



FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

Quantificação de mastócitos locais, em camundongos, injetados com o veneno de *Bothrops atrox* e tratados com a espécie vegetal antiofídica *Bellucia dichotoma*

Orientador

Professora Doutora Maria Cristina dos Santos (DP/ ICB)

Aluno

Thais Andréa dos Anjos Martins

Informações de Acesso ao Documento

Este documento é confidencial?

SIM

NÃO

Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM

NÃO

Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM

NÃO

**2. 4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados?
Especifique.**

3. Introdução

Os mastócitos (MC) são células filogeneticamente antigas do sistema imune inato, inicialmente descritas por Paul Ehrlich, em 1878. Sua principal característica histológica é a metacromasia, uma propriedade tintorial apresentada pelos grânulos que preenchem o citoplasma da célula: em vez de se corarem de azul como o tecido conjuntivo e as células em sua volta, ao usar o corante azul de toluidina, os mastócitos se coram de violeta. Os grânulos são preenchidos por vários mediadores pré-formados, como aminas bioativas



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

(histamina, heparina e serotonina) e proteases como triptase, caboxipeptidase A3, e algumas citocinas (DAHLIN; HALLGREN, 2015). Quando as células são estimuladas, tais compostos são liberados e induzem importante ação no ambiente extracelular. Apresentam uma distribuição disseminada pelo organismo e são encontrados predominantemente na interface entre o organismo e o ambiente externo, como a mucosa respiratória, a pele e o trato gastrointestinal (KUMAR; SHARMA, 2010).

Os mastócitos estão envolvidos em uma gama de atividades fisiológicas e patológicas. Duas principais funções foram associadas: são efetores da imunidade inata, regulando a migração e a maturação de outras células do sistema imune inato (KUMAR; SHARMA, 2010) e são promotores do processo alérgico, juntamente com a IgE, na hipersensibilidade do tipo I, estando diretamente relacionado à fisiopatologia da asma, rinite alérgica e crise anafilática (GALLI et al., 2016). Até recentemente, uma função ignorada dos MC era sua participação na formação do edema e da dor, induzidos por venenos de serpentes, em especial pelos do gênero *Bothrops* sp. (SOUZA et al., 2012; DE TONI et al., 2015).

O gênero *Bothrops* sp. é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na América Latina (SOUZA et al., 2012) e dentre as espécies, a *Bothrops atrox* é a responsável por maior parte dos acidentes, na região Norte do Brasil (FEITOSA et al., 2015). Seu veneno apresenta um efeito local mais exacerbado quando comparado aos demais venenos (MOREIRA et al., 2012). Os componentes são capazes de induzir a degranulação dos mastócitos e a esse evento pode-se relacionar o edema e a dor. O acidente ofídico por *B. atrox* é considerado uma doença ocupacional, afetando principalmente agricultores e moradores de zona rural. No Brasil e em especial, a Região Norte, pela distância entre o local do acidente e o centro de saúde que disponibilize o antiveneno, há alta morbimortalidade relacionada ao evento (WALDEZ; VOGT, 2009). O retardo e/ou a ausência de soroterapia estão relacionados a importantes sequelas físicas, que dificultam o desempenho das atividades cotidianas e laborativas dos vitimados (DOS-SANTOS, 2009; WALDEZ; VOGT, 2009; FEITOSA et al., 2015).

Em resposta as dificuldades de acesso ao serviço médico, as populações rurais buscam alternativas terapêuticas, como os extratos de plantas medicinais. O uso recorrente dessas plantas não é um evento isolado na região Norte do Brasil. Populações da Colômbia, Costa Rica e outros países da América Latina utilizam uma gama de plantas



medicinais, cuja eficácia está gradativamente sendo comprovada pela ciência (LOMONTE et al., 2009).

No Brasil, na região Oeste do Pará, uma das espécies vegetais mais usadas pela população no tratamento dos acidentes por serpentes é a *Bellucia dichotoma*, conhecida popularmente como muúba ou goiaba-de-anta. Em 2014, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, administrado por via oral, foi capaz de neutralizar eficientemente a atividade edematogênica do veneno de *Bothrops atrox*, como também aumentou a eficácia do soro antiofídico (MOURA et al., 2014).

Pela função edematogênica dos mastócitos, postula-se que uma das propriedades da *Bellucia dichotoma* seria a de influenciar negativamente a degranulação e dessa forma, diminuir o edema e suas consequências. Para isso, contou-se o número de MC presentes em lâminas histológicas obtidos de animais desafiados com o veneno e tratados com o extrato da planta, com o soro antiofídico e com os dois produtos simultaneamente.

4. Justificativa

Na literatura existem poucos estudos sobre a participação de mastócitos nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* sp. Sabe-se que os mastócitos, além de sua função na resposta inflamatória, liberam componentes capazes de bloquear enzimas presentes em venenos ofídicos (TSAI et al., 2015).

Em estudos recentes de nosso grupo com a espécie vegetal *Bellucia dichotoma* foi observado bloqueio da atividade edematogênica induzida pelo veneno de *Bothrops atrox*, em camundongos (MOURA et al, 2014). Sendo os produtos de degranulação de mastócitos importantes na formação do edema, o presente estudo visa verificar a participação dessas células na resposta inflamatória local induzida pelo veneno de *Bothrops atrox* e, também verificar e quantificar os mastócitos em animais desafiados com esse veneno e tratados com *Bellucia dichotoma*.

A promoção de pesquisas voltadas à comprovação e ao entendimento da ação antiofídica de plantas medicinais da Amazônia, além de diversificar os conhecimentos sobre a flora, pode instituir em longo prazo novos protocolos de tratamento para uma das doenças tropicais mais negligenciadas.

Além disso, o aprofundamento dos estudos envolvendo a ação dos mastócitos em resposta aos envenenamentos ofídicos permitirá um melhor entendimento do processo



inflamatório mediado por essas células e novos conhecimentos de base para o desenvolvimento de fármacos, que atuem nessa via inflamatória.

5. Objetivos

5.1. Geral

Quantificar o número de mastócitos ativados no local da injeção, com a peçonha de *Bothrops atrox*, em animais tratados e não tratados com a espécie vegetal *Bellucia dichotoma*.

5.2. Específicos

1) Quantificar o número de mastócitos ativados no local da injeção com o veneno de *Bothrops atrox* ou com salina (controle).

2) Verificar o número de mastócitos ativados nos tecidos envenenados após os seguintes tratamentos: com o extrato aquoso de *Bellucia dichotoma*, ou com o soro antibotrópico, ou com o extrato aquoso de *B. dichotoma* seguido de soro antibotrópico.

3) Correlacionar o número de mastócitos ativados à extensão das lesões locais.

4) Correlacionar o número de mastócitos ativados com a presença ou não de outras células do sistema imune, particularmente neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos.

6. Metodologia

- Extração do veneno da *Bothrops atrox*

O veneno foi extraído de serpentes adultas de *Bothrops atrox*, provenientes da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no Km 83 da BR-163, Santarém, PA, Brasil. Os espécimes foram mantidos no biotério das Faculdades Integradas do Tapajós-FIT, Santarém-PA, coordenado pelo MSc. Hipócrates de Menezes Chalkidis. O veneno foi coletado in natura e liofilizado no laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental, da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, PA. Após liofilização foi feito um “pool” do veneno e mantido a -20o C, até o momento do uso.

- Animais

Camundongos Swiss machos com o peso entre 34 a 41g, obtidos do Biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Santarém-PA foram utilizados nos



UFAM

experimentos. Os animais foram mantidos em temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, em ciclo de 12 h claro/12 h escuro, em gaiolas-padrão, com água e ração a vontade.

- Soro antibotrópico

O soro antibotrópico (SAB) utilizado foi o do Lote no: 105113B, produzido pelo Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil, a partir de plasma de cavalos imunizados com a mistura dos seguintes venenos: *Bothrops jararaca* (50%), *B. neuwiedi* (12,5%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. jararacussu* (12,5%).

- Obtenção e processamento da *Bellucia dichotoma*

Amostras da espécie vegetal *Bellucia dichotoma* foram coletadas em área de savana, nas proximidades da comunidade de Cucurunã ($02^\circ 27' 21.0''\text{S}$ e $54^\circ 47' 45.7''\text{W}$), localizada em Santarém, no período de março de 2013. A identificação botânica da espécie foi realizada pela Doutora Regina Célia Viana Martins da Silva do Herbário da EMBRAPA/Amazônia Oriental (Belém – PA, Brasil).

O extrato aquoso foi preparado pela doutoranda Valéria Mourão de Moura com base em informações populares, de acordo com a prática dos moradores das comunidades do Eixo Forte da Região Oeste do Pará. Para isto, foram utilizados 50 g de pó da casca de *Bellucia dichotoma* extraído com água destilada na proporção de 1:10 (m:v) sob agitação constante de 1.250 rpm e temperatura de 100°C até a fervura (chá por decocção). Após esfriar, retirou-se 150 mL, que é a quantidade equivalente a um copo de chá, como utilizado popularmente. Em seguida, foi liofilizado e o peso final seco do extrato foi de 2,9 g.

- Quantificação dos mastócitos

Para quantificar os mastócitos, foram injetados 5 μg de veneno dissolvido em salina 0,9% no coxim plantar da pata direita posterior dos animais, em volume constante de 50 μL (5 μg refere-se a duas vezes a menor quantidade de veneno necessária para induzir 30% de aumento máximo da espessura da pata experimental). Os camundongos foram separados aleatoriamente em 5 grupos: Grupo 1) controle positivo - 4 animais receberam apenas o veneno de *Bothrops atrox* (via subcutânea); Grupo 2) 5 receberam o extrato de *Bellucia dichotoma* (EBd) 283,3 mg/kg em via oral (VO), após injeção do veneno; Grupo 3) 5 receberam EBd VO após injeção do veneno e em seguida, o soro antibotrópico (BA) (100 μL), via plexo venoso oftálmico (PVO); Grupo 4) 4 receberam soro antibotrópico (BA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

via PVO, após injeção do veneno; Grupo 5) receberam 50 μ L salina 0.9% (controle negativo).

Após 24 horas, os animais foram sacrificados e suas patas direita e esquerda foram retiradas e fixadas em formol tamponado 10%, por 7 dias em temperatura ambiente. As amostras foram processadas no Laboratório de Biologia Celular. Após fixação, as patas foram seccionadas longitudinalmente com o auxílio de um estereomicroscópio (Leica EZ4D Digital System) e mantidas na mesma solução fixadora. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70 e 96%), infiltradas e incluídas em moldes individuais preenchidos com resina plástica de hidroxietil-metacrilato (Technovit 7100, Külzer-Heraues). Foram obtidas seções histológicas de 3 μ m e estas coradas com azul de toluidina 0,5% (azul de toluidina, 0,12g; borato de Na⁺, 0,5g; H₂O destilada, 100 mL) e fucsina básica (fucsina básica, 0,5g e H₂O destilada, 100 mL). Cada bloco histológico contendo a porção de pata produziu 6-8 seções por animal. Todo o processo de produção das seções histológicas foi realizado pela doutoranda Valéria Mourão de Moura.

A quantificação dos mastócitos foi realizada sob a orientação do Prof. Dr. Oscar Tadeu Ferreira da Costa do Laboratório de Citologia da Universidade Federal do Amazonas. Utilizou-se a técnica de análise estereológica. Para tanto, fotografou-se em baixo aumento cada lâmina produzida. Em seguida, utilizando o programa ImageJ 1.451, para evitar possíveis vieses de seleção e aferimento, selecionou-se aleatoriamente campos de vista. Estes foram fotografados em maior aumento, produzindo entre 24 a 64 imagens por animal. As imagens foram codificadas, o que proporcionou uma análise às cegas, de maneira que os pesquisadores envolvidos na contagem não soubessem de qual animal as lâminas pertenciam e não alterassem inconscientemente os valores.

Foi utilizado o programa 3dmod, onde sobre a fotografia das lâminas, foi aplicado uma grade 5 x 4 cuja área total é 1024 μ m². As linhas contínuas foram classificadas como proibidas, sendo que as células com propriedade metacromática cujos núcleos tocassem nessa linha não eram considerados na contagem a fim de evitar vieses. As células eram consideradas quando alguma parte do núcleo destas estava dentro da área determinada ou quando o núcleo estava em contato com a linha tracejada.

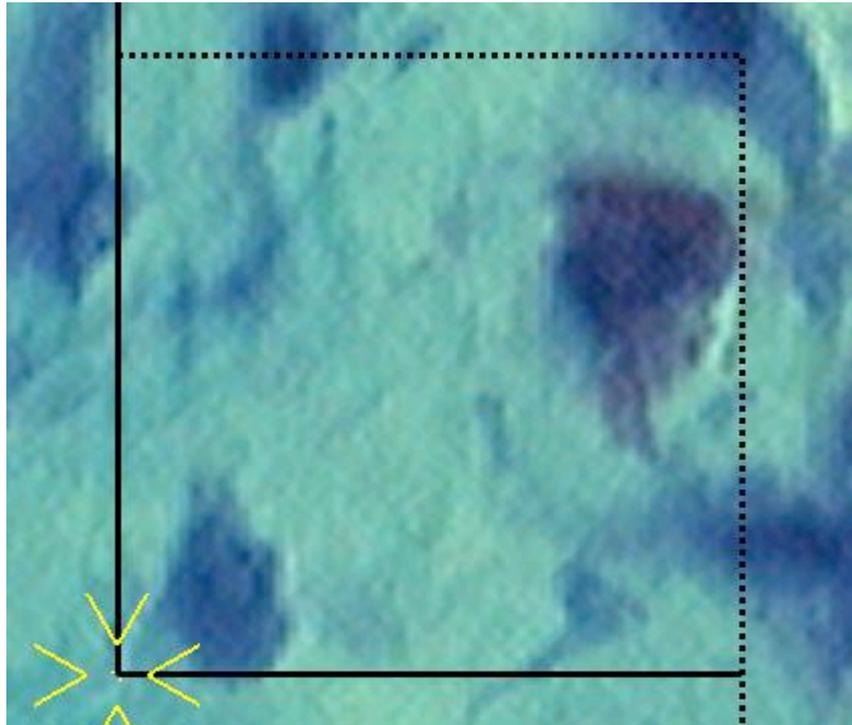


Figura 1: Mastócito com sua propriedade metacromática (célula com grânulos corados em roxo) dentro da área permitida. Compare com a célula no canto inferior esquerdo que está totalmente azul.

Após o término da contagem, os valores obtidos para cada animal foram aplicados à fórmula a seguir:

$$Total\ de\ \frac{MC}{mm^2} = \frac{MC\ animal}{\text{área} * N\ de\ frames}$$

Sendo que:

MC/mm²: o número de mastócitos por milímetro quadrado;

MC animal: a soma do número de mastócitos do animal;

Área: área do grid, isto é, da região válida para a contagem;

N de frames: número de lâminas do animal x o número de frames por lâmina (valor constante: 20).

Para a diferenciação dos mastócitos degranulados dos não-degranulados, usou-se a técnica descrita por Laufer et al. (2000). Foram considerados degranulados quando os mastócitos apresentavam grânulos salientes a partir da membrana celular, grânulos liberados em vesículas alterando a continuidade da membrana celular, membrana celular rompida com grânulos livres na proximidade ou metacromasia desigual, quando a célula perdia a coloração azul-violeta para assumir uma coloração mais clara (tons de rosa).

Os dados obtidos foram comparados pela análise de variância (ANOVA), seguido da avaliação das diferenças entre as médias dos grupos através do teste Tukey (GraphPad Prism 6 Software Inc, USA). Diferenças entre os resultados foram considerados relevantes quando o $p < 0,05$.

7. Resultados e Discussão

7.1 Contagem dos mastócitos

A média de mastócitos por milímetro quadrado encontrados nos animais do grupo de camundongos que receberam o veneno da *Bothrops atrox* (grupo *B. atrox*) foi de $22,55 \pm 4,33$ MC/mm². Nos animais que receberam o veneno e o tratamento com o extrato aquoso da *Bellucia dichotoma* (grupo EABd), a média foi $45,00 \pm 4,41$ MC/mm², demonstrando diferença para o grupo que recebeu apenas o veneno ($22,45$, IC a 95% - $39,42$ a $5,47$, $p < 0,05$). No grupo cujo tratamento foi o soro antitoxico (grupo BA), a média foi de $18,92 \pm 5,62$ MC/mm² e no que recebeu ambos os tratamentos (grupo EABd+BA) apresentou uma média de $25,24 \pm 7,65$ MC/mm². Tanto a comparação entre os grupos EABd e EABd+BA quanto entre EABd e BA apresentam diferença significativa: $19,75$ (IC a 95%: $4,848$ a $34,66$) e $26,08$ (IC a 95%: $9,104$ a $43,05$), respectivamente. No grupo controle, que recebeu apenas salina, a média foi $30,31 \pm 13,77$ MC/mm² (fig.2).

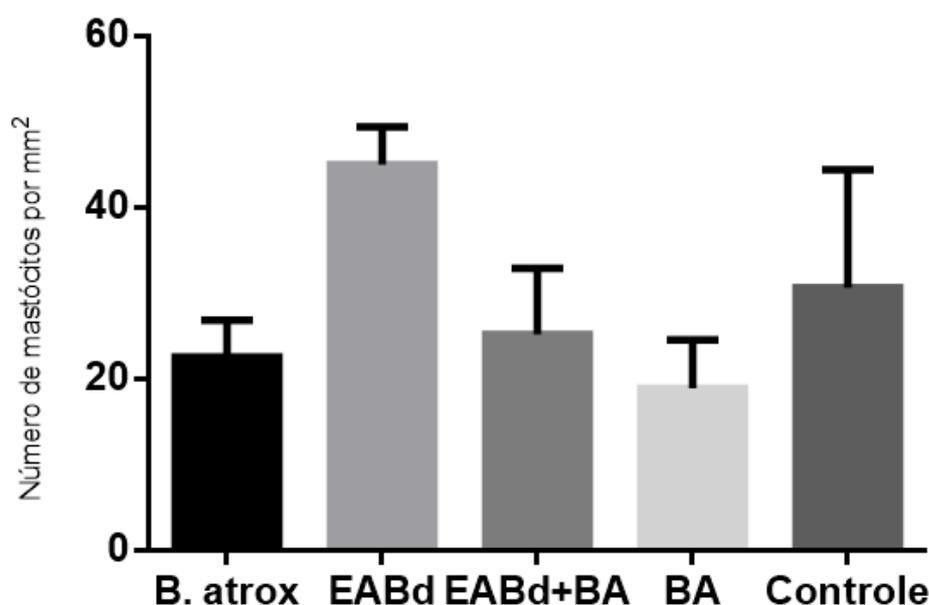


Figura 2: Média de mastócitos por mm². Houve diferenças significativas entre os grupos *B.atrox* e EABd, entre EABd e EABd+BA e entre EABd e BA ($p < 0,05$).

7.2 Porcentagem de mastócitos degranulados

Após a contagem dos mastócitos, foi feita a contagem dos mastócitos ativados. A média do grupo *B.atrox* foi de $17,04 \pm 3,74$ MC/mm²; do grupo EABd, $37,03 \pm 2,68$ MC/mm²; do grupo EABd+BA, $18,18 \pm 6,25$ MC/mm²; do grupo BA, $15,13 \pm 0,49$ MC/mm² e do grupo controle, $23,61 \pm 7,08$ MC/mm². Foram observadas diferenças significativas ao comparar a média do grupo EABd com a média do grupo *B.atrox* (-19,99, IC: -31,26 a -8,723, $p < 0,05$), grupo EABd com o EABd+BA (18,84, IC: 8,94 a 28,74, $p < 0,05$), grupo EABd com o BA (21,90, IC: 10,63 a 33,17, $p < 0,05$) e grupo EABd com o controle (13,42, IC: 0,064 a 26,20, $p < 0,05$) (fig.3).

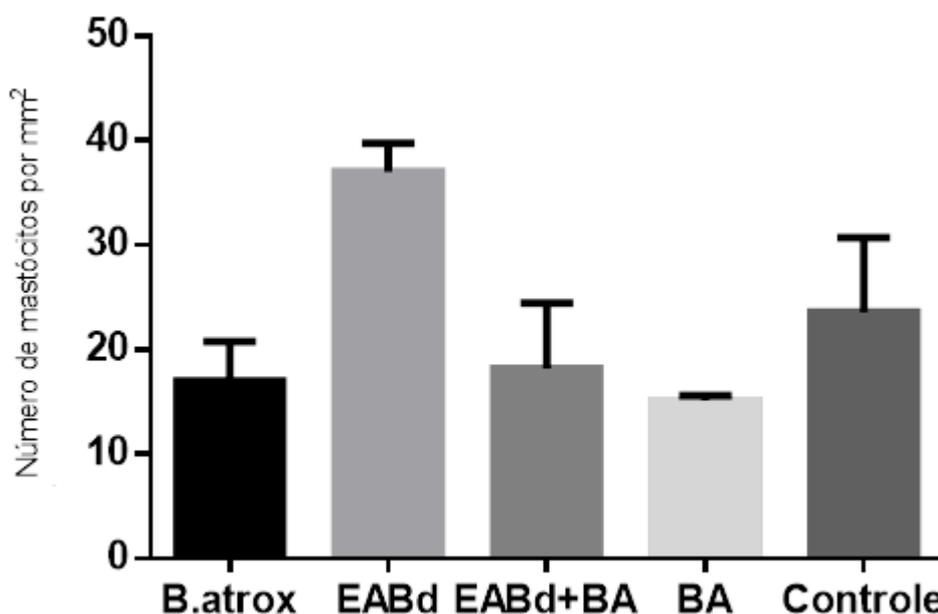


Figura 3: Média de mastócitos degranulados por mm². Houve diferenças significativas entre os grupos B.atrox e EABd; EABd e EABd+BA; EABd e BA; e EABd e Controle ($p < 0,05$).

Na comparação entre a contagem dos mastócitos totais e os mastócitos ativados, não houve diferença significativa nos grupos. No entanto, na análise histológica observou-se que os mastócitos degranulados no grupo controle e no grupo *B.atrox* estavam mais metacromáticos e seus grânulos mais visíveis do que os mastócitos degranulados nos outros grupos.

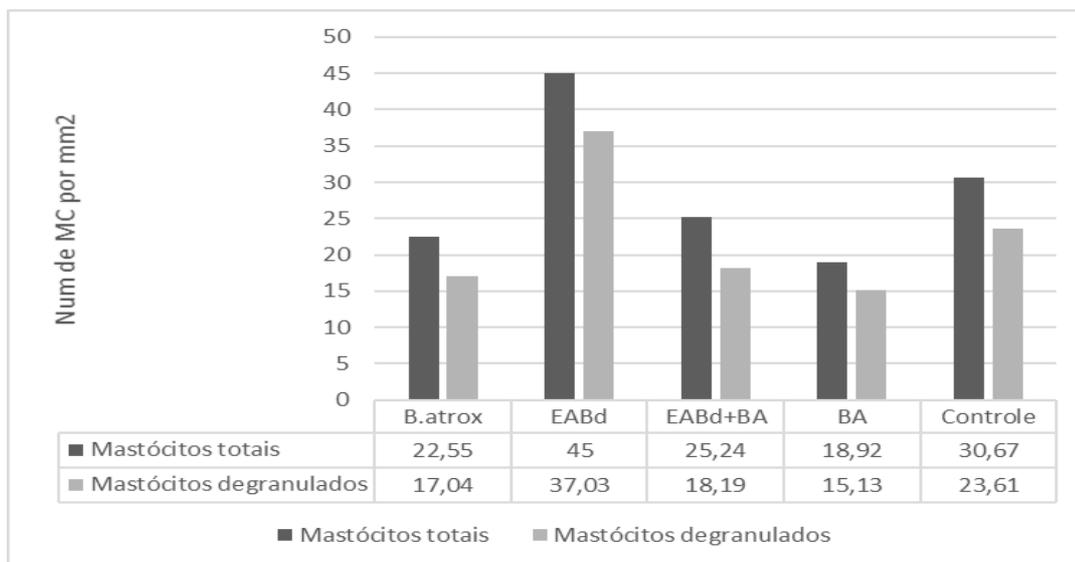


Figura 4: Comparação entre os mastócitos totais e de granulados por cada grupo.

7.3 Resultados complementares oriundos do projeto principal

O presente trabalho faz parte da linha de pesquisa envolvendo o efeito terapêutico da *Bellucia dichotoma* no tratamento profilático e pós-envenenamento por *Bothrops atrox*, desenvolvida pela doutoranda Valéria Mourão de Moura. Em Moura et al (2014), foi observado que o uso do extrato aquoso de *B. dichotoma*, tanto como tratamento isolado quanto como usado conjuntamente com o soro antiofídico, reduziu a formação do edema em todos os períodos de tempo (30, 60, 120, 240 e 360 minutos) quando comparado com o tratamento padrão, o soro isolado (fig.5).

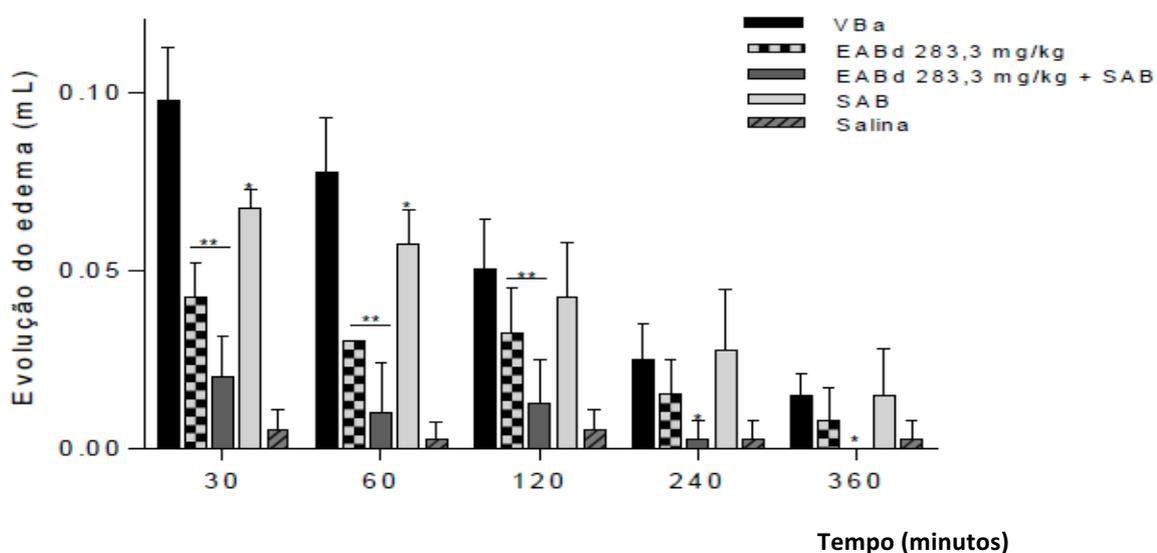


Figura 5: Cinética da Formação do Edema nos animais desafiados com o veneno de *Bothrops atrox* e mantidos sem tratamento (VBa), tratados com o extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* (EABd) ou com o EABd e soro antibotrópico (SAB) ou apenas com o SAB e os controles (Salina).



7.4 Discussão

O envenenamento pelo gênero *Bothrops sp.* está relacionado a intensas alterações locais, como edema, hiperalgesia, infiltração leucocitária, mionecrose, dermonecrose e hemorragias e a efeitos sistêmicos - distúrbios da hemostasia, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e alterações hemodinâmicas (MOREIRA et al., 2012). Essa diversidade de efeitos é devido a composição complexa do veneno, o que inclui proteínas, carboidratos, lipídios e compostos orgânicos. Os compostos proteicos conhecidos são as L-aminoácido oxidases, fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteinases, serinoproteinases, lectinas e hialuronidases. A lesão tissular está mais associada as metaloproteinases, as PLA₂ e as serinoproteinases (ZYCHAR et al., 2010). As metaloproteinases são enzimas zinco-dependentes e são os principais responsáveis pelos efeitos hemorrágicos. Essas lesam a membrana basal do endotélio, causando lesão tissular, inflamação e extravasamento de plasma (FOX; SERRANO, 2005). Os efeitos mionecróticos podem ser induzidos de forma direta, pelas enzimas miotóxicas com estrutura das PLA₂ ou de forma indireta, por distúrbios vasculares (MEBS; OWNBY, 1990). As serinoproteinases estão correlacionadas à atividade trombofílica observada nos envenenamentos (MATSUI et al., 2000)

O presente estudo mostrou que o grupo que não receberam tratamento e aquele que recebeu soro antibotrópico isoladamente apresentaram os menores valores de mastócitos por mm². Os baixos valores encontrados nos animais desafiados com o veneno estão contraditórios aos outros estudos envolvendo veneno de *Bothrops atrox* (DE SOUZA et al, 2012; DE TONI et al, 2015). Essa discrepância pode ser explicada pelo tempo entre o envenenamento e o sacrifício das cobaias. Na maioria dos estudos realizados, o tempo entre os dois eventos é de 1 hora, enquanto no nosso estudo, o tempo é de 24 horas. Com maior tempo, os mastócitos degranular-se-iam por completo, os grânulos tornar-se-iam fracamente metacromáticos, impedindo a contagem dessas células. Esse mesmo tempo não seria suficiente para a renovação dos grânulos nas células ativadas; após a depleção, podem-se passar semanas até que célula recupere a quantidade inicial de substâncias ativas (ALBRECHT; STEPHENSON, 1988).

Os animais que receberam apenas o extrato aquoso de *Bellucia dichotoma* como tratamento apresentam maiores valores de mastócitos ativados por mm² quando



UFAM

comparados aos outros grupos. De Toni et al. (2015), ao induzir a degranulação massiva dos mastócitos com o composto 48/80 nos animais antes de desafiá-los com o veneno de *Bothrops atrox*, mostrou uma redução expressiva do edema e da hiperalgesia. Resultados similares foram encontrados nos venenos de *Bothrops moojeni* (NASCIMENTO et al., 2012), indicando um importante papel da ativação dos mastócitos na formação do edema. Dessa forma, esperar-se-ia que o grupo com maiores níveis de mastócitos ativados também apresentasse os maiores níveis de edema, o que não aconteceu. Moura et al. (2014) demonstrou que o tratamento com o extrato de *B. dichotoma* reduzia significativamente o edema pós envenenamento, tanto quando administrado isoladamente quanto administrado conjuntamente com o soro antibotrópico. Com esses resultados, não há evidências de que a ação antiedematogênica da planta seja devido a inibição da liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos ativados.

O edema pós-envenenamento é multifatorial e é dependente de vários mecanismos cujo objetivo final é produzir vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular: além da liberação de histamina e serotonina pelos mastócitos ativados, há síntese de bradicinina e liberação de óxido nítrico, migração e ativação de neutrófilos com posterior produção de superóxidos, citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (ESCOCARD et al., 2006); além da síntese de prostaglandinas e leucotrienos pela ativação da cascata de ácido araquidônico nas membranas dos leucócitos (ZYCHAR et al., 2010; DE SOUZA et al., 2012). As metaloproteinases e as PLA₂ contribuem direta e indiretamente -pelo processo inflamatório induzido- para a formação do edema (WALDERLEY et al., 2014). A primeira estimula produção de eicosanoides e ativa o Sistema Complemento, induzindo a migração celular enquanto a segunda estimula a degranulação dos mastócitos. Dessa forma, o extrato de *Bellucia dichotoma* pode reduzir o edema inibindo direta ou indiretamente qualquer um dos mecanismos descritos acima. Novos estudos serão necessários para investigar a ação da planta no processo inflamatório.

Outra função está sendo designada aos mastócitos no envenenamento por serpentes. Metz et al (2006) mostrou que os mastócitos, ao entrarem em contato com certas proteínas dos venenos de abelha (*Apis melífera*) e de algumas serpentes, liberavam carboxipeptidase A e outras quimases que degradavam algumas proteases do veneno (especialmente a sarafotoxina 6b, relacionada com cardiotoxicidade). A liberação dessas substâncias estava associada ao aumento da sobrevivência das cobaias. Ainda não há estudos relacionando a liberação de carboxipeptidase A em resposta ao veneno de



UFAM

espécies do gênero *Bothrops* ou a eficácia dessa protease em inativar as substâncias biologicamente ativas do veneno. No entanto, esse conhecimento permite postular outra hipótese envolvendo o extrato de *Bellucia dichotoma* e a ativação dos mastócitos: o princípio ativo da planta iria estimular a ativação dos mastócitos e modular a liberação dos grânulos, isto é, ao invés de estimular a liberação de histamina e serotonina, induzindo dor e edema, a planta iria induzir a liberação de quimases cuja função primordial seria de inativar as principais enzimas botrópicas relacionadas a sintomatologia local: metaloproteinases, fosfolipases A₂ e as serinoproteases. Sabe-se que os mastócitos respondem de forma diferenciada a cada estímulo: quando a célula é ativada por padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), a célula libera maiores quantidades de citocinas e quimiocinas e poucas aminas biológicas. Já a ativação via o receptor FcεRI estimula a liberação predominante de aminas biológicas (GALLI et al, 2005; ABRAHAM; JOHN, 2010; JENSEN et al, 2014). Dessa forma, não é improvável que o extrato da planta estimule a liberação de quimases enquanto a fosfolipase A₂ do veneno estimule a liberação de mediadores inflamatórios.

8. Referências

- ABRAHAM, S. N.; JOHN, A. L. S. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nature Reviews Immunology*, v. 10, n. 6, p. 440-452, 2010
- ALBRECHT, W.N.; STEPHENSON, R. L. Health hazards of tertiary amine catalysts. *Scandinavian journal of work, environment & health*, p. 209-219, 1988.
- DAHLIN, J. S.; HALLGREN, J.. Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues. *Molecular immunology*, v. 63, n. 1, p. 9-17, 2015.
- DE SOUZA, Carlos AT et al. Local and systemic biochemical alterations induced by *Bothrops atrox* snake venom in mice. *Journal of venom research*, v. 3, p. 28, 2012.
- DE TONI, L.G. B et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by batroxase, a metalloproteinase isolated from *bothrops atrox* snake venom. *International immunopharmacology*, v. 28, n. 1, p. 199-207, 2015.
- DOS-SANTOS, M. C. Serpentes Peçonhentas e Ofidismo no Amazonas. In: João Luiz Costa Cardoso, Francisco Oscar de Siqueira França, Fan Hui Wen, Ceila Maria Sant'Ana Málaque & Vidal Haddad Jr. (Org.). *Animais Peçonhentos no Brasil*. 2ed. São Paulo: Sarvier, 2009.
- ESCOCARD, R. D. C. M. et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiology*, v. 211, n. 1, p. 37-46, 2006.



UFAM

FEITOSA, E. et al. Older Age and Time to Medical Assistance Are Associated with Severity and Mortality of Snakebites in the Brazilian Amazon: A Case-Control Study. *Plos One*, v. 10, p. e0132237, 2015.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.

GALLI, S. J. et al. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 23, p. 749-786, 2005.

GALLI, S. J. et al. Mast cells and IgE in defense against venoms: Possible “good side” of allergy?. *Allergy international*, v. 65, n. 1, p. 3-15, 2016.

JENSEN, B. M. et al. Molecular and stimulus-response profiles illustrate heterogeneity between peripheral and cord blood-derived human mast cells. *Journal of leukocyte biology*, v. 95, n. 6, p. 893-901, 2014.

LAUFER, S. R. Head Trauma Release of Histamine from Dural Mast Cells Alters Blood-Brain Barrier: Attenuation with Zolantidine. 2000. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia) – University of North Texas, 2000.

LOMONTE, Bruno et al. Neutralization of Bothrops asper venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. *Toxicon*, v. 54, n. 7, p. 1012-1028, 2009.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Mast cells: emerging sentinel innate immune cells with diverse role in immunity. *Molecular immunology*, v. 48, n. 1, p. 14-25, 2010.

MATSUI, T., FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1477, n. 1, p. 146-156, 2000.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmacology & therapeutics*, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

METZ, M. et al. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*, v. 313, n. 5786, p. 526-530, 2006.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by Bothrops atrox snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon*, v. 60, n. 1, p. 12-20, 2012.

MOURA, V. M. et al. A comparison of the ability of Bellucia dichotoma Cogn. (Melastomataceae) extract to inhibit the local effects of Bothrops atrox venom when pre-incubated and when used according to traditional methods. *Toxicon (Oxford)*, v. 85, p. 59-68, 2014.

NASCIMENTO, N. G. et al. Contribution of mast cells to the oedema induced by Bothrops moojeni snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*, v. 55, n. 2, p. 343-352, 2010.

