JIANG, X.; WILSON, S.J.; HOFSTRA, C.L.; BLEVITT, J.; PYATI, J.; LI, X. CHAI, W. CARRUTHERS, N. LOVENBERG, T.W. Cloning and pharmacological

characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, p. 420-426, 2001.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 949-956, 1993.

LOCATI, M.; TORRE, Y. M.; GALLIERA, E.; BONECCHI, R.; BODDULURI, H.; VAGO, G.; VECCHI, A.; MANTOVANI, A. Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 16, p. 679-686, 2005.

LOMONTE, B.; LUNDGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. **Toxicon**, v. 32, p. 41-55, 1994.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, p. 93-105, 1993.

LONGLEY, J.; DUFFY, T. P.; KOHN, S. The mast cell and mast cell disease. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 32, p. 545-561, 1995.

LORENZ, D.; WIESNER, B.; ZIPPER, J.; WINKLER, A.; KRAUSE, E.; BEYERMANN, M.; LINDAU, M.; BIENERT, M. Mechanism of peptide-induced mast cell degranulation. Translocation and patch-clamp studies. **J. Gen. Physiol.**, v. 112, p. 577-591, 1998.

LOVENBERG, T. W.; ROLAND, B. L.; WILSON, S. J.; JIANG, X.; PYATI, J.; HUVAR, A.; JACKSON, M. R.; ERLANDER, M. G. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, p. 1101-1117, 1999.

LUSTER, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, p. 436-445, 1998.

LUSTER, A. D.; TAGER, A. M. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 711-724, 2004.

MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 102, p. 364-370, 2005.

MALAVIYA, R.; ABRAHAM S.N. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, p. 841-846, 2000.

MALAVIYA, R.; GAO, Z.; THANKAVEL, K.; VAN DER MERWE, P. A.; ABRAHAM, S. N. The mast cell tumor necrosis factor alfa response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, p. 8110-8115, 1999.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 20, p. 955-972, 1982.

MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 907-918, 2006.

MARIANI, M.; PANINA-BORDIGNON, P. Analysis of homing receptor expression on infiltrating leukocytes in disease states. **J. Immunol. Methods**, v. 273, p. 103-114, 2003.

MARSHALL, J. S.; JAWDAT, D.M. Mast cells in innate immunity. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 114, p. 21-27, 2004.

MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cells in innate immunity. **Immunol. Rev.**, v. 173, p. 131-140, 2000.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33-71.

MELGAREJO, A. R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 42-70.

METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, v. 111, p. 485-491, 2008.

METCALFE, O. O.; SARAM, O.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 1033-1079, 1997.

METZ, M. E.; MAURER, M. Mast cells--key effector cells in immune responses. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 234-241, 2007.

METZ, M.; PILIPONSKY, A. M.; CHEN, C. C.; LAMMEL, V.; ABRINK, M.; PEJLER, G.; TSAI, M.; GALLI, S. J. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. **Science**, v. 313, p. 526-530, 2006.

MIKI, I.; KUSANO, A.; OHTA, S.; HANAI, N.; OTOSHI, M.; MASAKI, S.; SATO, S.; OHMORI, K. Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. **Cell. Immunol.**, v. 171, p. 285-288, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância dos acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: DEVEP/CGDT/COVEV, 2004.

MIYAGAWA, N.; IWASAKI, H.; KATO, T.; TANAKA, M.; SHIBATA, T.; WAKITANI, K. Two pharmacological phases in antigen-induced immediate airway response in rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 2260-2264, 2008.

MIZOGUCHI, A.; EGUCHI, N.; KIMURA, K.; KIYOHARA, Y.; QU, W. M.; HUANG, Z. L.; MOCHIZUKI, T.; LAZARUS, M.; KOBAYASHI, T.; KANEKO, T.; NARUMIYA, S.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, p. 11674-11679, 2001.

MOREIRA, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; AMARAL, R. B.; ZAMUNÉR, S. R.; TEIXEIRA, C. F. 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. 80, n. 2-3, p. 107-114, 2009.

MOREIRA, V.; ZAMUNER, S. R.; WALLACE, J. L.; TEIXEIRA, C. F. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 and D2, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v. 49, p. 615-624, 2007.

MORGAN, R. K.; MCALLISTER, B.; CROSS, L.; GREEN, D. S.; KORNFELD, H.; CENTER, D. M.; CRUIKSHANK, W. W. Histamine 4 receptor activation induces

recruitment of FoxP3⁺ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. **J. Immunol.**, v. 178, p. 8081-8089, 2007.

MOSER, B.; WOLF, M.; WALZ, A.; LOETSCHER, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 75-84, 2004.

MOURA DA SILVA, A.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, p. 713-719, 1991.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, p. 3032-43, 2000.

MURPHY, S.; KELLY, H.W. Cromolyn sodium: a review of mechanisms and clinical use in asthma. **Drug Intell. Clin. Pharm.**, v. 21, p. 22-35, 1987.

NAKAHATA, N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacol. Ther.**, v. 118, p. 18-35, 2008.

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **J. Herp.**, v. 37, p. 653-659, 2003.

ODA, T.; MATSUMOTO, S. Identification and characterization of histamine H₄ receptor. **Nippon Yakurigaku Zasshi.**, v. 118, p. 36-42, 2001.

OHNISHI, H.; MIYAHARA, N.; GELFAND, E. W. The role of leukotriene B₄ in allergic diseases. **Allergol. Int.**, v. 87, p. 291-298, 2008.

OLIVEIRA, R. C.; WEN, F. W.; SIFUENTES, D. N. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. *In*: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JUNIOR, V. (Ed.). **Animais Peçonhentos no Brasil – Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2009. p. 06-21.

OLSON, T. S.; LEY, K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 283, p. R7-28, 2002.

OLSSON, N.; ULFGREN, A. K.; NILSSON, G. Demonstration of mast cell chemotactic activity in synovial fluid from rheumatoid patients. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 60, p. 187-193, 2001.

O'REILLY, M.; ALPERT, R.; JENKINSON, S.; GLADUE, R.P.; FOO, S.; TRIM, S.; PETER, B.; TREVETHICK, M.; FIDOCK, M. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis. **J. Recept. Signal Transduct. Res.**, v. 22, p. 431-448, 2002.

PACHECO, P.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; GOMES, R. N.; BARBOSA-LIMA, G.; WERMELINGER, L. B.; MAYA-MONTEIRO, C. M.; SILVA, A. R.; BOZZA, M. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P. T. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. **J. Immunol.**, v. 179, p. 8500-8508, 2007.

PAES LEME, A. F.; KITANO, E. S.; FURTADO, M. F.; VALENTE, R. H.; CAMARGO, A. C.; HO, P. L.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. **Proteomics**, v. 9, p. 733-745, 2009.

PANULA, P.; AIRAKSINEN, M. S.; PIRVOLA, U.; KOTILAINEN, E. A histamine-containing neuronal system in human brain. **Neuroscience**, v. 34, p. 127-132, 1990.

PATON, W. D. Compound 48/80: a potent histamine liberator. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 6, p. 499-508, 1951.

PEARCE, F. L. Calcium and histamine secretion from mast cells. **Prog. Med. Chem.**, v. 19, p. 59-109, 1982.

PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C. F.; TAMBOURGI, D. V.; GUTIÉRREZ, J. M.; 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.

PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MACLOUF, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 1170-1173, 1985.

PROUDFOOT, A.E.; POWER, C.A.; WELLS, T.N. The strategy of blocking the chemokine system to combat disease. **Immunol. Rev.**, v. 177, p. 246-256, 2000.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.; FURTADO, M. F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

QURESHI, R.; JAKSCHIK, B. A. The role of mast cells in thioglycollate-induced inflammation. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2090-2096, 1988.

RÅDMARK, O.; SAMUELSSON, B. 5-Lipoxygenase: mechanisms of regulation. **J. Lipid. Res.**, v. 50, p. S40-45, 2009.

RAMPART, M. Neutrophil-endothelial cell interactions. *In*: BRAIN, S. D. (Ed.). **The handbook of immunopharmacology. Immunopharmacology of Microcirculation.** San Diego: Academic Press, 1994. p. 77-107.

REDDY, S. T.; HERSCHAMAN, H. R. Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D2 in activated mast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 3231-3237, 1997.

RIBATTI, D.; RONCALI, L.; NICO, B.; BERTOSI, M. Effects of exogenous heparin on the vasculogenesis of the chorioallantoic membrane. **Acta Anat., Basel**, v. 130, p. 257-263, 1987.

ROJAS, C. A.; GONÇALVES, M. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 8, p. 193-204, 2007.

ROLLINS, B. J. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. **Mol. Med. Today**, v. 2, p. 198-204, 1996.

ROLLINS, B. J.; MORRISON, E. D.; STILES, C. D. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, p. 3738-3742, 1988.

ROLLINS, B. J.; STIER, P.; ERNST, T.; WONG, G. G. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. **Mol. Cell. Biol.**, v. 9, p. 4687-4695, 1989.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. *In*: BURCHEL, W.; BUCKLEY, E. E. (Ed.). **Venomous Animals and Their Venoms.** New York: Academic Press, 1971. p. 345-403.

ROTHISCHILD, A. M.; ROTHISCHILD, Z. Liberation of pharmacologically active substances by snake venoms. *In*: LEE, C. Y. **Handbook of experimental pharmacology: Snake Venoms.** Berlin: Springer, 1979. p. 591-628.

ROYER, J.F.; SCHRATL, P.; CARRILLO, J.J.; JUPP, R.; BARKER, J.; WEYMAN-JONES, C.; BERI, R.; SARGENT, C.; SCHMIDT, J.A.; LANG-LOIDOLT, D.; HEINEMANN, A. A novel antagonist of prostaglandin D2 blocks the locomotion of eosinophils and basophils. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 38, p. 663-671, 2008

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; MOURA DA SILVA, A. M.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Local production of cytokines and matrix metalloproteinases after intramuscular injection of a myotoxic phospholipase A₂ and a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Med. Inflamm.**, v. 11, p. 121-128, 2002.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **Am. J. Pathol.**, v. 86, p. 183-276, 1977.

SAMUELSSON, B. Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. **Z. Rheumatol.**, v. 50, p. 3-6, 1991.

SAMUELSSON, B.; DAHLÉN, S. E.; LINDGREN, J. A.; ROUZER, C. A.; SERHAN, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v. 237, p. 1171-1176, 1987.

SCHLEIMER, R.P.; FOX, C.C.; NACLERIO, R.M.; PLAUT, M.; CRETICOS, P.S.; TOGIAS, A.G.; WARNER, J.A.; KAGEY-SOBOTKA, A.; LICHTENSTEIN, L.M. Role of human basophils and mast cells in the pathogenesis of allergic diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 76, p. 369-374, 1985.

SCHRAMM, R.; SCHAEFER, T.; MENGER, M. D.; THORLACIUS, H. Acute mast cell-dependent neutrophil recruitment in the skin is mediated by KC and LFA-1: inhibitory mechanisms of dexamethasone. **J. Leukoc. Biol.**, v. 72, p. 1122-1132, 2002.

SCHRATL, P.; ROYER, J. F.; KOSTENIS, E.; ULVEN, T.; STURM, E. M.; WALDHOER, M.; HOEFLER, G.; SCHULIGOI, R.; LIPPE, I. T.; PESKAR, B. A.; HEINEMANN, A. The role of the prostaglandin D2 receptor, DP, in eosinophil trafficking. **J. Immunol.**, v. 179, p. 4792-4799, 2007.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842-1860, 2008.

SCHULIGOI, R.; SCHMIDT, R.; GEISSLINGER, G.; KOLLROSER, M.; PESKAR, B. A.; HEINEMANN, A. PGD₂ metabolism in plasma: kinetics and relationship with bioactivity on DP1 and CRTH2 receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, n. 1, p. 107-117, 2007.

SCOTT, K. F.; BRYANT, K.J.; BIDGOOD, M. J. Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A2-cyclooxygenase pathways in inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 535-541, 1999.

SHIRAISHI, M.; HIRASAWA, N.; OIKAWA, S.; KOBAYASHI, Y.; OHUCHI, K. Analysis of histamine-producing cells at the late phase of allergic inflammation in rats. **Immunology**, v. 99, p. 600-606, 2000a.

SHIRAISHI, M.; HIRASAWA, N.; KOBAYASHI, Y.; OIKAWA, S.; MURAKAMI, A.; OHUCHI, K. Participation of mitogen-activated protein kinase in thapsigargin and TPA-induced histamine production in murine macrophage RAW 264.7 cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 129, p. 515-524, 2000b.

SHOWELL, H. J.; CONKLYN, M. J.; ALPERT, R.; HINGORANI, G. P.; WRIGHT, K. F.; SMITH, M. A.; STAM, E.; SALTER, E. D.; SCAMPOLI, D. N.; MELTZER, S.; REITER, L. A.; KOCH, K.; PISCOPIO, A. D.; CORTINA, S. R.; LOPEZ-ANAYA, A.; PETTIPHER, E. R.; MILICI, A. J.; GRIFFITHS, R. J. The preclinical pharmacological profile of the potent and selective leukotriene B4 antagonist CP-195543. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 285, p. 946-954, 1998.

SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, p. 45-90, 2008.

SMITH, M. J.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A. Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 32, p. 517-518, 1980.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 145-182, 2000.

SMITH, W. L.; LANGENBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes? **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 1491-1495, 2001.

SNYDER, F. Biochemistry of platelet-activating factor: a unique class of biologically active phospholipids. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 190, p.125-35, 1989.

STASSEN, M.; HULTNER, L.; MULLER, C.; SCHMITT, E. Mast cells and inflammation. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 50, p. 179-85, 2002.

STASSEN, M.; MULLER, C.; ARNOLD, M.; HULTNER, L.; KLEIN-HESSLING, S.; NEUDORFL, C.; REINEKE, T.; SERFLING, E.; SCHMITT, E. IL-9 and IL-13 production

by activated mast cells is strongly enhanced in the presence of lipopolysaccharide: NF-kappa B is decisively involved in the expression of IL-9. **J. Immunol.**, v. 166, p. 4391-4398, 2001.

SUPAJATURA, V.; USHIO, H.; NAKAO, A.; OKUMURA, K.; RA, C.; OGAWA, H. Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by toll-like receptor 4. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2250-2256, 2001.

TAGER, A. M. E.; LUSTER, A. D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 69, p. 123-34, 2003.

TAGER, A. M.; BROMLEY, S. K.; MEDOFF, B. D.; ISLAM, S. A.; BERCURY, S. D.; FRIEDRICH, E. B.; CARAFONE, A. D.; GERSZTEN, R. E.; LUSTER, A. D. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 982-990, 2003.

TAILOR, A.; GRANGER, D. N. Role of adhesion molecules in vascular regulation and damage. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 2, p. 78-83, 2000.

TAKAMATSU, S.; NAKASHIMA, I.; NAKANO, K. Modulation of endotoxin-induced histamine synthesis by cytokine in mouse bone marrow-derived macrophages. **J. Immunol.**, v. 156, p. 778-785, 1996.

TAKESHITA, K.; BACON, K.B.; GANTNER, F. Critical role of L-selectin and histamine H4 receptor in zymosan-induced neutrophil recruitment from the bone marrow: comparison with carrageenan. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, p. 272-280 2004.

TAKESHITA, K.; SAKAI, K.; BACON, K. B.; GANTNER, F. Critical role of histamine H4 receptor in leukotriene B4 production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan *in vivo*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 307, p. 1072-1078, 2003.

TAMAOKI, J.; NAKATA, J.; TAKEYAMA, K.; CHIYOTANI, A.; KONNO, K. Histamine H2 receptor-mediated airway goblet cell secretion and its modulation by histamine-degrading enzymes. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 99, p. 233-238, 1997.

TANNENBAUM, S.; OERTEL, H.; HENDERSON, W.; KALINER, M. The biologic activity of mast cell granules. I. Elicitation of inflammatory responses in rat skin. **J. Immunol.**, v. 125, p. 325-335, 1980.

TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor. **Toxicon**, v. 32, p. 419-426, 1994.

TEIXEIRA, C. F.; CHAVES, F.; ZAMUNER, R. S.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 86, p. 107-115, 2005.

TEIXEIRA, C. F.; ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; CHAVES, F.; GUTIERREZ, J. M. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. **Muscle Nerve**, v. 28, p. 449-459, 2003.

THORLACIUS, H.; RAUD, J.; ROSENGREN-BEEZLEY, S.; FORREST, M. J.; HEDQVIST, P.; LINDBOM, L. Mast cell activation induces P-selectin-dependent leukocyte rolling and adhesion in postcapillary venules *in vivo*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 203, p. 1043-1049, 1994.

THURMOND, R. L.; DESAI, P. J.; DUNFORD, P. J.; FUNG-LEUNG, W. P.; HOFSTRA, C. L.; JIANG, W.; NGUYEN, S.; RILEY, J. P.; SUN, S.; WILLIAMS, K. N.; EDWARDS, J. P.; KARLSSON, L. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 309, p. 404-413, 2004.

THURMOND, R.L.; GELFAND, E.W.; DUNFORD, P.J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 7, p. 41-53, 2008.

TONNESEN, M.G. Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. **J. Invest. Dermatol.**, v. 93, p. 53S-58S, 1989.

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

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 37, p. S5-12, 2006.

TUNCEL, N.; SENER, E.; CERIT, C.; KARASU, U.; GURER, F.; SAHINTURK, V.; BAYCU, C.; AK, D.; FILIZ, Z. Brain mast cells and therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide in a Parkinson's disease model in rats: brain microdialysis, behavior, and microscopy. **Peptides**, v. 26, p. 827-836, 2005.

VADDI, K. E.; NEWTON, R. C. Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. **J. Immunol.**, v. 153, p. 4721-4732, 1994.

VALENTE, A. J.; GRAVES, D. T.; VIALLE-VALENTIN, C. E.; DELGADO, R.; SCHWARTZ, C. J. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. **Biochemistry**, v. 27, p. 4162-4168, 1988.

VAN PELT, J. P.; DE JONG, E. M.; VAN ERP, P. E.; MITCHELL, M. I.; MARDER, P.; SPAETHE, S. M.; VAN HOOIJDONK, C. A.; KUIJPERS, A. L.; VAN DE KERKHOF, P. C. The regulation of CD11b integrin levels on human blood leukocytes and leukotriene B4-stimulated skin by a specific leukotriene B4 receptor antagonist (LY293111). **Biochem. Pharmacol.**, v. 53, p. 1005-1012, 1997.

VIDAL, J. C.; MOLINA, H.; STOPPANI, A. O. M. A general procedure for the isolation and purification of phospholipase A₂ isoenzymes from *Bothrops* venom. **Acta Physiol. Lat. Am.**, v. 23, p. 91-109, 1972.

VIOLA, A. E.; LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 48, p. 171-197, 2008.

WANG, Y.; THORLACIUS, H. Mast cell-derived tumour necrosis factor-alpha mediates macrophage inflammatory protein-2-induced recruitment of neutrophils in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, p. 1062-1068, 2005.

WEDEMEYER, J.; TSAI, M.; GAIL, S. J. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 624-631, 2000.

WEDMORE, C. V.; WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**, v. 289, p. 646-650, 1981.

WEISSLER, A.; MEKORI, Y.A.; MOR, A. The role of mast cells in non-allergic inflammation. **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 10, p. 843-45, 2008.

WELLER, C. L.; COLLINGTON, S. J.; BROWN, J. K.; MILLER, H. R.; AL-KASHI, A.; CLARK, P.; JOSE, P. J.; HARTNELL, A.; WILLIAMS, T. J. Leukotriene B4, an activation product of mast cells, is a chemoattractant for their progenitors. **J. Exp. Med.**, v. 201, p. 1961-1971, 2005.

WENGNER, A. M.; PITCHFORD, S. C.; FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute

inflammation. **Blood**, v. 111, p. 42-49, 2008.

WERINGER, E. J.; PERRY, B. D.; SAWYER, P. S.; GILMAN, S. C.; SHOWELL, H. J. Antagonizing leukotriene B4 receptors delays cardiac allograft rejection in mice. **Transplantation**, v. 67, p. 808-815, 1999.

WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 103, p. S378-81, 1999.

WHITE, M. V. The role of histamine in allergic diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 86, p. 599-05, 1990.

WILES, M.E.; WELBOURN, R.; GOLDMAN, G.; HECHTMAN, H.B.; SHEPRO, D. Thromboxane-induced neutrophil adhesion to pulmonary microvascular and aortic endothelium is regulated by CD18. **Inflammation**, v. 15, p. 181-199, 1991.

WILLIAMS, K. I.; HIGGS, G. A. Eicosanoids and inflammation. **J. Pathol.**, v. 156, p. 101-110, 1988.

WINKLER, I. G.; LÉVESQUE, J. P.; Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. **Exp. Hematol.**, v. 34, p. 996-1009, 2006.

YAMAKI, K.; THORLACIUS, H.; XIE, X.; LINDBOM, L.; HEDQVIST, P.; RAUD, J.; Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 390-399, 1998.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; CHANG, K.; TAKUWA, Y.; SHIMIZU, T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. **Nature**, v. 387, p. 620-624, 1997.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 385, p. 231-241, 2001.

YOKOMIZO, T.; KATO, K.; TERAWAKI, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 421-432, 2000.

ZAMPELI, E.; TILIGADA, E. The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. **Br. J. Pharmacol.**, v. 157, p. 24-33, 2009.

ZAMUNER, S. R.; DA CRUZ-HOFLING, M. A.; CORRADO, A. P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**, v. 44, p. 259-271, 2004.

ZAMUNER, S. R.; GUTIERREZ, J. M.; MUSCARA, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-1513, 2001.

ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; DE FÁTIMA PEREIRA TEIXEIRA, C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, p. 806-813, 2005.

ZHANG, M.; THURMOND, R.L.; DUNFORD, P.J. The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. **Pharmacol. Ther.**, v. 113, p. 594-606, 2007.

ZHANG, X. W.; LIU, Q.; WANG, Y.; THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 133, p. 413-421, 2001.

ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, v. 13, p. 93-100, 1992.

ANEXO A

ANEXO B

ANEXO C

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)