EDUARDO CESAR ZARZANA

**CROTOXINA: UMA NOVA ABORDAGEM
NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA
PULMONAR EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

**São Paulo
2011**

EDUARDO CESAR ZARZANA

**CROTOXINA: UMA NOVA ABORDAGEM
NA INFLAMAÇÃO ALÉRGICA
PULMONAR EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração:

Farmacologia

Orientador: Dra. Yara Cury

Co-orientadores: Prof. Dr. João Palermo Neto e Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Versão Original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Zarzana, Eduardo Cesar.

Crotoxina: uma nova abordagem na inflamação alérgica pulmonar em ratos / Eduardo Cesar Zarzana. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Yara Cury.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Toxinas de animais e inflamação.

Versão do título para o inglês: Crotoxina: new approach for the modulation of lung allergic inflammation in rats.

Descritores: 1. Crotoxina 2. Inflamação alérgica pulmonar 3. Antiinflamatório 4. Imunomodulatório 5. Receptores ALX 6. Ovalbumina I. Cury, Yara II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0103/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eduardo Cesar Zarzana.

Título da Tese: Crotoxina: uma nova abordagem na inflamação alérgica pulmonar em ratos.

Orientador(a): Yara Cury.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **093** nas fls. **35** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Yara Cury, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Crotolina: uma nova abordagem na modulação da inflamação alérgica pulmonar em ratos"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Eduardo César Zarzana e os pesquisadores Wothan Tavares de Lima e João Palermo Neto**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **17.08.2006**.

São Paulo, 17 de agosto de 2006.

Prof. Dr. **UBIRATAN FABRES MACHADO**
Coordenador da CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. **PATRICIA CASTELUCCI**
Secretária da CEEa - ICB/USP

Dedico este trabalho

À minha Família

Sou profundamente agradecido por tudo que vocês já fizeram e fazem por mim. Nada disso teria acontecido se não fosse pelo amor, pela dedicação e pela confiança que vocês sempre depositaram em mim. Sempre tive na minha casa uma palavra de incentivo, um gesto de ternura e carinho, toda vez que fraquejei. Também, não faltaram os “puxões de orelha” e as lições de humildade quando agia com arrogância e prepotência. Guardarei para sempre todos os exemplos de bravura, as atitudes virtuosas e o excelente convívio de todos esses anos. Vocês sabem, uma nova vida cheia de obstáculos se apresenta, mas já não tenho mais medo, pois sempre carregarei vocês no meu coração!

À minha esposa

Meu Sol, meu norte, minha grande companheira de todas as horas, com você aprendi o conceito da palavra felicidade e sou feliz; ah se você soubesse... Com seu jeito carinhoso e meigo me conquistou plenamente e transformou completamente a minha vida. Sem você, meus dias não teriam o mesmo brilho, não seriam tão cheios de vida e esperança. Soraia, eu simplesmente, TE AMO!

A Yara

Serei eternamente agradecido pela confiança, amizade e orientação. Me recebeu de portas abertas em seu laboratório e rapidamente me permitiu caminhar com as minhas “próprias pernas”, mas sempre esteve presente e preocupada com cada passo tomado por mim durante a pós-graduação. Impossível não se admirar com a sua incrível capacidade de coordenação e liderança. Tenho orgulho da minha formação e de ser seu aluno. Muito obrigado!

AGRADECIMENTO

Agradeço em especial

A meus queridos amigos da pós-graduação, sem vocês esse sonho jamais se concretizaria. Enfrentamos duras batalhas, aprendemos com os nossos erros e trabalhamos muito. Convivemos com as nossas limitações e superamos as descrenças. Trilhei por uma longa jornada e só agora, virarei mais uma importante página da minha vida. Terei muita saudade do caloroso convívio, do contato próximo, das intermináveis festas, da forma como nos divertimos e fomos felizes. Agradeço a todos, sinceramente!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima pelas valiosas sugestões ao longo do estudo, por ter me recebido de portas abertas no seu laboratório e pelas conversas científicas apaixonadas.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, por todo respeito, confiança dados à minha orientação e formação profissional. Agradeço pela oportunidade de fazer parte do grupo de neuroimunomodulação e permitir a condução dos experimentos no seu laboratório.

À Dra. Sandra Sampaio pela amizade, conselhos e dedicação durante todos esses anos.

Aos amigos, Ana Paula Ligeiro de Oliveira e Fernando Coelho pela inestimável contribuição durante a parte experimental. Agradeço pela paciência e pelos ensinamentos.

À Prof. Dra. Sônia Jancar pelas diversas sugestões e preciosa contribuição na realização do projeto deste trabalho.

À Prof. Dra. Lia Siguemi Sudo-Hayashi pelas sugestões e pela participação na minha qualificação.

Ao Prof. Dr. Amílcar Sabino Damazo do Departamento de Ciências Básicas em saúde Faculdade de Ciências Médicas – UFMT pela ajuda nos experimentos de histologia.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de ter sido aluno de pós-graduação (Mestrado e Doutorado).

A todos os professores do Departamento de Patologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pela chance de fazer parte do convívio e poder ter trabalhado durante todos esses anos.

Aos funcionários do biotério, quem sempre fizeram parte, agradeço pela estimada colaboração durante toda a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca pelo profissionalismo e pronto atendimento.

Para finalizar, sou profundamente grato às pessoas que doaram seu tempo, suas idéias, sua amizade e, acima de tudo, àquelas que doaram uma fração do seu suor para a criação desta tese.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao projeto (Processo – 06/04667-6)

RESUMO

ZARZANA, E. C. **Crotoxina**: uma nova abordagem na inflamação de origem alérgica em ratos. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A crotoxina (CTX) é a principal toxina do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, representando aproximadamente 65% do conteúdo protéico do veneno bruto. A CTX é caracterizada como β -neurotoxina com ação principalmente pré-sináptica, inibindo a liberação de acetilcolina nas junções neuro-musculares. No entanto, vários dados de literatura têm mostrado que, adicionalmente à atividade neurotóxica, a CTX apresenta efeitos imunomodulatórios antiinflamatório, analgésico e anti-tumoral. Apesar destes dados, não foi ainda determinada a ação desta toxina sobre modelos experimentais de alergia, como por exemplo, a inflamação alérgica pulmonar. Este trabalho teve por objetivo investigar o possível efeito inibitório da CTX sobre a gênese e o desenvolvimento de resposta inflamatória pulmonar induzida em ratos pela sensibilização com Ovalbumina (OVA), bem como a sua possível interferência na alergia já estabelecida. A administração subcutânea de CTX (18 μ g/rato), 2 horas antes da broncoprovocação, produziu: 1 – diminuição do número total de células recuperadas do lavado broncoalveolar, decorrente da redução no número de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos; 2- diminuição da atividade enzimática de mieloperoxidase em amostras de homogenato do pulmão; 3– redução da desgranulação dos mastócitos em brônquios intrapulmonares, efeitos estes que foram revertidos pelo pré-tratamento com BOC-2, um antagonista de receptores ALX; 4 – diminuição do número de linfócitos e monócitos na circulação periférica; 5 – redução no número total de leucócitos recuperados da medula óssea; 6 – aumento da expressão do complexo CD11/CD18 por leucócitos recuperados do lavado broncoalveolar e 7 - diminuição da força de contração de segmentos da traquéia, em resposta anafilática “*in vitro*”. Por outro lado, em animais sensibilizados e broncoprovocados por OVA, a CTX não interferiu com o aumento da permeabilidade vascular pulmonar, com as alterações histopatológicas do tecido pulmonar e com a produção de IgE. Analisamos, ainda neste trabalho, os efeitos da CTX administrada 2 horas antes da imunização primária, do reforço e/ou desafio. Neste esquema de tratamento, a toxina promoveu diminuição da produção de IgE e da força de contração de segmentos da traquéia, mas não interferiu com a secreção de IL4 e IL-6 de animais sensibilizados e broncoprovocados com OVA. Em conjunto, os resultados sugerem que a CTX interfere com a inflamação pulmonar acarretada pela sensibilização e desafio por OVA, modulando

mecanismos indutores e efetores da resposta alérgica. Estes resultados podem vir a contribuir para o melhor conhecimento da ação da toxina e no futuro, sobre os mecanismos endógenos da imunorregulação de inflamações alérgicas.

Palavras-chave: Crotoxina. Inflamação Alérgica Pulmonar. Antiinflamatório. Ovalbumina.

ABSTRACT

ZARZANA, E. C. **Crotoxin**: a new approach for the modulation of lung allergic inflammation in rats. 2011. 89 p. Ph. D. Thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Crotoxin (CTX) is the main toxin of the venom of South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, corresponding to 65% of the protein content of the crude venom. CTX is a β -neurotoxin that displays mainly pre-synaptic action, inhibiting the release of acetylcholine in the neuromuscular junctions. However, some experimental and clinical data have shown that, in addition to the neurotoxic activity, CTX displays immunomodulatory, antiinflammatory, analgesic and anti-tumoral properties. Despite these observations, the possible inhibitory action of this toxin in experimental models of allergy, such as lung allergic inflammation, was not determined yet. Therefore, this study aims to investigate the inhibitory effect of CTX on the genesis and development of lung inflammation induced in rats by sensitization with Ovalbumin (OVA). Subcutaneous administration of CTX (18 μ g/rat), 2 hours before bronchial provocation: 1 - decreases of total cell number harvested from the bronchoalveolar fluid, due to reduction in the amount of macrophages, lymphocytes, neutrophils and eosinophils; 2 – reduce myeloperoxidase activity in lung homogenate samples; 3 – decreases bronchial mastocyte degranulation. These effects were blocked by previous treatment with BOC-2 , an antagonist of ALX receptors; 4 - decreases the number of lymphocytes and monocytes in peripheral circulation; 5 - decreases the total number of leukocytes recovered from bone marrow; 6 – increases the expression of CD11/CD18 complex in leukocytes recovered from bronchoalveolar fluid; and 7 – decreases the strength of contraction of tracheal segments in anaphylactic response "in vitro". Incontrast, in animals sensitized and challenged with OVA, CTX did not inhibit the increase in pulmonary vascular permeability or the production of IgE caused by OVA. We also analyzed the effects of CTX administered 2 hours before primary immunization, booster and / or challenge with OVA. In this scheme of treatment, the toxin decreased the production of IgE and the strength of contraction of trachea segments. Together, these results suggest that CTX inhibits lung inflammation induced by sensitization and challenge with OVA, interfering with the initiators and effectors mechanisms of allergic inflammation.

These results could contribute to the better understanding of toxin action and in the future, of the endogenous mechanisms involved in immunoregulation of allergic response.

Keywords: Crotoxin. Allergic lung Inflammation. Inflammatory. Ovalbumin.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BOC-2	N-t-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe
CA	Crotopotina
CB	Subunidade B
CEEA	Comissão de Ética em experimentação animal
<i>Cdt</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Com-A	Concanavalina A
CTX	Crotoxina
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EPO	Eosinófilo peroxidase
ELISA	Ensaio imunoenzimático de fase sólida
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulocítica macrofágica
IL	Interleucina
LBA	Lavado broncoalveolar
MPO	Mieloperoxidase
OVA	Ovalbumina
PBS	Salina tamponada com fosfato
LXA ₄	Lipoxina A ₄
Ig	Imunoglobulina
LT	Leucotrieno
LFA	Antígeno associado a função de linfócitos
LO	Lipoxigenase
MBP	Proteína básica principal
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
SUS	Sistema único de saúde

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Efeito da crotoxina sobre o número total de leucócitos circulantes</i>	<i>54</i>
<i>Tabela 2 – Efeito da crotoxina sobre o numero de mastócitos intactos e desgranulados de pulmão de animais sensibilizados por ovalbumina</i>	<i>63</i>

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 - Crotalus durissus terrificus.....</i>	19
<i>Figura 2 - Efeito da Crotoxina sobre as alterações de permeabilidade vascular causadas pela sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA) em segmentos de traquéia (A) e brônquio interno (B).....</i>	43
<i>Figura 3 - Análise histopatológica do tecido pulmonar de animais sensibilizados e broncoprovocados por OVA, na presença ou ausência da crotoxina.....</i>	45
<i>Figura 4 - Efeito da crotoxina sobre os títulos (ELISA) de anticorpos totais do isotipo IgE, 24 horas após a broncoprovocação.....</i>	46
<i>Figura 5 - Efeito da crotoxina sobre o número total de células recuperadas no lavado broncoalveolar de ratos.....</i>	48
<i>Figura 6 - Efeito da crotoxina sobre o número total de células recuperadas na medula óssea de ratos.....</i>	48
<i>Figura 7 - Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação.....</i>	49
<i>Figura 8 - Efeito da crotoxina sobre o número de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação.....</i>	50
<i>Figura 9 - Efeito da crotoxina sobre a atividade de mieloperoxidase em tecido pulmonar de ratos, 24 horas após a broncoprovocação.....</i>	51
<i>Figura 10 - Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes na medula óssea, 24 horas após a broncoprovocação.....</i>	52
<i>Figura 11 - Efeito da crotoxina sobre a expressão de moléculas de adesão do complexo CD11a/CD18 no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação.....</i>	55
<i>Figura 12 - Efeito da crotoxina sobre a hiper-reatividade em segmentos de traquéia frente ao desafio com metacolina.....</i>	56
<i>Figura 13 - Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “in vitro” de segmento de traquéia isolada de ratos.....</i>	57
<i>Figura 14 - Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação com OVA.....</i>	58
<i>Figura 15 - Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “in vitro” de segmento de traquéia isolada de ratos.....</i>	59
<i>Figura 16 - Efeito da crotoxina sobre os níveis de IL-6 (Painel A) e IL-4 (Painel B) no soro, 24 horas após a broncoprovocação.....</i>	60
<i>Figura 17 - Envolvimento dos receptores ALX no efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados e broncoprovocados com ovalbumina.....</i>	61
<i>Figura 18 - Análise dos mastócitos no tecido pulmonar de ratos sensibilizados e broncoprovocados por ovalbumina, tratados ou não com crotoxina.....</i>	64

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1	Veneno de serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> e crotoxina	18
1.2	Efeito antiinflamatório e imunomodulatório da crotoxina e do veneno de serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i>	21
1.3	Inflamação Pulmonar Alérgica Experimental	23
1.4	Asma	26
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivos Gerais	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Animais	33
3.2	Tratamentos Farmacológicos “ <i>in vivo</i> ”	33
3.3	Obtenção e Administração da Crotoxina	33
3.4	Inflamação Alérgica Pulmonar - Sensibilização e Broncoprovocação “ <i>in vivo</i> ”	34
3.5	Análise Histopatológica do Pulmão.....	35
3.6	Avaliação da Alteração de Permeabilidade Vascular nas Vias Aéreas	35
3.7	Obtenção do Lavado Broncoalveolar	36
3.8	Determinação do Número de Células Recuperadas no Lavado Broncoalveolar	36
3.9	Determinação da Atividade de Mieloperoxidase	36
3.10	Avaliação da Participação de Receptores ALX no Efeito Inibitório da Crotoxina Sobre o Número de Leucócitos Recuperados do Lavado Broncoalveolar	37
3.11	Expressão de Moléculas de Adesão do Complexo CD11/CD18.....	38
3.12	Determinação de Mastócitos Intactos e Desgranulados em Cortes Histológicos de Tecido Pulmonar	38
3.13	Determinação de Citocinas IL4, IL6 e Anticorpos do Isotipo IgE (ELISA)	38
3.14	Determinação do Número de Leucócitos Circulantes	39
3.15	Determinação do Número de Células na Medula Óssea Femoral.....	39
3.16	Estudo da Capacidade Contrátil de Traquéia Isolada e Exposta a uma Solução de Ovalbumina “ <i>in vitro</i> ”	40
3.17	Avaliação da Hiper-reatividade “ <i>in vitro</i> ” nas Vias Aéreas Frente a Desafio com Metacolina	40
3.18	Análise Estatística.....	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Caracterização do modelo de inflamação pulmonar e análise do efeito da crotoxina	42
4.1.1	Alteração de permeabilidade vascular.....	42
4.1.2	Análise histopatológica do pulmão	44
4.1.3	Efeito da crotoxina sobre titulação de anticorpos totais do isotipo IgE (ELISA)	46
4.1.4	Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar e no lavado de medula óssea de animais normais	47
4.1.5	Determinação do número de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina	49
4.1.6	Determinação da atividade de mieloperoxidase, 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina	51
4.1.7	Determinação do número de células presentes no lavado de medula óssea, 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina	52
4.1.8	Determinação do número de leucócitos na circulação sanguínea periférica, imediatamente e 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina	53
4.1.9	Determinação da Expressão de moléculas de adesão do complexo CD11/CD18, na presença ou ausência da crotoxina	55
4.2	Determinação da hiper-reatividade “ <i>in vitro</i> ” de segmentos de traquéia em resposta ao desafio com metacolina	56
4.2.1	Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “ <i>in vitro</i> ” de segmento de traquéia isolada de ratos	57

4.3	Análise do efeito da crotoxina na fase indutora da reação alérgica	58
4.3.1	<i>Determinação do número de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação</i>	58
4.3.2	<i>Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “in vitro”, de segmento de traquéia isolada de ratos</i>	59
4.3.3	<i>Efeito da crotoxina sobre os níveis de IL-6 e IL-4 no lavado broncoalveolar (ELISA)</i>	60
4.3.4	<i>Envolvimento dos receptores ALX no efeito inibitório da crotoxina sobre alguns parâmetros inflamação pulmonar alérgica</i>	61
4.3.5	<i>Determinação do número de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação</i>	61
4.3.6	<i>Determinação das áreas teciduais e contagem dos mastócitos</i>	62
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS.....	78

1 REVISÃO DA LITERATURA

A crotoxina (CTX) é o principal componente tóxico do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt, cascavel), contribuindo com cerca de 80% da letalidade induzida pelo veneno total. Esta toxina é uma β -neurotoxina formada por dois componentes não covalentemente ligados: (a) a crotapotina (subunidade A, componente A; CA), de característica ácida, não tóxica e não hemolítica; e (b) uma fosfolipase A₂ (FLA₂) básica (subunidade B, componente B ou; CB) com atividade tóxica (HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971; BON; BOUCHIER; CHOUMET, 1989). Dentre as principais atividades da crotoxina, destacam-se a neurotoxicidade (BRAZIL, 1966; BREITHAUPT, 1976), miotoxicidade (BREITHAUPT, 1976), nefrotoxicidade (HADLER e BRAZIL, 1966; AMORA; SOUSA; MARTINS, 2006); e cardiotoxicidade (SANTOS; SOUZA; FREIRE-MAIA, 1990; HERNANDEZ; SCANNONE; FINOL, 2007). Contudo, vários estudos têm demonstrado que adicionalmente a estas atividades, a CTX apresenta efeito imunomodulatório (CARDOSO e MOTA, 1997), anti-inflamatório (SAMPAIO; BRIGATTE; SOUSA-E-SILVA, 2003; SAMPAIO; ALBA-LOUREIRO; BRIGATTE, 2006b; SAMPAIO; SANTOS; COSTA, 2006a), antimicrobiano (SAMPAIO; HYSLOP; FONTES, 2010), antitumoral (CORIN; VISKATIS; VIDAL, 1993; RUDD; VISKATIS; VIDAL, 1994; DONATO; MARTIN; PEREZ, 1996) e antinociceptivo (ZHANG; HAN; CHEN, 2006; NOGUEIRA-NETO; AMORIM; BRIGATTE, 2008; ZHU; WU; ZHOU, 2008). Algumas destas atividades são também relatadas para o veneno bruto da cascavel.

1.1 Veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e crotoxina

As serpentes do gênero *Crotalus* distribuem-se de maneira irregular pelo País. São conhecidas popularmente como cascavel, maracambóia e boicininga, sendo responsáveis por aproximadamente 9% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. Apresentam cauda com chocalho (guizo) e coloração marrom-amarelada. Habitam os campos abertos, regiões secas e pedregosas e os pastos, exceto a zona litorânea. Chegam a atingir, na fase adulta 1,6 m de comprimento (BUTANTAN, 2001).

Figura 1 - *Crotalus durissus terrificus*

O veneno da *Crotalus durissus terrificus* (*Cdt*) induz efeitos miotóxico, neurotóxico e anticoagulante. Segundo a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) (2001), os acidentes por essas serpentes podem ser muito graves, levando à morte, caso não sejam utilizadas abordagens terapêuticas adequadas. O principal tratamento é a soroterapia (antiveneno) (FUNASA, 2001). O efeito neurotóxico resulta do bloqueio neuro-muscular, por ação principalmente pré-sináptica, inibindo a liberação de acetilcolina (SAMPAIO et al., 2010). A atividade miotóxica, produz lesões no tecido muscular esquelético, levando à liberação de mioglobina para o sangue e mioglobinúria. Observam-se dores musculares generalizadas (TOKARNIA e PEIXOTO, 2006). O veneno apresenta ainda atividade anti-coagulante, decorrente do consumo de fibrinogênio (ETTINGER e FELDMAN, 1997).

O diagnóstico clínico do envenenamento por serpentes *Cdt* baseia-se, principalmente, na observação de manifestações sistêmicas decorrentes da atividade neurotóxica do veneno. Os sintomas do envenenamento caracterizam-se pelo aparecimento do chamado “fácies miastênico” ou “fácies neurotóxico”, onde se observam ptose palpebral, diplopia, oftalmoplegia, com dificuldade de acomodação visual, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos. Além disso, os pacientes relatam dores musculares generalizadas, urina escurecida, refletindo a eliminação de mioglobina, com manifestações

evidentes de rabdomiólise, decorrente da atividade miotóxica do veneno (ROSENFELD, 1971; AZEVEDO-MARQUES, 1990). As causas mais importantes da morte são a insuficiência respiratória aguda e o choque (TOKARNIA e PEIXOTO, 2006). A mortalidade nos casos não tratados chega a 72% e, nos casos tratados, a 12% (FUNASA, 2001).

O veneno das serpentes *Cdt* é composto por uma mistura complexa de toxinas biologicamente ativas; dentre elas estão a crotoxina (CTX), crotamina, convulxina e giroxina. Destaca-se ainda, uma enzima tipo trombina, responsável pelos distúrbios da coagulação sanguínea (RAW; ROCHA; ESTEVES, 1986). Têm sido sugerido que a giroxina e a enzima tipo trombina sejam o mesmo componente, uma vez que ambas apresentam as mesmas características bioquímicas e biológicas (ALEXANDER; GROTHUSEN; ZEPEDA, 1988).

A CTX foi inicialmente isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) e caracterizada como uma β -neurotoxina com ação principalmente pré-sináptica, inibindo a liberação de acetilcolina nas junções neuro-musculares (BON et al., 1989). Possui massa molecular em torno de 24-26 kDa, ponto isoeletrico de 4,7 e representa cerca de 65% do conteúdo protéico do veneno bruto. (BRAZIL, 1972; GOPALAKRISHNAKONE e HAWGOOD, 1984).

Como mencionado, a CTX é um heterodímero formado por um polipeptídeo ácido, não tóxico e não enzimático denominado crotapotina (CA) e por uma subunidade básica, responsável pela atividade tóxica e com atividade fosfolipásica (CB) (SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT, 1938; BON et al., 1989). Ambas as subunidades são importantes para a atividade da CTX. Para que haja ação, a CTX precisa dissociar-se, liberando a subunidade CB, a qual se liga ao sítio alvo na membrana celular (BON et al., 1988). Neste complexo, a CA age como uma molécula carreadora, norteando CB ao seu sítio alvo e prevenindo a ocorrência de ligações inespecíficas; ademais, Délot e Bom (DELOT e BON, 1993) sugeriram que CA participa do processo de ligação de CB com seu respectivo receptor. No entanto, somente a ligação irreversível de CB à membrana das terminações nervosas permite a dissociação da subunidade CA.

Rangel-Santos et al. (2004a), estudando a atividade tóxica da CTX ou da fração CB isolada de venenos das subespécies *C.d. terrificus*, *C.d. cascavella* ou *C.d. collilineatus*, observaram que as frações CB apresentam menor atividade neurotóxica e miotóxica, quando comparadas ao complexo crotoxina correspondente. Estes resultados reforçam os dados anteriores, indicando que a associação das subunidades é necessária para que haja atividade.

1.2 Efeito antiinflamatório e imunomodulatório da crotoxina e do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*

Vários dados de literatura têm mostrado que, adicionalmente as atividades fosfolipásicas, neurotóxica e miotóxica, tanto o veneno crotálico como a CTX e suas subunidades apresentam efeitos imunomodulatórios, anti-inflamatórios e analgésicos. (LANDUCCI; ANTUNES; DONATO, 1995; CARDOSO e MOTA, 1997; LANDUCCI; TOYAMA; MARANGONI, 2000; SAMPAIO; SOUSA-E-SILVA; BORELLI, 2001; SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006b; SAMPAIO et al., 2006a; NUNES; SAMPAIO; SANTORO, 2007; ZHANG; MURPHY; AGRAWAL, 2007; NOGUEIRA-NETO et al., 2008; ZHU et al., 2008).

O soro anti-veneno é o principal tratamento utilizado para reverter os efeitos decorrentes do envenenamento pela *Cdt*. No entanto, este soro, quando comparado, por exemplo, ao soro anti-veneno botrópico, apresenta menor título de anticorpos específicos (ROLIM-ROSA; VIERA; SILLES-VILLARROEL, 1980-1981; RAW et al., 1986). Estes dados sugerem que o veneno crotálico não é um bom imunógeno (SOERENSEN, 1990; SANO-MARTINS; TOMY; CAMPOLINA, 2001; CUPO; DE AZEVEDO-MARQUES; HERING, 2003) ou então, que este veneno apresenta atividade imunomodulatória, dificultando a produção do soro anti-veneno. Neste contexto, dados de literatura têm mostrado que o veneno da *Cdt* e a CTX apresentam papel supressor sobre a resposta imune humoral, constatado a partir do decréscimo significativo nos níveis de anticorpos anti-ovalbumina ou albumina sérica humana em animais tratados com o veneno ou toxina (CARDOSO e MOTA, 1997; ZAMBELLI; SAMPAIO; SUDO-HAYASHI, 2008). O efeito inibitório da crotoxina sobre a resposta humoral induzida pela imunização com albumina sérica humana, é também observado quando a toxina é administrada após o início da resposta imune inata (FAVORETTO; RICARDI; SILVA, 2011). Os mesmos autores, sugeriram que a CTX modula a fase indutora da resposta imune adaptativa, atuando diretamente nas células envolvidas com a apresentação de antígenos para os linfócitos T e por consequência, na geração da imunidade celular e humoral protetora. Esse efeito, multimediado, resulta em imunomodulação, observada com a geração de células T reguladoras (Treg) (FAVORETTO et al., 2011). Ainda, tem sido mostrado efeito inibitório do veneno de cascavel sobre a produção de anticorpos anti-hemácias de carneiro, uma vez que camundongos tratados com

este veneno e imunizados com hemácias de carneiro desenvolvem títulos anti-hemácias inferiores aos de animais controles (SANTOS; D'IMPÉRIO-LIMA; DIAS DA SILVA, 1986).

Estudo experimentais tem também demonstrado que a crotoxina inibe a proliferação de células esplênicas induzida por concanavalina A (Con-A) (CARDOSO; LOPES-FERREIRA; FAQUIM-MAURO, 2001; RANGEL-SANTOS; DOS-SANTOS; LOPES-FERREIRA, 2004b; RANGEL-SANTOS et al., 2004a). O efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos tem sido atribuído ao componente CA do complexo crotoxina, e mediado pelo aumento da produção de prostaglandina E₂ por macrófagos estimulados por esta fração (GARCIA; TOYAMA; CASTRO, 2003). Foi também observado que o componente CA inibe a proliferação de linfócitos obtidos de ratos com neurite autoimune experimental (CASTRO; FARIAS; PROENCA, 2007).

Cardoso et al. (2001), após tratarem camundongos com a CTX, observaram diminuição do número de leucócitos circulantes, da secreção de interleucina (IL) 10 e de IL-6 e aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides, sugerindo que a CTX é capaz de regular negativamente a resposta Th2. Corroborando estes dados, Zambelli et al. (2008) evidenciaram que a CTX, além de diminuir o número de linfócitos na circulação sanguínea, promove queda no número destas células na circulação linfática e aumento de linfócitos B e T nos linfonodos de ratos. Estas alterações são dependentes do componente CB (fosfolipase A₂) da crotoxina. Esta alteração no número de leucócitos circulantes parece ser decorrente de alterações na interação leucócito-endotélio da microcirculação sanguínea a nas vênulas do endotélio alto dos linfonodos (ZAMBELLI et al., 2008). Esses efeitos sobre o número de leucócitos circulantes são decorrentes, pelo menos em parte, de alterações na expressão de moléculas de adesão, uma vez que a toxina aumenta a expressão de LFA-1 em linfócitos.

Adicionalmente aos efeitos sobre linfócito, tem sido demonstrado que a CTX inibe algumas atividades funcionais de macrófagos, como a capacidade de espalhamento e de fagocitose (SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO; RANGEL-SANTOS; PERES, 2005). Esta atividade inibitória da toxina é mediada por alterações dos mecanismos de sinalização intracelular envolvidas no processo de fagocitose e envolvem aumento nos níveis citoplasmáticos de F-actina, acarretando reorganização inadequada dos filamentos de actina, além da inibição da atividade das GTPases (SAMPAIO et al., 2006a). Vários destes estudos têm sugerido que o componente FLA₂, mas não a crotapotina, é o responsável pelos efeitos da

CTX sobre linfócitos (ZAMBELLI et al., 2008) e macrófagos (SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO et al., 2006b).

O efeito inibitório da crotoxina sobre macrófagos e linfócitos é mediado por eicosanóides derivados da via das lipoxigenases (SAMPAIO et al., 2006b; ZAMBELLI et al., 2008), indicando que a atividade fosfolipásica pode ser importante para este efeito. Estudos recentes realizados pelo nosso grupo, demonstram ainda, que a diminuição do número de leucócitos circulantes induzida pela crotoxina é mediada pela lipoxina A₄, uma vez que a utilização de antagonista de receptores desta lipoxina, reverte o efeito da crotoxina sobre estas células (FAROM, 2009). O envolvimento deste mediador lipídico no efeito da toxina é também corroborado por dados mostrando que macrófagos incubados com a crotoxina liberam lipoxina A₄ (SAMPAIO et al., 2006b).

Várias evidências experimentais tem mostrado, ainda, que a crotoxina interfere com a resposta inflamatória. Nunes et al. (2010) mostraram que esta toxina induz efeito anti-edematogenico de longa duração, além de interferir com o componente celular da resposta inflamatória induzida por carragenina em camundongos. Este efeito é também mediado por receptores para lipoxina A₄. Foi observado também que componente CA do complexo crotoxina modula negativamente a resposta inflamatória, sendo capaz de inibir o edema de pata de ratos induzido por carragenina ou FLA₂ de venenos animais (LANDUCCI et al., 1995; LANDUCCI et al., 2000; CECCHINI; SOARES; CECCHINI, 2004).

Apesar dos dados de literatura indicarem efeito modulador da CTX sobre o componente vascular e celular das respostas inflamatória e imune, não foi ainda determinada a sua ação sobre inflamações de origem alérgicas.

1.3 Inflamação Pulmonar Alérgica Experimental

A prevalência de doenças alérgicas tem aumentado significativamente nos últimos anos, e diversos fatores são apontados como causadores deste fato, dentre eles, o aumento da exposição a alérgenos intra-domiciliares (pela maior permanência dentro das moradias), exposição a agentes poluentes, contato com novos produtos químicos e o menor estímulo do sistema imune em decorrência da utilização de agentes antimicrobianos na defesa contra infecções (BUCKLEY, 1988; WICKENS; PEARCE; CRANE, 1999).

Diante do exposto, sugere-se que o desencadeamento das crises de reações alérgicas, como por exemplo, a asma, após o contato com ácaros, polens, fungos, pêlos de animais, entre outros antígenos, esteja relacionado à existência de anticorpos para estas substâncias (VOORHORST e SPIEKSMAN, 1967; POLLART; CHAPMAN; PLATTS-MILLS, 1987; POLLART; MULLINS; VAILES, 1991). Não obstante, outros aspectos podem contribuir para desenvolvimento da asma, tais como a fumaça, o ar poluído e infecções virais (SLY, 2011).

As doenças alérgicas estão relacionadas a presença de imunoglobulina E (IgE) (ISHIZAKA; ISHIZAKA; HORNBROOK, 1966; BENNICH; ISHIZAKA; JOHANSSON, 1968; BUSSE; CORREN; LANIER, 2001; HODDESON; PRATT; HARVEY, 2010). Spalding et al. (2000) analisaram o nível sérico de imunoglobulina (Ig) E em indivíduos saudáveis, não atópicos e em pacientes atópicos, com manifestações respiratórias. Os autores observaram que os valores médios de IgE total nos pacientes atópicos, são significativamente maiores que aqueles observados entre indivíduos não atópicos. De fato, indivíduos que possuem propensão para sintetizar quantidades elevadas de imunoglobulinas são particularmente susceptíveis às alergias e a asma. Neste sentido, as imunoglobulinas, ou anticorpos mais diretamente associados à asma são a IgE e a IgG (TURNER e KINET, 1999; HOLGATE, 2004).

Devido a sua importância e complexidade, a asma tem sido amplamente estudada nas últimas décadas. Inúmeras questões relacionadas à fisiopatologia da doença ainda não foram respondidas, e modelos experimentais eficazes para testes pré-clínicos de novas terapias não estão ainda, bem estabelecidos. Os modelos animais têm sido utilizados por mais de 100 anos para elucidar a fisiopatologia de doenças humanas e para avaliar novos alvos terapêuticos. Em relação à asma, desde o início da década de 1990, foram estabelecidos modelos em camundongos para estudar aspectos específicos da doença, permitindo realizar estudos em animais isogênicos, com os sistemas imune e respiratório intactos. Modelos animais representam o único método disponível para estudar alguns processos *in vivo* da doença, já que aspectos éticos não permitem realizar alguns procedimentos invasivos em seres humanos (NIALS e UDDIN, 2008).

Muitas características fisiopatológicas da asma de origem atópica foram descobertas em espécies animais, entre elas, camundongos, ratos, ovelhas, gatos, cachorros e cavalos (WEGMANN e HAUBER, 2009). Destaca-se a importância dos modelos animais na

descoberta do papel da resposta imune T *helper* (Th), do tipo 2 e na disponibilização de modelos pré-clínicos para testes de novas terapias em potencial (TAUBE; DAKHAMA; GELFAND, 2004). No entanto, algumas terapias, que mostraram efeito benéfico nesses modelos, acabaram demonstrando pouca eficácia em pesquisas clínicas em humanos com asma. Assim, a extrapolação dos resultados de estudos em animais para seres humanos depende de alguns fatores limitantes, os quais têm sido discutidos pela comunidade científica nos últimos anos (ZOSKY e SLY, 2007). O modelo animal ideal deve reproduzir os principais aspectos da asma, incluindo sensibilização ao antígeno, mediada por IgE, broncoconstrição aguda, aumento da resistência de vias aéreas, produção de citocinas, linfócitos Th2 e eosinofilia, entre outros (EPSTEIN, 2004).

Infelizmente, ainda não foi possível desenvolver esse modelo ideal, pois os inúmeros modelos descritos e utilizados apresentam ainda, limitações. Entretanto, a utilização de animais nas pesquisas em asma é essencial para melhor entender os mecanismos da doença e possibilitar o teste de novos fármacos com potencial terapêutico.

Apesar das inúmeras considerações que devem ser feitas antes da escolha do modelo animal, o número de espécies para estudos em asma é vasto. Embora nenhuma espécie animal reproduza as características completas da asma em humanos, existem algumas nas quais certos aspectos são mais similares (KEIR e PAGE, 2008; BATES; RINCON; IRVIN, 2009). Roedores com resposta pulmonar alérgica aguda tem sido o modelo mais amplamente utilizado para elucidar mecanismos de doença e avaliar a eficácia pré-clínica de novos fármacos, já que são mais fáceis de manusear e tem, ainda, a vantagem do custo baixo, quando comparados a animais de maior porte (CAROFINO e FULKERSON, 2005; KUCHAREWICZ; BODZENTA-LUKASZYK; BUCZKO, 2008).

Além da preocupação com a escolha dos animais utilizados, o tipo de alérgeno e o protocolo de indução de alergia em roedores, devem ser criteriosamente considerados. Os roedores não desenvolvem resposta alérgica espontaneamente. Por isso, é necessário que se induza uma resposta alérgica “artificial” nas vias aéreas, para reproduzir a inflamação alérgica pulmonar (NIALS e UDDIN, 2008). Vários roedores são facilmente sensibilizados por um grande número de antígenos que normalmente não estão expostos no ambiente, incluindo a ovalbumina (OVA), que é o agente mais utilizado, e alguns outros alérgenos humanos, como o ácaro da poeira e fungos.

A OVA é o antígeno mais popular na pesquisa de asma em roedores, por se tratar de uma substância disponível comercialmente, de fácil manipulação e com a qual o animal de laboratório não tem contato ambiental. A OVA é a principal proteína encontrada na clara do ovo (cerca de 60% do conteúdo proteico), fazendo parte da superfamília das serpinas. É uma proteína muito utilizada em pesquisa, particularmente em imunologia (ANKIER, 1969; JOHNSON; WILEY; FATTOUH, 2004).

1.4 Asma

Em 1997, o National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI), em seu “NHLBI 1997 *Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma*”, definiu a asma como uma doença inflamatória crônica pulmonar, geralmente acompanhada de sinais clínicos que se somam ao broncoespasmo. Indivíduos sensibilizados, quando expostos ao alérgeno desenvolvem obstrução das vias aéreas, com conseqüente redução do seu calibre. Nestas condições, pode-se constatar redução na ventilação pulmonar. À luz da interdisciplinaridade dos estudos existentes sobre asma, admite-se que esta patologia se caracterize por alteração da função das vias aéreas em três aspectos: 1) obstrução (limitação do fluxo aéreo), em geral reversível total ou parcialmente, espontaneamente ou com tratamento, 2) inflamação e 3) aumento da reatividade a diversos estímulos (HOLGATE, 2004).

A asma, do ponto de vista epidemiológico, representa uma das desordens inflamatórias crônicas de maior incidência no mundo contemporâneo, revelando sua importância nas estatísticas de mortalidade e morbidade (CARLSEN, 1998; KELLER e LOWENSTEIN, 2002). Estudos indicam aumento da incidência e da prevalência da asma em países industrializados, assumindo desta forma, proporções alarmantes. De fato, existem cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo acometidas pela asma (MASOLI; FABIAN; HOLT, 2004). Nesse sentido, é interessante mencionar que o custo do seu tratamento é substancial, estimando-se gastos anuais da ordem de US\$ 6 bilhões nos Estados Unidos da América, US\$ 3 bilhões na Alemanha e US\$ 1,6 bilhões na Inglaterra (MOFFATT e COOKSON, 1999). O custo sócio-econômico da asma supere o custo combinado de infecções como a tuberculose e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), rendendo à indústria farmacêutica um lucro da ordem de US\$ 5,5 bilhões/ano. No Brasil, os estudos epidemiológicos referentes a asma são poucos, sendo desconhecida a verdadeira dimensão da doença nas diferentes regiões do país. No entanto, alguns dados revelam que a taxa de mortalidade cresceu 6,8% em

crianças e adultos jovens asmáticos, nas décadas de 70 e 90 (CHATKIN; BARRETO; FONSECA, 1999). Salto Júnior et al. (2002) realizaram um estudo em São Paulo e mostraram que em indivíduos de 5 a 34 anos foi também observada taxa elevada de mortalidade no mesmo período (0,2% a 0,4%). Atualmente ocorrem cerca de 350.000 internações por asma no Brasil, constituindo-se a quarta (2,3% do total) causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Em 1996, os custos do SUS com internação por asma, foram de 76 milhões de reais, 2,8% do gasto total anual e o terceiro maior valor gasto com uma doença. Um estudo multicêntrico (Internacional Study of Asthma and Allergies in Childhood- ISAAC) realizado em 56 países, mostrou uma variabilidade de asma ativa entre 1,6% a 36,8%. O Brasil sustenta a oitava posição, com prevalência de 20%.

A resposta inflamatória é um fenômeno importante na asma e continua sendo o alvo primário para o tratamento. Os corticóides inalatórios são o tratamento de escolha para o controle da asma (BARNES; PEDERSEN; BUSSE, 1998). O uso regular dos corticóides inalatórios diminui, a longo prazo, a inflamação dos brônquios, melhorando o fluxo de ar nas vias respiratórias, favorecendo a ação dos broncodilatadores (medicamento de alívio). Alguns estudos indicam que as abordagens terapêuticas atualmente empregadas na clínica são eficazes em controlar os sintomas (O'BYRNE, 2011). No entanto, muitos trabalhos relatam que essas abordagens não são eficientes no controle da progressão da doença. Em decorrência dos diferentes fenótipos e variáveis inflamatória e genética, as abordagens terapêuticas devem ser cada vez mais individualizadas, respeitando as diferenças existentes. Neste sentido, o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes no combate das causas e não apenas dos sintomas é necessário para tentar controlar o agravamento desta doença (BATEMAN; HURD; BARNES, 2008; CAMARGO; RACHELEFSKY; SCHATZ, 2009).

Entre os múltiplos e complexos aspectos da asma, podem-se distinguir 2 fases de resposta asmática: uma precoce e outra tardia. As crises asmáticas começam com espasmo bronquial, observado meia hora após contato com o estímulo desencadeante, e que dura de duas a quatro horas; esta é a fase chamada precoce e decorre de uma resposta deflagrada a partir da desgranulação de mastócitos, com conseqüente liberação de seus mediadores. De forma geral, observa-se também uma fase tardia, que se desenvolve de seis a oito horas depois. Na fase crônica, há predomínio da inflamação sobre o espasmo bronquial (LEMANSKE, 2000). Ademais, é nesta fase que se observa o desencadeamento da hiper-reatividade brônquica, caracterizada pelo aumento da já exacerbada contração da musculatura lisa das vias aéreas, frente a estímulos que podem ou não, estar associados ao agente

sensibilizante. Existe uma grande variedade de agentes irritantes como, por exemplo, ar frio, fármacos, poluentes atmosféricos, entre outros (SCHMIDT e RABE, 2000). Neste contexto, admite-se que o aumento da reatividade das vias aéreas, observada na fase tardia da asma, decorra dos efeitos tóxicos dos produtos gerados pelas células recrutadas para o pulmão (CALHOUN; SWENSON; DICK, 1991; GLEICH, 2000).

Como mencionado, a asma é uma doença inflamatória pulmonar. Diversas células participam de seu desencadeamento; dentre elas, os mastócitos tem papel relevante. Uma vez ativadas, estas células liberam um amplo espectro de mediadores inflamatórios tais como histamina, serotonina, leucotrienos (LT) C4, LTD4 e LTE4, prostanóides, citocinas, proteases, óxido nítrico, entre outros. Os mastócitos estão amplamente dispersos no organismo. Estas células estão presentes nas vias aéreas e podem ser encontradas no epitélio brônquico, na submucosa e nas proximidades dos vasos sangüíneos. A população de mastócitos é heterogênea, assim, existem mastócitos de tecido conjuntivo e de tecido mucoso (ENERBACK, 1966b; a; SAMARTZIDOU e DELCOUR, 1999). Uma das diferenças fundamentais entre os mastócitos é o repertório de mediadores liberados, bem como a sua susceptibilidade a agentes secretagogos (STONE; PRUSSIN; METCALFE, 2010). Neste sentido, os mastócitos de mucosa (abundantes na porção cervical da traquéia) liberam grandes quantidades de leucotrienos, enquanto os de conjuntivo (abundantes na porção torácica) são potentes liberadores de prostaglandinas. De Lima e Da Silva (1998) sugeriram que mediadores derivados dos mastócitos de tecido conjuntivo, mas não de mucosa, são relevantes para a obstrução das vias aéreas na reação anafilática “in vitro”. As citocinas liberadas pelos mastócitos promovem o influxo e a atividade das células inflamatórias, particularmente os eosinófilos e basófilos (MOREIRA e HOGABOAM, 2011).

Os macrófagos alveolares são importantes células efectoras imunes no espaço alveolar. Estas células estão envolvidas na manutenção da homeostasia das vias aéreas, tanto em indivíduos sadios como em indivíduos asmáticos (SPITERI; KNIGHT; JEREMY, 1994; CAREAU; SIROIS; BISSONNETTE, 2002; CAREAU; TURMEL; LAUZON-JOSET, 2010). Os macrófagos possuem receptores para IgE, embora de baixa afinidade e sua ativação tem como consequência a liberação de eicosanóides, fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas, óxido nítrico e outros produtos (SALVEMINI; PISTELLI; MOLLACE, 1992; CAREAU; PROULX; POULIOT, 2006). Estes mediadores, além de causar contração da musculatura lisa e, portanto, dificultar o fluxo de ar, acarretam também a migração de células, desencadeando inflamação nos pulmões (WEERSINK; POSTMA; AALBERS, 1994). Por outro lado,

evidências indicam que os macrófagos podem também exercer efeito protetor na indução e progressão da asma alérgica (MOREIRA e HOGABOAM, 2011).

Além dos mastócitos e macrófagos, os eosinófilos estão também envolvidos no desencadeamento da asma, principalmente no que concerne à fase tardia desta patologia. Entre os fatores que ativam os eosinófilos destacam-se o fator ativador de plaquetas, o leucotrieno B₄, o fator estimulador de colônia granulocítica macrofágica (GM-CSF), o fator de necrose tumoral (TNF), a proteína inflamatória do macrófago 1 α , IL-3, IL4 e IL5 (COYLE; PHILCOX; ROFE, 1995). A proliferação de eosinófilos é estimulada pelo GM-CSF, IL-3 e IL5 (FLOOD-PAGE; MENZIES-GOW; PHIPPS, 2003). Uma vez migradas para o pulmão, estas células têm capacidade de liberar agentes citotóxicos, como a proteína básica principal (MBP), eosinófilo peroxidase (EPO) e proteína catiônica eosinofílica (ECP), os quais contribuem para a lesão epitelial e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas (THOMAS e WARNER, 1996; LAMPINEN; CARLSON; HAKANSSON, 2004). Assim, estas células e seus mediadores provocam alterações na integridade epitelial, facilitando a penetração do alérgeno e o acesso dos mediadores inflamatórios às terminações nervosas aferentes; adicionalmente, provocam broncoconstrição por meio do reflexo axônico. Ainda, a liberação de peptídeos neurogênicos como o peptídeo vasoativo intestinal, Substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, podem exacerbar a resposta inflamatória e aumentar a hiper-reatividade brônquica (FOSTER, 1999). É importante considerar que o número elevado de eosinófilos nas vias aéreas pode servir de parâmetro para a determinação do grau de severidade da asma (FERGUSON; VAUGHAN; BROWN, 1995; HARGREAVE e LEIGH, 1999).

Outro importante tipo celular encontrado nas vias aéreas de pacientes asmáticos são os neutrófilos. Estudos recentes sugerem que estas células são importantes nos processos inflamatórios pulmonares. Em circunstâncias especiais, promovem a liberação de mediadores inflamatórios que favorecem a conservação dos sintomas no indivíduo asmático (MACDOWELL e PETERS, 2007). Apesar de não haver muitas discussões sobre sua participação, estas células podem potencialmente, causar lesão tecidual, em decorrência da liberação de diversas proteases e proteínas catiônicas, as quais são tóxicas para o tecido adjacente. Dados obtidos por Antczak et al. (1999) indicam a existência de ativação de neutrófilos em pacientes asmáticos, os quais apresentam elevada liberação de peróxido de hidrogênio no ar exalado. De fato, existem dados de necropsia indicando aumento de neutrófilos em pacientes com ataque asmático fatal. Lamblin et al. (1998) sugeriram que

neutrófilos podem causar lesão tecidual e participar do processo de descamação epitelial observada na asma.

Em síntese, as evidências do envolvimento de mecanismos inflamatórios na asma alérgica são convincentes. É razoável admitir, visto a complexidade desta afecção, que os fenômenos pulmonares observados na asma não sejam decorrentes da ativação de uma única célula ou do envolvimento de um único mediador. Neste sentido, uma complexa interação de células inflamatórias e mediadores deve estar envolvida com o desenvolvimento da hiper-reatividade das vias aéreas.

*

*

*

Como já mencionado, a CTX apresenta efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios, afetando particularmente o componente celular das respostas inflamatória e imune. Desta forma torna-se importante a investigação de um possível efeito inibitório desta toxina sobre a gênese e o desenvolvimento de um quadro alérgico pulmonar, bem como, de sua possível interferência na alergia já estabelecida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Investigar os efeitos da crotoxina (CTX) sobre modelo de inflamação alérgica pulmonar, desenvolvido em ratos pela sensibilização e broncoprovocação com ovalbumina (OVA).

2.2 Objetivos específicos

A. *Avaliar o efeito da CTX sobre a resposta inflamatória pulmonar em ratos sensibilizados e broncoprovocados com OVA. Este estudo envolveu a:*

- ⇒ padronização e implantação do modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar induzida por ovalbumina (OVA);
- ⇒ avaliação da hiper-reatividade das vias aéreas neste mesmo modelo;
- ⇒ análise morfofuncional do pulmão;
- ⇒ determinação do número de leucócitos na circulação sanguínea e na medula óssea;
- ⇒ avaliação da expressão de moléculas de adesão do complexo CD11/CD18;
- ⇒ avaliação dos efeitos da crotoxina, administrada em dose única, nos parâmetros acima mencionados;
- ⇒ investigação do efeito da crotoxina sobre a capacidade contrátil de traquéia isolada e exposta a uma solução de OVA (*in vitro*).

B. *Determinar o efeito da CTX sobre os principais mecanismos efetores da resposta imune eliciada pela imunização com Ovalbumina (OVA), avaliando o efeito da toxina sobre:*

- ⇒ a titulação de anticorpos totais do isotipo IgE (ELISA);
- ⇒ os níveis de IL-6 no lavado broncoalveolar (ELISA);

- ⇒ os níveis de IL-4 no soro (ELISA);
- ⇒ o número de células presentes no lavado broncoalveolar (LBA), 24 horas após a broncoprovocação;
- ⇒ a capacidade contrátil de traquéia isolada e exposta a uma solução de Ovalbumina “*in vitro*”.

C. *Avaliação da participação de receptores ALX no Efeito Inibitório da Crotoxina sobre o número de:*

- ⇒ leucócitos recuperados do lavado broncoalveolar;
- ⇒ mastócitos intactos e desgranulados em cortes histológicos de tecido pulmonar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* machos, linhagem Wistar, variedade albina, com idade entre 8 a 12 semanas, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura variando entre 22 e 25 °C, em umidade controlada (60 a 75%) por aparelhos centrais de aeração e ventilação, em um ciclo de 12 horas claro-escuro, com luz ligada às 7 horas. Os ratos receberam ração e água “*ad libitum*” durante todo período experimental. Os animais foram utilizados de acordo com as normas e protocolos aprovados pela comissão de Ética em experimentação animal (CEEA), registrado sob o nº93, nas folhas 35, do livro 2 para o uso de animais em experimentação, em 17/08/2006.

3.2 Tratamentos Farmacológicos “*in vivo*”

- Ovalbumina (OVA) Grau II (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA);
- Cloreto de Metacolina (Sigma Chemical CO – St. Louis, EUA)
- BOC-2 [N-t-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe] (Phoenix Pharmaceuticals, INC, EUA.);
- Hidróxido de Alumínio como adjuvante (EMS, BRA);
- Crotoxina (CTX) (isolada do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e fornecida pelo Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, BRA).

3.3 Obtenção e Administração da Crotoxina

A purificação da CTX foi realizada segundo o método descrito por Faure e Bon (1987), modificado. Uma alíquota contendo 15 mg do veneno de *Cdt* foi ressuspensa em 1 mL de Tris-HCl (50 mM, pH 7,0) e centrifugada a 10.000 g, por 10 minutos, (ultra-centrífuga Ependorf®, ALE), para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de troca iônica em uma coluna MONO-Q HR 5/5 de 5 mL, em sistema FPLC (fast-performance liquid chromatography, PHARMACIA®), em tampão Tris-HCl. As

proteínas adsorvidas à resina foram eluídas por um gradiente linear se 0 a 1 M NaCl, com o tampão de equilíbrio. Foram obtidos 3 picos principais (pico I, II e III), onde o pico II corresponde à eluição da CTX. Frações de 1 mL por tubo, foram coletadas e aferidas pela leitura da absorbância de 280 nm. As frações contendo a CTX foram testadas quanto à homogeneidade por eletroforese em gel de poliacrilamida. A atividade de fosfolipase A₂ foi analisada em substrato cromogênico. Os tubos correspondentes à CTX foram reunidos e dialisados. A concentração da toxina foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A CTX foi administrada por via sc, na dose de 18 µg/rato. Trabalhos anteriores demonstraram que esta dose promove alteração no número de leucócitos circulantes e na funcionalidade destas células (SAMPAIO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2005; SAMPAIO et al., 2006b; SAMPAIO et al., 2006a; ZAMBELLI et al., 2008), sem causar sinais clínicos de envenenamento crotálico (SAMPAIO et al., 2003). Também, de acordo com dados anteriores (NOGUEIRA-NETO et al., 2008), a administração diária da CTX (18 µg/rato), via sc, durante 7 dias, não acarreta sinais de envenenamento ou alterações histopatológicas em órgãos vitais ou mesmo alterações nos níveis de creatinoquinase.

Assim, foram utilizados durante a execução deste trabalho dois esquemas de tratamento com a CTX. O primeiro procurou avaliar o efeito da CTX sobre a resposta inflamatória pulmonar em ratos sensibilizados e broncoprovocados com OVA. Para tanto, a administração da CTX foi realizada uma única vez, por via subcutânea. Aproximadamente, 2 horas antes da broncoprovocação, na dose de 18 µg/rato. O segundo esquema de tratamento proposto procurou avaliar o efeito da CTX na fase indutora da resposta imune. Para testar esta hipótese, animais sensibilizados e broncoprovocados que receberam a CTX, pela mesma via, foram divididos em três grupos durante alguns ensaios experimentais: animais expostos a CTX 2 horas antes da sensibilização primária no dia 1 (OVA/CTX 1), ou no dia do reforço 7 (OVA/CTX 7), e nos dias 1 e 7 e 14 do experimento (OVA/CTX 1, 7 e 14). A dose utilizada também foi de 18 µg/rato.

3.4 Inflamação Alérgica Pulmonar - Sensibilização e Broncoprovocação “*in vivo*”

Para sensibilização, os animais receberam, por via intraperitoneal, 10 µg de OVA dissolvidas em 10 mg de hidróxido de alumínio. Após 7 dias da sensibilização, os animais

receberam, por via subcutânea, 0,5 mL de uma solução de 1mg de OVA (reforço), diluída em 1 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) . A broncoprovocação foi desencadeada 7 dias após o reforço, expondo os animais à inalação de 10 mL de OVA (1%) diluída em PBS. A sessão de inalação foi realizada por 15 minutos, colocando 2 animais por sessão, em caixa plástica (28 cm X 25 cm X 51 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico respiramax (NS®, BRA) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 a 1,0 μm^3 . Este período de sensibilização e broncoprovocação foi escolhido visto que, de acordo com Coleman et al. (1983), após a injeção intraperitoneal de OVA adsorvida em alúmen, os níveis circulantes de imunoglobulinas E (IgE) aumentam rapidamente entre 7 e 14 dias.

3.5 Análise Histopatológica do Pulmão

Para as análises histopatológicas, os pulmões dos animais foram perfundidos com 5 mL de PBS pelo ventrículo direito do coração, para remoção de sangue do leito vascular pulmonar. Imediatamente após a excisão dos pulmões, uma amostra representativa do tecido pulmonar esquerdo foi retirada para análise. O material foi fixado em formalina e 48 horas após, lavado por 3 h em água corrente, e então colocado em álcool 70%. Posteriormente, todo o material foi desidratado em séries crescentes de álcool (70 °GL a absoluto), clarificado em xilol e embebido em parafina. A seguir foram realizados cortes de 5 μm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina.

3.6 Avaliação da Alteração de Permeabilidade Vascular nas Vias Aéreas

A determinação do aumento de permeabilidade vascular, no pulmão, foi realizada através da técnica de quantificação do corante Azul de Evans (MERCK®, EUA) extravasado para o espaço intersticial. Decorridos 14 dias da sensibilização, os animais receberam o corante Azul de Evans (AE) (20 mg/Kg, iv) imediatamente antes da nebulização com OVA (10 mg/mL). Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral e, em menos de 3 minutos, foram exangüinados por secção dos vasos cervicais. A traquéia, brônquio externo, brônquio interno e parênquima pulmonar foram divididos em 2 segmentos e pesados. Uma das amostras foi colocada em formamida (4 mL/g de peso), à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 24 horas, enquanto a outra foi mantida em estufa a 60 °C, por 24 horas. A concentração de AE (expressa em μg de AE/g de peso seco do tecido), presente na

formamida, foi determinada a 620 nm em leitor ELISA®, por comparação com os valores obtidos com a curva padrão do AE.

3.7 Obtenção do Lavado Broncoalveolar

O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com Tavares de Lima et al. (1992). Decorrido o tempo de estudo desejado, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg; i.p.) e exsangüinados (secção da aorta abdominal). Para lavagem do espaço broncoalveolar, foi feita uma incisão longitudinal na região cérvico-ventral, seguida pela canulação da traquéia. Para tanto, foi utilizada uma válvula reguladora com três entradas. Uma cânula de polietileno foi acoplada à uma das entradas. A outra entrada foi acoplada na seringa de plástico contendo 20 mL de PBS. A terceira entrada foi acoplada em uma seringa vazia. A cânula foi inserida na traquéia e foi realizada a lavagem do espaço broncoalveolar. Esta lavagem foi feita em etapas, injetando-se lentamente, no espaço alveolar, um volume de 5 mL de PBS. A seguir, a válvula ligada à seringa contendo PBS foi fechada, abrindo-se aquela ligada à seringa vazia, para a aspiração do PBS injetado, acompanhado de delicadas massagens no pulmão. Esse procedimento foi repetido até que todo o volume de PBS tenha sido injetado.

3.8 Determinação do Número de Células Recuperadas no Lavado Broncoalveolar

O LBA foi centrifugado por 10 minutos, a 1610 g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as células foi ressuspensão em 1 mL de PBS. Alíquotas da amostra (100 µl) foram colocadas em centrífuga citológica (Cytospin®), por 5 minutos. As lâminas obtidas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa, modificado segundo Rosenfeld (1947), para a contagem diferencial dos leucócitos presentes no LBA. A contagem total de células foi feita em câmara de Neubauer. Para tanto, uma alíquota da amostra (90 µL) foi acrescida de 10 µL de cristal violeta (0,2%) dissolvida em ácido acético (30%). Dez microlitros desta alíquota foram diluídos em 90 µL de PBS; totalizando, portanto, uma diluição de 1:100. Os resultados foram expressos em número de células $\times 10^5/\text{mL}$.

3.9 Determinação da Atividade de Mieloperoxidase

A infiltração de neutrófilos para o pulmão foi investigada também por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Decorrido o tempo desejado de estudo, os animais foram anestesiados (hidrato de cloral 400 mg/kg, ip), submetidos à laparotomia mediana e dessangrados pela aorta abdominal. Subseqüentemente, a cavidade torácica foi aberta e o leito vascular do pulmão imediatamente perfundido com PBS contendo heparina (5 UI/mL), por meio de uma cânula inserida na artéria pulmonar. O tecido pulmonar livre de sangue, foi pesado e a ele adicionados 3 mL/g de tampão fosfato, pH 6,2, contendo 0,5% de brometo de hexadecil-trimetilamônio e 5 mM EDTA. A seguir, as amostras foram homogeneizadas (Polytron®-Brinckman Instruments, EUA), 2 vezes, por um período de 30 segundos cada. Os homogenatos resultantes foram então, submetidos a ondas ultrassônicas (Vibra Cell® – Sonics Materials, EUA) durante 2 minutos, por 3 vezes, na frequência de 40 Hz, em intervalos regulares de 5 segundos. As amostras foram centrifugadas a 28100 g, durante 15 minutos, à temperatura de 4 °C, e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade de MPO. A este material foram adicionados, 680 µL de PBS contendo 0,25% de albumina sérica bovina (BSA), 500 µL de tampão fosfato pH 6.2, 100 µL de água oxigenada (0,0005%), 40 µL da amostra e 100 µL de orto-dianisidina (1,25 mg/mL). Após 15 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 100 µL de azida sódica (1%). A quantificação da absorbância foi feita por espectrofotometria (450 nm) em leitor de placas (Spectra Max Plus® Molecular Devices, EUA).

3.10 Avaliação da Participação de Receptores ALX no Efeito Inibitório da Crotoxina Sobre o Número de Leucócitos Recuperados do Lavado Broncoalveolar

Para avaliação do envolvimento dos receptores ALX no efeito da CTX sobre o componente celular da inflamação pulmonar, foi utilizado BOC-2, um antagonista específico de receptor ALX (receptor para lipoxina A₄).

O BOC-2 foi dissolvido em solução salina estéril e administrado na dose de 5µg/animal, por via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes da injeção da CTX.

Duas horas após o tratamento com CTX, os animais foram submetidos a broncoprovocação e cerca de 24 horas após a sessão, os animais foram anestesiados e exsangüinados para a coleta do LBA.

3.11 Expressão de Moléculas de Adesão do Complexo CD11/CD18

A pesquisa de antígenos (moléculas de adesão do complexo CD11/CD18) foi realizada em células do LBA (item 3.7.). Uma suspensão de leucócitos (1×10^6 células) em 50 μ L de PBS, foi incubada a 4 °C, por 45 minutos, com 40 μ L de anticorpos anti-CD18 associados à fluoresceína. As células foram lavadas (3 X) com 1 mL de solução PBS, contendo 0,1% de azida sódica e 3% de soro fetal bovino, e centrifugadas a 10.000 g, por 1 minuto, a 4 °C, com a finalidade de eliminar os anticorpos que não se fixaram. O precipitado contendo as células foi então ressuspensão em 1 mL de paraformaldeído, a 0,5%, e mantido a 4 °C até o momento da aquisição por meio de citometria. A análise da expressão dos antígenos foi realizada sobre 10.000 eventos (FACSCalibur®, CAN) empregando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson®, CAN).

3.12 Determinação de Mastócitos Intactos e Desgranulados em Cortes Histológicos de Tecido Pulmonar

Para análise dos mastócitos no tecido pulmonar, animais sensibilizados e broncoprovocados tiveram a traquéia canulada e os pulmões insuflados com 1 mL de ar. Em seguida, os brônquios foram amarrados com barbante para evitar a perda de ar e o pulmão foi fixado em paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2%, em tampão fosfato Sorensen 0,1 M, pH 7,4, por 24 h, a 4 °C. As amostras de tecido pulmonar foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em soluções crescentes de etanol, clarificadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3 μ m foram realizados no micrótomo Hyrax M60 (Zeiss®, ALE) e, posteriormente, corados com solução de azul de toluidina 0,25% e borato de sódio a 0,25%, para análise histológica. As amostras (10 cortes por animal, 5 animais por grupo, n = 50 por grupo) foram analisadas no microscópio AxioScope.A1 (Zeiss®, ALE). Os cortes histológicos foram analisados por morfometria, por meio do Software Axiovision (Zeiss®, ALE).

3.13 Determinação de Citocinas IL4, IL6 e Anticorpos do Isotipo IgE (ELISA)

As citocinas (IL-4 e IL-6) e o anticorpo do isotipo IgE foram determinados por ELISA em amostras de sobrenadante do LBA e do soro, 24 horas após a broncoprovocação. Para tanto, foram utilizados *Kits Duo Set* disponíveis comercialmente (R & D System®, EUA) e

(Shibayagi®, Japão) com ensaios conduzidos de acordo com as instruções do fabricante e a densidade óptica obtida em leitor ELISA (Bio-Tek Instrument®, EUA) em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL ou ng/mL das amostras de soro ou sobrenadante.

3.14 Determinação do Número de Leucócitos Circulantes

A contagem total e diferencial de leucócitos circulantes foi realizada a partir de amostras de sangue heparinizado, coletadas da veia caudal dos animais, desprezando-se a primeira gota. A contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer, após a diluição das amostras de sangue, na proporção de 1:40, em líquido de Türk a 3%, agitadas por 30 segundos em agitador AP20 (Phoenix, EUA). As células foram contadas em microscópio óptico (Nikon®, JAP) utilizando objetiva de 10 X. A contagem diferencial dos leucócitos circulantes foi feita em esfregaços de amostras de sangue. As lâminas preparadas foram coradas por May-Grünwald-Giemsa, modificado segundo Rosenfeld (1947). O número de leucócitos foi determinado, usando-se objetiva de 100 X, em óleo de imersão. Foram contadas 100 células por lâmina, determinando a porcentagem de linfócitos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos.

O tecido da traquéia foi exposta a uma carga inicial de 500 mg e a análise feita a uma DDP de 500 mV. Durante o período de equilíbrio (40 minutos), a solução de Krebs-Henseilet foi trocada a cada 10 minutos. Decorrido esse período, a tensão foi reajustada para 500 mg. A capacidade contrátil (viabilidade tecidual) dos segmentos de brônquios e traquéias foi avaliada substituindo o tampão Krebs-Henseilet por tampão KCl despolarizante (60 mM). As preparações dos tecidos foram expostas ao KCl a fim de se obter um padrão de contração. Após a avaliação da viabilidade das preparações, o KCl foi substituído novamente pelo tampão Krebs-Henseilet. Decorridos 20 minutos de equilíbrio foram construídas curvas concentração-efeito a metacolina.

3.15 Determinação do Número de Células na Medula Óssea Femoral

Decorrido o tempo de estudo desejado, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg: i.p.) e exsangüinados (secção da aorta abdominal). O fêmur esquerdo dos animais foi retirado, lavado em PBS e seco em papel de filtro. Com auxílio de uma pinça

dente-de-rato, o fêmur foi mantido sobre um tubo Falcon (50 mL), em seguida introduzida, no canal medular do fêmur, uma agulha (0,80 X 25 mm) acoplada a uma seringa de polipropileno contendo 5 mL de PBS, para perfusão. A suspensão medular foi homogeneizada com auxílio de pipeta automática de 5 mL e centrifugada a 2410 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as células, ressuspensão em 1 mL de PBS.

A contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer em microscopia óptica comum (Nikon®, JAP). Para tanto, um alíquota da amostra (90 µL) foi acrescida de 10 µL de cristal violeta (0,2%) dissolvido em ácido acético (30%). Desta alíquota, 10 µL da amostra foi diluída em 90 µL de PBS; totalizando, portanto, uma diluição de 1:100. Os resultados foram expressos em número de células $\times 10^5/\text{mL}$.

3.16 Estudo da Capacidade Contrátil de Traquéia Isolada e Exposta a uma Solução de Ovalbumina “*in vitro*”

Após o período de sensibilização e broncoprovocação, animais foram anestesiados (hidrato de cloral; 400 mg/kg ip) e exsanguinados. Posteriormente, uma incisão longitudinal na região cervico-ventral foi realizada para a remoção da traquéia. Os segmentos de traquéia foram incubados em placas para órgãos isolados, contendo solução de Krebs-Henseleit, com 95% de O₂ e 5% de CO₂, a 37 °C, para avaliar as respostas isométricas à OVA. A curva concentração-efeito à OVA foi avaliada, utilizando um sistema de registro de dados (MacLab®, NZL), aquisição, armazenamento e análise (software MLS301). Os resultados foram expressos em g/100 mg de peso.

3.17 Avaliação da Hiper-reatividade “*in vitro*” nas Vias Aéreas Frente a Desafio com Metacolina

Após o período de sensibilização e broncoprovocação, animais foram anestesiados (hidrato de cloral; 400 mg/kg ip) e exsanguinados. Posteriormente, uma incisão longitudinal na região cervico-ventral foi realizada para a remoção da traquéia. Um fragmento deste tecido foi extraído e acondicionado em tampão Krebs-Henseleit, aerado. O brônquio intrapulmonar foi também isolado e o tecido conjuntivo adjacente removido. Para o registro isométrico de contração, todos os segmentos foram então montados em cubas para órgão isolado (15 mL), contendo solução de com 95% e 5% CO₂ com a seguinte composição (mM): NaCl, 115,0;

KCl, 4,6; CaCl₂ 2. H₂O, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄. 7 H₂O, 2,5; NaHCO₃, 25,0 e glicose 11,0 . O registro de força isométrica foi realizado usando o sistema, POWER LAB®, NZL, 4sp e transdutores isométricos (F-60), utilizando-se o programa Chart 3.4 para análise.

3.18 Análise Estatística

Os dados foram avaliados pelo teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias. Os dados paramétricos foram analisados por meio do teste “*t*” de Student ou análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney ou através do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunnett. Foram consideradas significantes as análises com nível de significância menor ou igual $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio de programa estatístico denominado GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo de inflamação pulmonar e análise do efeito da crotoxina

Para a indução da inflamação pulmonar, foi utilizado o protocolo de sensibilização e broncoprovocação por OVA, como descrito em material e métodos (item 3.4.). A caracterização da inflamação pulmonar e das alterações sistêmicas acarretadas pela OVA e a avaliação do efeito da CTX sobre este processo, foram realizadas de acordo com os parâmetros descritos abaixo. Nestes estudos, A CTX foi administrada por via s.c., na dose de 18 µg/rato, 2 h antes da broncoprovocação (itens 4.1.1 a 4.2)

4.1.1 *Alteração de permeabilidade vascular*

A Figura 2 mostra que o desafio com OVA, acarretou, nos animais sensibilizados, aumento da permeabilidade vascular, na traquéia (76%) e no brônquio interno (91%), quando comparado aos animais não sensibilizados e nem desafiados (grupo SAL/SAL). A CTX (18 µg/rato), administrada por via s.c. 2 h antes da broncoprovocação com OVA, não interferiu com as alterações de permeabilidade vascular causadas pela sensibilização e desafio com OVA. O tratamento com a CTX “*per se*”, não promoveu alteração da permeabilidade vascular pulmonar, quando comparado aos animais controles (grupo SAL/SAL).

A

B

Figura 2 - Efeito da Crotoxina sobre as alterações de permeabilidade vascular causadas pela sensibilização e desafio com ovalbumina (OVA) em segmentos de traquéia (A) e brônquio interno (B). A determinação da permeabilidade vascular foi realizada por meio da quantificação da concentração de azul de Evans (AE) extravasado (item 3.6.). Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem desafiados, tratados com CTX (SAL/CTX) e de ratos sensibilizados, desafiados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL.

4.1.2 Análise histopatológica do pulmão

As análises histopatológicas mostram que animais não sensibilizados nem broncoprovocados com OVA, apresentam parênquima íntegro, sem indícios de infiltrado leucocitário (Figura 3.A). A sensibilização seguida de broncoprovocação com OVA aumentou o tamanho das células caliciformes, sendo detectada ainda, a presença de muco dentro dos brônquios e de infiltrado inflamatório, quando comparado com a amostra representativa de pulmão de animais não imunizados (Figura 3.B).

O tratamento com a CTX não interferiu com as alterações histopatológicas causadas pela sensibilização e broncoprovocação, uma vez que foram observados intenso infiltrado polimorfonuclear, com presença marcante de neutrófilos e eosinófilos (Figura 3.C). A CTX “*per se*” também não modifica o tecido pulmonar de animais normais (Figura 3.D).

Figura 3 - Análise histopatológica do tecido pulmonar de animais sensibilizados e broncoprovocados por OVA, na presença ou ausência da crotoxina. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem broncoprovocados (SAL/SAL: A), animais sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com salina ou CTX (18 μ g/ animal), 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/SAL: B e OVA/CTX: C respectivamente) e de animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX: D) Decorridos 24 horas da broncoprovocação, os animais foram sacrificados, os pulmões foram coletados e processados pelas técnicas histopatológicas. Coloração HE em aumento de 200X. Onde, #: parênquima pulmonar e \$: Infiltrado polimorfonuclear.

4.1.3 Efeito da crotoxina sobre titulação de anticorpos totais do isotipo IgE (ELISA)

A Figura 4 mostra que o grupo de animais imunizados e broncoprovocados (OVA/SAL), apresentou aumento dos títulos de anticorpos do isotipo IgE, quando comparado ao grupo controle, tratado com solução salina (SAL/SAL). A administração da CTX, no grupo sensibilizado, não interferiu sobre os títulos de anticorpos, em relação aos animais imunizados tratados com solução salina. A toxina “*per se*”, não alterou significativamente a quantidade de anticorpos, quando comparado ao grupo controle.

Figura 4 – Efeito da crotoxina sobre os títulos (ELISA) de anticorpos totais do isotipo IgE, 24 horas após a broncoprovocação. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem desafiados, tratados com CTX (SAL/CTX) e de ratos sensibilizados, desafiados e tratados por via subcutânea com CTX (18 μ g/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL.

4.1.4 Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar e no lavado de medula óssea de animais normais

Inicialmente, investigamos se a administração subcutânea da CTX “*per se*” alteraria o número de leucócitos recuperados no lavado obtido do espaço broncoalveolar de animais normais, uma vez que não havia dados na literatura sobre o possível efeito da toxina neste parâmetro. Os resultados mostram que a CTX, administrada 2 ou 24 horas antes da coleta do LBA não alterou de maneira significativa, o número de células recuperadas no lavado, quando comparado ao grupo controle (Salina/Salina) (Figura 5).

Adicionalmente, analisamos o efeito da CTX “*per se*” sobre o número de células na medula óssea. Os resultados obtidos mostram que a administração da CTX também não alterou significativamente o número total de células recuperadas no lavado de medula, quando comparado com o grupo controle (Figura 6).

Figura 5 – Efeito da crotoxina sobre o número total de células recuperadas no lavado broncoalveolar de ratos. Os grupos consistiram de animais tratados por via subcutânea, com salina estéril (SAL/SAL) ou com CTX (SAL/CTX: 18µg/ animal), 2 ou 24 horas antes da coleta do lavado. Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo.

Figura 6 – Efeito da crotoxina sobre o número total de células recuperadas na medula óssea de ratos. Os grupos consistiram de animais tratados por via subcutânea, com salina (SAL/SAL) ou com CTX (SAL/CTX: 18µg/ animal), 2 ou 24 horas antes da coleta. Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo.

4.1.5 Determinação do número de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina

Os resultados obtidos mostram aumento significativo do número total de células presentes no LBA dos animais, 24 horas após o desafio com OVA (OVA/SAL), quando comparado aos animais SAL/SAL (Figura 7). A determinação do número diferencial de células mostrou que este aumento é decorrente do aumento de todos os tipos celulares encontrados no LBA (Figura 8).

A administração da CTX bloqueou o aumento do número de células presentes no LBA, quando comparado ao grupo anafilático (Figura 7). A diminuição do número total de células ocorreu como consequência da redução no número de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos (Figura 8).

Figura 7 – Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL) e de ratos sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina/Salina; # $p < 0,05$ em relação ao grupo Anafilático/Salina.

Figura 8 – Efeito da crotoxina sobre o número de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL, representados pela linha tracejada) e de ratos sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18 μ g/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL.

4.1.6 Determinação da atividade de mieloperoxidase, 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina

A broncoprovocação, em animais sensibilizados por OVA (OVA/SAL), acarretou aumento significativo da atividade de MPO, quando comparado aos animais controles (SAL/SAL). A administração da CTX reduziu (51%) a atividade enzimática de maneira significativa, quando comparado ao grupo anafilático (Figura 9).

Figura 9 – Efeito da crotoxina sobre a atividade de mieloperoxidase em tecido pulmonar de ratos, 24 horas após a broncoprovocação. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL) e de ratos sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/SAL.

4.1.7 Determinação do número de células presentes no lavado de medula óssea, 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina

Os resultados obtidos mostram que a broncoprovocação, em animais sensibilizados, diminuiu o número total de células recuperadas no lavado de medula óssea, quando comparado ao grupo controle (SAL/SAL). O tratamento com CTX também acarretou diminuição do número de células, que foi significativo quando comparado ao grupo SAL/SAL e ao grupo OVA/SAL (Figura 10).

figura 10 – Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes na medula óssea, 24 horas após a broncoprovocação. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL) e de ratos sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Decorridos 24 horas do desafio, os animais foram sacrificados e o lavado femoral realizado. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/SAL.

4.1.8 Determinação do número de leucócitos na circulação sanguínea periférica, imediatamente e 24 horas após a broncoprovocação, na presença ou ausência da crotoxina

Nesses estudos, a crotoxina foi administrada 2 h antes do desafio com OVA e as coletas de sangue realizadas imediatamente após a broncoprovocação (tempo 0 h da Tabela 1, que corresponde a 2 h da CTX) e 24 h após o desafio (tempo 24 h da Tabela 1, que corresponde a 26 h da CTX).

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a CTX *“per se”*, diminuiu significativamente, 2 h após sua administração (Tabela 1, Tempo 0 h), o número de leucócitos circulantes, quando comparado ao grupo controle (SAL/SAL). A análise diferencial mostra que essa diminuição decorreu da queda do número de linfócitos. As alterações no número de leucócitos circulantes não foram mais detectadas, 26 h (Tabela 1, Tempo 0 h) após o tratamento.

A sensibilização e broncoprovocação por OVA (OVA/SAL) reduziram significativamente o número de leucócitos na circulação sanguínea periférica, 24 horas após a broncoprovocação, quando comparado ao grupo SAL/SAL. A análise diferencial mostra que essa diminuição decorreu da queda no número de todos os tipos de células avaliadas. A CTX em animais sensibilizados e broncoprovocados (OVA/CTX), reverteu a queda no número de células circulantes, neste mesmo período, quando comparado ao grupo OVA/SAL.

Tabela 1 - Efeito da crotoxina sobre o número total de leucócitos circulantes

		Leucócitos (mm ³)			
Grupos		Total	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
SAL/SAL	0h	14500±1029	11600 ± 823	2610 ± 185	290 ± 21
	24h	13958 ± 1460	11166 ± 1168	2512 ± 263	279 ± 29
SAL/CTX	0h	9590 ± 2404*	6713 ± 1683*	2685 ± 673	192 ± 48
	24h	14305 ± 2109	11444 ± 1688	2575 ± 380	286 ± 42
OVA/SAL	0h	12625 ± 1597	10100 ± 1278	2273 ± 288	221 ± 32
	24h	8213 ± 1726*	6571 ± 1381*	1478 ± 311*	202 ± 35*
OVA/CTX	0h	12015 ± 1580	9613 ± 1265	2163 ± 285	240 ± 32
	24h	12135 ± 1694\$	9708 ± 1355\$	2184 ± 305\$	243 ± 34\$

Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem broncoprovocados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com crotoxina (SAL/CTX) e de ratos sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). As amostras de sangue foram coletadas pela veia caudal, imediatamente e 24 horas após a broncoprovocação. Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo, onde, * p<0,05 em relação ao grupo SAL/SAL e \$ p<0,05 em relação ao grupo OVA/SAL.

4.1.9 Determinação da Expressão de moléculas de adesão do complexo CD11/CD18, na presença ou ausência da crotoxina

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram que a sensibilização e broncoprovocação com OVA reduziram significativamente a expressão de CD11a/CD18 no LBA. A administração da CTX, em animais sensibilizados e broncoprovocados, inibiu parcialmente, mas significativamente, a redução na marcação das moléculas de adesão avaliadas. A CTX “*per se*”, não alterou a marcação na expressão de CD11a/CD18, quando comparado ao grupo controle (SAL/SAL).

Figura 11 – Efeito da crotoxina sobre a expressão de moléculas de adesão do complexo CD11a/CD18 no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem broncoprovocados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX) e de ratos sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Decorridos 24 horas da broncoprovocação os animais foram sacrificados e o sangue coletado. Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/SAL.

4.2 Determinação da hiper-reatividade “*in vitro*” de segmentos de traquéia em resposta ao desafio com metacolina

A Figura 12 mostra que a sensibilização e broncoprovocação não interferiram com a reatividade frente ao desafio com metacolina. Ainda, a administração da CTX, por via subcutânea, 2 horas antes do desafio não promoveu alteração significativa em relação aos demais grupos.

Figura 12 – Efeito da crotoxina sobre a hiper-reatividade em segmentos de traquéia frente ao desafio com metacolina. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL) e de ratos sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Decorridos 24 horas do desafio, os animais foram sacrificados e o fragmento da traquéia coletado. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo.

4.2.1 Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “in vitro” de segmento de traquéia isolada de ratos

A força de contração de segmentos da traquéia, determinada após a broncoprovocação (OVA) “in vitro”, foi significativamente maior, quando comparada aos animais controles (SAL/SAL). O tratamento com a CTX, 2 horas antes da broncoprovocação, bloqueou o aumento induzido pela OVA. A CTX, “per se”, não modifica o padrão da resposta contrátil, quando comparado aos grupo controle (Figura 13).

Figura 13 – Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “in vitro” de segmento de traquéia isolada de ratos. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem broncoprovocados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX) e de ratos sensibilizados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), ou salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Decorridos 2 horas do tratamento, os animais foram sacrificados e o fragmento da traquéia coletado. A atividade contrátil foi avaliada pela adição “in vitro” de solução de OVA na concentração de 100µg/mL nos dois grupos avaliados (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina/Salina e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/SAL.

4.3 Análise do efeito da crotoxina na fase indutora da reação alérgica

Neste estudo foi também avaliada a ação da CTX sobre a fase indutora do processo sensibilização. Para tanto, a crotoxina (18 µg/rato, s.c.) foi administrada ou no 1º, ou no 7º ou nos dias 0 e 7 e 14 do experimento. Os parâmetros avaliados, estão descritos a seguir.

4.3.1 Determinação do número de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação

Os resultados obtidos mostram aumento significativo do número total de células recuperadas no LBA dos animais, 24 horas após o desafio com OVA (OVA/SAL), quando comparado aos animais SAL/SAL. A CTX, em todos os tratamentos, bloqueou o aumento do número total de células, quando comparado ao grupo anafilático tratado com solução salina. A toxina, “*per se*”, não alterou o número CE células presentes no LBA (Figura 14).

Figura 14 – Efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação com OVA. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem broncoprovocados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX) e animais sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea, com salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/SAL), ou com CTX (18µg/animal) no dia 1 (OVA/CTX 1), ou no dia 7 (OVA/CTX 7), ou nos dias 0 e 7 e 14 do experimento (OVA/CTX 1, 7 e 14). Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/SAL.

4.3.2 Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “in vitro”, de segmento de traquéia isolada de ratos

Como mostra a Figura 15, a força de contração de segmentos da traquéia, depois da broncoprovocação “in vitro” (OVA), foi significativamente menor nos animais expostos à CTX, 2 horas antes de cada sensibilização, quando comparado a ratos tratados com veículo.

Figura 15 – Efeito da crotoxina sobre a resposta anafilática “in vitro” de segmento de traquéia isolada de ratos. Os grupos consistiram de animais sensibilizados, broncoprovocados “in vitro” e tratados por via subcutânea com salina (18µg/animal), 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/SAL) ou CTX (18µg/animal), nos dias 1 e 7 e 14 do experimento (OVA/CTX 1, 7 e 14), 2 horas antes de cada sensibilização. Decorridos 2 horas do tratamento, os animais foram sacrificados e o fragmento da traquéia coletado. A atividade contrátil foi avaliada pela adição “in vitro” de solução de OVA na concentração de 100µg/mL nos dois grupos avaliados (OVA/CTX e OVA/SAL, respectivamente). Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/SAL.

4.3.3 Efeito da crotoxina sobre os níveis de IL-6 e IL-4 no lavado broncoalveolar (ELISA)

A sensibilização e broncoprovocação não interferiram, significativamente, com a produção de IL-6 (Figura 16A) e IL-4 (Figura 16B). Da mesma forma, a CTX, em todos os períodos de administração, não promoveu alteração significativa na produção destas citocinas, em relação aos demais grupos.

A

B

Figura 16 – Efeito da crotoxina sobre os níveis de IL-6 (Painel A) e IL-4 (Painel B) no soro, 24 horas após a broncoprovocação. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem broncoprovocados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX) e animais sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea, com salina, 2 horas antes da broncoprovocação (OVA/SAL), ou CTX (18µg/ animal) no dia 0 (OVA/CTX 1), ou no dia 7 (OVA/CTX 7), ou nos dias 0 e 7 e 14 do experimento (OVA/CTX 1, 7 e 14). Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo.

4.3.4 Envolvimento dos receptores ALX no efeito inibitório da crotoxina sobre alguns parâmetros inflamação pulmonar alérgica

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que os efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos da crotoxina são mediados pela liberação de mediadores lipídicos derivados da via da 5-lipoxigenase e ativação de receptores ALX. Assim, avaliamos presentemente, se estes receptores estariam envolvidos em alguns dos efeitos da toxina na inflamação alérgica pulmonar. Para tanto, foi utilizado o BOC-2, um antagonista destes receptores. Nesse estudo, a CTX foi administrada 2 h antes da broncoprovocação.

4.3.5 Determinação do número de células presentes no lavado broncoalveolar, 24 horas após a broncoprovocação

Os resultados obtidos mostram aumento significativo do número total de células presentes no LBA dos animais, 24 horas após o desafio com OVA (OVA/SAL), quando comparado aos animais dos grupos SAL/SAL (Figura 17).

A administração da CTX bloqueou o aumento do número total de células, quando comparado ao grupo anafilático tratado com solução salina (Figura 17). O efeito da CTX foi revertido pelo tratamento com o antagonista seletivo de receptores ALX.

Figura 17 – Envolvimento dos receptores ALX no efeito da crotoxina sobre o número total de células presentes no lavado broncoalveolar de animais sensibilizados e broncoprovocados com ovalbumina. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX), animais não sensibilizados nem desafiados tratados com BOC (5µg/ animal) e CTX (SAL/BOC/CTX), ou animais sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), solução salina ou CTX+BOC (5µg/ animal), (OVA/CTX, OVA/SAL e OVA/BOC/CT, respectivamente). O BOC foi administrado 30 min antes da CTX. A toxina foi injetada 2 h antes da broncoprovocação. Os dados representam a média $\pm$ EPM de 5 animais por grupo, onde, * $p < 0,05$ em relação ao grupo SAL/SAL e # $p < 0,05$ em relação ao grupo OVA/CTX.

4.3.6 Determinação das áreas teciduais e contagem dos mastócitos

As análises dos cortes histológicos indicaram que os animais dos grupos OVA/SAL e OVA/CTX/BOC apresentaram maior porcentagem de desgranulação dos mastócitos (~70%), evidenciado pela presença de grânulos citoplasmáticos metacromáticos dispersos no parênquima pulmonar (Figura 18A, 18.D e Tabela 1), quando comparado ao grupo. SAL/SAL (~50%). Os animais do grupo SAL/SAL apresentaram estas mesmas células próximas aos vasos sanguíneos. Por outro lado, os animais do grupo OVA/CTX, apresentaram (~35%) mastócitos intactos, indicando que este tratamento inibiu o efeito da sensibilização por OVA. (Figura 18.C e Tabela 1). Esse efeito da toxina foi bloqueado pelo tratamento com BOC 2. Não foram detectadas diferenças significativas na porcentagem de mastócitos desgranulados nos grupos SAL/CTX e SAL/CTX/BOC, quando comparado ao grupo controle (Figura 18A), indicando que a toxina, “*per se*”, não induz desgranulação destas células.

Tabela 2 - Efeito da crotoxina sobre o número de mastócitos intactos e desgranulados de pulmão de animais sensibilizados por ovalbumina

	Mastócitos (células/mm ²)			
	Total	Intacto	Desgranulados	% Desg
SAL/SAL	1.90 ± 0.04	1.16 ± 0.17	0.94 ± 0.17	49,5
SAL/CTX	1.92 ± 0.05	0.90 ± 0.06	1.05 ± 0.06	54,7
SAL/CTX/BOC	1.92 ± 0.05	0.84 ± 0.07	1.08 ± 0.11	56,2
OVA/SALINA	1.96 ± 0.05	0.51 ± 0.06	1.45 ± 0.04	73,9
OVA/CTX	2.22 ± 0.04	1.44 ± 0.23 *	0.78 ± 0.21 *	35,2
OVA/CTX/BOC	1.94 ± 0.04	0.74 ± 0.19 #	1.42 ± 0.09 #	73,2

Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL), animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX), animais não sensibilizados nem desafiados tratados com BOC (5µg/ animal) e CTX (SAL/BOC/CTX), ou animais sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com CTX (18µg/ animal), solução salina ou CTX+BOC (5µg/ animal), (OVA/CTX, OVA/SAL e OVA/BOC/CT, respectivamente). O BOC foi administrado 30 min antes da CTX. A toxina foi injetada 2 h antes da broncoprovocação. Os dados representam a média ± EPM de 5 animais por grupo, onde, * p<0,05 em relação ao grupo OVA/SAL e # p<0,05 em relação ao grupo OVA/CTX.

Figura 18 – *Análise dos mastócitos no tecido pulmonar de ratos sensibilizados e broncoprovocados por ovalbumina, tratados ou não com crotoxina. Os grupos consistiram de animais não sensibilizados nem broncoprovocados tratados com CTX (SAL/CTX), ou animais sensibilizados, broncoprovocados e tratados por via subcutânea com solução salina, com CTX+BOC (5µg/animal), ou CTX (18µg/animal), (OVA/SAL-A, OVA/BOC/CTX-B e OVA/CTX-C, respectivamente,. animais não sensibilizados nem desafiados (SAL/SAL-D. O BOC (5µg/ animal) foi administrado 30 min antes da CTX. A toxina foi injetada 2 h antes da broncoprovocação Coloração: azul de toluidina. Barra: 5 µm.*

5 DISCUSSÃO

Como mencionado na Introdução, a CTX, o principal componente neurotóxico do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, interfere com as respostas inflamatória e imune, modulando principalmente o componente celular destas respostas. Apesar destes dados, a sua ação sobre patologias de origem alérgica não havia sido ainda, determinada. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito desta toxina sobre um modelo experimental de inflamação alérgica pulmonar.

Inicialmente foi caracterizado o modelo de indução da inflamação pulmonar induzida pela sensibilização e broncoprovocação por ovalbumina (OVA). Neste estudo, os animais foram injetados com OVA, por via intraperitoneal (imunização primária) e, após 7 dias, com OVA, por via subcutânea. Decorridos 14 dias da imunização primária, os ratos foram broncoprovocados com OVA, por via inalatória. Todos os experimentos foram conduzidos 24 horas após a broncoprovocação. Este tempo de latência entre a broncoprovocação e a eutanásia dos animais é muito importante para a detecção de alterações na celularidade pulmonar. Ligeiro de Oliveira e colaboradores (2004), analisando a migração celular para o pulmão de animais imunizados com OVA, mostraram que, em períodos superiores a 24 horas da broncoprovocação, ocorre decréscimo gradual do número total de células recuperadas no lavado broncoalveolar de ratos fêmeas, que se torna significativo após 48 horas. Esta redução é decorrente da diminuição do número de células mononucleares e de neutrófilos, mas não de eosinófilos.

Para a caracterização da inflamação pulmonar causada pela sensibilização e broncoprovocação por OVA, foram determinadas as alterações de permeabilidade vascular, por meio da quantificação do extravasamento de albumina marcada pelo azul de Evans, a mobilização de células para o pulmão, por meio da contagem do número de células recuperadas no lavado broncoalveolar (LBA), da quantificação da mieloperoxidase (MPO) e da análise histopatológica do tecido pulmonar, além da avaliação, no soro dos animais imunizados, do título de anticorpos totais do isotipo IgE.

Animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentaram aumento significativo da permeabilidade vascular. Adicionalmente, neste período de 24 horas, ocorreu aumento marcante do número de células mobilizadas para o pulmão, que foi decorrente do aumento no

numero de macrófagos, linfócitos, mas principalmente, de neutrófilos e eosinófilos. O significativo acúmulo de neutrófilos no pulmão foi também evidenciado pelo marcado aumento na atividade da MPO (aproximadamente 4 vezes). A MPO é um constituinte de neutrófilos e a avaliação de sua atividade é considerada um método indireto para determinar a quantidade de neutrófilos (BRADLEY; PRIEBAT; CHRISTENSEN, 1982). Dados de literatura têm mostrado que em animais sensibilizados com OVA, o primeiro contato com o alérgeno por via aerógena, é capaz de gerar uma resposta inflamatória pulmonar com intenso recrutamento, migração e ativação de leucócitos, com a liberação de vários mediadores inflamatórios (MARTINS; LIGEIRO DE OLIVEIRA; FIALHO DE ARAUJO, 2001; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004). A persistência deste processo inflamatório promove alterações estruturais e morfológicas das vias aéreas, as quais determinam o remodelamento das vias áreas. Este remodelamento é desencadeado pelo dano tecidual persistente, pelo processo de reparação e por alterações que causam anormalidades permanentes nas vias aéreas (DJUKANOVIC; ROCHE; WILSON, 1990).

Ainda, o método de indução de inflamação pulmonar presentemente utilizado (sensibilização e desafio com OVA) pode ser considerado como um modelo de inflamação alérgica pulmonar (MARTINS et al., 2001), também pelo aumento dos níveis plasmáticos de IgE e das concentrações de interleucinas de padrão Th2, estando correlacionado a um processo de asma alérgica (DE SANCTIS et al., 1999). De fato, no nosso estudo, níveis elevados de IgE foram detectados no soro de animais sensibilizados e broncoprovocados apresentaram no soro.

As análises histopatológicas do tecido pulmonar, presentemente realizadas para confirmar e ampliar a caracterização das alterações acarretadas pela sensibilização e broncoprovocação com OVA, mostraram que os animais sensibilizados e desafiados com OVA apresentam aumento do tamanho das células caliciformes, presença de muco dentro dos brônquios e infiltrado inflamatório. Os dados em conjunto sugerem a presença de resposta inflamatória aguda pulmonar.

Uma vez caracterizado o modelo de inflamação, investigamos o possível efeito da crotoxina nos parâmetros inflamatórios avaliados. Para tanto, a crotoxina foi administrada 2 h antes da broncoprovocação por OVA. Este protocolo teve como objetivo avaliar o efeito da toxina sobre uma resposta de sensibilização já instalada e esteve baseado em dados anteriores do nosso grupo, mostrando que, 2 h após o tratamento, a CTX é capaz de induzir alterações

no numero de leucócitos circulantes e na funcionalidade de linfócitos e macrófagos, sem acarretar, nos animais, sinais característicos de intoxicação (SAMPAIO et al., 2003; SAMPAIO et al., 2005). Adicionalmente, em alguns ensaios experimentais, a crotoxina foi administrada em diferentes períodos (dia 1, ou dia 7 ou dias 1, 7, e 14), com o intuito de avaliar seu possível efeito na fase de indução do processo de sensibilização.

Os resultados indicam que a crotoxina, administrada 2 h antes da broncoprovocação, não interferiu com o aumento de permeabilidade vascular induzida pela OVA, uma vez que, nos animais tratados com a toxina, as alterações observadas foram semelhantes às dos animais controles que receberam salina. Da mesma forma, o tratamento com a toxina não alterou os níveis circulantes de imunoglobulina E (IgE) nos animais sensibilizados e broncoprovocados por OVA. Apesar dos dados de literatura mostrarem que a CTX apresenta efeito imunomodulador, inibindo a resposta imune humoral (CARDOSO e MOTA, 1997), a administração de CTX, 2 h antes da broncoprovocação, não foi capaz de influenciar o processo de síntese destes anticorpos. A ausência de efeito da crotoxina, nesta condição experimental, pode ser devido ao período de tratamento (realizado no 14º dia, período em que o processo de sensibilização por OVA já está completo). Neste contexto, Coleman e colaboradores (1983), mostraram que a produção de anticorpos do tipo IgE já estão aumentados entre 7 e 14 dias após a imunização com a OVA.

O efeito da crotoxina sobre o numero de leucócitos presentes no LBA de animais sensibilizados e broncoprovocados, foi também investigado nesse estudo. Como mencionado na Introdução, a CTX apresenta efeitos modulatórios sobre as respostas imune e inflamatória, interferindo particularmente com o componente celular (macrófagos e linfócitos) de ambas as respostas (CARDOSO e MOTA, 1997; CARDOSO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2001; GARCIA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2005; SAMPAIO et al., 2010). Os mecanismos responsáveis por este efeito não são totalmente conhecidos, mas envolvem, pelo menos em parte, alteração nas vias de sinalização intracelular envolvidas no rearranjo do citoesqueleto de leucócitos, a ação de mediadores derivados da via das lipoxigenase e alterações na expressão de moléculas de adesão (SAMPAIO et al., 2006b; SAMPAIO et al., 2006a; ZAMBELLI et al., 2008). Nas nossas condições experimentais, a CTX reverteu, em animais sensibilizados e broncoprovocados, o aumento no numero de células mobilizadas para o espaço broncoalveolar causado pelo desafio com OVA. Os resultados mostraram ainda, que a toxina é capaz de interferir com todos os tipos celulares presentes no LBA. Dados recentes de literatura tem mostrado que a CTX e também o veneno crotálico, afetam a inflamação

induzida por carragenina em camundongos, inibindo significativamente a migração celular, principalmente de polimorfonucleares, causada por esse agente lesivo (Nunes et al., (2007; 2010). Os autores observaram ainda, que os efeitos inibitórios sobre o processo inflamatório induzido pela carragenina são de longa duração.

No presente estudo, foi também analisado o efeito da crotoxina sobre as alterações de celularidade da medula óssea causada pela sensibilização e broncoprovocação por OVA. A medula óssea é constituída por células do tecido hematopoiético, células estromais e células acessórias, agregadas a macromoléculas da matriz extracelular, que formam uma composição altamente organizada e ricamente vascularizada. A medula é um depósito de células e sua organização fornece microambiente adequado para a proliferação, diferenciação de células precursoras e, também, para a liberação de células sanguíneas diferenciadas para a circulação (MUSCHLER; BOEHM; EASLEY, 1997; TOMAKI; ZHAO; LUNDAHL, 2000; TRAVLOS, 2006). Os nossos resultados mostraram que, 24 h após a broncoprovocação (realizada no 14º dia do processo de sensibilização), ocorre queda no número de células presentes na medula dos animais. Dados de literatura tem mostrado que na vigência de reação alérgica pulmonar, ocorre aumento na expressão de precursores celulares na medula óssea, particularmente de eosinófilos (TOMAKI et al., 2000; JOHANSSON; SERGEJEVA; SJOSTRAND, 2004; SITKAUSKIENE; RADINGER; BOSSIOS, 2005; RADINGER e LOTVALL, 2009). Estas alterações, dependendo do modelo de imunização e do período de análise, podem ser detectadas rapidamente após o desafio, com pico em 72 horas, sendo que aproximadamente 21 dias após o desafio, ocorre diminuição do número destas células na medula, a qual coincide com a diminuição de eosinófilos na corrente sanguínea e com seu aumento no pulmão (SOUTHAM; WIDMER; ELLIS, 2005). No nosso estudo, não foi realizada contagem diferencial das células recuperadas da medula óssea, para possibilitar a determinação do tipo (tipos) de célula que se apresenta reduzida na vigência de sensibilização e broncoprovocação. Interessantemente, no presente estudo, a administração de CTX promoveu queda ainda maior no número de células na medula óssea dos animais imunizados. Cabe ressaltar, no entanto, que em animais não sensibilizados, a toxina não promoveu alterações significativas no número de células da medula óssea, neste mesmo período.

Para tentar melhor compreender os efeitos induzidos pela crotoxina no LBA e na medula óssea de animais sensibilizados e broncoprovocados por OVA, foi também analisada a ação da toxina sobre o número de leucócitos circulantes. Neste estudo, a CTX foi administrada 2 h antes da broncoprovocação e a contagem de células realizada imediatamente

ou 24 h após o desafio com OVA (períodos correspondentes a 2 e 26 h da administração da toxina, respectivamente). Os dados mostraram que a sensibilização e broncoprovocação por OVA reduziram significativamente o número de leucócitos na circulação sanguínea periférica, 24 horas após o desafio e que a CTX, neste mesmo período, reverteu este fenômeno. É importante salientar que a CTX “*per se*”, diminuiu de maneira significativa, o número de leucócitos (linfócitos) circulantes, 2 h após sua administração, contudo, 26 h após (período que corresponde a 24 h da broncoprovocação), essa alteração não é mais detectada. Desta forma, os resultados obtidos indicam que a crotoxina foi capaz de modular as alterações causadas pelo desafio com OVA. Cabe ressaltar que Zambelli e colaboradores (2008), investigando o número de leucócitos presentes na circulação sanguínea periférica e circulação linfática de ratos tratados com a CTX, observaram que a toxina acarreta, 2 h após o tratamento, queda do número de linfócitos sanguíneos e linfáticos. Estes autores observaram, ainda, que, 4 horas após o tratamento com a toxina, a leucopenia não é mais detectada, (ZAMBELLI; 2008). Estes dados corroboram os resultados presentemente obtidos, mostrando que 26 h após a administração da toxina, não são mais detectadas alterações no número de leucócitos circulantes.

Cabe lembrar que a toxina promoveu, nos animais sensibilizados e broncoprovocados com OVA, queda significativa no número de células na medula óssea. Assim, a reversão, causada pelo tratamento com a toxina, da queda no número de leucócitos circulantes em animais broncoprovocados, poderia ser consequência da maior liberação de células da medula óssea para a circulação sanguínea. Estes dados associados aos resultados mostrando que a crotoxina diminui, neste mesmo período da broncoprovocação por OVA, a migração de células para o pulmão, indicam que a toxina pode agir em diferentes locais, neste processo de modulação da resposta inflamatória.

Uma vez que foram detectadas alterações no número de leucócitos presentes na circulação sanguínea e no lavado broncoalveolar, investigamos o possível efeito da crotoxina na expressão de moléculas de adesão envolvidos nos fenômenos de migração celular. Resultados recentes do nosso grupo indicam que a CTX interfere com a expressão de moléculas de adesão (mais especificamente da integrina LFA-1) envolvidas nos fenômenos de interação leucócito-endotélio (ZAMBELLI et al., 2008), o que poderia contribuir para os dados ora encontrados.

A migração de leucócitos em direção aos alvéolos pulmonares é uma característica das doenças pulmonares e ocorre, principalmente, através de capilares e de vênulas pós-capilares (RIDGER; WAGNER; WALLACE, 2001; WARD e LENTSCH, 2002). O tráfego de leucócitos entre o sangue e os tecidos é regulado pela expressão de moléculas de adesão na superfície dessas células e de células endoteliais (BUTCHER e PICKER, 1996). Deste modo, as moléculas de adesão atuam em conjunto, facilitando a migração de células circulantes aos sítios inflamatórios. Inicialmente, a lesão tecidual acarreta a liberação de mediadores inflamatórios que induzem a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais. As selectinas, ativadas por estes mediadores, induzem a ligação inicial de leucócitos ao endotélio, permitindo o mecanismo de rolamento celular (*rolling*) sobre células endoteliais (GRAILER; KODERA; STEEBER, 2009). Em consequência da ligação às selectinas, ocorre mudança conformacional das $\beta 2$ integrinas presentes na membrana dos leucócitos, para um estado de alta afinidade, passando-se de uma fase selectina-dependente para outra integrina-dependente. Essa alteração induz a interação destes receptores celulares aos ligantes endoteliais da superfamília das imunoglobulinas. As integrinas expressas na superfície dos leucócitos, são compostas por duas cadeias peptídicas, α e β . Estas proteínas são agrupadas de acordo com o tipo de cadeia β que as compõem. Entre os diversos membros da família integrina, duas estão especialmente envolvidas na adesão do leucócito ao vaso: a LFA-1 (lymphocyte function-associated-1), particularmente expressa em linfócitos (CD11a/CD18) e a Mac-1 (CD11b/CD18), normalmente expressa em neutrófilos, monócitos e macrófagos. As demais integrinas são responsáveis por interações com a matriz extracelular (DIACOVO; ROTH; BUCCOLA, 1996; HONG-GELLER, 2009).

Os nossos resultados mostraram que a sensibilização e broncoprovocação por OVA diminuiu a expressão de LFA-1 (CD11a/CD18) nas células recuperadas do lavado broncoalveolar. A administração de CTX, em dose única, reverteu parcialmente as alterações observadas nestes animais. Apesar dos dados anteriores do nosso grupo mostrarem que a CTX aumenta a expressão de moléculas de adesão em linfócitos (Zambelli et al., 2008), deve-se considerar, em relação aos resultados presentemente obtidos, que a diminuição do número de células causadas pela toxina, no LBA dos animais desafiados por OVA, alterando o tipo celular presente no lavado, pode ter contribuído para as alterações na expressão das moléculas de adesão observadas.

No presente estudo, para a caracterização da resposta inflamatória pulmonar causada pela OVA e do efeito da crotoxina, foram também realizadas análises histopatológicas do tecido pulmonar. Estes estudos mostraram que a CTX, administrada 2 h antes da broncoprovocação, não foi capaz de interferir com as alterações detectadas para os animais sensibilizados e broncoprovocados, uma vez que foi observado, nestes animais, intenso infiltrado polimorfonuclear, com presença marcante de neutrófilos e eosinófilos. Estes dados mostrando que a CTX não alterou a presença de leucócitos no tecido pulmonar inflamado, pode ser decorrente da amostra de tecido analisado, não representativa de todo o tecido pulmonar.

Adicionalmente às alterações de permeabilidade vascular, do aumento da produção de anticorpos da classe IgE e alteração da arquitetura do tecido pulmonar, a resposta inflamatória pulmonar pode ser caracterizada pela presença de broncoconstrição e hiper-responsividade das vias aéreas (COHN; ELIAS; CHUPP, 2004). A hiper-reatividade aérea resulta da lesão tecidual provocada por substâncias tóxicas produzidas pelos leucócitos ativados, presentes no pulmão (KRANEVELD; FOLKERTS; VAN OOSTERHOUT, 1997; POLOSA e HOLGATE, 2006). Baseados nestes dados e para melhor caracterizar o modelo de inflamação pulmonar empregado neste estudo, avaliamos a reatividade da traquéia e do brônquio interno isolados de animais previamente sensibilizados e desafiados com OVA. Os resultados mostraram que, nas nossas condições experimentais, a inflamação pulmonar não é acompanhada de alterações na hiper-reatividade das vias aéreas. A ausência de alteração de reatividade pode ser consequência da inadequação do tempo do ensaio (24 horas após o desafio) e/ou do número de desafios (neste caso, um único desafio). É importante salientar que dados da literatura têm mostrado que, embora a hipersensibilidade alérgica seja adequada para estudar a inflamação das vias aéreas, nem sempre esta hipersensibilidade é acompanhada de alterações concomitantes da mecânica pulmonar nestes animais (BRYAN; O'CONNOR; MATTI, 2000; LECKIE, 2000).

Uma outra forma de avaliar isoladamente, o mecanismo de hipersensibilidade mediada por anticorpos anafiláticos é o modelo de reatividade *in vitro* das vias aéreas. Para que ocorra desgranulação dos mastócitos nesta condição experimental, é necessário que o anticorpo anafilático esteja ligado no receptor de alta especificidade, presente na superfície destas células. Esta condição foi garantida em nossos estudos, pela utilização do protocolo de sensibilização por OVA (2 tratamentos - sensibilização e reforço). A reatividade das vias aéreas foi avaliada, utilizando o modelo experimental de resposta anafilática “*in vitro*”, de

segmento de traquéia. A imunização com OVA promoveu a contração do segmento isolado de traquéia, fenômeno que foi bloqueado pela crotoxina. Cabe ressaltar que a CTX administrada 2 horas antes do desafio *in vitro*, não modificou o padrão da contração de animais não imunizados, sugerindo que a toxina “*per se*”, não apresenta efeito direto sobre a resposta contrátil da traquéia.

A inibição da contração, causada pela CTX, nos animais sensibilizados por OVA, poderia ser decorrente, por exemplo, da inibição da produção de IgE. Contudo, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, a toxina, administrada 2 h antes do desafio, não interferiu com o título destes anticorpos. Um outro mecanismo que poderia contribuir para o efeito inibitório da CTX sobre a reatividade das vias aéreas, seria a estabilização da membrana dos mastócitos, dificultando sua desgranulação, e/ou modular a cascata de sinalização intracelular, alterando a qualidade e quantidade de grânulos liberados.

Os mastócitos apresentam papel relevante na fase precoce da asma (também considerada como fase aguda), sendo as principais células envolvidas nas reações de hipersensibilidade imediata (WELLER; COLLINGTON; WILLIAMS, 2011). Uma vez ativados, os mastócitos secretam uma variedade imensa de mediadores da resposta inflamatória. Além disso, estas células contribuem significativamente para o desenvolvimento da resposta alérgica, por meio da ativação de células residentes e células vasculares, que também secretam diversos tipos de mediadores, induzindo o recrutamento celular para o foco inflamatório (LINO DOS SANTOS FRANCO; DAMAZO; BERALDO DE SOUZA, 2006).

Baseados nestes dados, caracterizamos o possível efeito da CTX sobre a desgranulação de mastócitos, na vigência de sensibilização e broncoprovocação por OVA. Nossos dados mostraram que este processo induz a desgranulação de mastócitos, estando os grânulos citoplasmáticos dispersos no parênquima pulmonar. Animais sensibilizados pela OVA e tratados com a CTX apresentaram número maior de mastócitos intactos, sugerindo que a toxina foi capaz de estabilizar essas células, revertendo parcialmente as alterações causadas pelo processo de sensibilização e broncoprovocação. Esta ação da crotoxina poderia contribuir também para a redução da reatividade das vias aéreas, no modelo de reatividade “*in vitro*”.

Ainda neste estudo, avaliamos os possíveis mecanismos envolvidos na ação inibitória da CTX na inflamação alérgica pulmonar. Sampaio e colaboradores (2006) e Zambelli e

colaboradores (2008) mostraram que a ação inibitória da toxina sobre macrófagos e linfócitos é modulada, pelo menos em parte, por mediadores lipídicos derivados da via da lipoxigenases, sugerindo participação destes mediadores nos efeitos da CTX sobre leucócitos. Foi também observado que macrófagos tratados com a CTX secretam quantidades significativas de lipoxina A₄ (LXA₄). Adicionalmente, dados recentes mostraram o envolvimento de receptores para a lipoxina A₄ (receptores ALX) medeiam o efeito inibitório da toxina sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina (Nunes et al., 2010). Baseado nestes dados, investigamos o envolvimento de receptores ALX no efeito da CTX sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar. Assim, por meio da utilização do N-t-butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (BOC-2), um antagonista de receptores para formil peptídeo tipo-1 (FPRL-1), também conhecido com ALXR ou receptor para lipoxina A₄ (LXA₄), administrados aos animais, foi observado que a diminuição do número de células no LBA e do número de mastócitos desgranulados, causada pela CTX em animais sensibilizados e broncoprovocados pela OVA, é mediada pela ativação de receptores ALX. Apesar de não termos utilizado um inibidor farmacológico da via das lipoxigenases, ou mesmo, determinado a possível presença de lipoxina A₄ nos animais tratados com a CTX, é possível sugerir, baseado nos nossos resultados e nos dados de literatura (SAMPAIO et al., 2006b; NUNES et al., 2010; SAMPAIO et al., 2010), que o efeito antiinflamatório da crotoxina é mediado por esta lipoxina.

Lipoxinas são mediadores lipídicos produzidos localmente pela via da lipoxigenases, durante as interações intercelulares entre leucócitos e células residentes, no curso do processo inflamatório, impedindo uma resposta exacerbada e limitando os danos ao hospedeiro (SERHAN, 2007). Inúmeros estudos tem mostrado que as lipoxinas apresentam potente ação antiinflamatória. A lipoxina A₄ inibe a migração de neutrófilos e eosinófilos em modelo de quimiotaxia in vitro (SOYOMBO; SPUR; LEE, 1994), reduz a infiltração neutrofilica em modelo de peritonite (BANNENBERG; CHIANG; ARIEL, 2005), e reduz o edema de pata induzido pela carragenina (MENEZES-DE-LIMA; KASSUYA; NASCIMENTO, 2006). Esta lipoxina apresenta ação antiinflamatória, inibindo expressão de moléculas de adesão, secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (SPITE e SERHAN, 2010). Levy e colaboradores (2002) investigaram o papel da LXA₄ em um modelo de asma experimental. Neste estudo foi observado que a administração de um análogo estável de lipoxina bloqueia o aparecimento da hiper-reatividade brônquica das vias aéreas e a inflamação pulmonar. O efeito antiinflamatório foi decorrente da diminuição de leucócitos recuperados do LBA e de

mediadores presentes no lavado, incluindo a interleucina-5, IL-13, a eotaxina, prostanóides e leucotrienos cisteínicos. Estes efeitos são mediados pela ativação de receptores FRPL-1.

No presente estudo, além de analisar o efeito da crotoxina sobre a resposta de animais já sensibilizados pela OVA, avaliamos o efeito desta toxina sobre a fase indutora da resposta pulmonar alérgica. Para tanto, a CATX foi administrada aos animais, 2 horas antes da imunização primária (dia 1), do reforço (dia 7) ou do desafio (dias 1, 7 e 14). Estes tratamentos promoveram queda do número de células presentes no LBA de animais sensibilizados e broncoprovocados com OVA. Foi também observada diminuição da força de contração de fragmento de traquéia isolada, em todos os grupos tratados com a toxina. Estes dados indicam que a crotoxina é capaz de interferir com os estágios iniciais da resposta imune à imunização com OVA. Para confirmar esta sugestão, determinamos novamente o efeito da CTX sobre um dos principais mecanismos efetores da resposta imune eliciada a partir da imunização com Ovalbumina (OVA): os anticorpos totais do isotipo IgE. Para testar esta hipótese, a CTX foi administrada em diferentes momentos da sensibilização com OVA. A sensibilizados e broncoprovocados acarretaram aumento dos níveis de IgE no soro. A CTX administrada 2 horas antes da imunização primária (Dia 1), do reforço (dia 7) e/ou desafio (dias 1, 7 e 14), promoveu queda na titulação desses anticorpos em animais sensibilizados e broncoprovocados com OVA, confirmando a atividade supressora da toxina sobre a resposta imune mediada por IgE.

As doenças alérgicas, incluindo asma são caracterizadas por inflamação com infiltração acentuada dos eosinófilos (COHN; ELIAS; CHUPP, 2004). Adicionalmente, varias citocinas estão envolvidas neste processo. Uma atividade essencial biológica da IL-4 no desenvolvimento da inflamação alérgica, é a capacidade de promover diferenciação de células Th0 *naive* em células Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (MURPHY e REINER, 2002). Estudos utilizando camundongos nocautes para a IL-4 mostram claramente sua importância no desenvolvimento de doenças inflamatórias de origem alérgica. Os parâmetros da resposta alérgica estão significativamente suprimidos em camundongos deficientes para IL-4, quando comparados com camundongos de tipo selvagem (BRUSSELLE; KIPS; TAVERNIER, 1994). Baseados nestes dados, avaliamos presentemente, os níveis de IL-4 em nosso modelo experimental de inflamação alérgica e também o efeito da crotoxina sobre a secreção desta citocina. Inicialmente tentamos dosar os níveis de IL-4 no sobrenadante do lavado broncoalveolar dos animais. No entanto, os valores encontrados ficaram abaixo do limite de detecção do método (ELISA). Um fator que poderia explicar esses baixos níveis

seria a limitação do método de coleta do LBA. Grande quantidade de solução é empregada para lavagem do espaço e o sobrenadante muito diluído dificulta a detecção. Para tentar contornar este problema técnico, tentamos determinar IL-4 diretamente no soro. Contudo, nas nossas condições experimentais, não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes grupos experimentais.

Tem sido demonstrado que em camundongos, a administração de CTX modula a secreção de algumas citocinas, incluindo a IL-6 (CARDOSO et al., 2001). A IL-6 é produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos e estimula a produção de células B, a proliferação de células T, a ativação do mecanismo natural de morte celular e citotoxicidade. Alguns estudos tem demonstrado aumento da concentração de IL-6 no LBA e soro de pacientes com infecção pulmonar (SCHUTTE; LOHMEYER; ROSSEAU, 1996). Baseado nestes dados, avaliamos neste trabalho, a possível alteração nos níveis séricos de IL-6 de animais sensibilizados e broncoprovocados, e o possível efeito da crotoxina neste parâmetro. Os resultados, apesar de não serem estatisticamente significantes, indicam que a sensibilização por OVA aumenta os níveis de IL-6, e que a CTX reverte este aumento.

Em resumo, os resultados apresentados até o momento indicam que a CTX, principal componente neurotóxico do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, interfere com a inflamação pulmonar acarretada pela sensibilização e desafio por OVA, modulando principalmente o componente celular desta resposta. Estes resultados podem vir a contribuir para o maior conhecimento da ação da toxina e no futuro, sobre os mecanismos endógenos da imunorregulação de inflamações alérgicas.

6 CONCLUSÃO

- O modelo de inflamação alérgica pulmonar empregado foi capaz de aumentar a permeabilidade vascular, por meio da quantificação do extravasamento de albumina corada com azul de Evans, a mobilização de células para o pulmão, por meio da contagem do número de células recuperadas no lavado broncoalveolar (LBA), da quantificação da mieloperoxidase (MPO), da análise histopatológica do tecido pulmonar. e da titulação no soro de anticorpos totais do isotipo IgE, em animais sensibilizados e broncoprovocados por OVA

- A administração subcutânea de CTX (18 µg/rato), 2 horas antes da broncoprovocação, produziu em animais sensibilizados:

- diminuição do número total de células recuperadas do lavado broncoalveolar, decorrente da redução no número de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos;
- diminuição da atividade enzimática de mieloperoxidase em amostras de homogenato do pulmão;
- redução da desgranulação dos mastócitos em brônquios intrapulmonares, efeitos estes que foram revertidos pelo pré-tratamento com BOC-2, um antagonista de receptores ALX;
- diminuição do número de linfócitos e monócitos na circulação periférica;
- redução no número total de leucócitos recuperados da medula óssea;
- aumento da expressão do complexo CD11/CD18 por leucócitos recuperados do lavado broncoalveolar;
- diminuição da força de contração de segmentos da traquéia, em resposta anafilática *“in vitro”*.

Ainda, observamos os efeitos da CTX administrada 2 horas antes da imunização primária, do reforço e/ou desafio. Neste esquema de tratamento, a toxina promoveu:

- diminuição da produção de IgE
- da força de contração de segmentos da traquéia, de animais sensibilizados e broncoprovocados com OVA.

Em conjunto, os resultados sugerem que a CTX interfere com a inflamação pulmonar acarretada pela sensibilização e desafio por OVA, modulando mecanismos indutores e efetores da resposta alérgica. Estes resultados podem vir a contribuir para o melhor conhecimento da ação da toxina, e no futuramente, sobre os mecanismos endógenos da imunorregulação de inflamações alérgicas.

REFERÊNCIAS¹

- ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, p. 953-960, 1988.
- AMORA, D. N.; SOUSA, T. M.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; MAGALHAES, M. R.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; DE MENEZES, D. B.; MONTEIRO, H. S. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 47, p. 260-264, 2006.
- ANKIER, S. I. Reactivity of rat and man to egg-white. **Prog. Drug. Res.**, v. 13, p. 340-394, 1969.
- ANTCZAK, A.; NOWAK, D.; BIALASIEWICZ, P.; KASIELSKI, M. Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. **Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)**, v. 47, p. 119-126, 1999.
- BANNENBERG, G. L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; ARITA, M.; TJONAHEN, E.; GOTTLINGER, K. H.; HONG, S.; SERHAN, C. N. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. **J. Immunol.**, v. 174, p. 4345-4355, 2005.
- BARNES, P. J.; PEDERSEN, S.; BUSSE, W. W. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids. New developments. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 157, p. S1-53, 1998.
- BATEMAN, E. D.; HURD, S. S.; BARNES, P. J.; BOUSQUET, J.; DRAZEN, J. M.; FITZGERALD, M.; GIBSON, P.; OHTA, K.; O'BYRNE, P.; PEDERSEN, S. E.; PIZZICHINI, E.; SULLIVAN, S. D.; WENZEL, S. E.; ZAR, H. J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **Eur. Respir. J.**, v. 31, p. 143-178, 2008.
- BATES, J. H.; RINCON, M.; IRVIN, C. G. Animal models of asthma. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 297, p. L401-410, 2009.
- BENNICH, H. H.; ISHIZAKA, K.; JOHANSSON, S. G.; ROWE, D. S.; STANWORTH, D. R.; TERRY, W. D. Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin. **Immunology**, v. 15, p. 323-324, 1968.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, p. 439-448, 1989.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

¹ De acordo com:

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

- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J. Invest. Dermatol.**, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BRAZIL, O. V. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 981-992, 1966.
- BRAZIL, O. V. Neurotoxins from the South American rattle snake venom. **Taiwan. Yi. Xue. Hui. Za. Zhi.**, v. 71, p. 394-400, 1972.
- BREITHAUPT, H. Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotapotin. **Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.**, v. 292, p. 271-278, 1976.
- BRUSSELLE, G. G.; KIPS, J. C.; TAVERNIER, J. H.; VAN DER HEYDEN, J. G.; CUVELIER, C. A.; PAUWELS, R. A.; BLUETHMANN, H. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. **Clin. Exp. Allergy**, v. 24, p. 73-80, 1994.
- BRYAN, S. A.; O'CONNOR, B. J.; MATTI, S.; LECKIE, M. J.; KANABAR, V.; KHAN, J.; WARRINGTON, S. J.; RENZETTI, L.; RAMES, A.; BOCK, J. A.; BOYCE, M. J.; HANSEL, T. T.; HOLGATE, S. T.; BARNES, P. J. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. **Lancet**, v. 356, p. 2149-2153, 2000.
- BUCKLEY, R. H. Certification in diagnostic laboratory immunology. **Ann. Intern. Med.**, v. 108, p. 458-459, 1988.
- BUSSE, W.; CORREN, J.; LANIER, B. Q.; MCALARY, M.; FOWLER-TAYLOR, A.; CIOPPA, G. D.; VAN AS, A.; GUPTA, N. Omalizumab, anti-IgE recombinant humanized monoclonal antibody, for the treatment of severe allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 108, p. 184-190, 2001.
- BUTANTAN. Prevenção de Acidentes com Animais Peçonhentos. **Instituto Butantan Fundacentro.1.ed. São Paulo**, p.4-46, 2001.
- BUTCHER, E. C.; PICKER, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science**, v. 272, p. 60-66, 1996.
- CALHOUN, W. J.; SWENSON, C. A.; DICK, E. C.; SCHWARTZ, L. B.; LEMANSKE, R. F., JR.; BUSSE, W. W. Experimental rhinovirus 16 infection potentiates histamine release after antigen bronchoprovocation in allergic subjects. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 144, p. 1267-1273, 1991.
- CAMARGO, C. A., JR.; RACHELEFSKY, G.; SCHATZ, M. Managing asthma exacerbations in the emergency department: summary of the National Asthma Education and Prevention Program Expert Panel Report 3 guidelines for the management of asthma exacerbations. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 124, p. S5-14, 2009.

- CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of Crotalus venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v. 35, p. 607-612, 1997.
- CARDOSO, D. F.; LOPES-FERREIRA, M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S.; FARSKY, S. H. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from Crotalus durissus terrificus snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators Inflamm.**, v. 10, p. 125-133, 2001.
- CAREAU, E.; SIROIS, J.; BISSONNETTE, E. Y. Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 26, p. 579-586, 2002.
- CAREAU, E.; PROULX, L. I.; POULIOT, P.; SPAHR, A.; TURMEL, V.; BISSONNETTE, E. Y. Antigen sensitization modulates alveolar macrophage functions in an asthma model. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 290, p. 871-879, 2006.
- CAREAU, E.; TURMEL, V.; LAUZON-JOSET, J. F.; BISSONNETTE, E. Y. Alveolar macrophages reduce airway hyperresponsiveness and modulate cytokine levels. **Exp. Lung Res.**, v. 36, p. 255-261, 2010.
- CARLSEN, K. H. Exercise induced asthma in children and adolescents and the relationship to sports. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 9, p. 173-180, 1998.
- CAROFINO, B.; FULKERSON, J. Medial hamstring tendon regeneration following harvest for anterior cruciate ligament reconstruction: fact, myth, and clinical implication. **Arthroscopy**, v. 21, p. 1257-1265, 2005.
- CASTRO, F. R.; FARIAS, A. S.; PROENCA, P. L.; DE LA HOZ, C.; LANGONE, F.; OLIVEIRA, E. C.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. The effect of treatment with crotopot on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. **Toxicon**, v. 49, p. 299-305, 2007.
- CECCHINI, A. L.; SOARES, A. M.; CECCHINI, R.; DE OLIVEIRA, A. H.; WARD, R. J.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Effect of crotopot on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A(2) from Bothrops snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 138, p. 429-436, 2004.
- CHATKIN, J. M.; BARRETO, S. M.; FONSECA, N. A.; GUTIERREZ, C. A.; SEARS, M. R. Trends in asthma mortality in young people in southern Brazil. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 82, p. 287-292, 1999.
- COHN, L.; ELIAS, J. A.; CHUPP, G. L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 789-815, 2004.
- COLEMAN, J. W.; LAYTON, G. T.; STANWORTH, D. R. The kinetics of in vivo sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. **Eur. J. Immunol.**, v. 13, p. 994-998, 1983.
- CORIN, R. E.; VISKATIS, L. J.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. A. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. **Invest. New Drugs**, v. 11, p. 11-15, 1993.

- COYLE, P.; PHILCOX, J. C.; ROFE, A. M. Metallothionein induction in cultured rat hepatocytes by arthritic rat serum, activated macrophages, interleukin-6, interleukin-11 and leukaemia inhibitory factor. **Inflamm. Res.**, v. 44, p. 475-481, 1995.
- CUPO, P.; DE AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Absence of myocardial involvement in children victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Toxicon**, v. 42, p. 741-745, 2003.
- DE LIMA, W. T.; DA SILVA, Z. L. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: role of connective tissue mast cells. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, p. 689-695, 1998.
- DELOT, E.; BON, C. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry**, v. 32, p. 10708-10713, 1993.
- DIACOVO, T. G.; ROTH, S. J.; BUCCOLA, J. M.; BAINTON, D. F.; SPRINGER, T. A. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. **Blood**, v. 88, p. 146-157, 1996.
- DJUKANOVIC, R.; ROCHE, W. R.; WILSON, J. W.; BEASLEY, C. R.; TWENTYMAN, O. P.; HOWARTH, R. H.; HOLGATE, S. T. Mucosal inflammation in asthma. **Am Rev Respir. Dis.**, v. 142, p. 434-457, 1990.
- DONATO, N. J.; MARTIN, C. A.; PEREZ, M.; NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin. A novel growth inhibitory mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, p. 1535-1543, 1996.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 66, p. 289-302, 1966a.
- ENERBACK, L. Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 3. Reactivity towards compound 48/80. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.**, v. 66, p. 313-322, 1966b.
- EPSTEIN, M. M. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 133, p. 84-100, 2004.
- ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de Medicina Veterinária. 4 ed. São Paulo. **Editora Manole**, v. 1997.
- FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, p. 229-234, 1987.
- FAVORETTO, B. C.; RICARDI, R.; SILVA, S. R.; JACYSYN, J. F.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H. A.; FAQUIM-MAURO, E. L. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**, v. 57, p. 600-607, 2011.

- FERGUSON, A. C.; VAUGHAN, R.; BROWN, H.; CURTIS, C. Evaluation of serum eosinophilic cationic protein as a marker of disease activity in chronic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 95, p. 23-28, 1995.
- FLOOD-PAGE, P.; MENZIES-GOW, A.; PHIPPS, S.; YING, S.; WANGOO, A.; LUDWIG, M. S.; BARNES, N.; ROBINSON, D.; KAY, A. B. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. **J. Clin. Invest.**, v. 112, p. 1029-1036, 2003.
- FOSTER, P. S. Allergic networks regulating eosinophilia. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 21, p. 451-454, 1999.
- FUNASA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. **Ministério da Saúde. FUNASA. 2 ed. Brasília**, p. 120, 2001.
- GARCIA, F.; TOYAMA, M. H.; CASTRO, F. R.; PROENCA, P. L.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. Crota potin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. **Toxicon**, v. 42, p. 433-437, 2003.
- GLEICH, G. J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 105, p. 651-663, 2000.
- GOPALAKRISHNAKONE, P.; HAWGOOD, B. J. Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 22, p. 791-804, 1984.
- GRAILER, J. J.; KODERA, M.; STEEBER, D. A. L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. **J. Dermatol. Sci.**, v. 56, p. 141-147, 2009.
- HADLER, W. A.; BRAZIL, O. V. Pharmacology of crystalline crotoxin. IV. Nephrotoxicity. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 1001-1008, 1966.
- HARGREAVE, F. E.; LEIGH, R. Induced sputum, eosinophilic bronchitis, and chronic obstructive pulmonary disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 160, p. S53-57, 1999.
- HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 68, p. 1560-1563, 1971.
- HERNANDEZ, M.; SCANNONE, H.; FINOL, H. J.; PINEDA, M. E.; FERNANDEZ, I.; VARGAS, A. M.; GIRON, M. E.; AGUILAR, I.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Alterations in the ultrastructure of cardiac autonomic nervous system triggered by crotoxin from rattlesnake (*Crotalus durissus cumanensis*) venom. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 59, p. 129-137, 2007.
- HODDESON, E. K.; PRATT, E.; HARVEY, R. J.; WISE, S. K. Local and systemic IgE in the evaluation and treatment of allergy. **Otolaryngol. Clin. North. Am.**, v. 43, p. 503-520, viii, 2010.
- HOLGATE, S. T. The epidemic of asthma and allergy. **J. R. Soc. Med.**, v. 97, p. 103-110, 2004.

- HONG-GELLER, E. A role for cell adhesion in beryllium-mediated lung disease. **J. Occup. Environ. Hyg.**, v. 6, p. 727-731; quiz D102-723, 2009.
- ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T.; HORNBROOK, M. M. Physicochemical properties of reaginic antibody. V. Correlation of reaginic activity with gamma-E-globulin antibody. **J. Immunol.**, v. 97, p. 840-853, 1966.
- JOHANSSON, A. K.; SERGEJEVA, S.; SJOSTRAND, M.; LEE, J. J.; LOTVALL, J. Allergen-induced traffic of bone marrow eosinophils, neutrophils and lymphocytes to airways. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p. 3135-3145, 2004.
- JOHNSON, J. R.; WILEY, R. E.; FATTOUH, R.; SWIRSKI, F. K.; GAJEWSKA, B. U.; COYLE, A. J.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.; ELLIS, R.; INMAN, M. D.; JORDANA, M. Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 169, p. 378-385, 2004.
- KEIR, S.; PAGE, C. The rabbit as a model to study asthma and other lung diseases. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v. 21, p. 721-730, 2008.
- KELLER, M. B.; LOWENSTEIN, S. R. Epidemiology of asthma. **Semin. Respir. Crit. Care Med.**, v. 23, p. 317-329, 2002.
- KRANEVELD, A. D.; FOLKERTS, G.; VAN OOSTERHOUT, A. J.; NIJKAMP, F. P. Airway hyperresponsiveness: first eosinophils and then neuropeptides. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 19, p. 517-527, 1997.
- KUCHAREWICZ, I.; BODZENTA-LUKASZYK, A.; BUCZKO, W. Experimental asthma in rats. **Pharmacol. Rep.**, v. 60, p. 783-788, 2008.
- LAMBLIN, C.; GOSSET, P.; TILLIE-LEBLOND, I.; SAULNIER, F.; MARQUETTE, C. H.; WALLAERT, B.; TONNEL, A. B. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 157, p. 394-402, 1998.
- LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, p. 793-805, 2004.
- LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotafotrin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 578-583, 1995.
- LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotafotrin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. **Toxicon**, v. 38, p. 199-208, 2000.
- LECKIE, M. J. Chronic allergen challenge as an experimental model: necessary, significant or useful? **Clin. Exp. Allergy**, v. 30, p. 1191-1193, 2000.
- LEMANSKE, R. F., JR. Inflammatory events in asthma: an expanding equation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 105, p. S633-636, 2000.

- LEVY, B. D.; DE SANCTIS, G. T.; DEVCHAND, P. R.; KIM, E.; ACKERMAN, K.; SCHMIDT, B. A.; SZCZEKLIK, W.; DRAZEN, J. M.; SERHAN, C. N. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). **Nat. Med.**, v. 8, p. 1018-1023, 2002.
- LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; DA SILVA, Z. L.; BORELLI, P.; TAVARES DE LIMA, W. Regulation of allergic lung inflammation in rats: interaction between estradiol and corticosterone. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 20-27, 2004.
- LINO DOS SANTOS FRANCO, A.; DAMAZO, A. S.; BERALDO DE SOUZA, H. R.; DOMINGOS, H. V.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; OLIANI, S. M.; COSTA, S. K.; TAVARES DE LIMA, W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 214, p. 35-42, 2006.
- MACDOWELL, A. L.; PETERS, S. P. Neutrophils in asthma. **Curr. Allergy Asthma Rep.**, v. 7, p. 464-468, 2007.
- MARTINS, E., JR.; LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAUJO, A. M.; TAVARES DE LIMA, W.; CIPOLLA-NETO, J.; COSTA ROSA, L. F. Melatonin modulates allergic lung inflammation. **J. Pineal Res.**, v. 31, p. 363-369, 2001.
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, p. 469-478, 2004.
- MENEZES-DE-LIMA, O., JR.; KASSUYA, C. A.; NASCIMENTO, A. F.; HENRIQUES, M. G.; CALIXTO, J. B. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. **Prostaglandins. Other. Lipid. Mediat.**, v. 80, p. 123-135, 2006.
- MOFFATT, M. F.; COOKSON, W. O. Genetics of asthma and inflammation: the status. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, p. 606-609, 1999.
- MOREIRA, A. P.; HOGABOAM, C. M. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 31, p. 485-491, 2011.
- MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 933-944, 2002.
- MUSCHLER, G. F.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **J. Bone Joint. Surg. Am.**, v. 79, p. 1699-1709, 1997.
- NIALS, A. T.; UDDIN, S. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. **Dis. Model Mech.**, v. 1, p. 213-220, 2008.

- NOGUEIRA-NETO, S.; AMORIM, R. L.; BRIGATTE, P.; PICOLO, G.; FERREIRA, W. A., JR.; GUTIERREZ, V. P.; CONCEICAO, I. M.; DELLA-CASA, M. S.; TAKAHIRA, R. K.; NICOLETTI, J. L.; CURY, Y. The analgesic effect of crotoxin on neuropathic pain is mediated by central muscarinic receptors and 5-lipoxygenase-derived mediators. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 91, p. 252-260, 2008.
- NUNES, F. P.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, p. 1090-1098, 2007.
- NUNES, F. P.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C.; GONCALVES, L. R.; CIRILLO, M. C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, p. 1100-1106, 2010.
- O'BYRNE, P. M. Therapeutic strategies to reduce asthma exacerbations. **J. Allergy Clin. Immunol.**, 2011.
- POLLART, S. M.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. House dust sensitivity and environmental control. **Prim. Care**, v. 14, p. 591-603, 1987.
- POLLART, S. M.; MULLINS, D. E.; VAILES, L. D.; HAYDEN, M. L.; PLATTS-MILLS, T. A.; SUTHERLAND, W. M.; CHAPMAN, M. D. Identification, quantitation, and purification of cockroach allergens using monoclonal antibodies. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 87, p. 511-521, 1991.
- POLOSA, R.; HOLGATE, S. T. Adenosine receptors as promising therapeutic targets for drug development in chronic airway inflammation. **Curr. Drug. Targets**, v. 7, p. 699-706, 2006.
- RADINGER, M.; LOTVALL, J. Eosinophil progenitors in allergy and asthma - do they matter? **Pharmacol. Ther.**, v. 121, p. 174-184, 2009.
- RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, p. 609-616, 2004a.
- RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D. F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, p. 801-810, 2004b.
- RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 333-338, 1986.
- RIDGER, V. C.; WAGNER, B. E.; WALLACE, W. A.; HELLEWELL, P. G. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. **J. Immunol.**, v. 166, p. 3484-3490, 2001.

- ROLIM-ROSA, R.; VIERA, E. G. J.; SILLES-VILLARROEL, M.; SIRACUSA, Y. Q.; IIZUKA, H. Análise comparativa pelo instituto Butantan. **Mem. Inst. Butantan**, v. 44/45, p. 259-267, 1980-1981.
- RUDD, C. J.; VISKATIS, L. J.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. A. In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. **Invest. New Drugs**, v. 12, p. 183-184, 1994.
- SALVEMINI, D.; PISTELLI, A.; MOLLACE, V.; ANGGARD, E.; VANE, J. The metabolism of glyceryl trinitrate to nitric oxide in the macrophage cell line J774 and its induction by Escherichia coli lipopolysaccharide. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 17-24, 1992.
- SAMARTZIDOU, H.; DELCOUR, A. H. Distinct sensitivities of OmpF and PhoE porins to charged modulators. **FEBS. Lett.**, v. 444, p. 65-70, 1999.
- SAMPAIO, S. C.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 70, p. 551-558, 2001.
- SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; DOS-SANTOS, E. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of Crotalus durissus terrificus snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, p. 899-907, 2003.
- SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; PERES, C. M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from Crotalus durissus terrificus venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 45, p. 671-676, 2005.
- SAMPAIO, S. C.; SANTOS, M. F.; COSTA, E. P.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CARNEIRO, S. M.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon**, v. 47, p. 909-919, 2006a.
- SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; DOS SANTOS, E. C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of Crotalus durissus terrificus venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, p. 313-321, 2006b.
- SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, p. 1045-1060, 2010.
- SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B.; DE CASTRO, S. C.; DE SOUSA-E-SILVA, M. C.; AMARAL, C. F.; REZENDE, N. A.; KAMIGUTI, A. S.; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (Crotalus durissus) in Brazil. **Q.J.M.**, v. 94, p. 551-559, 2001.

- SANTOS, M. C.; D'IMPÉRIO-LIMA, M. R.; DIAS DA SILVA, W. Influence of *Crotalus* venom on the response to sheep red blood cells. **Braz. J. Med. Biol.**, v. 19, p. 636, 1986.
- SANTOS, P. E.; SOUZA, S. D.; FREIRE-MAIA, L.; ALMEIDA, A. P. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. **Toxicon**, v. 28, p. 215-224, 1990.
- SCHMIDT, D. T.; RABE, K. F. [Reliable and modern therapy of allergic bronchial asthma]. **Internist. (Berl.)**, v. 41, p. 1391-1398, 2000.
- SCHUTTE, H.; LOHMEYER, J.; ROSSEAU, S.; ZIEGLER, S.; SIEBERT, C.; KIELISCH, H.; PRALLE, H.; GRIMMINGER, F.; MORR, H.; SEEGER, W. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. **Eur. Respir. J.**, v. 9, p. 1858-1867, 1996.
- SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 101-137, 2007.
- SITKAUSKIENE, B.; RADINGER, M.; BOSSIOS, A.; JOHANSSON, A. K.; SAKALAUSKAS, R.; LOTVALL, J. Airway allergen exposure stimulates bone marrow eosinophilia partly via IL-9. **Respir. Res.**, v. 6, p. 33, 2005.
- SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Two Active Proteins from Rattlesnake Venom. **Nature**, v. 142, p. 213-213, 1938.
- SLY, P. D. The early origins of asthma: who is really at risk? **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 11, p. 24-28, 2011.
- SOERENSEN, B. Animais peçonhentos, reconhecimento, distribuição geográfica, produção de soros e tratamento dos envenenamentos. **Atheneu**, v. 91-107, 1990.
- SOUTHAM, D. S.; WIDMER, N.; ELLIS, R.; HIROTA, J. A.; INMAN, M. D.; SEHMI, R. Increased eosinophil-lineage committed progenitors in the lung of allergen-challenged mice. **J Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, p. 95-102, 2005.
- SOYOMBO, O.; SPUR, B. W.; LEE, T. H. Effects of lipoxin A4 on chemotaxis and degranulation of human eosinophils stimulated by platelet-activating factor and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. **Allergy**, v. 49, p. 230-234, 1994.
- SPALDING, S. M.; WALD, V.; BERND, L. A. [Total serum IgE level in atopic and non-atopic individuals in Porto Alegre]. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 46, p. 93-97, 2000.
- SPITE, M.; SERHAN, C. N. Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. **Circ. Res.**, v. 107, p. 1170-1184, 2010.
- SPITERI, M. A.; KNIGHT, R. A.; JEREMY, J. Y.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Alveolar macrophage-induced suppression of peripheral blood mononuclear cell responsiveness is reversed by in vitro allergen exposure in bronchial asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 7, p. 1431-1438, 1994.

- STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, p. S73-80, 2010.
- TAUBE, C.; DAKHAMA, A.; GELFAND, E. W. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 135, p. 173-186, 2004.
- THOMAS, L. H.; WARNER, J. A. The eosinophil and its role in asthma. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, p. 593-597, 1996.
- TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. p. 55-68, 2006.
- TOMAKI, M.; ZHAO, L. L.; LUNDAHL, J.; SJOSTRAND, M.; JORDANA, M.; LINDEN, A.; O'BYRNE, P.; LOTVALL, J. Eosinophilopoiesis in a murine model of allergic airway eosinophilia: involvement of bone marrow IL-5 and IL-5 receptor alpha. **J. Immunol.**, v. 165, p. 4040-4050, 2000.
- TRAVLOS, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicol. Pathol.**, v. 34, p. 548-565, 2006.
- TURNER, H.; KINET, J. P. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. **Nature**, v. 402, p. B24-30, 1999.
- VOORHORST, R.; SPIEKSMAN, F. T. Correspondence: of mites and men. **J. Allergy**, v. 40, p. 357-358, 1967.
- WARD, P. A.; LENTSCH, A. B. Endogenous regulation of the acute inflammatory response. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 234-235, p. 225-228, 2002.
- WEERSINK, E. J.; POSTMA, D. S.; AALBERS, R.; DE MONCHY, J. G. Early and late asthmatic reaction after allergen challenge. **Respir. Med.**, v. 88, p. 103-114, 1994.
- WEGMANN, M.; HAUBER, H. P. Experimental approaches towards allergic asthma therapy-murine asthma models. **Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.**, v. 4, p. 37-53, 2009.
- WELLER, C. L.; COLLINGTON, S. J.; WILLIAMS, T.; LAMB, J. R. Mast cells in health and disease. **Clin. Sci. (Lond.)**, v. 120, p. 473-484, 2011.
- WICKENS, K.; PEARCE, N.; CRANE, J.; BEASLEY, R. Antibiotic use in early childhood and the development of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 29, p. 766-771, 1999.
- ZAMBELLI, V. O.; SAMPAIO, S. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; GRECO, K.; BRITTO, L. R.; ALVES, A. S.; ZYCHAR, B. C.; GONCALVES, L. R.; SPADACCI-MORENA, D. D.; OTTON, R.; DELLA-CASA, M. S.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, p. 1357-1367, 2008.

ZHANG, H. L.; HAN, R.; CHEN, Z. X.; CHEN, B. W.; GU, Z. L.; REID, P. F.; RAYMOND, L. N.; QIN, Z. H. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 48, p. 175-182, 2006.

ZHANG, M.; MURPHY, R. F.; AGRAWAL, D. K. Decoding IgE Fc receptors. **Immunol. Res.**, v. 37, p. 1-16, 2007.

ZHU, Q.; WU, D. C.; ZHOU, X. P.; GONG, S.; CHENG, B. C.; QIN, Z. H.; REID, P. F.; YIN, Q. Z.; JIANG, X. H. Inhibitory effect of crotoxin on the pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats. **Toxicon**, v. 51, p. 102-111, 2008.

ZOSKY, G. R.; SLY, P. D. Animal models of asthma. **Clin. Exp. Allergy**, v. 37, p. 973-988, 2007.