

Sérgio José Macedo Júnior

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NOCICEÇÃO INDUZIDA PELO
VENENO DA *BOTHROPS JARARACA* EM CAMUNDONGOS:
EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE POTENCIAL
TRANSITÓRIO TIPO ANQUIRINA 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Macedo Júnior, Sérgio José
MECANISMOS ENVOLVIDOS NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA
PELO VENENO DA BOTHROPS JARARACA EM CAMUNDONGOS:
EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE
POTENCIAL TRANSITÓRIO TIPO ANQUIRINA 1 / Sérgio José
Macedo Júnior ; orientador, Juliano Ferreira, 2018.
124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

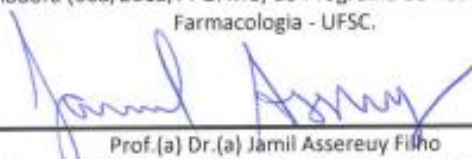
1. Farmacologia. 2. veneno da Bothrops jararaca.
3. TRPA1. 4. nocicepção. 5. dor. I. Ferreira,
Juliano. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

"Mecanismos envolvidos na nocicepção induzida pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos: evidências da participação dos receptores de potencial transitório tipo anquirina 1"

Por

Sérgio José Macedo Júnior

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (008/2018/PPGFMC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof. (a) Dr. (a) Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr. (a) Juliano Ferreira (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr. (a) Carlos Delfin Chávez Olórtegui (Universidade Federal de Minas Gerais)



Dr. (a) Fernando Spiller (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Alfeu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 15 de junho de 2018.

Agradecimentos

À Deus, por me proporcionar as vivências, o aprendizado e os amigos que tive durante esse período valioso de minha vida.

Aos meus pais Sérgio e Rita, por todo amor e dedicação. Obrigado pelo incentivo, apoio e por tudo que fizeram para que hoje eu pudesse estar vivendo este momento. Meu eterno obrigado.

À minha irmã Ana Luiza (*In memoriam*). Obrigado por guiar os meus passos, iluminar o meu caminho e continuar me ensinando que devemos valorizar cada momento e cada conquista no nosso dia.

Ao meu orientador Professor Juliano. Obrigado por ter me acolhido nesses últimos quatro anos e por ter compartilhado comigo o seu conhecimento e principalmente a sua paixão pela ciência.

Aos meus amigos do laboratório, Bauru, Débora, Marcella, Kharol, Camila e Muryel, obrigado pela ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas, pelo café, pela conversa agradável e principalmente pela amizade. Aprendi muito com cada um de vocês e agradeço por terem passado em minha vida neste momento.

Aos amigos que fizeram parte do lab Ferreira, Raquel (eterna chefe), Gerusa, Ney, Suélen e Mallone obrigado por compartilharem comigo seus conhecimentos, pela ajuda nos experimentos e pela amizade. Foi um prazer ter a companhia de vocês durante os últimos anos.

Ao Professor Pierangelo Geppetti e a Professora Romina Nassini, que me acolheram em seu laboratório na Università degli Studi Firenze para realização do meu doutorado *Sandwich*. Meu muito obrigado pelas orientações e por todo auxílio para realização dos experimentos.

Ao meu amigo Simone Li Puma, da Università degli Studi Firenze, obrigado pela amizade e por toda a disposição em me ensinar e me auxiliar nos experimentos em Florença. *Grazie mille amico.*

Ao Professor Adair Roberto Soares dos Santos, do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSC, pelas discussões científicas e por disponibilizar o veneno da *Bothrops jararaca* utilizado nos experimentos que compõem este trabalho.

Aos Professores Fernando Spiller e André Báfica do Departamento de Farmacologia e do Departamento de Imunologia da UFSC, pela disponibilização dos animais com deleção gênica da caspase 1/11 e receptores do tipo *toll 2* e *toll 4*.

Ao Professor Carlos Delfin Chavez Olortégui da UFMG, obrigado por nos auxiliar na obtenção das frações isoladas do veneno da *Bothrops jararaca* e por ter aceito o convite para participação da banca examinadora deste trabalho.

Ao Professor Alfeu Zanotto Filho, por todas as contribuições científicas dadas à esse trabalho ao longo dos últimos anos.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia, obrigado pela amizade e pelas boas conversas.

Aos demais Professores do Departamento de Farmacologia, obrigado por compartilharem seus conhecimentos comigo e por terem contribuído para minha formação profissional.

A Dna. Andrea e ao Sr. Sérgio, sempre simpáticos e dispostos para um bom papo nos corredores da Farmacologia.

À UFSC, minha segunda casa nos últimos 12 anos. Obrigado por me acolher e me ensinar algo novo todos os dias.

Ao Departamento de Farmacologia, pelo apoio técnico e por proporcionar todas as condições para que este trabalho fosse realizado.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro essencial para realização deste trabalho.

RESUMO

Os acidentes ofídicos causados por serpentes compreendem uma doença tropical negligenciada, acometendo pelo menos 1,8 a 2,7 milhões de pessoas em todo o mundo anualmente, especialmente em populações empobrecidas que vivem em países em desenvolvimento. Os sintomas locais estão presentes na maioria desses acidentes, dentre os quais destacam-se a dor e o edema. Os venenos de serpentes contêm vários componentes com a capacidade de evocar, exacerbar e sustentar a sensação de dor e o edema, incluindo ativadores do inflamassoma, dos receptores tipo-*toll* (TLRs) e dos receptores de potencial transitório (TRPs). Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na dor e no edema causados pelo veneno da *Bothrops jararaca* (BjV), a principal responsável pelos acidentes ofídicos no Brasil, são poucos conhecidos. No presente estudo, o objetivo foi investigar o envolvimento dos TRPs na nocicepção e edema induzidos pelo BjV. Primeiramente, foram caracterizadas a nocicepção e o edema induzidos pela injeção subcutânea do BjV em camundongos. Verificou-se que o BjV induziu uma significativa nocicepção aguda, apresentando pico de resposta entre 5-10 min após a injeção. O BjV também induziu hiperalgesia mecânica, comportamento afetivo-motivacional (AMB), alodínia ao frio e edema, observados a partir de 1 h, com pico em 3 h e duração de até 6 h após a administração. A ação nociceptiva e edematogênica do BjV foi similar em camundongos machos e fêmeas. Em seguida, foram utilizadas estratégias farmacológicas e genéticas (deleção gênica) para investigar o envolvimento dos TRPs na nocicepção e edema induzidos pelo BjV. A desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1 positivas (TRPV1 +), realizada pelo pré-tratamento com resiniferatoxina duas vezes ao dia, preveniu o desenvolvimento de todos os parâmetros nociceptivos avaliados, sem alterar o edema. Por outro lado, o uso de um antagonista (SB366791) ou a deleção gênica do TRPV1 não alteraram a nocicepção ou o edema induzidos pelo BjV. Notavelmente, a nocicepção aguda induzida pelo BjV, a hiperalgesia mecânica, o AMB e a alodínia a frio foram prevenidas pelo antagonismo do TRPA1 ou pela sua deleção gênica. Também,

ensaios *in vitro* foram usados para verificar o efeito do BjV no influxo de cálcio em cultura primária de neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD) ou células HEK293 expressando canais TRPV1 ou TRPA1. Nesse sentido, o BjV induziu o influxo de cálcio em células HEK293 transfectadas com o TRPA1, mas não com canais TRPV1. Além disso, o BjV promoveu influxo de cálcio em neurônios GRD de ratos, sendo significativamente prevenido por um antagonista TRPA1 (alil isotiocianato), mas não prevenido por um antagonista TRPV1 (capsazepina). Da mesma forma, o BjV induziu influxo de cálcio em neurônios GRD de camundongos tipo-selvagem, mas não de camundongos com deleção gênica para os canais TRPA1. Além disso, a nocicepção e o edema induzidos pelo BjV foram prevenidos por um inibidor de metaloprotease (1,10-Fenantrolina) ou por um inibidor da fosfolipase A₂ (PLA₂) (brometo de *p*-bromofenacila, com exceção da nocicepção aguda) e também pela fervura do BjV. A injeção subcutânea da fração P1 ou da fração P2, obtidas do BjV por separação cromatográfica, induziram hiperalgesia mecânica, AMB, alodínia ao frio e edema. Por outro lado, a nocicepção aguda foi induzida apenas pela fração P2. As outras frações obtidas do BjV (P3, P4 e P5) não foram capazes de promover o desenvolvimento de nocicepção e edema. Foi demonstrado que a atividade da metaloproteases do BjV está concentrada na fração P1, enquanto que a atividade enzimática de PLA₂ está concentrada na fração P2. Assim, nossos resultados sugerem que a nocicepção induzida pelo BjV, mas não o edema, é mediada por uma ativação direta do canal TRPA1 em fibras TRPV1 +, e que esse efeito pode ser mediado pelas metaloproteases ou pelas PLA₂, ou ainda, por ambas as enzimas presentes no veneno.

Palavras-chave: veneno da *Bothrops jararaca*, TRPA1, nocicepção, dor, metaloprotease, fosfolipase A₂.

ABSTRACT

Snakebite envenoming is a neglected tropical disease occurring in at least 1.8 – 2.7 million people worldwide per year, especially in impoverished populations living in the rural tropics. Local symptoms are present in most snakebite envenoming, of which pain and edema stands out. Snake venoms contain various factors with the ability to evoke, enhance and sustain pain sensation and edema, including activators of the inflammasome, toll-like receptors (TLRs) and transient receptor potential channels (TRPs). However, the molecular mechanisms involved in pain and edema caused by the venom of *Bothrops jararaca* (BjV), the main cause of snakebites in Brazil, are almost unknown. Here, we aimed to investigate the involvement of TRPs on *Bothrops jararaca* venom (BjV)-induced nociception and edema. Firstly, nociception and edema induced by subcutaneous injection of BjV in mice were characterized. It was found that BjV significantly caused acute nociception (licking time), presenting peak response between 5-10 min after injection. Also BjV induced mechanical hyperalgesia, affective-motivational behavior (AMB), cold allodynia and edema starting at 1 h, peaking at 3 h and lasting up to 6 h after administration. Of note, nociceptive and edematogenic action of BjV were similar in both male and female mice. After that, pharmacological and genetic approaches (gene deletion) were used to investigate the involvement of TRPs on BjV-induced nociception and edema. The defunctionalization of TRPV1-positive (TRPV1+) sensory fibers produced by resiniferatoxin pre-treatment twice daily prevented the development of all nociceptive parameters evaluated, without altering edema. On the other hand, the antagonism (SB366791) or gene deletion of TRPV1 did not alter BjV-induced nociception or edema. Notably, BjV-induced acute nociception, mechanical hyperalgesia, AMB and cold allodynia were largely prevented by TRPA1 antagonism or gene deletion. Also, *in vitro* assays were used to verify the action of BjV on calcium transients of cultured dorsal root ganglia (DRG) neurons or HEK293 cells expressing TRPV1 or TRPA1 channels. In these sense, BjV induced calcium influx in HEK293 cells transfected with TRPA1, but not with TRPV1 channels. Moreover, BjV caused calcium

influx in rat DRG neurons, which was significantly prevented by a TRPA1 antagonist (allyl isothiocyanate), but not prevented by a TRPV1 antagonist (capsazepine). Similarly, BjV induced calcium influx in DRG neurons of wild-type mice, but not of TRPA1 knockout mice. Moreover, BjV induced nociception and edema were prevented by a metalloprotease inhibitor (1,10-Phenanthroline) or by a phospholipase A₂ (PLA₂) inhibitor (*p*-bromophenacyl bromide, with exception of acute nociception) and also by BjV bolus. In addition, subcutaneous injection of Fraction P1 or Fraction P2, obtained from BjV by chromatographic separation, induced mechanical hyperalgesia, AMB, cold allodynia and edema. On the other hand, acute nociception was only induced by the P2 fraction. The other fractions obtained from BjV (P3, P4 and P5) were not able to promote development of nociception and edema. Interestingly, it was demonstrated that BjV metalloprotease activity is concentrated in Fraction P1, whereas, PLA₂ enzymatic activity is concentrated in Fraction P2. Our present results suggest that BjV-induced nociception, but not edema, is mediated by a direct TRPA1 channel activation in TRPV1+fibers, and that this effect could be mediated by metalloproteases or PLA₂ or by both enzymes present in the venom.

Keywords: *Bothrops jararaca* venom, TRPA1, nociception, pain, metalloprotease, phospholipase A₂

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de tempo para nocicepção e edema induzidos pela injeção subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (1 µg/pata) em camundongos.

Figura 2. Curva dose-resposta para nocicepção e edema induzidos pela injeção subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (0,05 - 20 µg/pata) em camundongos.

Figura 3. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos pretratados com resiniferatoxina (RTX).

Figura 4. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica dos receptores de potencial transitório do tipo vanilóide 1.

Figura 5. Efeito de um antagonista seletivo dos receptores de potencial transitório do tipo vanilóide 1 na nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops Jararaca*.

Figura 6. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica dos receptores de potencial transitório do tipo anquirina 1.

Figura 7. Efeito de um antagonista dos receptores de potencial transitório do tipo anquirina 1 na nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops Jararaca*.

Figura 8. Influxo de Ca^{2+} em cultura de células HEK293 transfectadas com o canal TRPA1 ou TRPV1.

Figura 9. Influxo de Ca^{2+} em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos e de camundongos.

Figura 10. Separação cromatográfica e avaliação da atividade enzimática das frações do veneno bruto da *Bothrops jararaca*.

Figura 11. Caracterização da nocicepção e do edema induzidos pela injeção subcutânea das frações obtidas do veneno da *Bothrops jararaca*.

Figura 12. Representação esquemática resumindo os principais achados obtidos no presente estudo.

Figura Suplementar 1. Caracterização da nocicepção e edema induzidos pela injeção intraplantar do veneno da *Bothrops jararaca* (1 µg/pata) em camundongos machos e fêmeas.

Figura Suplementar 2. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica de caspase 1/11.

Figura suplementar 3. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica de receptores *toll-like 2* ou receptores *toll-like 4*.

Figura Suplementar 4. Teste de limpeza do olho frente a estimulação corneal com agonistas dos canais TRPA1 ou TRPV1 em camundongos pretratados com resiniferatoxina.

Figura Suplementar 5. Parâmetros cinéticos dos ensaios *in vitro* para determinação da atividade enzimática de componentes específicos do veneno da *Bothrops jararaca*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais sintomas locais e sistêmicos decorrentes dos acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Bothrops*.

Tabela 2. Classificação da gravidade dos acidentes causados pela *Bothrops jararaca*.

Tabela 3. Avaliação *in vitro* da atividade enzimática de metaloprotease, serinoprotease, fosfolipase A₂ e L-aminoácido presentes no BjV.

Tabela 4. Envolvimento de componentes termosensíveis e componentes de baixo peso molecular na nocicepção e edema induzidos pelo BjV.

Tabela 5. Efeito promovido por inibidores de metaloprotease, fosfolipase A₂ e serinoprotease presentes no BjV na nocicepção e edema induzidos pelo veneno.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AEBSF - Fluoreto de 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil
AIM-2 – do inglês *absent in melanoma 2 protein*
AITC - alil isotiocianato
ANOVA - análise de variância
ARA-C - citosina-b-D-arabinofuranosídeo
ASC - do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*
ATP- adenosina trifosfato
BAPNA - N α -Benzoil-DL-Arginina *p*-Nitroanilida
BjV – Veneno da *Bothrops jararaca*
CaCl₂ – cloreto de cálcio
CAM - comportamento afetivo-motivacional
cDNA – DNA complementar
CE₅₀ – Concentração efetiva 50%
CEUA - Comitê de Ética para Uso de Animais
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CPS – capsaicina
CPZ – capsazepina
DAMPS - padrões moleculares associados ao perigo
DE₅₀ – Dose efetiva 50%
DMEM - do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucléico
E.P.M. – erro padrão da média
E_{max} – Efeito máximo
FPLC - do inglês, *Fast Performance Liquid Chromatography*
GRD –gânglio da raiz dorsal
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HBSS - do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*
HEK293 – do inglês, *human endotelial cells 293*

HEPES – ácido 2-[4-(2-hydroxietyl)piperazin-1-il]etanesulfônico
hPAR2-AP - do inglês *Human Proteinase Receptor 2 Activator Peptide*
i.p. – intraperitoneal
IC95% - Intervalo de confiança 95%
IL-18 - interleucina 18
IL-1Ra – Antagonista do receptor de IL-1
IL-1 β - interleucina 1 beta
IRFs - fatores reguladores de interferon
KCl – cloreto de potássio
Km – constante de Michaeli-Menten
LAO - L-aminoácido oxidase
LPS – lipopolissacêrdeos
MgSO₄ – sulfato de magnésio
MyD88 – do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*
NaCl – cloreto de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
NF- κ B - fator nuclear kappa B
NGF - fator de crescimento do nervo
NLR - do inglês, *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*.
NLRC4 – do inglês, *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing family, CARD domain-containing protein 4*
NLRP3 - do inglês, *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing family, pyrin domain containing 3*.
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMPS - padrões moleculares associados à patógenos
pBPB - Brometo de p-bromofenacil
PBS - do inglês, *Phosphate Buffer Saline*
PLA₂ – fosfolipase A₂
RTX – resiniferatoxina
s.c. – subcutânea

SAB - soro albumina bovina

SFB - soro fetal bovino

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMP - metaloproteases do veneno de serpentes

SVPLA₂ - fosfolipase A₂ do veneno de serpentes

SVSP - serinoproteases do veneno de serpentes

TLR - receptores do tipo *toll*

TLR2 – receptor do tipo *toll* subtipo 2

TLR4 – receptor do tipo *toll* subtipo 4

TMB – tetrametilbenzidina

TRIS-HCl - hidrocloreto de *tris*(hidroximetil)aminometano

TRKa – do inglês, *tropomyosin receptor kinase A*

TRPA1 - receptores de potencial transitório anquirina subtipo 1

TRPs - receptores de potencial transitório

TRPV1 - receptores de potencial transitório vanilóide subtipo 1

TRPV4 - receptores de potencial transitório vanilóide subtipo 4

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

VAMPs – do inglês, *Venom-associated molecular patterns*

V_{max} – velocidade máxima

ΔDO – variação da densidade óptica

SUMÁRIO

1. Introdução.....	23
1.1. Histórico e epidemiologia dos acidentes causados por serpentes peçonhentas	23
1.2. Sintomas clínicos decorrentes do envenenamento causado pela <i>Bothrops jararaca</i>	26
1.3. Componentes do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> responsáveis pelos sintomas locais decorrentes do envenenamento	28
1.4. Tratamento utilizado nos casos de envenenamento pela <i>Bothrops jararaca</i>	31
1.5. Inflamassoma e receptores do tipo <i>toll</i> como possíveis mediadores dos sintomas locais induzidos por venenos	33
1.6. Receptores de potencial transitório (TRPV1 e TRPA1) como possíveis mediadores dos sintomas locais induzidos por venenos	35
1.7. Os canais TRPV1 e TRPA1 como alvo para ação de venenos e toxinas isoladas de venenos animais	39
2. Objetivos.....	42
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
3. Material e Métodos.....	43
3.1. Animais	43
3.2. Fármacos e Reagentes.....	44
3.3. Procedimentos Experimentais	46
3.4. Caracterização da nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> (BjV).....	47

3.4.1. Nociceção e edema induzidos pelo veneno da <i>Bothrops jararaca</i> (BjV)	47
3.4.2. Testes Comportamentais.....	47
3.5. Investigação do envolvimento do inflamassoma e dos receptores do tipo <i>toll</i> (TLR2 e TLR4) na nociceção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> (BjV).....	49
3.6. Investigação do envolvimento dos canais TRPV1 e TRPA1 na nociceção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> (BjV)	50
3.6.1. Desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas	50
3.6.2. Teste de estimulação corneal	51
3.6.3. Efeito da deleção gênica ou do antagonismo dos canais TRPV1 ou TRPA1 na nociceção e edema induzidos pelo BjV..	52
3.6.4. Cultura de células HEK293 e isolamento de neurônios sensoriais primários.....	52
3.6.5. Ensaios de imageamento de influxo de cálcio.....	54
3.7. Investigação dos componentes do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> envolvidos com o seu efeito nociceptivo e desenvolvimento de edema	55
3.7.1. Fervura, congelamento e diálise do veneno da <i>Bothrops jararaca</i>	55
3.7.2. Contribuição de componentes enzimáticos do BjV para o desenvolvimento de sua nociceção e edema.....	56
3.7.3. Determinação das atividades enzimáticas do veneno da <i>Bothrops jararaca</i>	56
3.7.4. Determinação da concentração de proteínas	58

3.7.5. Separação cromatográfica do veneno bruto da <i>Bothrops jararaca</i>	58
3.7.6. Nocicepção e edema induzidos pelas frações isoladas do veneno bruto da <i>Bothrops jararaca</i>	59
3.8. Análise Estatística	59
4. Resultados.....	60
4.1. Caracterização da nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> (BjV) 60	
4.2. Contribuição da caspase 1/11 e dos receptores do tipo <i>toll</i> na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> (BjV)	65
4.3. Investigação do envolvimento dos canais TRPV1 e TRPA1 na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> (BjV)	67
4.4. O veneno da <i>Bothrops jararaca</i> promove ativação seletiva de canais TRPA1 em cultura de células HEK293 e em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal	75
4.5. Investigação dos componentes do veneno da <i>Bothrops jararaca</i> envolvidos com o seu efeito nociceptivo e desenvolvimento de edema.....	82
4.6. Separação cromatográfica e avaliação da atividade enzimática, da nocicepção e do edema induzidos pelas frações isoladas do veneno bruto da <i>Bothrops jararaca</i>	91
5. Discussão.....	95
6. Conclusões.....	114
7. Referências.....	116
8. Apêndices.....	134

Figura Suplementar 1. Caracterização da nocicepção e edema induzidos pela injeção intraplantar do veneno da Bothrops jararaca (1 µg/pata) em camundongos machos e fêmeas	134
Figura Suplementar 2. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da Bothrops jararaca em camundongos com deleção gênica de caspase 1/11.....	135
Figura suplementar 3. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da Bothrops jararaca em camundongos com deleção gênica de receptores toll-like 2 ou receptores toll-like 4.....	136
Figura Suplementar 4. Teste de limpeza do olho frente a estimulação corneal com agonistas dos canais TRPA1 ou TRPV1 em camundongos pretratados com resiniferatoxina.	137
Figura Suplementar 5. Parâmetros cinéticos dos ensaios in vitro para determinação da atividade enzimática de componentes específicos do veneno da Bothrops jararaca.....	138

1. Introdução

1.1. Histórico e epidemiologia dos acidentes causados por serpentes peçonhentas

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas compreendem um importante problema de saúde pública no mundo, especialmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. O estudo pioneiro realizado por Swaroop e Grab (1954) demonstrou que, já nos anos 40 e 50 do século XX, ocorriam cerca de 30 à 40 mil mortes decorrentes de acidentes ofídicos em todo o mundo, sendo que as maiores taxas de mortalidade se apresentavam em regiões da África, Ásia e América Latina. Desde então, diversos trabalhos têm sido realizados afim de se conhecer a magnitude deste problema, embora considerem os números subestimados, uma vez que, uma parcela considerável dos indivíduos acometidos não procuram atendimento médico após o acidente ou vivem em áreas onde as estatísticas de saúde são deficitárias, permanecendo, assim, invisíveis aos relatórios oficiais (GUTIÉRREZ et al., 2006; 2010).

Baseado nesses levantamentos, estima-se que anualmente cerca de 1,8 à 2,7 milhões de pessoas são acometidas por acidentes ofídicos em todo o mundo, com a ocorrência de mais de 100 mil mortes, sendo que as maiores taxas de mortalidade têm sido registradas na Ásia (57 à 100 mil), seguida da África (20 à 32 mil) e da América Latina (3,5 à 5 mil). Além disso, uma proporção considerável de indivíduos convivem com sequelas após o envenenamento, incluindo, dentre as principais, as amputações e desfigurações (GUTIÉRREZ et al., 2017). Interessantemente, têm sido relatados que os acidentes ofídicos acometem anualmente um número maior de indivíduos se comparados à algumas doenças, tais como leishmaniose (200 – 400 mil casos/ano), hanseníase (214 mil casos/ano) e doença de Chagas (24 mil casos/ano), todas classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doenças tropicais negligenciadas (ARNOLD, 2016). Diante desse cenário, em 2009 a OMS incluiu os acidentes ofídicos na lista de

doenças tropicais negligenciadas, com o objetivo de adotar medidas eficazes para reduzir suas taxas de mortalidade. Neste sentido, como parte da política da OMS, foi lançada em 2009 uma base de dados global com informações atualizadas sobre a distribuição de serpentes venenosas, as espécies de risco, os soros antiofídicos disponíveis e seus fabricantes (WHO 2010a; RÄGO et al., 2015), e em 2010, foi elaborada uma diretriz para apoiar a produção, o controle e a regulamentação dos soros antiofídicos (WHO 2010b; RÄGO et al., 2015). No entanto, mesmo com essas medidas os acidentes ofídicos continuam sendo um problema de saúde pública, necessitando de maior atenção por parte das autoridades de saúde e da comunidade científica, especialmente em regiões mais pobres, como por exemplo em países da América Latina (GUTIÉRREZ et al., 2010; WILLIAMS et al., 2010; BHAUMIK, 2013; ARNOLD, 2016; THE LANCET, 2017).

Análise realizada no final dos anos 90 do século XX estimou uma ocorrência anual de aproximadamente 300 mil acidentes ofídicos na América Latina e cerca de 5 mil mortes Chippaux (1998). Estudos mais recentes, têm demonstrado um número total de acidentes ofídicos de aproximadamente 4 mil na América Central e 50 mil na América do Sul, apresentando taxas de mortalidade por 100 mil habitantes que variam de 0,02 à 0,5, dependendo do país (GUTIÉRREZ, 2011; 2014; MALAQUE e GUTIÉRREZ, 2016). Além disso, esses estudos apontam que na América Latina o Brasil é país com maior número de casos, apresentando aproximadamente 26 à 29 mil acidentes ofídicos por ano.

No Brasil, o estudo epidemiológico pioneiro acerca dos acidentes ofídicos foi realizado por Vital Brazil em 1901, onde foi estabelecido o número de óbitos por serpentes peçonhentas no estado de São Paulo entre os anos de 1897 e 1900 (BRAZIL, 1901; BOCHNER e STRUCHINER, 2003). No mesmo período, Vital Brazil criou o *Boletim para Observação de Accidente Ophidico*, compreendendo uma das primeiras ferramentas para registro dos acidentes ofídicos no país (VAZ, 1950). Atualmente, esses acidentes devem ser reportados ao Ministério da Saúde por meio do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, o qual

disponibiliza todos os dados referentes aos acidentes ofídicos registrados no país desde 2001. Recentemente, alguns trabalhos analisaram esses dados, traçando um perfil dos acidentes ofídicos registrados no SINAN entre os anos de 2001 e 2012 (BOCHNER et al., 2014; CHIPPAUX, 2015). De acordo com os autores, durante esse período foram registrados entre 325 mil e 330 mil casos, apresentando uma média em torno de 27 mil casos por ano e uma incidência média crescente variando de 10,7 à 16/100 mil habitantes. A região Norte apresentou a maior incidência (de 56,1 à 59,4/100 mil habitantes) e as regiões sudeste e sul as menores (7,9 e 8,2/100 mil habitantes, respectivamente). Além disso, têm sido demonstrado que em torno de 70% à 86% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil entre os anos de 2001 e 2013 foram causados por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (BOCHNER, 2014; CHIPPAUX, 2015; MOTA DA SILVA, 2015). Esses dados vão ao encontro de levantamentos realizados em regiões específicas do Brasil, os quais também têm demonstrado que as espécies de *Bothrops* são as responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados nessas regiões. Essa predominância de acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* pode estar relacionada a extensa distribuição de suas espécies em todo o território brasileiro. Dentre as espécies mais importantes, destacam-se a *Bothrops atrox* (encontrada principalmente na Região Amazônica), a *Bothrops moojeni* (encontrada principalmente na região Centro-Oeste), a *Bothrops erythromelas* (encontrada principalmente na região Nordeste) e a *Bothrops alternatus* (encontrada principalmente na região Sul) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MALAQUE e GUTIÉRREZ, 2016). No entanto, a *Bothrops jararaca* é a espécie mais comumente encontrada no Brasil, especialmente em áreas anteriormente ocupadas pela Mata Atlântica e, devido a sua alta capacidade adaptativa, pode estar presente inclusive em espaços urbanos, sendo responsável pela maioria dos acidentes causados na região Sudeste do Brasil (BERTOLOZZI et al., 2016).

1.2. Sintomas clínicos decorrentes do envenenamento causado pela *Bothrops jararaca*

Os sintomas clínicos decorrentes dos acidentes causados pela *Bothrops jararaca* são bem descritos, e podem ser divididos em sintomas sistêmicos e locais. Dentre os sintomas sistêmicas destacam-se as hemorragias sistêmicas, como por exemplo hemorragia gengival, hematúria e epistaxe. Tem sido sugerido que as hemorragias promovidas pelo veneno da *Bothrops jararaca* estão relacionadas com a atividade proteolítica de seus componentes sobre proteínas da membrana basal de capilares vasculares e também com a sua ação fibrinogenolítica, interferindo diretamente com a estabilidade dos capilares vasculares e com a formação da rede de fibrina, respectivamente. Paradoxalmente, têm sido relatado que componentes do veneno da *Bothrops jararaca* também são capazes de promover a ativação de fatores da cascata de coagulação, como por exemplo, a protrombina e o fator X, contribuindo para formação de coágulos, especialmente em pequenos capilares vasculares (MARKLAND e SWENSON, 2013). Por outro lado, dentre os sintomas locais induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* destacam-se o desenvolvimento de edema e a dor. Sugere-se que o desenvolvimento de edema promovido pelo veneno é decorrente da atividade de seus componentes sobre células endoteliais dos capilares vasculares, facilitando o extravassamento plasmático para os tecidos adjacentes. Quanto ao desenvolvimento da dor, os componentes ou mecanismos responsáveis ainda não estão completamente esclarecidos, mas sugere-se que a degradação de matriz extracelular e a liberação de fosfolipídeos de membrana promovidas por diferentes componentes do veneno possam estar envolvidas (GUTIÉRREZ, 2017). Interessantemente, têm sido relatado que os sintomas locais podem estar presentes em aproximadamente 90% dos acidentes causados pela *Bothrops jararaca* e por outras serpentes do gênero *Bothrops* (ver tabela 1), enquanto que outros sintomas como necrose, bolhas e complicações, como a síndrome compartimental, são menos frequentes (GUTIÉRREZ, 2017).

Tabela 1. Principais sintomas locais e sistêmicos decorrentes dos acidentes ofídicos causados por serpentes do gênero *Bothrops*.

Autores	Sintomas Locais		Sintomas Sistêmicos		
	Edema	Dor	Hemorragia gengival	Epistaxe	Hematúria
Ribeiro e Jorge, 1997	95,4%	95,6%	8,98%	0,38%	1,02%
Mise et al., 2007	90,7%	N.A. ¹	5,1%	0,8%	3,2%
Rohr, 2007	82%	92,3%	5,1%	N.A.	N.A.
Oliveira et al., 2010	87,1%	95,9%	10,5%	0,5%	1,7%
Nogueira-Junior, 2014	57,1%	77,1%	8,6%	N.A.	N.A.
Santana et al., 2015	42,2%	50,3%	Hemorragias: 10,7%		
Leobas et al., 2016	75,0%	90,7%	Hemorragias: 1,1%		

¹Não se aplica

Uma análise criteriosa dos sintomas clínicos decorrentes do acidente causado pela *Bothrops jararaca* é importante para se determinar a gravidade, o prognóstico e o tratamento para cada caso. Sendo assim, considerando os sintomas clínicos apresentados e suas gravidades, os acidentes ofídicos causados pela *Bothrops jararaca* podem ser classificados em leves, moderados ou graves, conforme apresentado na tabela 2. Neste sentido, têm sido demonstrado que dos acidentes ofídicos registrados no Brasil entre os anos de 2001 e 2012, 50 à 60% dos casos foram classificados como leve, 35 à 40% como moderados e apenas 6 à 9% como graves (BOCHNER et al., 2014; CHIPPAUX, 2015). De maneira semelhante, a revisão feita por Maláque e Gutiérrez (2016) demonstra que 80% dos acidentes causados pela *Bothrops jararaca* são classificados como leve, 16% como moderados e somente 4% como graves. Ainda, têm sido sugerido que uma porcentagem maior dos acidentes causados pela *Bothrops jararaca* são classificados como leve (80%), quando comparados com os acidentes causados por outras serpentes do

gênero *Bothrops* (*Bothrops moojeni*: 23%; *Bothrops asper*: 39%; *Bothrops atrox*: 59%). Diante do exposto, fica evidente que a maioria dos acidentes causados pela *Bothrops jararaca* são de gravidade leve ou moderada, onde há o predomínio de sintomas locais, sendo os mais frequentes, o desenvolvimento de edema e a dor, descrita principalmente como em queimação ou latejante. Portanto, para um adequado controle desses sintomas é importante, primeiramente, conhecer os componentes do veneno e os mecanismos que contribuem para os seus desenvolvimentos.

Tabela 2. Classificação da gravidade dos acidentes causados pela *Bothrops jararaca*¹

Gravidade	Sintomas locais	Sintomas Sistêmicos
Leve	Dor pouco intensa Edema local em 1 ou 2 segmentos Hemorragia local discreta	Hemorragia sistêmica ausente Testes de coagulação normais ou alterados
Moderado	Dor evidente Edema local evidente em 3 ou 4 segmentos Hemorragia local evidente	Alterações hemorrágicas sistêmicas evidentes Testes de coagulação normais ou alterados
Severo	Dor intensa Edema local endurecido em 5 segmentos Hemorragia severa	Alterações hemorrágicas sistêmicas severas Testes de coagulação alterados

¹Baseado em Ministério da Saúde, 2001 e Maláque e Gutiérrez, 2016

1.3. Componentes do veneno da *Bothrops jararaca* responsáveis pelos sintomas locais decorrentes do envenenamento

De maneira geral, os venenos de serpentes compreendem misturas químicas complexas, apresentando componentes que podem variar de 6 à mais de 100 kDa. Têm sido extensivamente demonstrado que as moléculas de alto peso molecular correspondem a maior parte dos componentes do veneno da *Bothrops jararaca*, sendo em sua maioria proteínas com propriedades enzimáticas. Neste sentido, análises de proteômica têm identificado que as proteínas mais abundantes no veneno da

Bothrops jararaca pertencem as seguintes classes: metaloproteases do veneno de serpentes (do inglês, *Snake Venom Metalloproteases, SVMMP*), serinoproteases do veneno de serpentes (do inglês, *Snake Venom Serinoproteases, SVSP*), lecitina tipo-C de serpentes (do inglês, *snake C-type lectin/lectin-like*), proteínas secretórias ricas em cisteínas, fosfolipase A₂ do veneno de serpentes (do inglês, *Snake Venom Phospholipase A₂, SVPLA₂*), L-aminoácido oxidase (LAAO) e hialuronidases, as quais, em conjunto, correspondem a cerca de 95% do total de proteínas encontradas no veneno. Cabe salientar que outras 40 classes de proteínas menos abundantes também têm sido identificadas no veneno da *Bothrops jararaca* (DIAS et al., 2013; SOUSA et al., 2013; NICOLAU et al., 2016).

As metaloproteases, que podem representar até 50% da composição do veneno da *Bothrops jararaca*, possuem a capacidade de hidrolisar componentes chaves da membrana basal dos capilares vasculares, levando a uma redução da estabilidade mecânica desses microvasos. Conseqüentemente, forças hemodinâmicas que atua na circulação sanguínea podem causar distensão e eventualmente ruptura da parede dos capilares, culminando com extravassamento plasmático e contribuindo para o desenvolvimento de hemorragia local e de edema. Além disso, as metaloproteases também contribuem para no desenvolvimento de hemorragia local e de edema por meio do rompimento da adesão entre as células endotélias dos capilares vasculares. As metaloproteases também apresentam a capacidade de hidrolisar componentes da matriz extracelular, como por exemplo colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos, contribuindo para o dano tecidual local e para o surgimento de sintomas tais como necrose cutânea e formação de bolhas (ESCALANTE et al., 2011; GUTIÉRREZ et al., 2016). Interessantemente, as metaloproteases também parecem estar envolvidas com o desenvolvimento da dor induzida pelo veneno da *Bothrops jararaca*. Estudos em *in vivo* têm demonstrado que inibidores da atividade enzimática de metaloproteases reduziram significativamente a dor induzida pela administração subcutânea do veneno em roedores (BONAVITA et al., 2006; ZYCHAR et al., 2010). Corroborando esses achados, a injeção subcutânea da jararagina,

uma metaloprotease isolada do BjV, foi capaz de induzir hiperalgesia mecânica em camundongos (FERRAZ et al., 2015).

Outro componente comumente encontrado no BjV é a fosfolipase A2 do veneno de serpentes (SVPLA₂), a qual compreende uma pequena porcentagem do veneno (0,7%), quando comparado à outros componentes, tais como as metaloproteases (53%) e as serinoproteases (28%) (CIDADE et al., 2006). As SVPLA₂ exercem seus efeitos a partir da ligação à membrana plasmática das células, a qual pode se dar por meio da hidrólise dos fosfolípidos de membrana, como no caso das SVPLA₂ que possuem atividade enzimática, ou por meio de interações hidrofóbicas com os fosfolípidos, como no caso das SVPLA₂ enzimaticamente inativas. Independentemente da sua forma de interação com os fosfolípidos de membrana, o resultado será uma ruptura da integridade da membrana plasmática das células, com consequente influxo de cálcio, disfunção mitocondrial e dano celular irreversível (MONTECCUCO et al., 2008; GUTIÉRREZ e OWNBY., 2003). Através desses mecanismos as SVPLA₂ podem estimular o desenvolvimento de um extenso processo inflamatório local, com o recrutamento e ativação celular no tecido afetado e a síntese e liberação de mediadores endógenos, tais como eicosanóides, bradicinina, serotonina, histamina, ATP e citocinas pró-inflamatórias (TREBIEN e CALIXTO, 1989; TEIXEIRA et al., 1994; CURY et al., 1994; FARSKY et al., 1997; ROCHA et al., 2000; CHACUR et al., 2002; BONAVIDA et al., 2006; CLISSA et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; CARNEIRO et al., 2008; YAMASHITA et al., 2011; MARTINOV et al., 2013; FERRAZ et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Dessa forma, as SVPLA₂ podem contribuir para o desenvolvimento dos sintomas locais induzidos pelo BjV, especialmente dor e edema. Neste sentido, Zychar e colaboradores (2010) demonstraram que um inibidor de PLA₂, o brometo de p-bromofenacil, previniu significativamente o desenvolvimento de nocicepção promovida pelo BjV em camundongos. Cabe salientar que, o BjV apresenta atividade moderada de fosfolipase A2, enquanto o veneno de outras serpentes do gênero *Bothrops*, como por exemplo, a *Bothrops moojeni* e a *Bothrops jararacussu* apresentam alta atividade de

fosfolipase A2 (CAMPOS et al., 2013), sendo importante também, para o desenvolvimento de edema induzido por esses venenos (BONAVITA, 2006; MENALDO et al., 2017; ZAMBELLI et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Esses achados sugerem que as SVPLA2 presentes no BjV também podem ser importantes para o edema induzido pelo veneno.

A hialuronidase compreende outro componente amplamente encontrado no veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, principalmente no da *Bothrops jararaca* (TAN e PONNUDURAI, 1991; DE SOUZA et al., 2015). As hialuronidases promovem a degradação do ácido hialurônico, um componente essencial da matriz extracelular em tecidos intersticiais. Com a degradação do ácido hialurônico ocorre um aumento da permeabilidade e da fluidez da matriz extracelular, facilitando a difusão do veneno e de suas toxinas no local da inoculação (DELAFONTAINE et al., 2017). Dessa forma, as hialuronidases presentes no BjV podem facilitar e amplificar os efeitos locais promovidos pelos demais componentes do veneno, tais como as SVMP e SVPLA₂, contribuindo para o desenvolvimento de hemorragia, edema e necrose. É importante salientar que os efeitos promovidas pelo BjV no local da inoculação envolvem mecanismos que, na maioria das vezes, levam ao desenvolvimento de lesões que são difíceis de serem controladas de forma rápida ou completa (GOLD et al., 2002) pelo tratamento atualmente disponível.

1.4. Tratamento utilizado nos casos de envenenamento pela *Bothrops jararaca*

Atualmente, o soro antibotrópico compreende a única alternativa efetiva para o tratamento dos acidentes ofídicos causados pela *Bothrops jararaca* (WHO, 2010). O soro antibotrópico compreende um concentrado de imunoglobulinas obtido por meio da imunização prévia de cavalos com uma mistura de venenos de cinco espécies de serpentes do gênero *Bothrops*: *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus* e *Bothrops neuwiedi* (SOARES et al., 2018). Usualmente, o refinamento do concentrado de imunoglobulinas IgG obtido dos

animais imunizados é feito por meio de digestão enzimática com pepsina, produzindo fragmentos F(ab')₂. Se supõe que, utilizando esse protocolo, ocorre a remoção da fração Fc do fragmento de ligação ao antígeno (Fab), reduzindo, assim, o risco de reações adversas. Outras opções que podem ser utilizadas envolvem a utilização de papaína para obtenção de fragmentos Fab de menor tamanho ou a purificação de moléculas inteiras de IgG pela precipitação com ácido caprílico (WHO, 2010; GUTIÉRREZ, 2017).

O soro antibotrópico tem provado ser efetivo frente à muitos dos sintomas produzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca*, principalmente contra os sintomas sistêmicos. No entanto, o soro antibotrópico apresenta algumas limitações terapêuticas. Assim como ocorre com outros soros antiofídicos, pode ocorrer que uma pequena porcentagem das imunoglobulinas IgG contidas em um frasco de soro sejam específicas contra as proteínas presentes no veneno. Isso pode acontecer pois os animais que são imunizados para produção do soro, apresentam um sistema imune maduro e sua imunização com o veneno pode ser incapaz de produzir altos títulos de IgG. Consequentemente, uma quantidade maior de frascos do soro será necessária para se obter um controle satisfatório dos sintomas, aumentando, assim, os riscos para o desenvolvimento de reações adversas ao soro e também o custo do tratamento. Cabe salientar que, o processo de produção do soro antibotrópico, bem como o seu transporte e armazenamento, os quais devem ser feitos sob refrigeração, são altamente dispendiosos (HARRISON et al., 2011; HARRISON e GUTIÉRREZ, 2016). Além disso, têm sido sugerido que o soro antibotrópico apresenta efetividade limitada contra os sintomas locais promovidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* (MALÁQUE e GUTIÉRREZ, 2016), os quais podem progredir mesmo após a administração do soro. Cabe salientar que atualmente, não há terapia validada para o adequado tratamento das sintomas locais induzidas pelo veneno da *Bothrops jararaca*, sendo que, para o controle da dor, fármacos analgésicos disponíveis para uso clínico, tais como paracetamol e opióides, são indicados como tratamento de suporte, no entanto, não se mostram completamente eficazes.

Por outro lado, antiinflamatórios não-esteroidais devem ser evitados, uma vez que podem acentuar as complicações renais e hemorrágicas promovidas pelo veneno (MALÁQUE e GUTIÉRREZ, 2016; GUTIÉRREZ, 2017).

Diante desse cenário, fica evidente a necessidade de se desenvolver alternativas terapêuticas ao soro antiofídico para um tratamento mais seguro e eficaz dos sintomas produzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca*, principalmente dos sintomas locais como dor e edema. Assim, ampliar o conhecimento a cerca dos componentes do veneno da *Bothrops jararaca* e dos mecanismos endógenos envolvidos na dor e no desenvolvimento de edema induzidos pelo veneno, compreendem passos importantes para o descobrimento de novos alvos terapêuticos e para o posterior desenvolvimento de fármacos que possam auxiliar no tratamento desses sintomas locais.

1.5. Inflamassoma e receptores do tipo *toll* como possíveis mediadores dos sintomas locais induzidos por venenos

Com relação aos mecanismos e mediadores endógenos responsáveis pela resposta inflamatória local e pelos desenvolvimento de sintomas locais induzidos por venenos e toxinas, a participação do inflamassoma e dos receptores do tipo *toll* (do inglês, *toll-like receptors, TLR*) têm recebido importante destaque nos últimos tempos. Os inflamassomas são complexos multiprotéicos estruturalmente formados pela proteína adaptadora ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) e pela proteína NLR (do inglês, *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*). Resumidamente, a proteína adaptadora ASC tem como função recrutar a enzima caspase 1 para o complexo do inflamassoma, enquanto que a proteína NLR funciona como um suporte molecular para a ativação da caspase 1. Uma vez integrada ao inflamassoma e ativada, a caspase 1 irá promover, principalmente, a maturação e secreção da interleucina 1 beta (IL-1 β) e da interleucina 18 (IL-18). Diversos tipos de inflamassoma têm sido descritos, sendo que um dos mais

estudados é o inflamassoma NLRP3 (do inglês, *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing family, pyrin domain containing 3*). O NLRP3 podem ser ativados por padrões moleculares associados à patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) ou por padrões moleculares associados ao perigo (do inglês, *danger-associated molecular patterns, DAMPs*), os quais, usualmente, compreendem moléculas secretadas como consequência de lesão tecidual, tais como, ATP, cristais de ácido úrico e DNA mitocondrial (Para revisão ver: SANTONI et al., 2015). Além dos PAMPs e DAMPs, têm sido demonstrado que venenos e toxinas isoladas de venenos animais também podem ativar o inflamassoma NLRP3. Neste sentido, Palm e Medzhitov (2013) demonstraram que o veneno da *Apis mellifera* e a melitina, um peptídeo formador de poros isolado do veneno, promovem a ativação do inflamassoma *in vitro* e *in vivo*, o que contribui para o desenvolvimento da resposta imune e inflamatória induzidas por esses compostos. Semelhantemente, Zoccal e colaboradores (2016) demonstraram que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* também é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3, e que a participação desse mecanismo contribui para a mortalidade induzida pelo veneno.

Os TLRs compreendem uma família de proteínas transmembrana envolvidas com o reconhecimento de PAMPs e DAMPs. Uma vez ativados os TLRs recrutam moléculas adaptadoras, como por exemplo, a MyD88 e o domínio *toll*/receptor IL-1, levando a ativação de fatores de transcrição incluindo o fator nuclear kappa B (NF- κ b) e fatores reguladores de interferon (IRFs) (SANTONI et al., 2015; BLASIUS e BEUTLER; 2010; HACKER et al., 2011). Esses fatores de transcrição por suas vezes, irão estimular a produção e a secreção de diferentes mediadores proinflamatórios, os quais desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento de uma resposta inflamatória (MCGETTRICK e O'NEILL, 2010). Dentre os PAMPs que podem promover a ativação dos TLRs, estão os componentes da parede fúngica, o lipopolissacarídeos (LPS), flagelos bacterianos, peptídeoglicanos e outros componentes de microorganismos infecciosos. Já dentre os DAMPs destacam-se os os produtos da

matriz extracelular, os ácidos graxos, o DNA mitocondrial e o citocromo C (Para revisão ver: ERRIDGE, 2010; SANTONI et al., 2015). Além disso, alguns estudos têm demonstrado a participação dos TLRs na inflamação induzida pelo veneno de serpentes. Neste sentido, foi demonstrado que o TLR subtipo 2 (TLR2) e a molécula adaptador MyD88 estão envolvidas com a resposta inflamatória induzida pelo veneno da *Bothrops atrox*. Recentemente, Rucavado e colaboradores (2016) demonstraram que a ativação do TLR subtipo 4 (TLR4) por DAMPs contribui para o aumento da permeabilidade vascular promovido pelo veneno da *Bothrops asper*.

Diante do exposto, a participação do inflamassoma - seguida da ativação de caspase 1 e secreção de IL-1 β - bem como dos TLRs, como possíveis mediadores dos sintomas locais induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca*, devem ser investigados. Além da participação de componentes do sistema imune, têm sido sugerido que neurônios sensoriais periféricos, especialmente receptores localizados nesses neurônios, também podem estar envolvidos com a resposta inflamatória local e os sintomas locais induzidos por venenos e toxinas animais, com destaque para a dor e o desenvolvimento de edema. Neste sentido, os receptores de potencial transitório (do inglês, *Transient Receptor Potential, TRP*) têm recebido um importante destaque. Cabe salientar aqui, que os TRPs têm se apresentado como possíveis mediadores de um contato intercambiável e bidirecional com componentes do inflamassoma e com os TLRs, participando, conjuntamente com estes, na sinalização envolvida com o desenvolvimento de respostas inflamatórias (WHITE et al., 2011; SANTONI et al., 2015).

1.6. Receptores de potencial transitório (TRPV1 e TRPA1) como possíveis mediadores dos sintomas locais induzidos por venenos

Os canais TRPs compreendem uma família de canais iônicos, classicamente relacionados à dor e a inflamação. A primeira sugestão de que os canais TRPs desempenham um papel fundamental na transdução de estímulos nocivos e portanto na dor,

foi feita por Caterina e colaboradores em 1997. Neste estudo pioneiro, os autores observaram pela primeira vez em mamíferos que a dor causada pela capsaicina (substância presente na *Capsicum* sp.) ocorria devido a ativação de canais iônicos expressos exclusivamente em neurônios de pequeno diâmetro especializados na transmissão de estímulos nocivos. Além disso, os autores demonstraram que esses canais iônicos também eram ativados pelo calor nocivo e por prótons. Inicialmente, esses canais ficaram conhecidos como receptores vanilóides subtipo 1 (VR1). Posteriormente, devido a sua semelhança funcional e estrutural com os canais TRPs identificados por Montell e Rubin (1989) na *Drosophila melanogaster*, ficaram conhecidos como receptores de potencial transitório vanilóide subtipo 1 (TRPV1). Em seguida, outros canais iônicos com características semelhantes aos TRPV1 foram clonados e tiveram sua função relacionada a transdução de estímulos térmicos e dor, com destaque para os receptores TRPV4 (GÜLER et al., 2002), e TRPA1 (STORY et al., 2003).

Os canais TRPV1 e TRPA1 encontram-se na membrana plasmática de um subgrupo de neurônios especializados em mediar a nocicepção, chamados de nociceptores. Os nociceptores podem ser encontrados em dois tipos de fibras sensoriais, as fibras A δ e as fibras C. As fibras A δ apresentam populações de neurônios que respondem à estímulos mecânicos e químicos, mas que apresentam um elevado limiar de ativação à estímulos térmicos. Por outro lado, essas fibras possuem outra população de neurônios que respondem à estímulos térmicos mas possuem alto limiar de ativação à estímulos mecânicos. Já as fibras C, também são chamadas de polimodais, pois apresentam populações de neurônios que respondem aos estímulos nocivos de diferentes naturezas (mecânica, térmica e química), embora de maneira mais lenta que as fibras A δ devido a sua não mielinização (SHERRINGTON, 1906; BASBAUM et al., 2009). Em sua maioria os canais TRPV1 encontram-se expressos nas fibras C, enquanto que uma pequena porcentagem desses canais também são expressos em fibras A δ . Uma parte dos nociceptores que expressam os canais TRPV1 também expressam os canais TRPA1 (STORY et al., 2003). Desse modo, essas fibras

sensoriais que expressam ambos os canais são chamadas de fibras TRPV1/TRPA1 positivas.

Os nociceptores apresentam seus corpos celulares agrupados em uma região conhecida como gânglio da raiz dorsal, vizinha à medula espinal, mas localizada externamente ao sistema nervoso central. Os axônios dos nociceptores se propagam em duas direções opostas, à periferia e ao corno dorsal da medula espinal, onde são estabelecidas conexões sinápticas com neurônios de segunda ordem responsáveis pela condução dos estímulos nocivos até centros superiores do sistema nervoso central, principalmente para o córtex somatossensorial (Para revisão ver: JULIUS e BASBAUM, 2001). Os canais TRPV1 e TRPA1 compreendem um dos principais mecanismos de transdução dos estímulos nocivos nos nociceptores, sendo responsáveis por mediar as rápidas mudanças de condutância da membrana dos nociceptores, aumentando de maneira transitória a permeabilidade da membrana neuronal à determinados íons (Para revisão ver: SOUSA-VALENTE et al., 2017). Uma vez ativados, os canais TRPV1 e TRPA1 permitem o influxo de cátions nos nociceptores, principalmente Ca^{2+} e Na^+ , levando a despolarização da sua membrana, aumentando a probabilidade de geração de potenciais de ação nesses neurônios e facilitando a transmissão do estímulo nocivo ao longo dos seus axônios (Para revisão ver: SOUSA-VALENTE et al., 2017). Além disso, o influxo de Ca^{2+} pode aumentar a liberação de mediadores ou neurotransmissores na medula espinal (PARNAS e PARNAS, 2010) que, por suas vezes, podem facilitar a ativação de neurônios de segunda ordem e a propagação do estímulo nocivo.

De fato, desde o estudo pioneiro de Caterina e colaboradores (1997) diversos estudos têm sido realizados em roedores utilizando ferramentas farmacológicas (antagonistas) e genéticas (deleção gênica) e têm demonstrado que os canais TRPV1 e TRPA1 são mediadores clássicos de estímulos nocivos, principalmente de origem térmica sendo que, os TRPV1 são ativados pelo calor nocivo (temperaturas acima de 42 °C), enquanto os TRPA1 são ativados pelo frio nocivo (temperaturas abaixo de 17°C). Além disso, os canais TRPs também podem ser ativados por

estímulos mecânicos e por uma variedade de estímulos químicos. Classicamente, os canais TRPV1 são ativados pela capsaicina e pela resiniferatoxina, um potente análogo da capsaicina encontrada em plantas do gênero *Euphorbia*, enquanto que, os canais TRPA1, são ativados pelos isotiocianatos (encontrados no rabanete e no óleo de mostarda), pelo cinamaldeído (encontrado na canela) e pela alicina (encontrada no alho). Os canais TRPV1 e TRPA1 são conhecidos por mediar a dor em queimação decorrente de suas ativações por esses compostos (Para revisão ver: PATAPOUTIAN et al., 2009).

Os canais TRPV1 e TRPA1 localizados nas terminações nervosas periféricas também podem ser ativados por mediadores endógenos produzidos e liberados devido à alguma lesão tecidual. Neste sentido, destacam-se como mediadores que ativam diretamente estes canais, as espécies reativas de oxigênio, especialmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); além do ácido araquidônico e os seus produtos (prostaglandinas e leucotrienos) (SAWADA et al., 2008; TREVISAN et al., 2013). Por outro lado, têm sido sugerido que a bradicinina e o fator de crescimento do nervo (do inglês *Nerve Growth Factor*, NGF), importantes mediadores endógenos envolvidos com a dor e edema e produzido a partir de lesão tecidual ativam indiretamente os canais TRPV1 ou TRPA1, por meio da sinalização intracelular decorrente da ativação dos seus receptor B2 ou TRKa, respectivamente (FERREIRA et al., 2004; BANDELL et al., 2004; WANG et al., 2007; Ji et al., 2002; ZHANG et al., 2005; DIOGENES et al., 2007). Assim, está bem consolidado na literatura que os canais TRPV1 e TRPA1 estão envolvidos na nocicepção aguda induzida por estímulos térmicos e químicos nocivos, mas também na nocicepção decorrente de lesão ou inflamação tecidual, seja pela ativação direta dos canais pelos mediadores endógenos ou pelo fenômeno de sensibilização periférica. Ademais, a ativação dos canais TRPV1 ou TRPA1 em terminações nervosas periféricas promove a liberação de peptídeos vasoativos, tais como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), os quais, por sua vez, induzem sinais clássicos de inflamação, contribuindo para vasodilatação e edema, em um fenômeno conhecido como inflamação neurogênica (Para

revisão ver: PATAPOUTIAN et al., 2009; JULIUS, 2013; SOUSA-VALENTE et al., 2013).

Diante do exposto, alguns dos mediadores endógenos capazes de promover ativação dos canais TRPV1 e TRPA1 são produzidos, liberados e estão envolvidos com a nocicepção e edema que se desenvolvem após a inoculação do BjV. Além disso, alguns pacientes relatam dor em queimação após o acidente botrópico (SMITH e BUSH, 2010). Em conjunto, esses achados reforçam a possibilidade de que os canais TRPV1 e TRPA1 contribuem para o desenvolvimento dos sintomas locais induzidos pelo BjV.

1.7. Os canais TRPV1 e TRPA1 como alvo para ação de venenos e toxinas isoladas de venenos animais

OS canais TRPV1 e TRPA1 estão relacionados com a nocicepção e edema promovidos por uma variedade de venenos de diferentes espécies animais. Neste sentido, Siemens e colaboradores examinaram em 2006 o veneno de 22 espécies de aranhas e escorpiões cujas picadas sabidamente causam dor. Inicialmente os autores demonstraram que o veneno bruto da *Psalmopoeus cambridgei*, uma tarântula nativa da região do Caribe, é capaz de promover o influxo de cálcio em células HEK293 expressando os canais TRPV1. Após realizar a purificação do veneno, os autores obtiveram 3 famílias de peptídeos estruturalmente semelhante, os quais foram chamados de vanilotoxinas. Posteriormente, demonstraram que essas famílias de toxinas atuavam como agonistas dos canais TRPV1, e que a nocicepção e desenvolvimento de edema induzidos após serem administradas na pata de camundongos eram dependentes dos canais TRPV1. Nesse mesmo ano, Cuyper e colaboradores (2006) demonstraram que os canais TRPV1 são alvos para ação do veneno de cnidários, tais como *Aiptasia pulchella*, *Cyanea capillata*, *Physalia physalis* e *Chironex fleckerii*, contribuindo para a dor induzida por esses venenos. De maneira semelhante, Bohlen e colaboradores (2010) demonstraram que o veneno da *Ornithoctonus huwena*, uma tarântula típica do sudeste da China, apresenta componentes de alto peso molecular

que atuam como ativadores diretos, seletivos e irreversíveis dos canais TRPV1, sugerindo que esse mecanismo contribui para a nocicepção e inflamação promovidos pelo veneno dessa espécie de aracnídeo. Já Gewehr e colaboradores (2013) sugeriram que o veneno da *Phoneutria negriventer*, uma das principais espécies responsáveis pelos acidentes causados por aracnídeos no Brasil, ativa diretamente os canais TRPV1, compreendendo um dos principais mecanismos envolvidos na nocicepção induzida por esse veneno. Em 2015, Yang e colaboradores descreveram o peptídeo RhTx, um peptídeo presente no veneno da *Scolopendra subspinipes mutilans*, espécie de centopéia nativa da China. Os autores demonstraram que essa toxina ativa diretamente os canais TRPV1 promovendo o desenvolvimento de nocicepção. No mesmo ano, Hakim e colaboradores (2015) demonstraram que o peptídeo BmP01, presente no veneno do escorpião *Mesobuthus martensii*, é capaz de ativar os canais TRPV1, sendo esse um dos mecanismos responsáveis pela dor induzida por esse veneno. Mais recentemente, foi demonstrado que o veneno da serpente *Echis coloratus* possui toxinas capazes de ativar diretamente os canais TRPV1 (GERON et al., 2017). Esses achados sugerem que os canais TRPV1 compreendem importantes alvos para ação de venenos e toxinas isoladas de venenos animais (Para revisão ver: BOHLEN e JULIUS, 2012; SIEMENS e HANACK, 2014).

Com relação aos canais TRPA1, têm sido demonstrado que alguns venenos e toxinas podem promover uma ativação direta dos canais TRPA1. Neste sentido, foi demonstrado que a crotalina, um peptídeo obtido do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é capaz de ativar os canais TRPA1 *in vitro*. Além disso, os autores demonstraram que essa ativação é seguida de uma extensa e prolongada desensibilização do canal, o que pode contribuir para o efeito antinociceptivo promovido por esse peptídeo (BRESSAN et al., 2016). Mais recentemente, Logashina e colaboradores (2017) demonstraram que o peptídeo Ms 9a-1, obtido da anêmona do mar *Metridium senile*, atua como um modulador positivo dos canais TRPA1 potencializando sua resposta à agonistas endógenos e acompanhado da desfuncionalização dos neurônios que expressam

os canais TRPA1. Por outro lado, as ciguatoxinas, um grupo de toxinas lipofílicas produzidas por dinoflagelados do gênero *Gambierdiscus* e que se acumulam na cadeia alimentar marinha, promovem o desenvolvimento de nocicepção (alodínia ao frio) a partir de uma ativação indireta dos canais TRPA1 (via ativação de canais de sódio Nav1.8), conforme demonstrado por Vetter e colaboradores (2012). Assim, esses achados reforçam o potencial dos canais TRPV1 e TRPA1 como mediadores diretos ou indiretos da nocicepção e desenvolvimento de edema promovidos pelo veneno da *Bothrops jararaca*.

É importante ressaltar que modelos animais, especialmente roedores, têm sido importantes ferramentas para a elucidação dos mecanismos endógenos, bem como dos componentes do veneno, responsáveis pelos sintomas decorrentes do envenenamento causado pela *Bothrops jararaca*. Além disso, esses sintomas, sistêmicos e locais, vem sendo muito bem reproduzidos em roedores, os quais, inclusive, são presas naturais de serpentes como a *Bothrops jararaca*. Ademais, cabe salientar aqui que, o estudo da dor em roedores é feito por meio da nocicepção, a qual compreende o processo neural de codificação de estímulos nocivos. Como consequências dessa codificação o animal pode apresentar comportamentos motores como reflexos de retirada ou comportamentos nocifensivos espontâneos e complexos. Similar ao que ocorre em humanos, também podem ser estudados em roedores a hiperalgesia, descrita como um aumento na sensibilidade à um estímulo nocivo, e a alodínia, descrita como uma resposta à um estímulo não nocivo (para revisão ver LOESER e TREEDE, 2008).

Diante do exposto, considerando que esses canais TRPV1 e TRPA1 estão diretamente envolvidos com a transdução e transmissão de estímulos nocivos; que podem ser ativados por mediadores produzidos e liberados após lesão tecidual (dentre os quais destacam-se àqueles que sabidamente são produzidos e liberados após a inoculação do veneno da *Bothrops jararaca*); e que se apresentam como mediadores da nocicepção e edema causados por diferentes peptídeos e toxinas encontradas em venenos de

diversas espécies animais, hipotetizamos que os canais TRPV1 e TRPA1 favorecem a nocicepção e o desenvolvimento de edema promovidos pelo BJV.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar os possíveis mecanismos endógenos e os componentes do veneno da *Bothrops jararaca* responsáveis pela sua nocicepção e edema em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar a nocicepção e o edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (BJV) na pata de camundongos.
2. Avaliar a contribuição do inflamossoma e dos receptores do tipo *toll* na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do BJV.
3. Investigar o envolvimento dos canais TRPs na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do BJV.
4. Avaliar a ativação dos canais TRPA1 pelo BJV em cultura de células HEK293 e em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos e camundongos.
5. Investigar os componentes do BJV responsáveis pelo seu efeito nociceptivo e desenvolvimento de edema.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram conduzidos de acordo com os guias éticos atuais para investigação experimental da dor em animais conscientes. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC, protocolo número P872) e sob as permissões de pesquisa da Universidade de Florença, Itália (#204/2012 e #194/2015-PR). Foram utilizados camundongos *Swiss* machos e fêmeas (30-35 g, 4-8 semanas) obtidos do Biotério Central da UFSC e camundongos C57BL/6 (machos, 20-25 g, 5-6 semanas; Envigo, Milão, Itália), tipo selvagem (*TRPAV1*^{+/+} e *TRPA1*^{+/+}) ou com deleção gênica dos canais TRPV1 (*TRPV1*^{-/-}, 25-30 g, 5-8 weeks; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) ou com deleção gênica dos canais TRPA1 (*TRPA1*^{-/-}, 25-30 g, 5-8 semanas, B6.129P-*TRPA1*^{tm1Kykwl}; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Camundongos com deleção gênica da caspase 1/11 (*Cas*^{-/-}) foram gentilmente cedidos pelo Prof. André Báfica (Laboratório de Imunobiologia, UFSC). Camundongos com deleção gênica dos receptores do tipo *toll* 2 (*TLR2*^{-/-}) e camundongos com deleção gênica dos receptores do tipo *toll* 4 (*TLR4*^{-/-}) (machos, 20-25 g, 8-10 semanas Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Fernando Spiller (Laboratório de Imunobiologia, UFSC) o qual recebeu os animais como doação do Prof. Ricardo T. Gazzinelli (Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os animais foram mantidos em número de 10 (para camundongos *Swiss*) ou 6 (para camundongos C57BL/6) por gaiola, em um biotério com temperatura (22±1 °C) e umidade (55-65 %) controladas, ciclo claro/escuro de 12h/12h e livre acesso a água e ração. Os animais foram mantidos nesse ambiente por pelo menos 7 dias antes da realização dos experimentos, sendo que, passaram por um período de ambientação à sala de experimentação de pelo menos 1 hora antes da manipulação experimental. O número de animais usados

foi o mínimo necessário para demonstrar os efeitos consistentes de cada protocolo. Todos os esforços foram realizados para minimizar a dor dos animais em cada experimento. No final de cada experimento os animais foram ortotansados por meio da inalação de uma mistura de CO₂ e O₂ 10–50%.

3.2. Fármacos e Reagentes

O veneno bruto da *Bothrops jararaca* liofilizado foi obtido, por meio de doação, do Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brasil). O veneno foi armazenado à temperatura de -20°C e a solução de uso foi preparada (em solução fisiológica, NaCl 0,9%) no dia de cada experimento. Os compostos A-967079 e HC-030031 (antagonistas do canal TRPA1), alil isotiocianato e capsaicina (agonistas TRPA1 e TRPV1, respectivamente) e resiniferatoxina foram obtidas da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O composto SB-366791 (antagonista do canal TRPV1) foi obtido da Tocris Bioscience (Baldwin, USA). A-967079, HC-030031, alil isotiocianato e SB-366791 foram preparados em dimetilsulfóxido (DMSO e acondicionadas à 5-8°C, até o momento de nova diluição (em NaCl 0,9%) para obtenção da solução de uso. Capsaicina e resiniferatoxina foram preparadas em solução fisiológica (NaCl, 0,9%) e mantidas à temperatura de -20°C até o momento do uso. Terbutalina, atropina e aminofilina, utilizadas no preparo do coquetel de proteção contra falência respiratória utilizado no protocolo de tratamento com resiniferatoxina, foram obtidas da Hipolabor Farmacêutica (Belo Horizonte, MG, BR), Hypofarma (Ribeirão das Neves, MG, BR) e Teuto (Anápolis, GO, BR), respectivamente.

Os meios de cultivos e os reagentes utilizados na cultura de células HEK293 e de neurônios sensoriais primários, foram todos adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O meio de Hank (do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution, HBSS*) meio de Eagle modificado (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM*) ou meio *Ham's F12* foram mantidos a temperatura de 2-8°C após abertura dos frascos. A colagenase tipo 1A, tripsina e papaína, utilizadas para digestão enzimática no protocolo de cultura primária de neurônios sensoriais primários,

foram mantidas à -20°C e as soluções de uso foram preparadas no dia do experimento. As soluções estoques de soro fetal bovino (SFB, 10%), soro de cavalo (10%), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 mg/ml) foram preparadas em PBS (do inglês, Phosphate Buffer Saline) e mantidas à -20°C até o dia de uso. O fator de crescimento do nervo (do inglês, *nerve growth factor*, NGF, 100 ng/ml) (apenas para os gânglios de ratos) e a citosina-b-D-arabinofuranosídeo (ARA-C, 2,5 mM) foram preparadas em PBS e mantidas à -80°C até o dia de uso. A sonda fluorescente FURA-2 AM-éster, utilizada nos ensaios de imageamento de cálcio foi obtida da Alexis Biochemicals (Lausen, Suíça) e a solução estoque (5 µM) foi preparada em DMSO e armazenada à temperatura de -20 °C até o momento do uso. Os agonistas dos canais TRPA1 e TRPV1 (alil isotiocianato e capsaicina), os antagonistas dos canais TRPA1 e TRPV1 (HC-030031 e capsazepina) e a ionomicina utilizados nos ensaios de imageamento de cálcio foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), mantidos em temperatura de 2-8°C e preparados em DMSO (0,3%) no dia do experimento.

Os inibidores enzimáticos 1,10-Fenantrolina, Brometo de p-bromofenacil (pBPB) e Fluoreto de 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil (AEBSF) foram obtidas da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Inicialmente, 1,10-Fenantrolina e pBPB foram preparados em etanol 10% e posteriormente diluídos em solução fisiológica (NaCl, 0,9% para os ensaios *in vivo*) ou em tampão TRIS-HCl (para os ensaios *in vitro*) para preparo da solução de uso, sendo que, a concentração de etanol na solução final de uso não ultrapassou 1%. O AEBSF foi preparado em em solução fisiológica (NaCl, 0,9% para os ensaios *in vivo*) ou em tampão TRIS-HCl (para os ensaios *in vitro*) para preparo da solução de uso. Os substratos azocaseína, N α -Benzoil-DL-Arginina *p*-Nitroanilida (BAPNA) e ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico utilizados nas reações enzimáticas para determinação das atividades enzimáticas do veneno da *Bothrops jararaca* forma adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) e preparados em tampão TRIS-HCl adicionado com CaCl₂

(azocaseína e BAPNA) ou acetonitrila (ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico).

3.3. Procedimentos Experimentais

Para os experimentos *in vivo*, o tamanho da amostra para os grupos experimentais foi estimada considerando o desfecho primário previamente estabelecido (hiperalgesia mecânica) e os resultados obtidos em estudos pilotos, utilizando os seguintes parâmetros: desvio padrão de 0,044 e diferença a ser detectada de 0,69, para um nível de significância de 5%, um poder de teste de 90% e um teste de hipótese bicaudal. O tamanho de efeito mínimo foi considerado como uma redução de pelo menos 50% no limiar de retirada da pata frente à aplicação dos filamentos de von Frey. Assim, foi estimado um tamanho de amostra de 6 animais para cada grupo experimental. A alocação dos animais nos grupos experimentais foi feita de maneira oculta ao avaliador do desfecho. Para a alocação, os animais foram randomizados, levando em consideração os valores basais obtidos para o desfecho primário. Para a randomização foi utilizado o *software* RANDOM.ORG disponível gratuitamente na rede mundial de computadores. Assim, os números dos animais e suas distribuições nos grupos experimentais foram gerados automaticamente e de maneira aleatória previamente a cada experimento. Os experimentos foram realizados em 2-3 blocos experimentais independentes, utilizando 2-3 animais em cada bloco). Os experimentadores responsáveis pela avaliação do desfecho foram cegados às identidades dos animais, especificamente à condição de tratamento ou ao *background* genético. As identidades foram reveladas apenas após o término do experimento.

3.4. Caracterização da nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (BjV)

3.4.1. Nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* (BjV)

Em uma primeira série de experimentos, camundongos Swiss receberam injeção do BjV (0,05 – 20 µg/pata) por via subcutânea (s.c.) na pata traseira. Imediatamente após a administração do BjV ou do seu veículo (solução fisiológica, NaCl 0,9%), foi avaliada a resposta nociceptiva espontânea aguda. Além disso, outros comportamentos indicativos de nocicepção também foram avaliados, uma vez que, em termos de sensibilidade e especificidade, têm sido sugerido algumas vantagens em se avaliar uma combinação de comportamentos indicativos de nocicepção ao invés de se observar um único parâmetro nociceptivo. Neste sentido, também foram avaliadas a hiperalgesia mecânica e alodínia térmica ao frio, bem como o desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional e de edema, de 1 até 24 horas após a administração subcutânea do BjV ou veículo.

3.4.2. Testes Comportamentais

3.4.2.1. Nocicepção Espontânea Aguda

Imediatamente após as injeções subcutâneas, os camundongos foram colocados em câmaras acrílicas individuais e o tempo total dispendido por cada animal lambendo a pata injetada foi medido durante 15 minutos, sendo considerado parâmetro indicativo de nocicepção. Os resultados foram expressos com somatório do tempo (s) obtido durante os 15 minutos de observação.

3.4.2.2. Hiperlgesia Mecânica

A hiperlgesia mecânica foi avaliada por meio do limiar de retirada da pata frente a aplicação dos filamentos de von Frey, usando o paradigma “Up-and-Down”, conforme descrito previamente por Chaplan e colaboradores (1994). Para realização desse teste, os animais foram alocados individualmente em câmaras

acrílicas sobre uma plataforma elevada com assoalho em grade, permitindo o acesso às suas patas. Os filamentos de von Frey foram aplicados individualmente na superfície plantar da pata traseira dos animais, com incrementos logarítmicos crescentes de força. Os comportamentos de levantar, chacoalhar ou lambe da pata foram considerados respostas positivas frente à aplicação do filamento. Em caso de resposta positiva um filamento de maior força foi utilizado, ao contrário, na ausência de resposta positiva, um filamento de menor força foi aplicado. Esse protocolo prosseguiu até que seis filamentos fossem aplicados ou, então, em caso de respostas positivas ou ausências de respostas positivas frente aos quatro primeiros filamentos utilizados. Os resultados foram expressos como limiar de retirada da pata 50% (g) e calculados conforme descrito por Dixon (1980), como mostrado a seguir:

$$\text{Limiar 50\% (g)} = 10^{[X_f + k\delta]}$$

onde X_f = valor do último filamento de von Frey usado (em log); k = valor tabelado para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (DIXON, 1980); δ = diferença média (em log) entre os estímulos (0,4498).

3.4.2.3. Comportamento Afetivo-motivacional (CAM)

O comportamento afetivo-motivacional (CAM) foi avaliado de acordo com Corder e colaboradores (2017), com algumas modificações. Imediatamente após a aplicação de cada filamento de von Frey, os animais foram observados por um período máximo de 1 minuto, sendo atribuído um escore (de 0 à 3) considerando posição da pata ipsilateral, em relação ao assoalho da plataforma. Escore 0: os animais permaneceram com a região plantar da pata totalmente pressionada contra o assoalho da plataforma; escore 1: os animais permaneceram com a região plantar da pata totalmente pressionada contra o assoalho da plataforma, em posição lateral ou em forma de concha; escore 2: os animais permaneceram com a pata totalmente recolhida do assoalho da plataforma; escore 3: os animais permaneceram com a pata totalmente recolhida do

assoalho da plataforma e apresentaram comportamento de lambida da pata. Os resultados foram expressos como o somatório dos escores obtidos após a aplicação de cada filamento de von Frey. O valor máximo possível de ser obtido para cada animal era 18, uma vez que os filamentos de von Frey foram aplicados no máximo 6 vezes.

3.4.2.4. Alodínia térmica à estímulo frio

A alodínia térmica à estímulo frio foi avaliada utilizando-se o teste da acetona. Para realização desse teste, os animais foram alocados individualmente em câmaras acrílicas sobre uma plataforma elevada com assoalho em grade, permitindo o acesso às suas patas. Com o auxílio de uma micropipeta foram aplicados 50 μ L de acetona na superfície plantar da pata traseira dos animais. Após a aplicação da acetona, os animais foram observados por um período de 1 minuto, sendo mensurado o tempo (s) em que o animal permaneceu exibindo os comportamentos indicativos de nocicepção (elevação, agitação e lambida da pata injetada) evocados pelo resfriamento da pata proporcionado pela evaporação da acetona.

3.4.2.5. Mensuração do desenvolvimento de edema da pata

O desenvolvimento de edema da pata foi mensurado como espessura da pata, a qual foi medida utilizando um paquímetro digital (Western[®]Pro, Mitutoyo Corporation, modelo: PK0505CPX, acurácia de $\pm 0,1$ mm). As medidas foram feitas no sentido ventral-dorsal da pata e os resultados foram expressos Δ da espessura da pata (em milímetros), calculados como se segue: espessura da pata ipsilateral – espessura da pata contralateral.

3.5. Investigação do envolvimento do inflamassoma e dos receptores do tipo *toll* (TLR2 e TLR4) na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (BjV)

Com o objetivo de avaliar a contribuição de uma proteína chave decorrente da ativação do inflamassoma, no desenvolvimento de nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.), foram utilizados camundongos C57BL/6 com deleção gênica da enzima caspase 1/11 (Cas1/11^{-/-}). É importante salientar que os camundongos com deleção gênica da enzima caspase-1 também apresentam deleção da enzima caspase-11. Camundongos expressando a caspase 1/11 (Cas1/11^{+/+}) foram utilizados como controles, sendo que, a nocicepção e edema foram induzidos pela administração subcutânea de BjV de maneira semelhante à descrita anteriormente e foram utilizados os mesmos testes comportamentais que já foram descritos anteriormente.

Com o intuito de avaliar o envolvimento dos TLRs no desenvolvimento de nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.), foram utilizados camundongos C57BL/6 com deleção gênica do TLR2 (TLR2^{-/-}) ou com deleção gênica do (TLR4^{-/-}). Camundongos expressando os TLRs (TLR^{+/+}) foram utilizados como controle e a nocicepção e edema foram induzidos pela administração subcutânea de BjV de maneira semelhante à descrita anteriormente. Foram utilizados os mesmos testes comportamentais que já foram descritos anteriormente.

3.6. Investigação do envolvimento dos canais TRPV1 e TRPA1 na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (BjV)

3.6.1. Desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas

Para investigar o papel das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas na nocicepção e edema induzidos pelo BjV, os animais foram submetidos ao protocolo de desfuncionalização dessas fibras induzida pelo tratamento sistêmico com resiniferatoxina (RTX), baseado em Riol-Blanco e colaboradores (2014). Para isso, camundongos C57BL/6 foram tratados com RTX ou veículo (solução salina) por via s.c. nas seguintes doses e de acordo com o seguinte

protocolo experimental: dia 1 (30 µg/kg, s.c.); dia 2 (70 µg/kg, s.c.); dia 3 (100 µg/kg, s.c.). A dose total utilizada em cada dia foi dividida e administrada duas vezes ao dia. Com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de falência respiratória, a qual pode ser potencialmente promovida pela RTX, um coquetel contendo fármacos broncodilatadores foi utilizado, consistindo de 0,4 ml Terbutalina (0.5 mg/ml) + 0,2 ml Atropina (1 mg/ml) + 0,4 ml Aminofilina (240 mg/5 ml) + 9 ml de solução fisiológica. Desses 10 ml de coquetel, foram administrados 0,1 ml/10 g de peso corporal para cada camundongo, por via intraperitoneal (i.p.), imediatamente antes da primeira injeção de RTX. Para confirmar a desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas, foi realizado o teste de estimulação corneal com alil isotiocianato ou capsaicina, conforme descrito a seguir.

3.6.2. Teste de estimulação corneal

Afim de confirmar a desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas, foi realizado, 7 dias após a primeira injeção de RTX ou veículo (salina), o teste de estimulação corneal com alil isotiocianato ou capsaicina, semelhante ao descrito por Brittain et al., 2011 e Farazifard et al., 2005. Esse teste consiste na aplicação de solução salina (50 µl) ou do agonista TRPA1 alil isotiocianato (AITC, 50 µl, 1 mM) ou do agonista TRPV1 capsaicina (CPS, 50 µl, 100 µM) no olho dos animais. Após a aplicação das soluções, os animais foram alocados, individualmente, embaixo de funis de vidro transparente e o número (n) de comportamentos de limpeza do olho (do inglês *eye wiping*) foi contabilizado durante um período de 1 minuto. Os resultados foram expressos como número de comportamentos de limpeza do olho e para os animais previamente tratados com RTX, apenas aqueles que apresentaram uma redução significativa desse comportamento após aplicação dos agonistas dos canais TRPV1 e TRPA1 foram utilizados para avaliação da nocicepção e edema induzidos pelo BjV.

3.6.3. Efeito da deleção gênica ou do antagonismo dos canais TRPV1 ou TRPA1 na nocicepção e edema induzidos pelo BjV

Ainda com o objetivo de avaliar o envolvimento dos canais TRPV1 ou TRPA1 no desenvolvimento de nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.), foram utilizados camundongos C57BL/6 com deleção gênica dos canais TRPV1 (TRPV1^{-/-}) ou com deleção gênica dos canais TRPA1 (TRPA1^{-/-}). É importante salientar que camundongos expressando os canais TRPV1 (TRPV1^{+/+}) e TRPA1 (TRPA1^{+/+}) foram utilizados como controles e que a nocicepção e edema foram induzidos pelo BjV de maneira semelhante à descrita anteriormente e avaliados utilizando os mesmos testes comportamentais que já foram descritos. Ainda com o intuito de avaliar o envolvimento dos canais TRPV1 ou TRPA1 na nocicepção e edema induzidos pelo BjV (1 µg/pata, s.c.), os animais receberam uma co-administração subcutânea do veneno com o antagonista seletivo dos canais TRPV1, o SB-366791 (1 nmol/pata, s.c.) ou com o antagonista seletivo dos canais TRPA1, o A-967079 (10 µg/pata, s.c.), sendo que os animais pertencentes ao grupo controle receberam uma co-administração do BjV (1 µg/pata, s.c.) com veículo. Imediatamente após os tratamentos, os animais foram avaliados utilizando os mesmos testes comportamentais e tempos de avaliação descritos anteriormente. Em uma outra abordagem, os animais foram tratados com A-967079 (10 µg/pata, s.c.) 1 hora após a administração do BjV (1 µg/pata, s.c.), sendo a hiperalgesia mecânica, o comportamento afetivo-motivacional, a alodínia térmica ao frio e o desenvolvimento de edema avaliados até 2 horas após o tratamento com A-967079.

3.6.4. Cultura de células HEK293 e isolamento de neurônios sensoriais primários

Com o objetivo de avaliar a capacidade do BjV em promover uma ativação direta dos canais TRPV1 ou TRPA1, foi realizada a avaliação do influxo de cálcio induzida pelo BjV em cultura de células endoteliais de rim humano (do inglês, *Human Endothelial Kidney*, HEK293) e em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos e camundongos.

Células HEK293 não transfectadas (*American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA; ATCC® CRL-1573™) foram mantida em cultura seguindo as instruções do fabricante. Células HEK293 estavelmente transfectadas com o cDNA do canal TRPV1 (hTRPV1-HEK293, gentilmente doadas por M. J. Gunthorpe, GlaxoSmithKline, Harlow, Reino Unido) ou com o cDNA do canal TRPA1 de humanos (hTRPA1-HEK293, gentilmente doadas pelo Professor A.H. Morice, University of Hull, Hull, Reino Unido), foram mantidas em cultura conforme descrito previamente (NASSINI et al., 2015), em atmosfera contendo 5% de CO₂ à 37°C.

Neurônios do gânglio da raiz dorsal foram isolados de ratos Sprague-Dawley, de camundongos sem deleção gênica dos canais TRPA1 (TRPA1^{+/+}) e de camundongos com deleção gênica dos canais TRPA1 (TRPA1^{-/-}), sendo mantidos em cultura conforme descrito por Materazzi et al (2012). Resumidamente, os animais foram ortotanasiados com auxílio de uma guilhotina e foram devidamente dissecados para se ter acesso aos gânglios da raiz dorsal. Posteriormente, com auxílio de um microscópio, os gânglios da raiz dorsal foram removidos individualmente de forma bilateral. Imediatamente após a remoção, os gânglios da raiz dorsal foram transferidos para um meio de Hank (do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS) contendo 2mg/ml de colagenase tipo 1A e 1 mg/ml de tripsina (para os gânglios de ratos) ou papaína 1 mg/ml (para os gânglios de camundongos), para realização da digestão enzimática (por 30 minutos à 37°C). Em seguida, os gânglios foram transferidos para o meio de Eagle modificado (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) (para os gânglios de ratos) ou meio Ham's F12 (para os gânglios de camundongos) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 10% de soro de cavalo (apenas para os gânglios de ratos), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina. Posteriormente, foi feita a dissociação mecânica dos gânglios por meio da sua passagem por uma série de seringas de diferentes espessuras (23-25 G). O meio de cultura e os gânglios já dissociados foram filtrados para remoção de debris e foram, posteriormente, centrifugados (por 6 minutos à 1200 r.p.m). Após a centrifugação, o *pellet* obtido foi ressuspenso em DMEM com a

adição de 100 ng/ml de fator de crescimento do nervo (do inglês, *nerve growth factor*, *NGF*) (apenas para os gânglios de ratos) e 2,5 mM citosina-b-D-arabinofuranosídeo (ARA-C). Os neurônios do gânglio da raiz dorsal foram plaqueados em lamínulas de vidro de 25 mm de diâmetro previamente revestidas com poli-L-lisina (8,3 μ M) e laminina (5 μ M) e mantidos em cultura por 2-3 dias até serem utilizados para os experimentos de influxo de cálcio.

3.6.5. Ensaios de imageamento de influxo de cálcio

A investigação do influxo de cálcio induzido pelo BJV foi realizada nas culturas de células HEK não-transfectadas, células HEK293 transfectadas com os canais TRPV1 ou TRPA1 e também nas culturas primárias de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos e de camundongos TRPA1^{+/+} e TRPA1^{-/-}, preparadas e mantidas em cultura conforme descrito anteriormente. As células plaqueadas foram carregadas com a sonda fluorescente FURA-2 AM-éster (5 μ M) (Alexis Biochemicals; Lausen, Suíça), a qual foi adicionada na solução tampão contendo 2 mM de CaCl₂; 5,4 mM KCl; 0,4 mM de MgSO₄; 135 mM de NaCl; 10 mM de D-glucose; 10 mM de HEPES e 0,1% de soro albumina bovina (SAB) em pH 7,4. Aproximadamente 40 minutos após serem carregadas com FURA-2 AM-éster, as células foram lavadas e transferidas para uma câmara acoplada a um microscópio *Nikon Eclipse TE-200 U* utilizado para os registros de influxo de cálcio. As células foram excitadas alternativamente à 340 e 380 nm e um sistema de análise dinâmico de imagens (Laboratory Automation 2.0; RCSsoftware, Florence, Italy) foi utilizado para determinar as alterações relativas no cálcio intracelular pela razão das respostas obtidas à 340 nm e à 380 nm (Razão_{340/380}). Com o objetivo de promover um influxo de cálcio dependente dos canais TRPV1 ou TRPA1 as células HEK293 e as culturas primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos e camundongos TRPA1^{+/+} e TRPA1^{-/-} foram desafiados com agonistas seletivos desses canais, capsaicina (CPS, agonista TRPV1, 0,1 μ M) ou alil isotiocianato (AITC, agonista TRPA1, 10 μ M) ou dimetilsulfóxido (DMSO, 0,3%, usado como veículo). As células HEK293 e os neurônios do gânglio da raiz dorsal também foram desafiados com BJV (0,05 – 1 mg/ml,

concentração final). Em outro grupo de experimentos as células HEK293 e os neurônios do gânglios dorsal de ratos foram preexpostos ao antagonista seletivo dos canais TRPA1, HC-030031 (10 μM) ou ao antagonista seletivo dos canais TRPV1, capsazepina (CPZ, 10 μM) ou dimetilsulfóxido (DMSO, 0,3%, usado como veículo) e depois de pelo menos 5 minutos foram desafiados com os respectivos agonistas (CPS, agonista TRPV1, 0,1 μM ou AITC, agonista TRPA1, 10 μM) ou com BjV (1 mg/ml). Os resultados foram expressos como a porcentagem de alteração na Razão_{340/380}, normalizados pela resposta máxima induzida pela ionomicina (5 μM), adicionada ao final de cada experimento.

3.7. Investigação dos componentes do veneno da *Bothrops jararaca* envolvidos com o seu efeito nociceptivo e desenvolvimento de edema

3.7.1. Fervura, congelamento e diálise do veneno da *Bothrops jararaca*

Com o objetivo de investigar a contribuição de moléculas termolábeis presentes no veneno para o desenvolvimento de suas respostas nociceptivas e de edema, o BjV (1 $\mu\text{g/pata}$) foi submetido a um processo de fervura por 15 minutos à temperatura de 96 °C (GEWEHR et al., 2013) ou à um processo de congelamento por 24 horas à -20°C, previamente a sua administração subcutânea. Para investigar o envolvimento de moléculas de baixo peso molecular no desenvolvimento da nocicepção e edema induzidos pelo veneno, o BjV (2 ml de uma solução 1 mg/ml) foi dialisado por 24 horas à 4-6 °C utilizando uma membrana de diálise capaz de reter moléculas maiores que 14 kDa (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e 2 L de tampão fosfato (do inglês, *Phosphate Buffer Solution*, PBS) como solução de diálise. Essa solução foi trocada em 2, 4, 6, 8, 10 e 22 horas após o início da diálise (GEWEHR et al., 2013). Após 24 horas, o BjV dialisado foi diluído para sua dose final (1 $\mu\text{g/pata}$) e administrado por via subcutânea nos animais, sendo utilizados os mesmos testes comportamentais e tempos de

avaliação descritos anteriormente para avaliação da nocicepção e edema.

3.7.2. Contribuição de componentes enzimáticos do BjV para o desenvolvimento de sua nocicepção e edema

Com o objetivo de investigar a contribuição de componentes enzimáticos do veneno para seu efeito nociceptivo e edema, o BjV (1 mg/ml) foi incubado por 1 hora à 37 °C, com o inibidor de metaloproteases, 1,10-Fenantrolina (10 mM) ou com o inibidor de serinoproteases, AEBSF (1 mM) (ZYCHAR et al, 2010) ou com o inibidor de fosfolipase A₂, pBPB (174 µM). Após essa incubação com os respectivos inibidores, o BjV foi diluído para sua dose final (1 µg/pata) e administrado por via subcutânea nos animais. O grupo controle foi administrado com BjV (1 µg/pata) previamente incubado por 1 hora à 37 °C, no entanto sem a presença de inibidores enzimáticos. É importante salientar que foram utilizados os mesmos testes comportamentais e tempos de avaliação descritos anteriormente para avaliação da nocicepção e edema.

3.7.3. Determinação das atividades enzimáticas do veneno da *Bothrops jararaca*

As atividades enzimáticas de metaloproteases, serinoprotease, fosfolipase A₂, e L-aminoácido oxidase (LAAO) foram determinadas em amostras do BjV controle (0,05 mg/ml) e em amostras do BjV submetidas aos processos de fervura, congelamento ou diálise, bem como nas amostras de BjV incubadas com os inibidores enzimáticos de metaloproteases, serinoprotease ou fosfolipase A₂.

Resumidamente, a atividade enzimática de metaloprotease foi determinada utilizando o ensaio da azocaseína, conforme descrito por Escalante e colaboradores (2011), com pequenas modificações. As amostras de BjV foram diluídas em tampão Tris-HCl (25 mM, pH 7,4, concentração final de 0,05 mg/ml) e incubadas por 90 minutos à 37°C com diferentes concentrações de azocaseína (0,12 – 7,5 mg/ml, diluída em tampão Tris-HCl 25 mM adicionado

com CaCl_2 , 10 mM, pH 7,4). Após os 90 minutos, 200 μL de ácido tricloriacético (5%) foram adicionados e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 3700 r.p.m. Após a centrifugação, 100 μL do sobrenadante obtido foi misturado à 100 μL de NaOH 0,5 M. A absorbância foi medida à 450 nm usando um espectrofotômetro (Spectramax Paradigm, Multi-Mode Detection Plataforma, Molecular Devices, USA).

A atividade enzimática de serinoproteases foi determinada pelo ensaio de hidrólise do substrato cromogênico BAPNA ($\text{N}\alpha$ -Benzoil-DL-Arginina *p*-Nitroanilida) (VILCA-QUISPE et al., 2010; ERLANGER et al., 1961). As amostras de BjV foram diluídas em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 8,0, concentração final de 0,05 mg/ml) e incubadas à 37°C com diferentes concentrações de BAPNA (0,187 – 6 mM, diluída em tampão Tris-HCl 10 mM adicionado com CaCl_2 , 10 mM, pH 8,0). A absorbância foi medida à 405 nm a cada 10 minutos por 40 minutos, utilizando o mesmo espectrofotômetro descrito anteriormente.

A atividade enzimática de fosfolipase A_2 foi realizada de acordo com Holzer e Mackessy (1996). As amostras de BjV foram diluídas (concentração final de 0,05 mg/ml) em tampão Tris-HCl (10 mM adicionado com CaCl_2 10 mM e NaCl 100 mM, pH 8,0), combinadas a 100 μl do substrato ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico (3 mM, diluído em acetonitrila) e incubadas por 20 minutos à 37° C. Para parar a reação as amostras foram colocadas em gelo e 100 μl de Triton X-100 (2,5% preparado em H_2O destilada) foi adicionado. Em seguida as amostras foram deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância foi medida à 425 nm utilizando o mesmo espectrofotômetro descrito anteriormente.

A atividade enzimática da L-aminoácido oxidase foi determinada de acordo com Ciscotto et al (2009). Resumidamente, uma mistura contendo peroxidase (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 18,4 mM), L-leucina (20 μM) e amostras do BjV (concentração final de 0,05 mg/ml) foi preparada em tampão TRIS-HCl (0,1 M, pH 8,0), em um volume final de 100 μl . Essa

mistura foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e a absorbância foi medida à 436 nm após 30 minutos, utilizando o mesmo espectrofotômetro descrito anteriormente.

Para todas as atividade enzimáticas descritas anteriormente os ensaios foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Além disso, os valores obtidos para cada amostra foram corrigidos pelo tempo total da reação e também pela concentração de proteínas em cada amostra.

3.7.4. Determinação da concentração de proteínas

As concentrações de proteínas nas amostras de BjV foram determinadas de acordo com Bradford (1976), estimadas através da interpolação dos valores à uma curva padrão de soro albumina bovina (SAB). O ensaio colorimétrico foi realizado utilizando o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), sendo a absorbância medida à 595 nm utilizando o mesmo espectrofotômetro descrito anteriormente.

3.7.5. Separação cromatográfica do veneno bruto da *Bothrops jararaca*

A separação dos componentes do veneno da *Bothrops jararaca* foi realizada de acordo com Ciscotto et al (2009), utilizando colunas de gel filtração (Superdex™ 75 HR10/30 Pharmacia, 10 mm de diâmetro) operadas por um sistema de cromatografia líquida de rápida performance (do inglês, *Fast Performance Liquid Chromatography*, FPLC, Pharmacia). O BjV (10 mg) foi primeiramente solubilizado em 0,5 ml de tampão de eluição (Formiato de amônio 0,15 M, pH 6,0) e posteriormente aplicado às colunas previamente equilibradas com o tampão e sob um fluxo de eluição de 0,5 ml/minuto. Os produtos obtidos a partir da eluição foram coletados em frações de 1,5 ml. Essas frações foram agrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos (P1 – P5), determinados pelo registro da absorbância à 280 nm. Em seguida as frações foram liofilizadas e estocadas à -80 °C até serem utilizadas para os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Nos ensaios *in vitro*, em cada uma das frações isoladas do veneno da bruto da *Bothrops jararaca*, foram determinadas as atividades enzimáticas de metaloprotease, serinoprotease, fosfolipase A₂ e LAAO. Os ensaios enzimáticos utilizados foram os mesmos descritos anteriormente, sendo que a concentração final de cada uma das frações em cada um dos ensaios foi de 2 mg/ml. Por fim, os valores obtidos para cada fração foram corrigidos pelo tempo total da reação e também pela concentração de proteínas presente em cada fração.

3.7.6. Nocicepção e edema induzidos pelas frações isoladas do veneno bruto da *Bothrops jararaca*

Após a separação cromatográfica dos componentes do BjV, procurou-se avaliar o desenvolvimento de comportamento nociceptivo e de edema induzidos pela administração subcutânea das frações obtidas do veneno nas seguintes doses: Fração P1 (0,5 µg/pata, s.c.), Fração P2 (3 µg/pata, s.c.), Fração P3 (1 µg/pata, s.c.), Fração P4 (1,1 µg/pata, s.c.) e Fração P5 (0,3 µg/pata, s.c.). Cabe salientar que essas doses são proporcionais às concentrações das respectivas frações utilizadas nos ensaios *in vitro* para determinação de suas atividades enzimáticas. Imediatamente após a administração de cada uma das frações ou do seu veículo (tampão de eluição utilizado na separação das frações), foi avaliada a resposta nociceptiva espontânea aguda. Além disso, a hiperalgesia mecânica e a alodínia térmica ao frio, bem como o desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional e de edema, foram avaliados de 1 à 6 horas após a injeção das frações. Os resultados foram expressos como somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (para nocicepção espontânea aguda) e de 1 à 6 horas (para os demais parâmetros avaliados).

3.8. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média±erro padrão da média (E.P.M.). O teste de Grubbs foi utilizado para detecção de possíveis valores *outliers*, sendo que os valores identificados como tal foram excluídos das análises estatísticas. As análises estatísticas

foram realizadas, conforme a necessidade, por meio do teste t de Student's, análise de variância (ANOVA) de uma via seguidas pelos testes *post hoc* de Dunett, ANOVA de duas vias com ou sem medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. O nível de diferença estatística foi considerado significativo quando os valores de p encontrados foram menores que 0,05 ($p < 0,05$). Os dados obtidos nos experimentos realizados para avaliar a hiperalgesia mecânica, por meio do teste de von Frey, foram transformados e expressos como logaritmo com o intuito de atender aos critérios para realização de análise estatística paramétrica. A análise dos dados, bem como a confecção dos gráficos foram realizadas com o auxílio do *software* Graph Pad Prism (2005, San Diego, CA) versão 5.03.

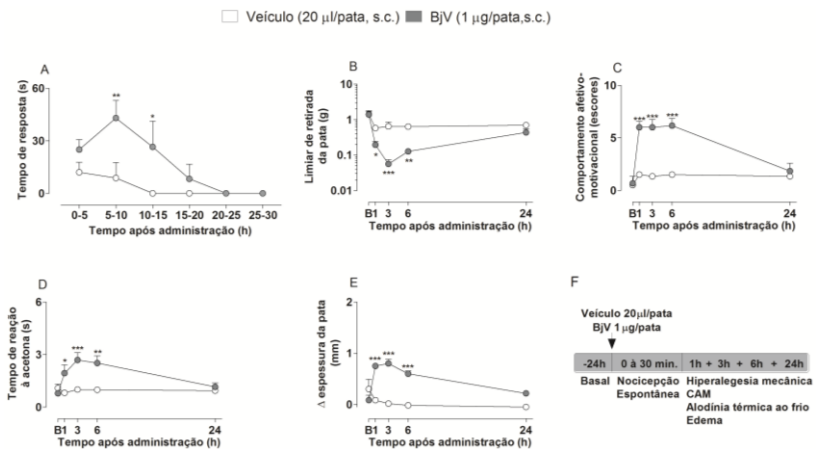
4. Resultados

4.1. Caracterização da nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (BjV)

Inicialmente foi caracterizado o decurso temporal da nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea de BjV em camundongos machos. A dose de BjV utilizada para esse primeiro ensaio foi de 1 $\mu\text{g/pata}$, baseado em resultados prévios do grupo de pesquisa (NASCIMENTO, 2015). De acordo com os resultados da Figura 1A, a injeção subcutânea de BjV (1 $\mu\text{g/pata}$) induziu comportamento nociceptivo espontâneo (lamber a pata) imediatamente após a sua injeção, apresentado um pico de resposta de 5-10 minutos após a administração e um somatório de nocicepção até 15 minutos de $68,3 \pm 8,4$ s. Cabe salientar que, 15 minutos após sua administração subcutânea, o comportamento nociceptivo espontâneo induzido pelo BjV não diferiu daquele observado nos animais administrados com veículo. Portanto, para os experimentos subsequentes, os resultados obtidos para esse parâmetro comportamental foram expressos como o somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos após as injeções subcutâneas.

A administração subcutânea do BjV (1 µg/pata) também induziu o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, observada inicialmente após 1 hora, apresentando pico de efeito 3 horas e durando até 6 horas após a sua administração (Figura 1B). No pico, a redução no limiar de retirada da pata frente a estimulação com filamentos de von Frey foi de $68,9 \pm 11,6\%$. Além da retirada de pata, a aplicação dos filamentos induziu comportamentos relacionados a aspectos afetivo-motivacionais (CAM) da nocicepção de 1 a 6 horas após o tratamento com BjV (1 µg/pata, s.c.)(Figura 1C). Ainda, a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata) induziu o desenvolvimento de alodínia térmica ao frio, iniciando uma hora, apresentando pico de efeito 3 horas e durando 6 após a sua administração. No pico foi observado um incremento no tempo de reação à acetona de $105,5 \pm 40,3\%$ (Figure 1D). Por fim, também foi observado desenvolvimento de edema após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), apresentando pico de efeito em 1 hora após a injeção (incremento na espessura da pata de $1,92 \pm 0,08$ mm) (Figure 1E). Cabe salientar que, 24 horas após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), as respostas obtidas para todos os parâmetros nociceptivos voltaram aos seus valores basais. Sendo assim, para os experimentos subsequentes, os resultados da hiperalgesia mecânica, do comportamento afetivo motivacional (CAM), da alodínia ao frio e do edema, foram expressos como o somatório das respostas obtidas 1 , 3 e 6 horas após as injeções subcutâneas.

Figura 1. Curva de tempo para nociceção e edema induzidos pela injeção subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (1 µg/pata) em camundongos. (A) Nociceção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Hiperalgesia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M., sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo veículo (20 µl/pata). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.



Posteriormente, estimamos a potência e a eficácia do BjV em produzir nociceção e edema a partir de uma curva dose-resposta (0,05, 1 e 20 µg/pata) (Figura 2). Para a nociceção espontânea (Figura 2A) o valor estimado de dose-efetiva 50 (DE₅₀) foi de 0,1 (0,04 – 0,5) µg/pata e um efeito máximo (E_{máx}) de 70,3±12,2 s (incrementos no tempo de resposta nociceptiva de 402,6±104,5% em relação à resposta obtida com a administração subcutânea de veículo). De acordo com a Figura 2B, a injeção

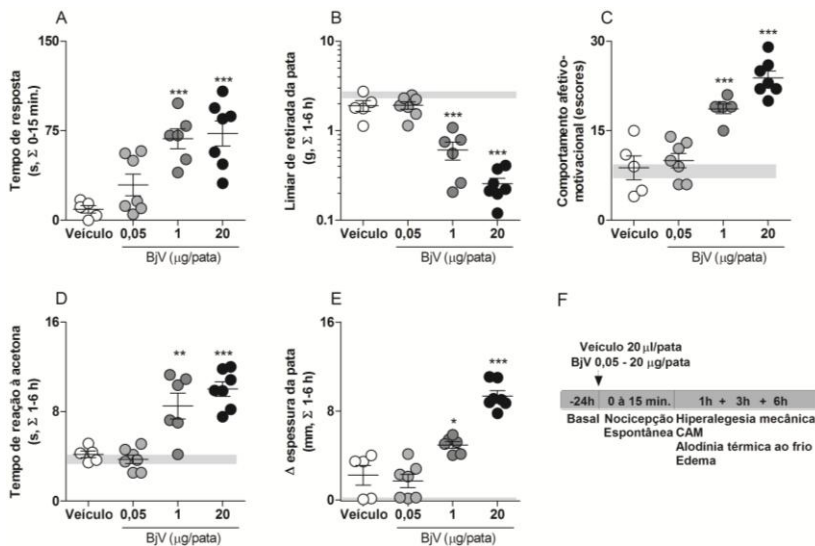
subcutânea de BjV promoveu o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica com valor de DE_{50} de 0,6 (0,3 – 1,5) $\mu\text{g/pata}$ e $E_{\text{máx}}$ de $0,26 \pm 0,04$ g (redução no limiar de retirada da pata de $85,0 \pm 2,6\%$ em relação à resposta obtida com a administração subcutânea de veículo). O desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional (CAM) induzido pelo BjV (Figura 2C) teve valor de DE_{50} de 0,6 (0,2 – 1,7) $\mu\text{g/pata}$ e $E_{\text{máx}}$ de $23,0 \pm 0,9$ (incremento nos escores indicativos do CAM de $115,5 \pm 8,4\%$ em relação à resposta obtida com a administração subcutânea de veículo). Para alodínia térmica ao frio (Figura 2D), o valor de DE_{50} foi 1,0 (0,1 – 9,5) $\mu\text{g/pata}$ e $E_{\text{máx}}$ de $10,3 \pm 0,6$ s (incremento nos tempos de reação à acetona $86,2 \pm 12,1\%$, em relação à resposta obtida com a administração subcutânea de veículo). Finalmente, para o edema (Figura 2E) a DE_{50} foi de 0,9 (0,1 – 6,0) $\mu\text{g/pata}$ e $E_{\text{máx}}$ de $9,4 \pm 0,5$ mm (incremento na espessura da pata de $390,8 \pm 28,3\%$ em relação à resposta obtida com a administração subcutânea de veículo).

Cabe salientar que, para a resposta da maioria dos parâmetros estudados, não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses de 1 e 20 $\mu\text{g/pata}$ de BjV. Além disso, a dose de 1 $\mu\text{g/pata}$ de BjV induziu um quadro de intoxicação considerado leve, com desenvolvimento de edema e hemorragia local (dados não mostrados) discretos e restritos ao local da injeção. Por outro lado a dose de 20 $\mu\text{g/pata}$ de BjV induziu um quadro de intoxicação considerado moderado à grave, com desenvolvimento de edema e hemorragia local graves, que não ficaram restritos ao local da injeção e desapareceram somente 72 horas após a administração subcutânea (dados não mostrados). Cabe salientar que cerca de 80% dos quadros de intoxicação causados pelo BjV são classificados como leve. Assim, com intuito de induzir um quadro mais frequente ao que se apresenta em seres humanos e para evitar estresse excessivo e desnecessário nos camundongos estudados, selecionamos a dose de 1 $\mu\text{g/pata}$ de BjV para os experimentos seguintes.

Posteriormente comparamos as respostas investigadas previamente em camundongos macho com fêmeas. A nocicepção e edema induzidos pelo BjV (1 $\mu\text{g/pata}$) foi semelhante entre

camundongos machos e fêmeas, não havendo diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros, conforme apresentado na Figura Suplementar 1. Considerando estes resultados e o fato de que homens correspondem a mais de 70% das vítimas de acidentes ofídicos causados pela *Bothrops jararaca*, optamos pela utilização de camundongos machos para realização dos experimentos subsequentes.

Figura 2. Curva dose-resposta para nocicepção e edema induzidos pela injeção subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (0,05 - 20 µg/pata) em camundongos. (A) Nocicepção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Hiperalgisia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nocicepção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. O teste de Grubbs foi utilizado para detecção de possíveis *outliers*, sendo encontrado e excluído um valor no grupo veículo. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunett. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo BjV (1 µg/pata) ou BjV (20 µg/pata) com o grupo veículo (20 µl/pata). **p<0,01 e ***p<0,001. A linha cinza representa média±E.P.M. dos valores basais. BjV – *Bothrops jararaca* venom; s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.



4.2. Contribuição da caspase 1/11 e dos receptores do tipo *toll* na nociceção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (BjV)

Conforme os resultados representados na Figura Suplementar 2A, a deleção gênica da caspase 1/11 reduziu significativamente o comportamento nociceptivo espontâneo induzido pelo BjV (1 µg/pata, s.c.) imediatamente após a sua injeção, promovendo uma redução no tempo de resposta nociceptiva de $60,1 \pm 11,2\%$, em relação ao grupo controle (sem deleção gênica da caspase 1/11). Por outro lado, considerando o somatório das respostas obtidas de 1 à 6 horas após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.), a deleção gênica da caspase 1/11 não foi capaz de reduzir significativamente nenhum dos demais parâmetros nociceptivos avaliados (Figura Suplemntar 2B-D) e tampouco o desenvolvimento de edema (Figura Suplementar 2E), em relação às respostas obtidas com camundongo selvagens (sem deleção gênica da caspase 1/11, $Cas^{+/+}$). Cabe salientar que a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.) em camundongos $Cas^{+/+}$ promoveu o desenvolvimento significativo de nocieção e edema, sendo que, foi obtido uma redução de

68,4±7,0% para o limiar de retirada da pata frente a estimulação com filamentos de von Frey (Figura Suplementar 2B), um incremento de 91,6±4,1% nos escores indicativos de CAM (Figura Suplementar 2C), um aumento de 76,9±12,3% no tempo de resposta nociceptiva (Figura Suplementar 2D) e um incremento de 100,4±2,7% na espessura da pata (Figura Suplementar 2E), em relação aos respectivos valores basais (representados pela linha cinza).

De acordo com a Figura Suplementar 3, o desenvolvimento de comportamento nociceptivo e de edema induzidos pelo BjV (1 µg/pata) em camundongos com deleção gênica dos receptores do tipo *toll* subtipo 2 ou do receptor do tipo *toll* subtipo 4, foram semelhantes ao observado em animais controle (sem deleção gênica dos respectivos canais, TLR^{+/+}), sendo que, considerando o somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos ou de 1 à 6 horas após a administração subcutânea do veneno, não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos TLR^{+/+} e TLR2^{-/-} ou entre os grupos TLR^{+/+} e TLR4^{-/-}, para nenhum dos parâmetros avaliados (Figura Suplementar 3A-E). É importante salientar que a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.) em camundongos TLR^{+/+} promoveu o desenvolvimento significativo de nocicepção e edema, sendo que, foi obtido uma redução de 79,7±6,1% para o limiar de retirada da pata frente a estimulação com filamentos de von Frey (Figura Suplementar 3B), um incremento de 92,3±8,4% nos escores indicativos de CAM (Figura Suplementar 3C), um aumento de 83,2±14,9% no tempo de resposta nociceptiva (Figura Suplementar 3D) e um incremento de 100,3±4,1% na espessura da pata (Figura Suplementar 3E), em relação aos respectivos valores basais (representados pela linha cinza).

4.3. Investigação do envolvimento dos canais TRPV1 e TRPA1 na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea do veneno da *Bothrops jararaca* (BjV)

Após a caracterização da nocicepção e edema induzidos pelo BjV, o protocolo proposto posteriormente foi utilizado para investigação do envolvimento dos canais TRPV1 e TRPA1 nesses efeitos promovidos pelo veneno. Neste sentido, iniciamos essa investigação com o pré tratamento dos animais com resiniferatoxina, um potente agonista dos canais TRPV1 e que classicamente é utilizada para promover a desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas.

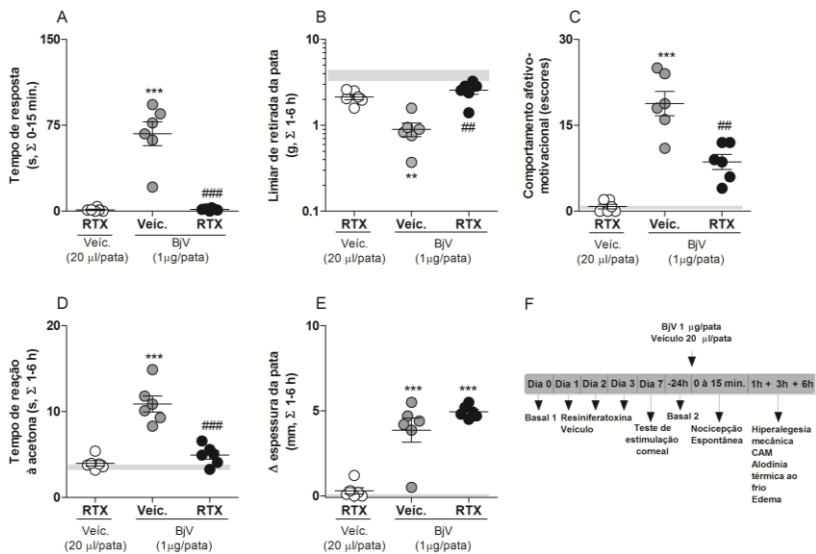
Para confirmar se o protocolo realizado promoveu desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas, foi realizado o teste de estimulação corneal com alil isotiocianato (50 μ l - 1 mM, agonista TRPA1) ou capsaicina (50 μ l - 100 μ M, agonista TRPV1) e avaliado o número de comportamentos de limpeza do olho (do inglês, *eye wiping*) após a aplicação de cada agonista. Conforme representado na Figura Suplementar 4, o pré-tratamento com resiniferatoxina preveniu 85,6 \pm 6,8% ou 93,1 \pm 2,5% o número de comportamentos de limpeza do olho após a estimulação corneal com alil isotiocianato (Figura suplementar 4A) ou capsaicina (Figura suplementar 4B), confirmando a desfuncionalização nos animais tratados. Além disto, é importante salientar que o protocolo de pré-tratamento com resiniferatoxina não promoveu alteração *per se* em nenhum dos parâmetros nociceptivos avaliados, ou seja, não alterou significativamente o limiar de retirada da pata após aplicação dos filamentos de von Frey ou os escores de comportamento afetivo-motivacional (CAM), o tempo de nocicepção ou a espessura pata (Figura 3, comparação do grupo veículo+veículo comparada com os valores basais). Após esses testes, foi realizada a administração subcutânea do BjV (1 μ g/pata, s.c.) e a subsequente avaliação da nocicepção e desenvolvimento de edema induzidos pelo veneno, conforme já descrito anteriormente.

De acordo com o resultados apresentado na Figura 3A, o pré-tratamento com resiniferatoxina praticamente aboliu a nocicepção espontânea, a hiperalgesia mecânica e a alodínia ao frio

induzidas pelo BjV (1 µg/pata, s.c.), com inibições de 99±1, 100 e 86±7%, respectivamente, em relação ao grupo pré-tratado com veículo. O pré-tratamento com resiniferatoxina também inibiu parcialmente o desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional (CAM) induzido pelo BjV (1 µg/pata, s.c.) (Figura 3C), sendo observada uma redução de 57±7% no incremento dos escores indicativos de CAM, em relação ao grupo pré-tratado com veículo. Por fim, conforme a Figure 3E, a resiniferatoxina não foi capaz de prevenir o desenvolvimento de edema induzido pelo BjV (1 µg/pata, s.c.). Esses resultados sugerem que as fibras TRPV1/TRPA1 positivas desempenham um papel importante nos comportamentos nociceptivos promovidos pelo BjV. Entretanto, com esses dados, não podemos concluir se os comportamentos nociceptivos observados são mediados individualmente por um dos canais TRPV1 ou TRPA1 ou por ambos os canais.

Figura 3. Nociceção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos pretratados com resiniferatoxina (RTX).

(A) Nociceção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Hiperalgisia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunett. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo veículo (20 µl/pata). **p<0,01 e ***p<0,001. # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo BjV RTX- com o grupo BjV RTX+. #p<0,05; ##p<0,01 e ###p<0,001. A linha cinza representa média±E.P.M. dos valores basais. BjV – *Bothrops jararaca* venom; RTX – Resniferatoxina; Veíc. Veículo; s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.



Considerando os resultados obtidos anteriormente, foram utilizados animais com deleção gênica dos canais TRPV1 ou TRPA1, bem como antagonistas seletivos dos canais TRPV1 ou TRPA1 com o objetivo de avaliar suas participações nas manifestações locais promovidas pelo BjV.

Comparados a camundongos selvagens ou ao veículo, a deleção gênica dos canais TRPV1 ou a administração subcutânea do antagonista TRPV1, SB-367079 (1 nmol/pata) não alteraram a nocicepção e o edema induzidos pelo BjV (1 μ g/pata), não havendo diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros avaliados, conforme apresentado na Figura 4 (para deleção gênica dos canais TRPV1) e Figura 5 (para o antagonista seletivo TRPV1, SB-367079). Semelhantemente, a deleção gênica dos canais TRPV4 também não reduziu o desenvolvimento de nocicepção e edema induzidos pelo BjV (1 μ g/pata), não havendo diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros avaliados (dados não mostrados).

Figura 4. Nociceção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica dos receptores de potencial transitório do tipo vanilóide 1. (A) Nociceção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (C) Hiperalgisia mecânica – Teste de von Frey; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student.* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo TRPV1^{+/+} ou TRPV1^{-/-} com seus valores basais. ***p<0,001. A linha cinza representa média±E.P.M. dos valores basais. BjV – *Bothrops jararaca* venom; TRPV1 – Receptor de Potencial Transitório tipo Vanilóide 1; s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.

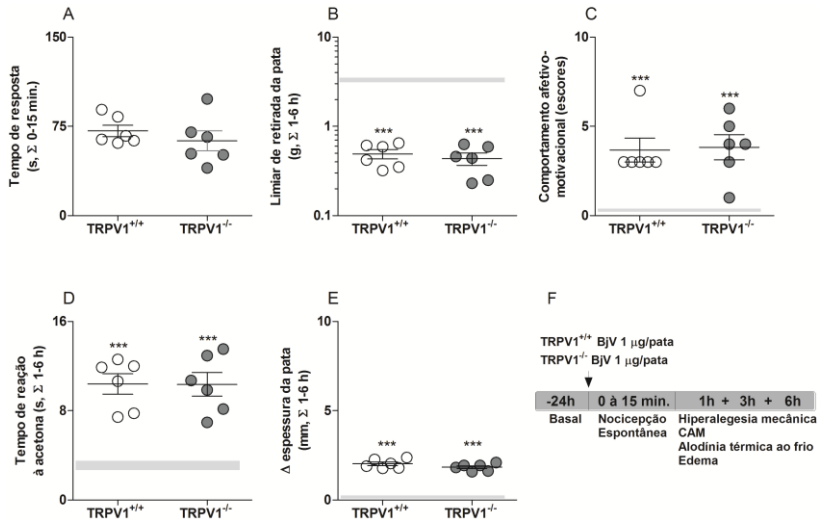
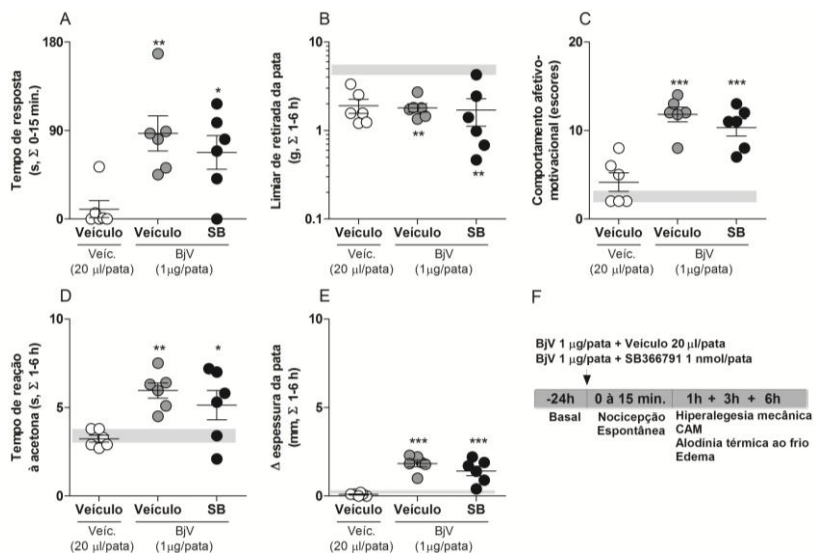
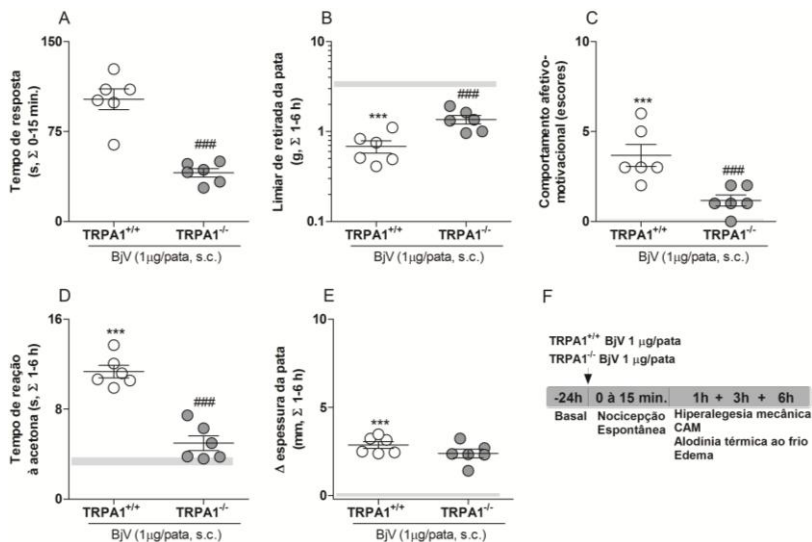


Figura 5. Efeito de um antagonista seletivo dos receptores de potencial transitório do tipo vanilóide 1 na nociceção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops Jararaca*. (A) Nociceção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Hiperalgisia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunett.* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo BjV (1 µg/pata) ao grupo veículo (20 µl/pata). *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001. A linha cinza representa média±E.P.M. dos valores basais. BjV – *Bothrops jararaca* venom; Veíc. – veículo; SB – SB367079 (antagonista TRPV1); s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.



Os resultados apresentados na Figura 6A demonstram que a deleção gênica dos canais TRPA1 reduziu significativamente ($60,2\pm 3,4\%$) o comportamento nociceptivo espontâneo induzido pelo BjV ($1\ \mu\text{g/pata}$, s.c.), em relação ao grupo controle (animais selvagens). De maneira semelhante, a deleção gênica dos canais TRPA1 também inibiu parcialmente a hiperalgesia mecânica ($43\pm 7\%$) e o comportamento afetivo-motivacional ($68\pm 8\%$) induzidos pelo pelo BjV ($1\ \mu\text{g/pata}$, s.c.) (Figura 6B-C). A deleção gênica dos canais TRPA1 inibiu amplamente ($80\pm 8\%$) a alodínia térmica ao frio induzida pelo BjV (Figura 6D). Por fim, a deleção gênica dos canais TRPA1 não foi capaz de inibir significativamente o desenvolvimento do edema induzido pelo BjV ($1\ \mu\text{g/pata}$, s.c.) (Figura 6E).

Figura 6. Nociceção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica dos receptores de potencial transitório do tipo anquirina 1. (A) Nociceção espontânea – licking; (B) Hiperalgesia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média \pm E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV ($1\ \mu\text{g/pata}$), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo TRPA1^{+/+} com seus valores basais. ***p<0,001. # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo TRPA1^{+/+} com o grupo TRPA1^{-/-}. ####p<0,001. A linha cinza representa média \pm E.P.M. dos valores basais. BjV – *Bothrops jararaca* venom; TRPA1 – Receptor de Potencial Transitório tipo Anquirina 1; s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.



Para confirmar os achados obtidos em animais com deleção gênica dos canais TRPA1, foi utilizado um antagonista seletivo desses receptores, o A-967079 (10 μ g/pata). A pré-administração subcutânea do antagonista dos canais TRPA1 inibiu parcialmente o comportamento nociceptivo espontâneo induzido pelo BjV (Figura 7A) imediatamente após a sua injeção, promovendo uma redução no tempo de resposta nociceptiva de $62,2 \pm 7,6\%$, em relação ao grupo tratado com veículo. Além disso, o A-967079 também aboliu a hiperalegesia mecânica induzida pelo BjV (1 μ g/pata, s.c.) (Figura 7B), sendo que, observada uma inibição de 100% na redução do limiar de retirada da pata frente a aplicação de filamentos de von Frey, em relação ao grupo tratado com veículo. De maneira semelhante, o A-967079 também inibiu o desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional (CAM) induzido pelo BjV (1 μ g/pata, s.c.) (Figura 7C), sendo observada uma inibição de $63,6 \pm 13,4\%$ no incremento dos escores indicativos de CAM, em relação ao grupo tratado com veículo. Ainda, o antagonista TRPA1 inibiu completamente a alodinia térmica ao frio induzida pelo BjV (1 μ g/pata, s.c.) (Figura 7D), sendo observada uma inibição de 100% no

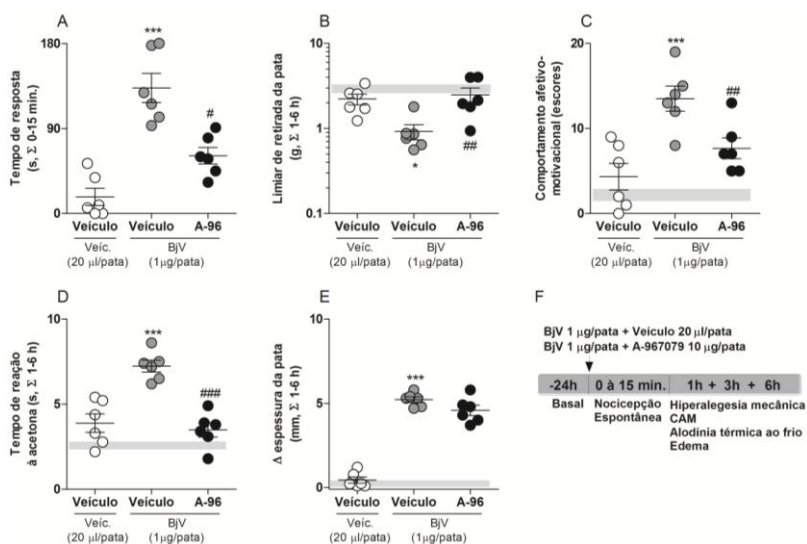
incremento do tempo de reação à acetona, em relação ao grupo tratado com veículo. Por fim, semelhantemente ao observado com o pré-tratamento com RTX e nos animais com deleção gênica do canal TRPA1, o antagonista TRPA1 A-967079, não foi capaz de prevenir significativamente o desenvolvimento do edema induzido pelo BjV (1 µg/pata, s.c.) (Figura 7E).

Cabe salientar que foi realizado o controle-positivo para o A-967079, demonstrando que o antagonista TRPA1 na mesma dose, tempo e via de tratamento inibiu significativamente a nocicepção espontânea induzida pela administração subcutânea do agonista TRPA1, o AITC (10 nmol/pata, s.c.), promovendo uma redução no tempo de resposta nociceptiva de 86±7%, em relação ao grupo tratado com veículo (dados não mostrados).

Além do A-967079, também foi utilizado um outro antagonista clássico dos canais TRPA1, o HC030031. A administração do HC030031 (100 µg/pata, s.c.) previamente ao veneno também foi capaz de prevenir o desenvolvimento de nocicepção induzido pela administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.) (dados não mostrados).

Figura 7. Efeito de um antagonista dos receptores de potencial transitório do tipo anquirina 1 na nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops Jararaca*. (A) Nocicepção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Hiperalgisia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nocicepção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao

grupo veículo (20 μ l/pata). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo veículo + BjV (1 μ g/pata) com o grupo A-96 + BjV (1 μ g/pata). # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$. A linha cinza representa média \pm E.P.M. dos valores basais. BjV – *Bothrops jararaca* venom; Veíc. – veículo; A-96 – A-967079 (antagonista TRPA1); s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.



Desta forma, o receptor TRPA1, mas não TRPV1 ou TRPV4, exercem um papel crítico no desenvolvimento da nociceção induzida pelo BjV em camundongos. Posteriormente, investigamos se o BjV poderia ativar diretamente os canais TRPA1.

4.4. O veneno da *Bothrops jararaca* promove ativação seletiva de canais TRPA1 em cultura de células HEK293 e em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal

De acordo com os resultados representados na Figura 8, o veneno da *Bothrops jararaca* (nas concentrações de 0,1 e 1 mg/ml) foi capaz de promover influxo de cálcio em cultura de células HEK293 transfectadas com o canal TRPA1 (Figura 8A). O valor de

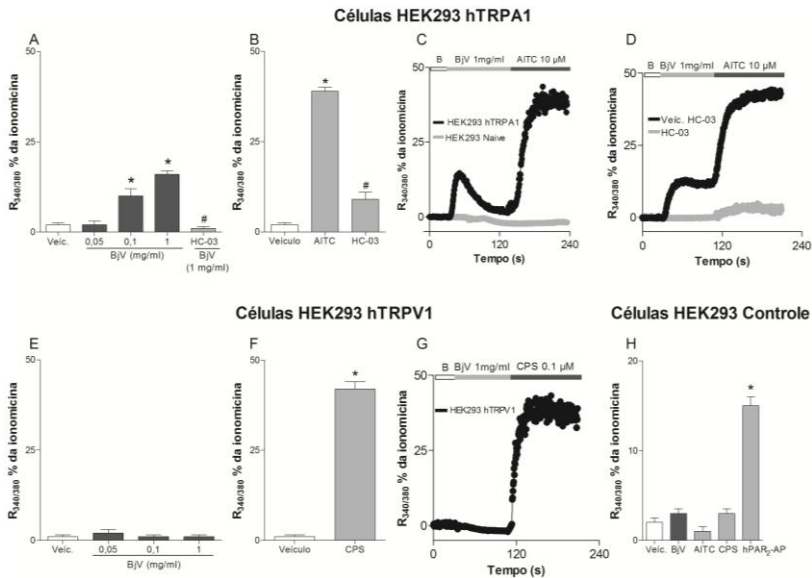
CE_{50} (IC95%) estimado a partir da curva dose-resposta foi de 0,13 (0,07 – 0,25) mg/ml, e o E_{max} de $16\pm 1\%$ do influxo total obtido após a aplicação de ionomicina. Ainda de acordo com a Figura 8A, é possível observar que o antagonista do canal TRPA1 (HC-030031, 30 μ M), aplicado à cultura previamente ao BjV, inibiu completamente o influxo de cálcio induzido pelo BjV (1 mg/ml). Na Figura 8B está representado o efeito promovido pelo agonista do canal TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μ M), o qual foi capaz de induzir um significativo influxo de cálcio, representando $39\pm 1\%$ do influxo total obtido após a aplicação da ionomicina, mostrando que as células HEK293 transfectadas com o canal TRPA1 encontravam-se perfeitamente funcionais. Além disso, a Figura 8B demonstra que o antagonista do canal TRPA1 (HC-030031, 30 μ M), aplicado à cultura previamente ao AITC (10 μ M) promoveu uma redução significativa, de $77\pm 5\%$, no influxo de cálcio promovido pelo agonista. Os traçados típicos de influxo de cálcio representados na Figura 8C reforçam os resultados obtidos anteriormente, demonstrando que, o BjV (1 mg/ml) e o agonista AITC (10 μ M) induziram influxo de cálcio nas células HEK293 transfectadas com o canal (traçado escuro) e não foram capazes de induzir influxo de cálcio nas células HEK293 não-transfectadas (traçado claro). Também, os traçados típicos de influxo de cálcio representados na Figura 8D apontam que, a aplicação do antagonista do canal TRPA1 (HC-030031, 30 μ M) bloqueou o influxo de cálcio promovido pelo BjV (1 mg/ml) ou pelo agonista TRPA1 (AITC 10 μ M) (traçado claro).

Por outro lado, o veneno da *Bothrops jararaca* não foi capaz de promover influxo de cálcio em cultura de células HEK293 transfectadas com o canal TRPV1 (Figuras 8E e 8G), em nenhuma das concentrações utilizadas (0,05 – 1 mg/ml). Já o agonista do canal TRPV1 (CPS, capsaicina, 0,1 μ M), foi capaz de induzir um significativo influxo de cálcio, representando $42\pm 2\%$ do influxo total obtido após a aplicação da ionomicina (Figura 8F e 8G), mostrando que as células HEK293 transfectadas com o canal TRPV1 encontravam-se perfeitamente funcionais. Por fim, os resultados expressos na Figura 8H demonstram que o influxo de cálcio em células HEK293 não-transfectadas foi possível apenas com a

aplicação do hPAR2-AP (do inglês *Human Proteinase Receptor 2 Activator Peptide*), enquanto que a aplicação do BjV (1 mg/ml), do agonista TRPA1 (AITC 10 μ M), ou do agonista TRPV1 (Capsaicina 0,1 μ M) não promoveram influxo de cálcio em células HEK293 não-transfectadas, demonstrando as especificidades de suas respostas nas células HEK293 transfectadas.

Figura 8. Influxo de Ca^{2+} em cultura de células HEK293 transfectadas com o canal TRPA1 ou TRPV1. (A) Influxo de cálcio em cultura de células HEK293 hTRPA1 induzido pelo veneno da *Bothrops jararaca* (0,05 – 1 mg/ml) e (B) pelo agonista TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μ M) na presença do antagonista do canal TRPA1 (HC-030031, 30 μ M) . (C) Traçado típico da resposta promovida pelo veneno da *Bothrops jararaca* (1 mg/ml) e pelo agonista TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μ M) em cultura de células HEK293 transfectadas (traçado escuro) ou não transfectada (traçado claro) com o canal TRPA1 e (D) em cultura de células HEK293 transfectadas com o canal TRPA1 na presença (traçado claro) do antagonista TRPA1 (HC-030031, 30 μ M) ou do seu veículo (traçado escuro). (E) Influxo de cálcio em cultura de células HEK293 hTRPV1 na presença do veneno da *Bothrops jararaca* (0,05 – 1 mg/ml) e (F) do agonista TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μ M). (G) Traçado típico da resposta promovida pelo veneno da *Bothrops jararaca* (1 mg/ml) e pelo agonista TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μ M) em cultura de células HEK293 transfectadas com o canal TRPV1. (H) Influxo de cálcio em cultura de células HEK293 não-transfectadas na presença do veneno da *Bothrops jararaca* (BjV 1 mg/ml), do agonista TRPA1 (AITC 10 μ M), do agonista TRPV1 (CPS 0,1 μ M) ou do peptídeo ativador de receptores ativados por proteinases humanas (hPAR2-AP 50 μ M). Os dados estão representados como média \pm E.P.M. Análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student (F) ou ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni para múltiplas comparações (A, B, E, H). * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo veículo. *p<0,05. # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado

com o grupo BjV 1 mg/ml ou AITC. # $p < 0,05$. HEK293 – do inglês *Human Endothelial Kidney*; hTRPA1 - do inglês *Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1*; hTRPV1 - do inglês *Human Transient Receptor Potential Vanilloid 1*; TRPA1 KO – do inglês *Transient Receptor Potential Ankyrin 1 knockout*; BjV – Veneno da *Bothrops jararaca*; AITC – Alil isotiocianato; CPS – Capsaicina; hPAR2-AP – do inglês *Human Proteinase Receptor 2 Activator Peptide*.



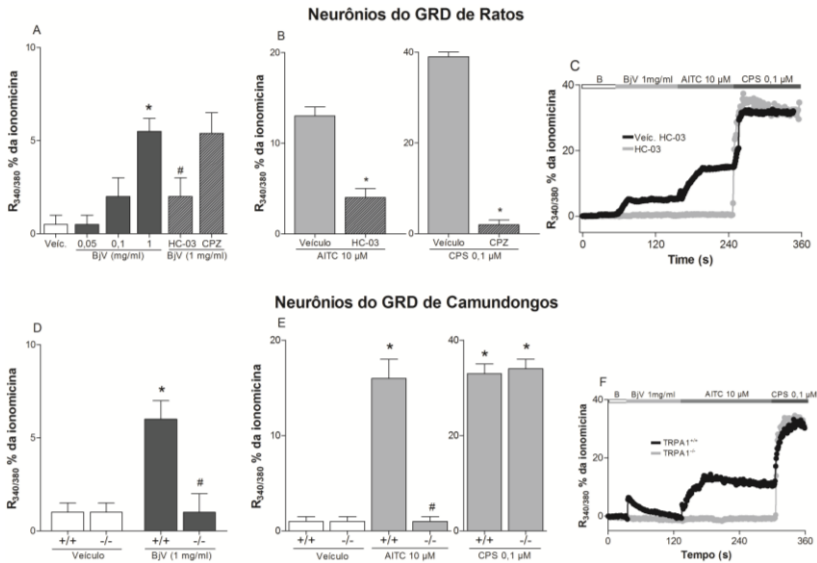
Para comparar os resultados obtidos por expressão heteróloga do TRPA1 com a expressão nativa, foi avaliada a capacidade do BjV em promover influxo de cálcio em culturas primárias de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) ratos. De um total de 89 neurônios observados, 57% foram sensíveis a capsaicina, 41% foram sensíveis ao AITC e 28% foram ativados pelo BjV (3 experimentos em dias independentes realizados em triplicata). Ainda, cabe salientar que todos os neurônios BjV positivos também foram TRPV1 e TRPA1 positivos. Conforme demonstrado na Figura 9A, o BjV foi capaz de promover influxo de cálcio em cultura primária de neurônios do GRD de ratos, com valor de CE_{50} estimado

de 0,13 (0,02 – 0,6) mg/ml e $E_{\text{máx}}$ de 5,5±0,7% do influxo total obtido após a aplicação de ionomicina. Ainda de acordo com a Figura 9A, é possível observar que o antagonista do canal TRPA1 (HC-030031, 30 μM), aplicado à cultura previamente ao BjV, promoveu uma inibição de 70±20% no influxo de cálcio induzido pelo BjV (1 mg/ml), enquanto que o antagonista TRPV1 (CPZ, Capsazepina 10 μM) não foi capaz de alterar significativamente o influxo de cálcio induzido pelo BjV (1 mg/ml). Na Figura 9B estão representados os efeitos promovidos pelos agonistas dos canais TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μM) e TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μM) os quais induziram influxos significativos de cálcio, representando, respectivamente 13±1% e 39±1% do influxo total obtido após a aplicação da ionomicina, mostrando que os neurônios do GRD de ratos encontravam-se perfeitamente responsivos a ativação dos canais TRPA1 e TRPV1. Além disso, a Figura 9B demonstra que o antagonista do canal TRPA1 (HC-030031, 30 μM), aplicado à cultura previamente ao AITC (10 μM) promoveu uma redução significativa, de 69±8%, no influxo de cálcio promovido pelo agonista, demonstrando que o HC-030031, na concentração utilizada, encontrava-se funcional. Semelhantemente, o antagonista do canal TRPV1 (CPZ, 10 μM), aplicado à cultura previamente à capsaicina (0,1 μM) promoveu uma redução significativa, de 95±2%, no influxo de cálcio promovido pelo agonista, demonstrando que a CPZ, na concentração utilizada, encontrava-se funcional. Além disso, os traçados típicos de influxo de cálcio representados na Figura 9C reforçam os resultados anteriores, apontando que, a aplicação prévia do antagonista do canal TRPA1 (HC-030031, 30 μM) bloqueou o influxo de cálcio promovido pelo BjV (1 mg/ml) ou pelo agonista TRPA1 (AITC 10 μM), sem afetar, no entanto, o influxo de cálcio promovido pelo agonista TRPV1 (Capsaicina 0,1 μM) (traçado claro), em relação ao traçado obtido com a aplicação prévia do veículo (traçado escuro).

Os resultados obtidos utilizando cultura de células HEK293 e cultura primária de neurônios do GRD de ratos sugerem que o BjV promove ativação dos canais TRPA1. Com o intuito de confirmar esses achados, procurou-se avaliar o influxo de cálcio promovido

pelo BjV em cultura primária de neurônios do GRD de camundongos selvagens ou com deleção gênica dos canais TRPA1. A aplicação do BjV (1 mg/ml) foi capaz de promover um influxo de cálcio significativamente maior do que o apresentado pelo seu veículo, em cultura primária de neurônios do GRD de camundongos selvagens, correspondendo à $6\pm 1\%$ do influxo total obtido após a aplicação de ionomicina (Figura 9D). Ainda de acordo com a Figura 9D, é possível observar que o influxo de cálcio promovido pelo BjV (1 mg/ml) foi completamente abolido na cultura primária de neurônios do GRD de camundongos TRPA1^{-/-}. Na Figura 9E estão representados os efeitos promovidos pelos agonistas dos canais TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μM) e TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μM) os quais induziram influxos significativos de cálcio, representando, respectivamente, $16\pm 2\%$ e $33\pm 2\%$ do influxo total obtido após a aplicação da ionomicina, mostrando que os neurônios do GRD de camundongos TRPA1^{+/+} encontravam-se perfeitamente responsivos a ativação dos canais TRPA1 e TRPV1. Além disso, a Figura 9E demonstra que o influxo de cálcio promovido pelo agonista TRPA1 (AITC 10 μM) foi completamente abolido na cultura primária de neurônios do GRD de camundongos TRPA1^{-/-}. No entanto, o influxo de cálcio promovido pelo agonista TRPV1 (capsaicina 0,1 μM) na cultura primária de neurônios do GRD de camundongos TRPA1^{-/-} foi estatisticamente semelhante ao obtido na cultura primária de neurônios do GRD de camundongos selvagens. Os traçados típicos de influxo de cálcio representados na Figura 9F reforçam os resultados anteriores, apontando que o BjV (1 mg/ml), o agonista TRPA1 (AITC 10 μM) e o agonista TRPV1 (Capsaicina 0,1 μM) promoveram significativos influxos de cálcio em cultura primária de neurônios do GRD de camundongos TRPA1^{+/+} (traçado escuro). Por outro lado, o influxo de cálcio promovido pelo BjV (1 mg/ml) e pelo AITC (10 μM) foi completamente abolido em cultura primária de neurônios do GRD de camundongos TRPA1^{-/-} (traçado claro), sendo que o efeito promovido pelo agonista TRPV1 (capsaicina 0,1 μM) não foi afetado.

Figura 9. Influxo de Ca^{2+} em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) de ratos e de camundongos. (A) Influxo de cálcio em cultura primária de neurônios do GRD de ratos, induzido pelo veneno da *Bothrops jararaca* (0,05 – 1 mg/ml) ou (B) pelos agonistas dos canais TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μM) ou TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μM), na presença do antagonista do canal TRPA1 (HC030031 30 μM), ou do antagonista do canal TRPV1 (CPZ, capsazepina 10 μM) ou dos seus respectivos veículos. (C) Traçado típico da resposta promovida pelo veneno da *Bothrops jararaca* (1 mg/ml) e pelos agonistas dos canais TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μM) ou TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μM) em cultura primária de neurônios do GRD de ratos, na presença do antagonista TRPA1 (HC030031 30 μM , traçado claro) ou do seu veículo (traçado escuro). (D) Influxo de cálcio em cultura primária de neurônios do GRD de camundongos sem deleção gênica (+/+) ou com deleção gênica (-/-) dos canais TRPA1, induzido pelo veneno da *Bothrops jararaca* (1 mg/ml) ou (E) pelos agonistas dos canais TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μM) ou TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μM). (F) Traçado típico da resposta promovida pelo veneno da *Bothrops jararaca* (1 mg/ml) e pelos agonistas TRPA1 (AITC, alil isotiocianato 10 μM) e TRPV1 (CPS, capsaicina 0,1 μM) em cultura primária de neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos sem deleção gênica (TRPA1^{+/+}, traçado escuro) ou com deleção gênica (TRPA1^{-/-}, traçado claro) dos canais TRPA1. Os dados estão representados como média \pm E.P.M. Análise estatística foi realizada utilizando teste t de Student (B) ou ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni para múltiplas comparações (A, D, E). * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo veículo. * $p < 0,05$. # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo BjV 1 mg/ml ou com o grupo sem deleção gênica do canal TRPA1 (+/+) tratado com BjV (1 mg/ml) ou AITC (10 μM). # $p < 0,05$. BjV – Veneno da *Bothrops jararaca*; AITC – Alil isotiocianato; CPS – Capsaicina; HC-03 – HC-030031 (antagonista do canal TRPA1); CPZ – Capsazepina (antagonista do canal TRPV1).



4.5. Investigação dos componentes do veneno da *Bothrops jararaca* envolvidos com o seu efeito nociceptivo e desenvolvimento de edema

Após a caracterização do comportamento nociceptivo e do edema induzidos pelo BjV e da observação da participação dos canais TRPA1 nesses efeitos, procurou-se investigar quais os possíveis componentes do veneno que poderiam estar contribuindo para o desenvolvimento dessas manifestações locais. Para isso, diferentes manipulações foram realizadas no BjV, tais como a incubação com inibidores da atividade enzimática dos principais componentes do BjV (metaloprotease, serinoprotease, fosfolipase A₂ – PLA₂ e L-aminoácido oxidase - LAAO). Também foram realizadas a fervura ou congelamento (afim de investigar a contribuição de componentes termossensíveis nos seus efeitos), ou ainda a diálise (para investigar a participação de componentes de baixo molecular). Com intuito de confirmar a efetividade dessas manipulações, foram realizadas avaliações *in vitro* das atividades enzimáticas dos principais componentes do BjV após sua incubação

com os diferentes inibidores e também após a sua fervura, congelamento ou diálise. Inicialmente, foram avaliados os parâmetros cinéticos para determinação da atividade de metaloprotease, de serinoprotease, de PLA_2 e de LAAO no BjV, utilizando, respectivamente, azocaseína, DL-BAPA, ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico e L-leucina como substratos. Os resultados expressos na Figura Suplementar 5A demonstram que o aumento na concentração de azocaseína (0,0 – 7,5 mg/ml) possibilitou a obtenção de uma velocidade máxima (V_{max}) de $1,14 \pm 0,04 \Delta DO/mg$ de proteína/h e uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de $0,47 \pm 0,07$ mg/ml, para atividade de metaloprotease. Já para a atividade de serinoprotease, foi possível observar que o aumento na concentração de DL-BAPA (0,0 – 6,0 mg/ml) possibilitou a obtenção de uma V_{max} de $9,07 \pm 0,24 \Delta DO/mg$ de proteína/h e uma constante de Michaelis-Menten (K_m) de $1,54 \pm 0,10$ mg/ml (Figura suplementar 5B). Para atividade enzimática de PLA_2 , o aumento na concentração de ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico (0,12 – 1,25 mg/ml) possibilitou a obtenção de uma V_{max} de $0,92 \pm 0,24 \Delta DO/mg$ de proteína/h e uma constante de Michaelis-Menten de $0,60 \pm 0,34$ mg/ml (Figura Suplementar 5C). Já a figura suplementar 5D demonstra que, para a atividade de LAAO, o aumento na concentração de L-leucina (0,008 – 1,00 mM) permitiu a obtenção de uma V_{max} de $417,8 \pm 27,2$ nmol H_2O_2/mg de proteína/min. e uma constante de Michaelis-Menten de $0,012 \pm 0,006$ mM. A partir desses resultados, foram determinadas as concentrações dos substratos e os tempos de reação, os quais foram utilizados, posteriormente, para determinar as atividades enzimáticas para esses componentes do BjV após sua incubação com os diferentes inibidores e também após a sua fervura, congelamento ou diálise. Assim, os resultados representados na Tabela 3 demonstram que a atividade de metaloprotease do BjV (0,05 mg/ml) foi completamente abolida após sua incubação com o inibidor de metaloproteases (1,10-Fenantrolina, 10 mM), quando comparada a atividade de metaloprotease do BjV incubado com veículo. Semelhantemente, a atividade de metaloprotease do BjV (0,05 mg/ml) também foi completamente abolida após a sua fervura, quando comparado a

atividade de metaloprotease do BjV que não passou pelo processo de fervura. Diferentemente, a atividade de metaloprotease do BjV (0,05 mg/ml) não foi reduzida significativamente após a incubação do veneno com os inibidores de fosfolipase A₂ (pBPB, 174 µM) ou de serinoprotease (AEBSF, 1 mM). Também, o congelamento ou diálise do BjV (0,05 mg/ml) não foram capazes de reduzir a atividade de metaloprotease do veneno, quando comparada com seus respectivos grupos controle. Ainda de acordo com a Tabela 3, a atividade de serinoprotease do BjV (0,05 mg/ml) foi significativamente inibida após sua incubação com o inibidor de serinoproteases (AEBSF, 1 mM), quando comparada a atividade de serinoprotease do BjV incubado com veículo. Interessantemente, a incubação do BjV (0,05 mg/ml) com o inibidor de metaloprotease (1,10-Fenantrolina, 10 mM) promoveu uma pequena, porém significativa redução da atividade da serinoprotease, quando comparada a atividade da serinoprotease do BjV incubado com veículo. Já o inibidor de fosfolipase A₂ (pBPB, 174 µM) não foi capaz de reduzir a atividade de serinoprotease do BjV de forma significativa. Além disso, a atividade de serinoprotease do BjV (0,05 mg/ml) foi significativamente inibida após sua fervura e parcialmente reduzida após o seu congelamento, quando comparada a atividade da serinoprotease do BjV que não passou pelo processo de fervura ou congelamento, respectivamente. Já, a diálise do BjV (0,05 mg/ml) parece não reduzir a atividade de serinoprotease do veneno, em relação a atividade da serinoprotease do BjV que não foi dialisado. Ainda de acordo com a tabela 3, a atividade de fosfolipase A₂ do BjV (0,05 mg/ml) foi reduzida significativamente após a incubação do veneno com o inibidore de fosfolipase A₂ (pBPB, 174 µM), quando comparada a atividade de fosfolipase A₂ do BjV incubado com veículo. Diferentemente, a atividade de fosfolipase A₂ do BjV (0,05 mg/ml) não foi reduzida significativamente após a incubação do veneno com os inibidores de serinoprotease (AEBSF, 1 mM). Além disso, cabe salientar que não foi possível avaliar o efeito do inibidor de metaloprotease (1,10-Fenantrolina, 10 mM) na atividade de fosfolipase A₂ do BjV, uma vez que houve formação de precipitado

no poço de reação após a adição do substrato da reação. Ainda, conforme a Tabela 3, a atividade de fosfolipase A₂ do BjV (0,05 mg/ml) foi significativamente inibida após sua fervura e parcialmente reduzida após o seu congelamento, quando comparada a atividade da fosfolipase A₂ do BjV que não passou pelo processo de fervura ou congelamento, respectivamente. Por fim, a diálise do BjV (0,05 mg/ml) parece não reduzir a atividade de fosfolipase A₂ do veneno, em relação a atividade da fosfolipase A₂ do BjV que não foi dialisado.

Também de acordo com a Tabela 3, a atividade enzimática de LAAO no BjV (0,05 mg/ml) foi significativamente inibida após a sua incubação com o inibidor 1,10-fenantrolina, o qual também havia inibido a atividade de metaloprotease. Já as incubações do BjV (0,05 mg/ml) com os inibidores AEBSF ou pBPB, não reduziram significativamente a atividade enzimática de LAAO, quando comparados à atividade do BjV previamente incubado com veículo. Por outro lado, o processo de fervura ou congelamento do BjV (0,05 mg/ml) reduziram significativamente a atividade de LAAO, quando comparado ao BjV que não foi previamente submetido à esses processos. Por fim, a diálise do BjV (0,05 mg/ml) parece não reduzir a atividade de LAAO do veneno, em relação a atividade da LAAO do BjV que não foi dialisado.

Tabela 3. Avaliação *in vitro* da atividade enzimática de metaloprotease, serinoprotease, fosfolipase A₂ e L-aminoácido oxidase presentes no BjV.

	Atividade de Metaloprotease controle=0,7±0,01 ΔDO/min./mg proteína)	Atividade de Serinoproteases controle=4,5±0,12 ΔDO/min./mg proteína)	Atividade de Fosfolipase A ₂ controle=0,2±0,03 ΔDO/min./mg proteína)	Atividade de LAAO controle=826±36 nmol H ₂ O ₂ /min./mg proteína
	Redução vs Controle (%)	Redução vs Controle (%)	Redução vs Controle (%)	Redução vs Controle (%)
Fenantrolina (10 mM)	100***	17,9±0,2	N.D.	77,6±6,6***
AEBSF (1 mM)	5,7±1,4	94,6±2,2***	23,3±9,4	14,0±0,1
pBPB (174 μM)	7,1±0,3	7,8±4,7	56,8±13,4**	8,2±0,8
BjV Fervido	100***	83,8±0,7***	62,1±2,9***	100***
BjV Congelado	0	41,2±0,3***	22,5±2,8	75,3±2,6***
BjV Dialisado	0	0	0	0

Previamente aos ensaios enzimáticos o BjV (0,05 mg/ml) foi incubado com inibidores de metaloprotease (1,10-Fenantrolina, 10 mM) ou serinoprotease (AEBSF, 1 mM) ou fosfolipase A₂ (pBPB, 174 μM) durante 1 hora à 37°C ou então fervido (mantido a temperatura de 96 °C por 15 minutos) ou congelado (à -20°C por 24 horas) ou dialisado (membrana de diálise de 14 kDa). Os dados estão expressos como porcentagem de redução da atividade enzimática comparada com os respectivos grupos controles. Diferença estatisticamente significativa quando valor de p<0,05. N.D. - Não Determinado; AEBSF – do inglês *4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride*; pBPB – do inglês *p-bromophenacyl bromide*; LAAO – L-aminoácido oxidase.

Posteriormente, a fim de investigar a contribuição desses componentes na nocicepção e no edema promovidos pelo BjV, foi realizado, inicialmente, a fervura ou o congelamento do BjV

previamente à sua administração na pata. Conforme os resultados apresentados na Tabela 4, a fervura do veneno (à 96°C por 15 minutos) reduziu a praticamente a metade o comportamento nociceptivo espontâneo induzido, em relação ao grupo administrado com BjV não-fervido. Semelhantemente, a fervura do BjV também reduziu a hiperalgesia mecânica, o comportamento afetivo-motivacional e a alodínia térmica ao frio, em relação ao grupo administrado com BjV não-fervido. Ainda, a fervura do BjV, também reduziu o edema induzido pelo veneno. Por outro lado, ainda de acordo com os resultados expressos na Tabela 4, o congelamento do BjV (à -20°C por 24 horas), previamente à sua administração subcutânea na pata, não foi capaz de reduzir significativamente nenhum dos parâmetros nociceptivos avaliados ou o edema induzidos pelo BjV. Finalmente, a diálise do BjV não foi capaz de prevenir as parâmetros nociceptivos avaliados, em comparação ao grupo administrado com BjV que não foi previamente dialisado (BjV não dialisado). Por outro lado, a diálise do BjV preveniu parcialmente o desenvolvimento de edema induzido pelo veneno.

Tabela 4. Envolvimento de componentes termosensíveis e componentes de baixo peso molecular na nocicepção e edema induzidos pelo BjV.

	Componentes Sensíveis ao Calor		Componentes Sensíveis ao Congelamento		Componentes de Baixo Peso Molecular	
	BjV não-fervido	BjV fervido % redução	BjV não-congelado	BjV congelado	BjV não-dialisado	BjV dialisado % redução
Nocicepção espontânea (s)	96±21	45±10* (53±11)	81,2±38,6	100±18,0 0	113,7±9,9	75,0±19,2
Hiperalgisia mecânica (g)	0,9±0,3	2,3±0,5* (100)	1,1±0,5	1,4±0,4	1,3±0,3	1,2±0,3
CAM (escores)	14,4±1,3	5,5±1,8** (62±4)	12,2±2,4	12,0±2,6	13,8±0,7	15,8±1,4
Alodínia ao frio (s)	6,1±0,4	4,2±0,6* (31±3)	9,2±2,3	8,1±1,7	5,0±0,6	4,4±0,7
Edema (mm)	2,4±0,2	0,9±0,2*** (64±1)	4,2±0,2	2,3±1,0	6,1±0,2	5,0±0,2** (18±1)

Previamente à administração subcutânea na pata dos camundongos, o BjV foi desnaturado (mantido a temperatura de 96 °C por 15 minutos) ou congelado (à -20°C por 24 horas) ou dialisado (membrana de diálise de 14 kDa). Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 1 à 6 horas após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata). * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao respectivo grupo controle (BjV não-desnaturado ou BjV não-dialisado ou BjV não-congelado). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Os valores representados entre parênteses indicam porcentagem de redução nas respostas quando comparado à resposta dos respectivos grupos controles. CAM – Comportamento afetivo-motivacional.

Em seguida, foram utilizados inibidores de diferentes componentes enzimáticos do BjV com intuito de investigar suas contribuições para a nocicepção e desenvolvimento de edema induzidos pelo veneno (Tabela 5). Assim, pode-se observar que o 1,10-Fenantrolina (10 mM), incubado com o BjV previamente a sua administração subcutânea, previniu o comportamento nociceptivo espontâneo

induzido pelo BjV (1 µg/pata, s.c.) em relação ao grupo veículo. Cabe salientar que esse inibidor aboliu a atividade de metaloprotease e reduziu apenas parcialmente a atividade de serinoprotease, sugerindo que sua atuação se dá preferencialmente sobre as metaloproteases. Já o inibidor de fosfolipases A2, brometo de p-bromofenacil (pBPB, 174 µM), não foi capaz de prevenir significativamente o comportamento nociceptivo espontâneo induzido pelo BjV (1 µg/pata, s.c.). Por outro lado, os inibidores de metaloproteases e de fosfolipase A2 reduziram a hiperalgisia mecânica, o comportamento afetivo-motivacional, a alodínia térmica e o edema induzidos pela administração subcutânea do BjV (1 µg/pata, s.c.). Enquanto isso, o inibidor de serinoproteases, fluoreto de 4-(2-aminoetil) benzenossulfonila (AEBSF, 1 mM), não promoveu inibição significativa de nenhum dos parâmetros nociceptivos avaliados. Entretanto, o AEBSF previniu o desenvolvimento de edema induzido pelo BjV (1 µg/pata, s.c.), sendo observada uma pequena, porém significativa, redução na espessura da pata, em relação ao grupo veículo.

Tabela 5. Efeito promovido por inibidores de metaloprotease, fosfolipase A₂ e serinoprotease presentes no BjV na nocicepção e edema induzidos pelo veneno.

	Metaloproteases de Veneno de Serpentes		Fosfolipase A ₂ de Veneno de Serpentes		Serinoproteases de Veneno de Serpentes	
	Veículo	Fenantrolina (%inibição)	Veículo	pBPB (%inibição)	Veículo	AEBSF (%inibição)
Nocicepção espontânea (s)	115±12	23±6^{***} (79,6±3,3)	118±30	82±17	111±30	100±17
Hiperalgisia mecânica (g)	1,0±0,2	2,3±0,4* (70,7±4,5)	0,9±0,2	1,6±0,2[*] (67,7±7,5)	1,0±0,1	1,3±0,2
CAM (escores)	13,6±0,9	3,5±1,5^{***} (74,7±5,6)	15±1	10,0±1,3^{**} (35,2±1,9)	15±1	14,3±0,5
Alodinia ao frio (s)	5,2±0,8	2,5±0,2^{**} (49,5±7,9)	7,2±0,6	3,2±0,3^{***} (55,5±4,0)	6,4±0,8	6,8±0,6
Edema (mm)	6,3±0,2	1,3±0,3^{***} (78,5±1,5)	6,3±0,6	1,7±0,2^{***} (73,5±5,4)	6,2±0,6	5,1±0,2

Previamente à administração subcutânea na pata dos camundongos o BjV foi incubado com inibidores de metaloprotease (1,10-Fenantrolina, 10 mM) ou fosfolipase A₂ (pBPB, 174 µM) ou serinoprotease (AEBSF, 1 mM) durante 1 hora à 37°C. Dados expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 1 à 6 horas após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata). * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao respectivo grupo veículo. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Os valores representados entre parênteses indicam porcentagem de inibição nas respostas quando comparado às respostas dos respectivos grupos controles. AEBSF – do inglês *4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride*; pBPB – do inglês *p-bromophenacyl bromide*; CAM – Comportamento afetivo-motivacional.

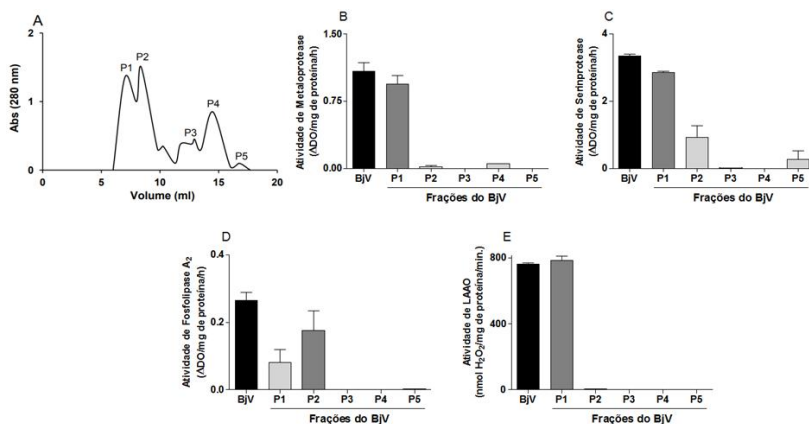
4.6. Separação cromatográfica e avaliação da atividade enzimática, da nocicepção e do edema induzidos pelas frações isoladas do veneno bruto da *Bothrops jararaca*

A partir dos resultados obtidos anteriormente, e ainda com o intuito de identificar os principais componentes do BjV responsáveis pelo seu efeito nociceptivo e desenvolvimento de edema, procurou-se realizar um fracionamento do veneno bruto da *Bothrops jararaca*, com intuito de promover a separação dos seus componentes. Na Figura 10A está representado o perfil de eluição do BjV (10 mg) através de colunas Superdex (equilibradas com formiato de amônia 0,15 M, pH 6,0) utilizadas para a separação cromatográfica das frações do BjV utilizando a técnica de FPLC (do inglês, *Fast Performance Liquid Chromatography*), conforme descrito na seção Material e Métodos. De acordo com o perfil cromatográfico obtido a partir do registro da absorbância em 280 nm, é possível observar a presença de 5 picos protéicos (P1 – P5), representando as frações presentes no veneno bruto da *Bothrops jararaca*. Na Figura 10B está expresso a atividade de metaloprotease para o veneno bruto da *Bothrops jararaca* e para as suas respectivas frações (P1 –P5). É possível observar que a Fração P1 apresenta significativa atividade de metaloprotease, representando aproximadamente $91,0 \pm 6,5\%$ de toda atividade de metaloprotease do BjV bruto. Ainda de acordo com a Figura 10B é possível observar uma atividade residual de metaloprotease nas Frações P2 e P4, representando, respectivamente cerca de $20,9 \pm 13,3\%$ e $6,2 \pm 5,4\%$ de toda a atividade de metaloprotease do veneno bruto. Por outro lado não foi detectado nenhuma atividade significativa de metaloprotease nas Frações P3 e P5. Na figura 10C está representado a atividade de serinoprotease para o veneno bruto da *Bothrops jararaca* e para as suas respectivas frações (P1 – P5). Pode-se observar que a atividade de serinoprotease do BjV bruto está concentrada na Fração P1, representando cerca de $85,4 \pm 0,7\%$ da atividade de serinoprotease obtida com o veneno bruto. Além disso, foi possível observar uma atividade residual de serinoprotease na Fração P2, representando $27,9 \pm 10,1\%$ da atividade de serinoprotease obtida com o veneno bruto. Ainda, foi

possível identificar um atividade de serinoprotease muito menor na Fração P5, representando somente 8% da atividade dessa enzima no veneno bruto. Já na Figura 10D está expresso a atividade de fosfolipase A₂ (PLA₂) para o veneno bruto da *Bothrops jararaca* e para as suas respectivas frações (P1 – P5). É possível observar que a atividade de PLA₂ do BjV bruto está concentrada na sua Fração P2, representando cerca de 66±22% da atividade de fosfolipase A₂ obtida com o veneno bruto. Ainda, pode-se observar uma atividade residual de PLA₂ na Fração P1 e na Fração P5, embora tenham sido menores que a atividade de PLA₂ obtida na Fração P2, representando respectivamente 30,5±14,7% e 0,7±0,6% da atividade de fosfolipase A₂ obtida com o veneno bruto. Por fim, na Figura 10E está respresentado a atividade de LAAO para o veneno bruto da *Bothrops jararaca* e para as suas respectivas frações (P1 – P5). Pode-se observar que a atividade da LAAO no BjV bruto está concentrada na sua fração P1, representando cerca de 100% da atividade da LAAO obtida com o veneno bruto.

Figura 10. Separação cromatográfica e avaliação da atividade enzimática das frações do veneno bruto da *Bothrops jararaca*. (A) Perfil representativo da eluição do veneno bruto da *Bothrops jararaca* (10 mg de proteína) em uma coluna Superdex™ 75 HR10/30 usando um sistema de FPLC (do inglês *Fast Performance Liquid Chromatography*). Tampão de eluição utilizado foi Formiato de Amônio (0,15 M, p.H. 6,0), fluxo de 0,5 ml/minuto à temperatura ambiente; (B) Atividade de metaloprotease do veneno bruto da *Bothrops jararaca* e das sua respectivas frações, avaliada pelo ensaio da azocaseína; (C) Atividade de serinoprotease do veneno bruto da *Bothrops jararaca* e das suas respectivas frações, avaliadas utilizando o substrato DL-BAPA; (D) Atividade de fosfolipase A₂ do veneno bruto da *Bothrops jararaca* e das suas respectivas frações, avaliada utilizando o substrato ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico; (E) Atividade LAAO do veneno bruto da *Bothrops jararaca* e das suas respectivas frações, avaliada utilizando a L-leucina como substrato. Os dados são expressos como média±E.P.M., sendo realizados 2 à 3 blocos experimentais independentes. BjV –

Bothrops jararaca venom; Abs – Absorbância; Δ DO – Variação da densidade optica; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; LAO –L-aminoácido oxidase; h – hora; min. – minuto.



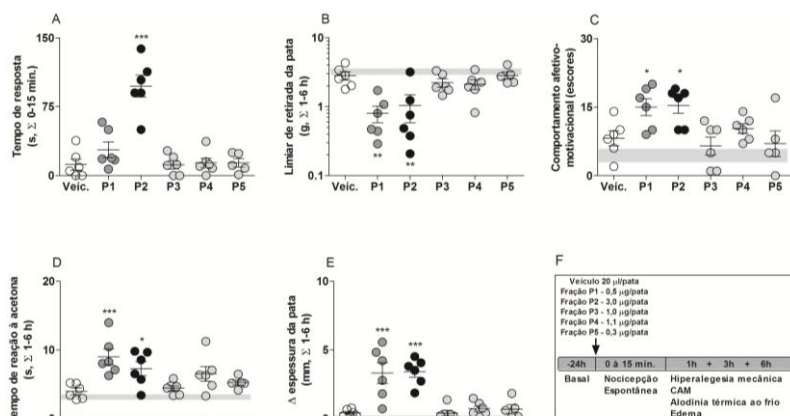
Após a identificação das atividades enzimáticas nas frações obtidas do BJV, procurou-se avaliar o desenvolvimento de comportamento nociceptivo e de edema induzidos pela injeção subcutânea dessas Frações. De acordo com os resultados representados na Figura 11A a administração subcutânea da Fração P1 (0,5 μ g/pata, s.c.) não foi capaz de induzir o desenvolvimento de comportamento nociceptivo espontâneo, imediatamente após a sua injeção. Por outro lado, a injeção subcutânea da Fração P1 (0,5 μ g/pata, s.c.) promoveu desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (Figura 11B), sendo que, foi obtida uma redução de $121,6 \pm 26,5\%$ no limiar de retirada da pata frente a estimulação com filamentos de von Frey, em relação ao grupo veículo. Além disso, a Fração P1 (0,5 μ g/pata, s.c.) induziu o desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional (CAM) (Figura 11C), sendo que, houve um incremento de $83,7 \pm 23,0\%$ nos escores indicativos de CAM, em relação ao grupo veículo. Ainda, a injeção subcutânea da Fração P1 (0,5 μ g/pata, s.c.) também induziu o desenvolvimento de alodínea térmica ao frio (Figura 11D), sendo que, foi observado um incremento no tempo de resposta à acetona de $126 \pm 28\%$, em

relação ao grupo veículo. Por fim, da Fração P1 (0,5 µg/pata, s.c.) induziu um expressivo desenvolvimento de edema (Figura 11E), sendo observado um incremento muito superior à 100% na espessura da pata, em relação ao grupo veículo.

Já administração subcutânea da Fração P2 (3 µg/pata, s.c.) induziu um significativo desenvolvimento de nocicepção espontânea, sendo observado um incremento muito superior à 100% no tempo de resposta em relação ao grupo veículo (Figura 11). Além disso, a injeção subcutânea da Fração P2 (3 µg/pata, s.c.) promoveu desenvolvimento de hiperalgesia mecânica (Figura 11B), sendo que, foi obtida uma redução de $63\pm 16\%$ no limiar de retirada da pata frente a estimulação com filamentos de von Frey, em relação ao grupo veículo. Ainda, a Fração P2 também induziu o desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional (CAM) e alodínia térmica ao frio, promovendo, respectivamente, incrementos de $88\pm 21\%$ e $83\pm 26\%$ nos escores indicativos de CAM e no tempo de reação à acetona em relação ao grupo veículo (Figuras 11C e 11D). Por fim, a injeção subcutânea da fração P2 também promoveu um significativo desenvolvimento de edema, sendo observado um incremento muito superior à 100% na espessura da pata, em relação ao grupo veículo. Diferentemente, a administração subcutânea das Frações P3, P4 ou P5 não foi capaz de induzir o desenvolvimento de nocicepção e edema após injeção na pata dos camundongos, não havendo diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 11A-D).

Figura 11. Caracterização da nocicepção e do edema induzidos pela injeção subcutânea das frações obtidas do veneno da *Bothrops jararaca*. (A) Nocicepção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Hiperalgesia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nocicepção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6

horas (B-E) após a administração subcutânea das Frações: P1 (0,5 µg/pata), P2 (3,0 µg/pata), P3 (1 µg/pata), P4 (1,1 µg/pata), P5 (0,3 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. O teste de Grubbs foi utilizado para detecção de possíveis *outliers*. Análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo veículo (20 µl/pata). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. A linha cinza representa média ± E.P.M. dos valores basais. s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.



5. Discussão

O conhecimento a cerca dos mecanismos responsáveis pelos sintomas locais induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca*, compreende um passo importante para o desenvolvimento de ferramentas que busquem um controle efetivo desses sintomas. Neste sentido, o presente trabalho procurou investigar mecanismos endógenos e componentes do veneno envolvidos com o desenvolvimento de dor e edema, os quais estão entre os sintomas locais mais frequentes decorrentes dos envenenamentos causados pela *Bothrops jararaca*.

A primeira parte deste estudo procurou caracterizar a nociceção e o edema induzidos pela administração subcutânea

(s.c.) do BjV em camundongos. Foi possível observar o desenvolvimento de comportamento nociceptivo espontâneo imediatamente após a injeção do BjV, o qual se apresentou de maneira transitória, com pico de resposta entre 5 e 10 minutos após a injeção. De fato, a dor imediata após a injeção de veneno é característica da picada de serpentes pertencentes à família *Viperidae* (WARREL, 2004) na qual se encontra a *Bothrops jararaca*. Acredita-se que a dor induzida por esses venenos em seres humanos apresenta um caráter protetivo para a serpente, afastando-os e afugentando-os, especialmente se a serpente estiver em uma situação de risco. Contudo a indução de dor pelo veneno não se limita à seres humanos, mas se estende, também, à potenciais presas dessas serpentes, como por exemplo répteis, anfíbios, aves e pequenos mamíferos. Cabe salientar aqui, que o modelo animal utilizado no presente estudo (camundongos) também se encontra entre as presas de serpentes como a *Bothrops jararaca*. Considerando que a dor apresenta uma importante ação imobilizante, pode-se dizer que o desenvolvimento de dor após a inoculação do veneno contribui para imobilização e para a consequente ingestão da presa (CINTRA-FRANCISCHINELLI, et al., 2010).

Além da dor imediata, outros sintomas locais têm sido relatados após a inoculação do veneno da *Bothrops jararaca* e de outras serpentes da família *Viperidae* em humanos. Destacam-se o edema, a hemorragia local e a equimose, os quais geralmente são evidentes já nas primeiras 2 à 4 horas. Outros sintomas um pouco menos comuns, como bolhas e necrose, podem ser observados de 12 à 24 horas, especialmente nos casos considerados mais graves (Para revisão ver: GUTIÉRREZ, 2017). De maneira semelhante, têm sido demonstrado que o BjV é capaz de induzir hiperalgesia, alodínia e edema em animais de laboratório (CHACUR et al., 2002; BONAVITA et al., 2006; ZYCHAR et al., 2010; PICOLO et al., 2002; YAMASHITA et al., 2011; MARTINOV et al., 2013; CHACUR et al., 2004) . Esses efeitos são evidenciados especialmente nas primeiras 6 horas após a administração do veneno. Neste sentido, os resultados obtidos na primeira parte deste estudo, após a injeção

do BjV (1 $\mu\text{g/pata}$), reproduzem os principais sintomas locais induzidos pelo BjV em seres humanos e corroboram os achados em animais de laboratório, sendo que foi observado o desenvolvimento de comportamento afetivo-motivacional, hiperalgesia mecânica, alodínia térmica e edema, os quais se apresentaram de 1 à 6 horas após a injeção do veneno. Além disso, neste mesmo intervalo de tempo, também foi possível observar o desenvolvimento de hemorragia local e equimose.

Após definir o decurso temporal para o desenvolvimento dos sintomas locais induzidos pelo BjV, demonstramos apartir da realização de uma curva dose resposta (0,05 - 20 $\mu\text{g/pata}$) que a dose efetiva 50% obtida para todos os parâmetros nociceptivos observados e também para o desenvolvimento de edema foi próxima à 1 $\mu\text{g/pata}$. Além disso, o efeito máximo observado para os parâmetros nociceptivos e para o edema foram obtidos com a dose de 20 $\mu\text{g/pata}$ de BjV. Sugere-se que em média podem ser inoculados pela *Bothrops jararaca* durante uma picada em seres humanos em torno de 36 mg de veneno (BÜCHERL, 1963), ou seja, em torno de 0,5 mg/kg (considerando um indivíduo padrão adulto de 70 kg). Fazendo uma transformação das doses que induziram nocicepção e edema e considerando um peso médio de 30 g para cada camundongo, pode-se chegar à valores de 0,03 mg/kg (para a dose de 1 $\mu\text{g/pata}$) e 0,66 mg/kg (para a dose de 20 $\mu\text{g/pata}$). Assim, foi possível observar o desenvolvimeneto de nocicepção e edema mesmo utilizando uma dose que está abaixo (1 $\mu\text{g/pata}$) ou uma dose que está compatível (20 $\mu\text{g/pata}$) com a quantidade média de veneno que estima-se ser inoculada pela *Bothrops jararaca* em seres humanos. De maneira semelhante, diversos estudos em animais de laboratório têm demonstrado que doses do BjV que variam de 1 até 30 $\mu\text{g/pata}$, são capazes de promover o desenvolvimento de nocicepção e edema e que inclusive esses efeitos foram observados em testes de nocicepção espontânea ou frente à estímulos mecânicos ou térmicos (CHACUR et al., 2002; BONAVITA et al., 2006; ZYCHAR et al., 2010; PICOLO et al., 2002; YAMASHITA et al., 2011; MARTINOV et al., 2013; CHACUR et al., 2004). Diante disso, os resultados do presente estudo corroboram e expandem os achados

da literatura com relação à dose do BjV necessária para o desenvolvimento dos sintomas locais, tanto em humanos quanto em animais de laboratório. Também, os testes aqui utilizados para se avaliar esses sintomas, foram os mesmos que classicamente são capazes de detectar o desenvolvimento de nocicepção e edema induzidos pelo BjV. Cabe salientar que em conjunto com a nocicepção e edema, também houve o desenvolvimento de hemorragia local e equimose, com ambas as doses testadas (1 ou 20 $\mu\text{g/pata}$).

Na prática clínica, uma análise cuidadosa do aparecimento e da evolução dos sintomas locais induzidos pelo BjV é utilizada para classificar a gravidade da intoxicação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; MALÁQUE e GUTIÉRREZ, 2016). Neste sentido, nos casos classificados como leves ou moderados o edema, a hemorragia local e a equimose são considerados discretos, restritos ao local e desaparecem cerca de 24 horas após a inoculação do veneno. Por outro lado, nos casos considerados graves esses sintomas não ficam restritos ao local e regrediram somente após decorridas 72 horas da inoculação do veneno (Para revisão ver: GUTIÉRREZ, 2017). Interessantemente, no presente estudo todos os sintomas locais induzidos pelo BjV 1 $\mu\text{g/pata}$ ficaram restritos ao local da injeção e desapareceram 24 horas após a sua administração subcutânea. Por outro lado, o edema, a hemorragia local e a equimose induzidos pelo BjV 20 $\mu\text{g/pata}$ não ficaram restritos ao local da injeção, acometendo outros segmentos anatômicos e reduzindo somente 72 horas após a sua injeção subcutânea. Diante desses achados, pode-se sugerir que com a dose de 1 $\mu\text{g/pata}$ foi possível caracterizar um quadro de intoxicação leve pelo BjV, enquanto que, com a dose de 20 $\mu\text{g/pata}$, caracterizou-se um quadro de intoxicação grave. Cabe salientar aqui que, os levantamentos epidemiológicos demonstram que a maioria dos quadros de intoxicação causados pelo BjV são classificados como leves (BOCHNER et al, 2014; MOTA-DA-SILVA, et al., 2015; CHIPPAUX, 2015; MALÁQUE e GUTIÉRREZ, 2016). Sendo assim, a dose de 1 $\mu\text{g/pata}$ de BjV foi utilizada na sequência do estudo, para se investigar os mecanismos e componentes do veneno responsáveis pelo sintomas locais previamente observados.

A segunda parte do presente estudo, procurou investigar os possíveis mecanismos responsáveis pela nocicepção e edema induzidos pelo BjV, sendo avaliado inicialmente, a participação do inflamossoma. O inflamossoma compreende um complexo multiprotéico classicamente envolvido com respostas inflamatórias e imunes, a partir da ativação de diferentes vias de sinalização. No aspecto molecular, uma de suas principais funções é o recrutamento e a ativação da enzima caspase-1, que por sua vez, irá promover a maturação e a secreção de mediadores pró-inflamatórios, dos quais se destacam a IL-1 β e a IL-18. Em 2012, Dombrowsky e colaboradores sugeriram que o veneno da abelha *Apis mellifera* e a melitina (toxina isolada deste veneno) são capazes de induzir a ativação da caspase-1 e a secreção de IL-1 β , em cultura de queratinócitos, e que esses efeitos são dependentes de componentes do inflamossoma, como a proteína AIM-2. Semelhantemente, Palm e Medzhitov (2013) também demonstraram que o veneno da *Apis mellifera* e a melitina promovem a ativação de caspase-1 e a consequente secreção de IL-1 β em cultura de macrófagos, de maneira dependente de componentes do inflamossoma, como a proteína NLRP3 e a proteína adaptadora ASC. Ainda, mais recentemente, Zoccal e colaboradores (2016) demonstraram que o veneno do escorpião *Tityus serrulatus* também ativa a caspase-1 e promove a secreção de IL-1 β em cultura primária de macrófagos. Além disso, demonstraram que esses efeitos são dependentes de diferentes proteínas constituintes do inflamossoma, tais como NLRP3, NLRC4 e ASC, bem como do efluxo de potássio. Esses achados sugerem que o inflamossoma é um importante alvo para o veneno e para toxinas isoladas de venenos animais, podendo contribuir sobremaneira para os efeitos observados após suas administrações. Diante disso, procuramos investigar se a nocicepção e o edema induzidos pelo BjV poderiam estar sendo mediados pelo inflamossoma. Foi possível observar que a maioria dos parâmetros nociceptivos avaliados e o desenvolvimento de edema não foram atenuados nos animais com deleção gênica da enzima caspase-1, a qual desempenha um papel chave na ativação do inflamossoma. Esses dados sugerem que,

aparentemente a nocicepção e o edema induzidos pelo BjV, provavelmente não estão sendo mediados pela ativação do eixo inflamossoma/caspase-1/IL-1 β . Curiosamente, têm sido sugerido que a ativação do inflamossoma parece desempenhar um papel protetivo diante de intoxicações por venenos animais. Palm e Medzhitov (2013), demonstraram que camundongos com deleção gênica da caspase-1 apresentaram maior susceptibilidade à hipotermia induzida pela administração intraperitoneal do veneno da *Apis mellifera* e aumento na formação de lesões necróticas na pele após a administração subcutânea do veneno ou da toxina melitina. De maneira semelhante, o mesmo estudo demonstrou que a hipotermia e a formação de lesões induzidas pelo veneno da serpente *Crotalus atrox* também foram mais severos em camundongos com deleção gênica da caspase-1. Neste sentido, os resultados obtidos em camundongos com deleção gênica da caspase-1/11 apontam que o inflamossoma parece não exercer um efeito protetor frente ao desenvolvimento de nocicepção e edema induzidos pelo BjV. Paradoxalmente, nossos resultados demonstraram que apenas a nocicepção espontânea observada imediatamente após a administração do BjV foi reduzida em animais com deleção gênica da caspase-1/11. No entanto, a utilização de um antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) não foi capaz de prevenir essa nocicepção espontânea observada imediatamente após a administração do BjV (resultados não apresentados). Têm sido demonstrado que algumas respostas dependentes da ativação de constituintes do inflamossoma como NLR4 e caspase-1, são independentes da produção de IL-1 β ou IL-18. Nestes casos, a ativação do inflamossoma está associada a uma extensa produção e secreção de mediadores lipídicos, os quais promovem um rápido desenvolvimento do processo inflamatório, podendo ser evidenciado dentro de poucos minutos (von MOLTKE et al., 2012). Diante disso, não podemos descartar a possibilidade de que a nocicepção espontânea imediatamente após a administração do BjV esteja sendo mediada por constituintes do inflamossoma, tais como a caspase-1, mas de maneira independente de IL-1 β .

Outro possível mecanismo envolvido com os sintomas locais induzidos pelo BjV investigado no presente estudo, foi a participação dos receptores do tipo *toll* (TLR). Os TLR pertencem à família de receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *Pattern Recognition Receptors, PRRs*) (SANTONI et al., 2015). Diversos subtipos de TLR têm sido descritos em seres humanos e em camundongos, sendo que os subtipos TLR1 à TLR9 estão presentes em ambas as espécies (KAWAI e AKIRA, 2010). Esses receptores reconhecem e são ativados por PAMPs, presentes em agentes infecciosos como bactérias, vírus, fungos e protozoários (KAWAI e AKIRA, 2010, 2011) ou por DAMPs, tais como os produtos de degradação da matriz extracelular, o DNA mitocondrial, o ATP e as espécies reativas de oxigênio, geralmente produzidos e secretados em locais onde há lesão tecidual (Para revisão ver: ERRIDGE, 2010; SANTONI et al., 2015). Uma vez ativados pelos PAMPs ou DAMPs, os TLR promovem a ativação de fatores de transcrição que irão estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias que desempenham um papel importante na ativação de uma resposta inflamatória (SANTONI et al., 2015; BLASIUS e BEUTLER; 2010; HACKER et al., 2011). Recentemente, Zoccal e colaboradores (2014) propuseram o termo padrões moleculares associados ao veneno (do inglês, *Venom-Associated Molecular Patterns, VAMPs*) referindo-se às componentes ou moléculas presentes no veneno de animais capazes de serem reconhecidas por PRRs e promoverem o desenvolvimento de inflamação. Neste sentido, têm sido demonstrado que os TLR2 estão envolvidos com a resposta inflamatória aguda induzida pela administração intraperitônea do veneno da *Bothrops atrox* e que esse efeito parece depender da proteína adaptadora MyD88, principal molécula responsável pela sinalização intracelular decorrente da ativação dos TLRs (MOREIRA et al., 2013; 2016). Além disso, Rucavado e colaboradores (2016) demonstraram que DAMPs presentes no exudato de lesões induzidas pelo veneno da *Bothrops asper* são capazes de aumentar a permeabilidade vascular via TLR4, contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas locais induzidos pelo veneno. Esses achados sugerem que os TLRs atuam como

importantes mediadores dos efeitos promovidos por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, seja pela sua ativação direta por VAMPs ou indiretamente pela formação de DAMPs. Diante disso, procuramos investigar se a nocicepção e o edema induzidos pelo BjV poderiam estar sendo mediados pelos TLR e observamos que a deleção gênica dos TLR2 ou TLR4 não evitaram o desenvolvimento de nocicepção e edema promovidos pelo veneno. Assim, apesar de existirem evidências que sugerem a participação dos TLRs na resposta inflamatória induzida por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, os resultados do presente estudo sugerem que esses receptores não estão envolvidos com os sintomas locais promovidos pelo BjV. Interessantemente, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o lipopolissacrídeo (LPS), um dos principais constituintes da membrana externa de bactérias gram-negativas, é reconhecido pelos TLR4, iniciando uma resposta imune com a produção de importantes mediadores inflamatórios (Para revisão ver: KAWAI e AKIRA, 2011). Assim, os resultados obtidos a partir da administração do BjV em camundongos com deleção gênica dos TLR4 sugerem que o desenvolvimento dos sintomas locais observados não está relacionado com uma possível contaminação do veneno com LPS ou com bactérias gram-negativas.

Outro mecanismo que poderia estar mediando a nocicepção e edema induzidos pelo BjV são os receptores de potencial transitório (TRPs). Os canais TRPs pertencem a uma superfamília de canais iônicos dos quais 27 membros foram identificados em seres humanos. Classicamente, os canais TRPs estão presentes na membrana dos nociceptores, os neurônios especializados na transmissão de estímulos nocivos. Quando ativados, os TRPs promovem um grande influxo de íons nos nociceptores, tais como Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} ou Zn^{2+} , levando à geração de potenciais de ação nesses neurônios. Dentre os representantes da superfamília de TRPs, destacam-se os TRPV1 e TRPA1, os quais estão relacionados de maneira direta ou indireta com os efeitos promovidos por venenos e toxinas isoladas de venenos animais, especialmente com o desenvolvimento de nocicepção (Para revisão ver: JAMI et al., 2017; SIEMENS e HANACK, 2014). No presente estudo, o primeiro

indício que sugere a participação desses canais na nocicepção induzida pelo BjV foi obtido a partir da realização do protocolo com resiniferatoxina, a qual é um potente agonista dos canais TRPV1 e classicamente têm sido utilizada com intuito de promover desfuncionalização das fibras sensoriais TRPV1/TRPA1 positivas. Os resultados aqui apresentados mostram que o pré-tratamento com resiniferatoxina reduziu significativamente a nocicepção induzida pelo BjV, embora não tenha evitado o desenvolvimento de edema. Interessantemente, têm sido demonstrado que a administração sistêmica de resiniferatoxina é capaz de promover uma desfuncionalização completa e duradoura dos neurônios TRPV1/TRPA1 positivos. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar essa desfuncionalização, tais como a inativação de canais de Na^+ voltagem dependentes e o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} (pela entrada de Ca^{2+} extracelular pelo canal TRPV1 ou liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares). Essa sobrecarga de Ca^{2+} pode levar a ativação de proteases intracelulares dependentes de Ca^{2+} , desestabilização do citoesqueleto, despolimerização de microtúbulos e inibição da atividade mitocondrial. Em conjunto, esses mecanismos levam a uma redução na excitabilidade e na responsividade dos neurônios TRPV1/TRPA1 positivos, contribuindo para a sua desfuncionalização. No entanto essa desfuncionalização é reversível dentro de alguns dias ou poucas semanas. (Para revisão ver: IODAROLA e GONELLA, 2013; MORAN e SZALASSI, 2017; ANAND e BLEY, 2011). Assim, como o protocolo realizado no presente estudo utilizou a administração de resiniferatoxina por via sistêmica, é provável que a degeneração dos terminais nervosos bem como o efeito promovido pela resiniferatoxina sejam reversíveis. Contudo, a realização do teste de estimulação corneal com agonistas dos canais TRPV1 (capsaicina) ou TRPA1 (alil isotiocianato), permitiu confirmar que 7 dias após o tratamento com resiniferatoxina e previamente a administração do BjV, os neurônios TRPV1/TRPA1 estavam efetivamente desfuncionalizados.

Apesar de sugerirem a participação dos canais TRPV1 ou TRPA1 na nocicepção induzida pelo BjV, os resultados obtidos

apartir do pré-tratamento com resiniferatoxina não possibilitam concluir se ambos os canais são importantes para esse efeito ou se apenas um deles seria mais importante. Para tentar responder à essa questão foram utilizadas ferramentas farmacológicas e genéticas *in vivo* e também abordagens *in vitro* com o objetivo de se avaliar de maneira mais específica o envolvimento desses canais nos efeitos promovidos pelo BJV. Neste sentido, não foi possível observar inibição de nenhum dos parâmetros indicativos de nocicepção e tampouco do desenvolvimento do edema apartir do pré-tratamento dos camundongos com um antagonista seletivo dos canais TRPV1 ou em animais com deleção gênica dos canais TRPV1. Além disso, os resultados obtidos apartir dos ensaios *in vitro* em cultura de células HEK293 transfectadas com o canal TRPV1 e em culturas primárias de neurônios do GRD de ratos, sugerem que o BJV não é capaz de ativar diretamente os canais TRPV1. Diferentemente dos resultados aqui obtidos, têm sido demonstrado que os canais TRPV1 podem ser ativados e medeiam a nocicepção induzida por uma variedade de venenos e toxinas isoladas de venenos animais. Em 2006, Siemens e colaboradores demonstraram que *as vanilotoxinas (VaTx1, VaTx2, VaTx3) obtidas do veneno da aranha Psalmopoeus cambridgei*, atuam como agonistas dos canais TRPV1, e que a indução de nocicepção e desenvolvimento de edema após serem administradas na pata de camundongos são dependentes dos canais TRPV1. De maneira semelhante, os canais TRPV1 também podem ser ativados e mediar a nocicepção induzida pelo veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* (GEWEHR et al., 2013), e pela toxina DkTx obtida do veneno da aranha *Ornithoctonus huwena* (BOHLEN et al., 2010). Além disso, os canais TRPV1 também contribuem para a nocicepção induzida *pelos peptídeos RhTx da centopéia chinesa Scolopendra subspinipes mutilans* (YANG et al., 2015), e BmP01 do escorpião *Mesobuthus martensii* (HAKIM et al., 2015). Também já foi demonstrado sua participação na nocicepção promovida pelo veneno de cnidários tais como *Aiptasia pulchella*, *Cyanea capillata*, *Physalia physalis* e *Chironex fleckerii* (CUYPERS et al., 2006), e por componentes do veneno de serpentes como a *Echis coloratus* (GERON et al., 2017).

Assim, a utilização e combinação de estratégias genéticas e farmacológicas *in vivo*, juntamente com os dados obtidos em cultura de células HEK293 tranfectadas com o canal TRPV1, permitem ao presente estudo expandir o campo do conhecimento a cerca dos canais TRPV1 como alvos para ação de venenos e toxinas animais, fornecendo evidências de que os canais TRPV1 parecem não serem alvos para ação do BjV. Além disso, esses achados corroboram e também expandem o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pelos sintomas locais induzidos pelo BjV, permitindo excluir o envolvimento dos canais TRPV1.

Por outro lado, a nocicepção induzida pelo BjV foi significativamente reduzida em camundongos com deleção gênica dos canais TRPA1. Esse resultado foi confirmado com o pré-tratamento dos animais com um antagonista seletivo dos canais TRPA1. Além disso, os resultados obtidos a partir dos ensaios *in vitro* em cultura de células HEK293 tranfectadas com o canal TRPA1 e em culturas primárias de neurônios do GRD de ratos e camundongos sugerem que o BjV é capaz de ativar diretamente os canais TRPA1. De fato, têm sido demonstrado que os canais TRPA1 são alvos para venenos e toxinas isoladas de venenos animais. Curiosamente, a maior parte dos estudos têm demonstrado que os peptídeos ou toxinas obtidas de venenos animais que atuam sobre os canais TRPA1 apresentam atividade analgésica, devido à inibição do canal ou em decorrência de sua desensibilização induzida por ativação. Neste sentido, Tonello e colaboradores (2017) demonstram que o peptídeo Ph α 1 β obtido do veneno da aranha *Phoneutria nigriventer* atua como antagonista dos canais TRPA1 e apresenta importante efeito antinociceptivo em camundongos. De maneira semelhante, o peptídeo ProTx-I, obtido do veneno da tarântula *Thrixopelma pruriens* atua como um antagonista de alta afinidade nos canais TRPA1, apresentando uma importante ação analgésica (GUI et al., 2014). Somando-se à esses achados, recentemente Bressan e colaboradores (2016) demonstraram que a crotalina, um peptídeo obtido do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é capaz de ativar os canais TRPA1 *in vitro* e de promover uma extensa e prolongada dessensibilização do canal *in*

vivo, o que contribui para o seu efeito antinociceptivo. Semelhantemente, o peptídeo Ms9a-1, obtido da anêmona do mar *Metridium senile*, atua como um modulador positivo dos canais TRPA1, potencializa a resposta do canal à agonistas endógenos e promove desfuncionalização dos neurônios que expressam os canais TRPA1 (LOGASHINA et al., 2017). Por fim, o estudo de Vetter e colaboradores (2012) é um dos poucos que demonstram que os canais TRPA1 são mediadores da nocicepção promovida por toxinas animais. Neste estudo, os autores sugerem que a nocicepção (alodínia ao frio) promovida pelas ciguatoxinas (toxinas produzidas por dinoflagelados do gênero *Gambierdiscus*) se deve a ativação indireta dos canais TRPA1, a partir da sua ação sobre canais de sódio Nav 1.8. Diante do exposto, a combinação de estratégias genéticas e farmacológicas *in vivo*, em conjunto com os dados obtidos em cultura de células HEK293 tranfectadas com o canal TRPA1 e em cultura de neurônios do GRD de ratos e camundongos, permitem ao presente estudo fornecer as primeiras evidências de que os canais TRPA1 são diretamente ativados por um veneno animal e medeiam o seu efeito nociceptivo, expandindo o campo do conhecimento a cerca dos canais TRPA1 como alvos para ação de venenos e toxinas animais. Além disso, esses achados também expandem o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pelos sintomas locais induzidos pelo BjV, permitindo concluir que seu efeito nociceptivo se deve à ativação direta dos canais TRPA1 pelo veneno.

Com relação ao desenvolvimento de edema, os resultados obtidos no presente estudo revelam que as estratégias utilizadas (depleção das fibras sensoriais que expressam os canais TRPV1 e TRPA1 pelo tratamento com resiniferatoxina, deleção gênica dos canais TRPV1 ou TRPA1 e bloqueio farmacológico dos canais TRPV1 ou TRPA1) não foram capazes de prevenir/reduzir o desenvolvimento de edema promovido pelo BjV. Esses dados sugerem que o edema induzido pelo BjV não é mediado pela ativação dos canais TRPV1 ou TRPA1, apesar de estar bem estabelecido que a ativação desses canais em terminações nervosas periféricas leva a liberação de peptídeos vasoativos, tais como

substância P e CGRP, os quais por sua vez podem aumentar a permeabilidade vascular e facilitar a migração de células do sistema imune para o tecido lesionado, em um processo conhecido como inflamação neurogênica. Esses resultados vão ao encontro dos dados obtidos por Gonçalves e Mariano (2000), que demonstram que a desfuncionalização dos canais TRPV1 e TRPA1 (por meio do tratamento neonatal dos animais com capsaicina), bem como a secção cirúrgica dos nervos ciático e safeno, não foram capazes de reduzir o edema induzido pelo BjV. Têm sido sugerido que o edema promovido pelo veneno de serpentes é decorrente da lesão promovida pelos seus componentes às células endoteliais dos capilares vasculares, dilatando o espaço perinuclear, lesionando a membrana plasmática e levando ao extravassamento plasmático (OWNBY, 1982; GOLD et al., 2002).

Uma vez caracterizados a nocicepção e o edema induzidos pelo BjV e determinado que, especialmente a nocicepção, é mediada pelos canais TRPA1, a terceira parte do presente estudo procurou investigar os possíveis componentes do veneno que, via TRPA1, poderiam ser os responsáveis pelos seus sintomas locais.

Foi observado que o processo de diálise do BjV, realizado para remover moléculas de baixo peso molecular, não foi capaz de reduzir o desenvolvimento de nocicepção e edema induzidos pelo veneno. Esse achado sugere que moléculas de alto peso molecular são as principais responsáveis pelos efeitos promovidos pelo BjV. De fato, diversas moléculas de alto peso molecular tem sido isoladas do veneno de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops*, incluindo a *Bothrops jararaca*. Essas moléculas correspondem a maior parte dos componentes do veneno e em sua maioria são proteínas com propriedades enzimáticas. Dentre esses componentes destacam-se as enzimas metaloproteases, fosfolipase A₂, serinoproteases, e L-aminoácido oxidase (LAO) (DIAS et al., 2013; SOUSA et al., 2013; NICOLAU et al., 2016).

O presente estudo identificou uma importante atividade de serinoprotease no BjV, a qual foi significativamente reduzida pelo AEBSF, um clássico inibidor de serinoprotease. Esse inibidor, no entanto, não alterou a atividade de outros componentes do BjV, tais

como as metaloprotease, PLA₂ e LAAO. A atividade de serinoproteases também foi reduzida pelo processo de fervura do BjV e parcialmente reduzida pelo seu congelamento, sugerindo que as serinoproteases são componentes termossensíveis. Apesar do processo de fervura do BjV antes da sua injeção subcutânea, ter reduzido a nocicepção e o desenvolvimento de edema promovidos pelo veneno, o mesmo não foi obtido com o veneno submetido ao processo de congelamento. Além disso, a incubação do BjV com o inibidor de serinoproteases, AEBSF, previamente à sua administração na pata dos camundongos, não foi capaz de reduzir a nocicepção e o edema induzidos pelo veneno. Em conjunto, esses achados sugerem que as serinoproteases não estão envolvidas com a nocicepção e edema promovidos pelo BjV. De fato, têm sido sugerido que as serinoproteases não desempenham um papel primordial na nocicepção e desenvolvimento de edema induzidos por venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Neste sentido, Zychar e colaboradores (2010) demonstraram que um inibidor de serinoproteases, o PMSF, não foi capaz de reduzir a nocicepção induzida pelo veneno da *Bothrops jararaca*, e apenas promoveu uma discreta redução no edema desencadeado pelo veneno. Além disso, foi demonstrado que duas serinoproteases isoladas do veneno da *Bothrops pirajai*, a BpirSP27 e a BpirSP41, não apresentaram efeitos substanciais na indução de nocicepção e edema promovidos pelo veneno (MENALDO et al., 2013). Semelhantemente, Mamede e colaboradores (2016) sugerem que as serinoproteases presentes no veneno da *Bothrops alternatus* e da *Bothrops moojeni*, contribuem discretamente para a hiperalgesia e para o edema induzidos por esses venenos. Diante disso, os resultados do presente estudo corroboram os achados da literatura com relação a participação das serinoproteases nos sintomas locais promovidos pelo BjV, sugerindo uma menor contribuição desse componente nos efeitos observados.

O presente estudo também identificou uma importante atividade de LAAO no BjV. A LAAO contribui para o efeito tóxico dos venenos de serpentes onde está presente. Essa enzima é responsável pela deaminação oxidativa de L-aminoácidos

específicos produzindo o α -cetoácido correspondente, peróxido de hidrogênio e amônia. Classicamente, as LAAOs apresentam um importante efeito citotóxico sobre diferentes tipos celulares, como por exemplo, as células endoteliais vasculares, podendo contribuir para as hemorragias locais induzidas pelos venenos (ALVES et al., 2008) ou sobre as células do rim, contribuindo para seu efeito nefrotóxico (DANTAS et al., 2015). Além disso, também têm sido relatado que as LAAOs podem inibir a agregação plaquetária, apresentando um efeito anticoagulante (SAKURAI et al., 2003). No presente estudo, foi observado que a atividade de LAAO foi significativamente reduzida pelo 1,10-fenatrolina, o qual também reduziu a atividade de metaloprotease (ver discussão adiante). Isso pode ser explicado pelo fato de o 1,10-fenatrolina atuar como um quelante de íons divalentes e as duas enzimas (LAAO e metaloprotease) apresentarem íons divalentes em seus sítios ativos, os quais são essenciais para a atividade catalítica dessas enzimas. Interessantemente, o 1,10-fenatrolina reduziu a nocicepção e o edema induzidos pelo BjV e, portanto, isso poderia estar ocorrendo devido a inibição da atividade da LAAO ou da metaloprotease ou ainda, de ambas. No entanto, foi observado que o processo de congelamento do BjV reduziu, preferencialmente, a atividade enzimática da LAAO, sem alterar a atividade enzimática de metaloprotease. Somando-se à isso, observou-se que a administração subcutânea do BjV submetido ao processo de congelamento promoveu desenvolvimento de nocicepção e edema. Assim, esses achados sugerem que as LAAOs presentes no BjV não contribuem para o desenvolvimento dos sintomas locais observados após a injeção do veneno. De fato, aparentemente não há estudos que tenham procurado investigar a participação das LAAOs na nocicepção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* ou pelo veneno de outras serpentes do gênero *Bothrops*.

Além da atividade serinoprotease e LAAO, foi demonstrado que o BjV apresenta uma importante atividade de metaloprotease, corroborando os achados da literatura. Essa atividade de metaloprotease do BjV foi significativamente inibida/reduzida por um inibidor clássico de metaloproteases, o 1,10-fenatrolina. Além

disso, essa atividade enzimática também foi amplamente reduzida quando o BjV foi submetido ao processo de fervura. Interessantemente, conforme já comentado anteriormente, a incubação do BjV com o inibidor de metaloprotease, 1,10-fenantrolina, previamente à sua administração na pata dos camundongos, reduziu significativamente a nocicepção e o edema induzidos pelo veneno. De maneira semelhante o processo de fervura do BjV antes da sua injeção subcutânea, também foi capaz de reduzir a nocicepção e o desenvolvimento de edema promovidos pelo BjV. Corroborando esses achados, a administração de uma fração do BjV, a qual concentra a atividade de metaloproteases (fração P1), também foi capaz de promover o desenvolvimento de nocicepção e edema. Em conjunto, esses resultados sugerem que as metaloproteases presentes no BjV desempenham um papel importante no desenvolvimento dos sintomas locais induzidos pelo veneno. De fato, têm sido demonstrado que as metaloproteases contribuem sobremaneira para o processo inflamatório local induzido pelo veneno da *Bothrops jararaca*. Neste sentido, Bonavita e colaboradores (2006) sugerem que as metaloproteases estão envolvidas com a degranulação de mastócitos, liberação de histamina e desenvolvimento de hiperalgesia térmica promovida pelo BjV. De maneira semelhante, Zychar e colaboradores (2010) também sugeriram que as metaloproteases contribuem para a nocicepção induzida pelo BjV, uma vez que, sua resposta foi reduzida pelo inibidor 1,10-fenantrolina. Além disso, têm sido demonstrado que a jararagina, uma metaloprotease isolada do veneno da *Bothrops jararaca*, promove o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica após sua administração na pata de camundongos (ZYCHAR et al., 2010). As metaloproteases também contribuem para os efeitos locais, especialmente nocicepção e edema, promovidos pelo veneno de outras serpentes do gênero *Bothrops*. A batroxase, uma metaloprotease isolada do veneno da *Bothrops atrox* é capaz de induzir hiperalgesia mecânica e desenvolvimento de edema após ser injetada na pata de ratos (DE TONI et al., 2015). Semelhantemente, a BpirMP uma metaloprotease isolada do veneno da *Bothrops pirajai* contribui

para os eventos inflamatórios locais induzidos pelo veneno, incluindo a hiperalgesia mecânica e o desenvolvimento de edema (BERNARDES et al., 2015). Já a BaP1, uma metaloprotease isolada do veneno da *Bothrops asper* induz o recrutamento de leucócitos e a liberação de citocinas pró-inflamatórias após a sua administração na cavidade peritoneal de camundongos (FERNANDES et al., 2006). Diante do exposto, os resultados do presente estudo corroboram os achados da literatura demonstrando que as metaloproteases encontradas no veneno da *Bothrops jararaca* desempenham um papel central na nocicepção e desenvolvimento de edema induzidos pelo veneno. Além disso, também foi possível observar que a hemorragia local induzida pelo BjV foi significativamente reduzida pelo inibidor de metaloprotease (1,10-fenantrolina) ou pelo processo de fervura do veneno. Esses achados corroboram dados da literatura que sugerem que as metaloproteases contribuem para hemorragia local induzida pelo veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. A atividade hemorrágica das metaloproteases está relacionada à degradação de componentes da membrana basal das células endoteliais dos capilares vasculares, à atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica e à inibição da agregação plaquetária (Para revisão ver: XIONG e HUANG et al., 2018).

Por fim, o presente estudo também identificou uma importante atividade enzimática de fosfolipase A_2 no BjV. Essa atividade foi parcialmente reduzida pelo pBPB, um clássico inibidor da atividade de fosfolipase A_2 , o qual não reduziu a atividade enzimática de outros componentes do BjV, tais como metaloproteases, serinoproteases ou LAAO. Interessantemente, a incubação do BjV com esse inibidor de fosfolipase A_2 , não foi capaz de reduzir significativamente a nocicepção espontânea observada imediatamente após a administração do veneno na pata de camundongos, embora tenha reduzido os demais parâmetros nociceptivos e o desenvolvimento de edema. Considerando que o pBPB reduziu apenas de maneira parcial a atividade de PLA_2 , ainda há uma atividade residual de PLA_2 mesmo na presença do inibidor, a qual pode estar sendo suficiente para mediar essa nocicepção espontânea imediatamente após a injeção do BjV. Além disso, têm

sido demonstrado que as PLA₂ do veneno de serpentes, incluindo as do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, pertencem à duas classes principais, a classe I (também chamadas de Asp49 PLA₂), na qual estão as PLA₂ que apresentam atividade catalítica, e a classe II (também chamadas de Lys49 PLA₂) na qual se encontram as PLA₂ que não possuem atividade catalítica devido à substituição de um resíduo de Aspartato por um resíduo de Lisina na posição 49. Diversos estudos têm demonstrado que ambas as isoformas de PLA₂ isoladas dos venenos de diferentes espécies de *Bothrops*, contribuem para a nocicepção e desenvolvimento de edema promovidos por esses venenos (Para revisão ver TEIXEIRA et al., 2003). Neste sentido, está bem estabelecido que tanto a Asp49 PLA₂ quanto a Lys49 PLA₂ obtidas do veneno da *Bothrops asper* são capazes de promover hiperalgesia mecânica após suas administrações em roedores (CHACUR et al., 2003; 2004a; 2004b). Recentemente, ZHANG e colaboradores (2017) demonstraram que a BomoTx, uma Lys49 PLA₂ isolada do veneno da *Bothrops moojeni* é capaz de induzir dor inflamatória não-neurogênica, hiperalgesia térmica e alodínia mecânica em camundongos. De maneira semelhante, a bothropstoxina-I (BthTx-I), uma Lys49 PLA₂ obtida do veneno da *Bothrops jararacussu* promove o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica e edema após sua administração na pata de ratos (ZAMBELLI et al., 2017). Interessantemente, têm sido sugerido que a presença de atividade enzimática não é estritamente necessária para a indução da nocicepção, mas pode ser importante para determinar a intensidade do efeito nociceptivo nas Asp49 PLA₂. Além disso, sugere-se que atividade hiperalgésica das Lys49 PLA₂ está relacionada com uma sequência de aminoácidos (115 – 129) localizados na porção C terminal catiônica/hidrofóbica da enzima (CHACUR et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2003; ZAMBELLI et al., 2017).

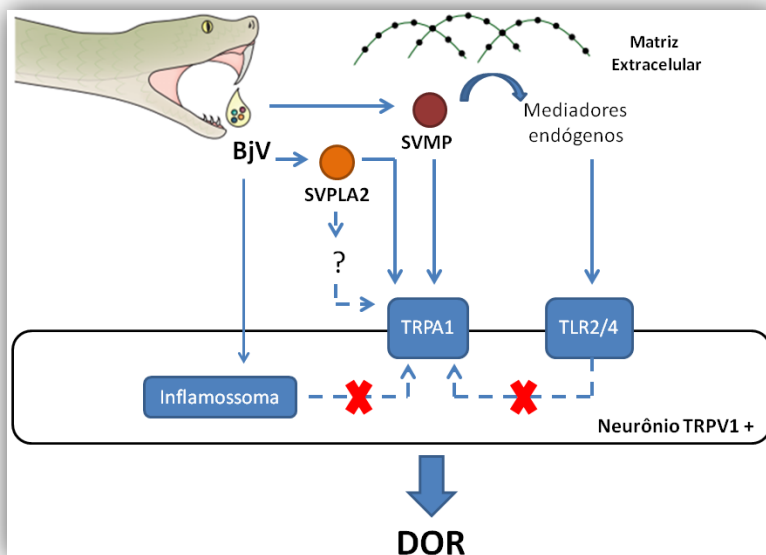
Diante do exposto, pode-se sugerir que a prevenção da nocicepção e edema promovidos pelo pBPB se devam a inibição, preferencialmente, da atividade enzimática das Asp49 PLA₂ presentes no BjV. No entanto, parte da nocicepção espontânea observada imediatamente após a administração do BjV pode estar sendo mediada pelas Lys49 PLA₂, as quais possivelmente não

encontram-se inibidas pelo pBPB. Além disso, foi possível observar que uma fração do BjV, a qual concentra a atividade de PLA₂ (fração P2), foi a que induziu uma maior resposta nociceptiva espontânea imediatamente após a administração subcutânea na pata de camundongos, principalmente se comparado ao efeito obtido com a fração P1, na qual se concentram as atividades de metaloprotease e serinoprotease. Essa fração P2 também promoveu o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica, alodínia ao frio e edema. Em conjunto, esses achados sugerem que as PLA₂ podem ser as principais responsáveis pela nocicepção obtida logo após a injeção do BjV e, juntamente com as metaloproteases presentes na fração P2, contribuem para os demais comportamentos nociceptivos e edema induzidos pelo BjV.

Diante do exposto, os dados aqui apresentados demonstram que o veneno da *Bothrops jararaca* induz nocicepção e edema quando injetado na pata de camundongos e que esse efeito é dependente de canais TRPA1 presentes em neurônios TRPV1 +. Além disso, sugerem que esse efeito pode estar sendo mediado, direta ou indiretamente pelas metaloproteases ou PLA₂ presentes no veneno, ou ainda, por ambas as enzimas. Por fim, esses dados ressaltam o papel desempenhado pelos canais TRPs como mediadores da nocicepção promovida por venenos animais.

Figura 12. Representação esquemática resumindo os principais achados obtidos no presente estudo. O veneno da *Bothros jararaca* apresenta efeito nociceptivo de maneira dependente dos canais TRPA1. As metaloproteases e as PLA₂ são os principais componentes do veneno que contribuem para o seu efeito nociceptivo, podendo mediar essa resposta de maneira direta ou indiretamente (via mediadores endógenos). Os receptores tipo *toll 2* ou 4, bem como o inflamossoma, parecem não contribuir para a nocicepção induzida pelo BjV. As setas cheias representam uma ação direta sobre os alvos, enquanto que as setas pontilhadas representam uma ação indireta. BjV – veneno da *Bothrops jararaca*; SVMP –

Metaloproteases do Veneno de Serpentes; SVPLA2 – Fosfolipase A₂ do veneno de serpentes; MEC – Matriz Extracelular. A imagem representativa da serpente foi obtida da publicação de Gutiérrez (2017).



6. Conclusões

1. A administração subcutânea do BjV na pata de camundongos induziu nocicepção aguda, hiperalgesia mecânica, comportamento afetivo-motivacional, alodínia ao frio e desenvolvimento de edema.
2. A ativação do inflamossoma ou dos receptores do tipo *toll*, parece não ser primordial para a nocicepção e edema induzidos pelo BjV.
3. O BjV é capaz de ativar os canais TRPA1, mas não os canais TRPV1, expressos em células HEK293 ou em neurônios do GRD de ratos ou camundongos.

4. A nocicepção, mas não o edema, induzidos pelo BjV é mediada pelos canais TRPA1, mas não pelos canais TRPV1, expressos em fibras TRPV1 positivas.
5. Componentes presentes nas frações P1 e P2 do BjV, com destaque para as metaloproteases e PLA₂ são os principais responsáveis pela nocicepção e edema induzidos pelo BjV.

Perspectivas

1. Investigar a participação dos canais TRPA1 na nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea das frações P1 ou P2 isoladas do BjV.
2. Determinar os níveis de H₂O₂ e de amônia no tecido da pata e no lavado da pata injetada com o BjV.
3. Avaliar a nocicepção e edema induzidos pela administração subcutânea da LAAO obtida do veneno de *Bothrops sp* ou LAAO recombinante na pata dos camundongos.
4. Investigar o efeito de anticorpo anti-LAAO na nocicepção e edema induzidos pelo BjV.
5. Avaliar a participação de hialuronidase presente no BjV nos efeitos locais promovidos pelo veneno.

7. Referências

ALVES, RM et al., Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A Molecular & Integrative Physiology**. v. 151, n.4, Dez, p. 542-50, 2008.

ANAND, P e BLEY, K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. **British Journal of Anaesthesia**. v. 107, n.4, Out, p. 490-502, 2011.

ARNOLD, C. Vipers, mambas and taipans: the escalating health crisis over snakebites. **Nature**. v. 537, n. 7618, Set, p. 26-28, 2016.

BANDELL M, et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**. v.41, n.6, Mar, p. 849-57, 2004.

BASBAUM, AI. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v.139, n. 2, Out, p. 267- 84, 2009.

BERNARDES, CP et al. Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom. **Molecular Immunology**. v. 68, n. 2 Pt B, Dez, p. 456-64, 2015.

BERTOLOZZI, MR et al. Vulnerabilities in snakebites in Sao Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v. 49, n. 82, Abr, p. 1-7, 2015.

BHAUMIK, S. Snakebite: a forgotten problem. **BMJ**. v. 346:f628, Jan, 2013.

BLASIUS, AL e BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**. v. 32, n. 3, Mar, p. 305–15, 2010.

BOCHNER, R e STRUCHINER, J.C. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Caderno de Saúde Pública**. v. 19, n.1, Jan-Fev, p. 7-16, 2003.

BOCHNER, R. et al. A Profile of Snake Bites in Brazil, 2001 to 2012. **Journal of Clinical Toxicology**. v. 4, n. 3, Abr, 2014.

BOHLEN, CJ e JULIUS, D. Receptor-targeting mechanisms of pain-causing toxins: How ow? **Toxicon**. v. 60, n.3, Set, p. 254-64, 2012.

BOHLEN, CJ et al. A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. **Cell**. v. 141, n.5, Maio, p. 834-45, 2010.

BONAVITA, AGC. et al. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**. v. 47, n. 8, Jun, p. 885–893, 2006.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, n. 1-2, Maio, p. 248-54, 1976.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophidico. **Revista Médica de São Paulo**. v. IV, p. 255- 260. 1901.

BRESSAN, E. et al. Crotalphine desensitizes TRPA1 ion channels to alleviate inflammatory hyperalgesia. **Pain**. v. 157, n.11, Nov, p. 2504-2516, 2016.

BRITAIN, JM et al. Suppression of inflammatory and neuropathic pain by uncoupling CRMP-2 from the presynaptic Ca²⁺ channel complex. **Nature Medicine**. v. 17, n. 7, Jun, p. 822-829, 2011.

CAMPOS, LB et al. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. **Toxicon**. v. 73, Dez, p. 1-10, 2013.

CARNEIRO, AS et al. *Bothrops jararaca* venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon**. v.52, n.5, Out, p. 619-27, 2008.

CATERINA, MJ et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. v. 389, n. 6653, Out, p. 816-24, 1997.

CHACUR, et al. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by Bothrops jararaca venom. **Toxicon**. v. 40, n.7, Jul, p. 1047-51, 2002.

CHACUR, M et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from Bothrops asper snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**. v. 41, n.6, Maio, p. 667-78, 2003.

CHACUR, M et al. Snake venom phospholipase A2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**. v. 108, n.1-2, Mar, p. 180-91, 2004a.

CHACUR, M. Snake venom components enhance pain upon subcutaneous injection: an initial examination of spinal cord mediators. **Pain**. v. 111, n.1-2, Set, p. 65-76, 2004b.

CHAPLAN, SR et al. Quantitative assessment of allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 53, n. 1, Jul, p. 55-63, 1994.

CHIPPAUX, J.P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 21, n.13, Maio, 2015.

CHIPPAUX, JP Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 76, n. 5, p. 515–524, 1998.

CIDADE, DA et al. Bothrops jararaca venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**. v. 48, n.4, Set, p. 437-61, 2006.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M et al. Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain. **Toxicon**. v. 55, n.2-3, Feb-Mar, p. 590-6, 2010.

CISCOTTO, P et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from Bothrops jararaca snake venom. **Toxicon**. v. 53, n. 3, Mar, p. 330-41, 2009.

CLISSA, P.B. et al. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**. v. 47, n.5, Abr, p.591–596, 2006.

CORDER, G et al. Loss of μ opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. **Nature Medicine**. v. 23, n.2, Fev, p. 164-173, 2017.

CURY, Y et al. Edematogenic responses induced by Bothrops jararaca venom in rats: role of lymphocytes. **Toxicon**. v. 32, n.11, Nov, p. 1425-31, 1994.

CUYPERS, E et al. Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. **FEBS Letters**. v. 580, n.24, Out, p. 5728-32, 2006.

DANTAS, RT et al. l-amino acid oxidase from *Bothrops marajoensis* causes nephrotoxicity in isolated perfused kidney and cytotoxicity in MDCK renal cells. **Toxicon**. v. 104, Set, p. 52-6, 2015.

DELAFONTAINE, M et al. Enzymatic and pro-inflammatory activities of *Bothrops lanceolatus* venom: Relevance for envenomation. **Toxins (Basel)**. v. 9, n. 8, pii: E244, 2017.

DE SOUZA, LL et al. Determination of toxic activities in *Bothrops* spp. Snake venoms using animal free approaches: correlation between in vitro versus in vivo assays. **Toxicological Science**. v. 147, n.2, p. 458-65, 2015.

DE TONI, LG 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, Set, p. 199-207, 2015.

DIAS, GS et al. Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens, **J. Proteome Res**. v.12, n. 10, Out, p. 4585–4598, 2013.

DIOGENES, A et. al. NGF up-regulates TRPA1: implications for orofacial pain. **Journal of dental research**. v. 86, n.6, Jun, p. 550-5, 2007.

DIXON, WJ. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 20, Abr, p. 441-462, 1980.

DOMBROWSKY, Y et al. Honey bee (*Apis mellifera*) venom induces AIM2 inflammasome activation in human keratinocytes. **Allergy**. v. 67, n.11, Nov, p. 1400-7, 2012.

ERLANGER, BF et al. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 95, Nov, p. 271-8, 1961.

ERRIDGE, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? **Journal of Leukocyte Biology**. v.87, n.6, Jun, p. 989-99, 2010.

ESCALANTE, T et al. Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability: Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. **PLoS One**. v. 6, n. 12, Dez, e28017, 2011.

ESCALANTE, T et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, Ago, p. 1781–1794, 2011.

FARAZIFARD, R et al. Eye-wiping test: a sensitive animal model for acute trigeminal pain studies. **Brain Research – Brain Research Protocols**. v. 16, n. 1-3, Dez, p. 44-49, 2005.

FARSKY, SH et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**. v. 35, n.2, Fev, p. 185-93, 1997.

FERNANDES, CM et al. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF- α and PGE2-dependent mechanisms. **British Journal of Pharmacology**. v. 151, n. 8, Aug, p.1254–1261, 2007.

FERNANDES, CP et al. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**. v. 47, n.5, Abr, p. 549-59, 2006.

FERRAZ CR et al. Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF- α , IL1 β and NFkB in mice. **Toxicon**. v. 103, Set, p. 119-128, 2015.

FERREIRA, J et al. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice. **British Journal of Pharmacology**. v. 141, n.5, Mar, p. 787-94, 2004.

GERON, M et al. Protein toxins of the *Echis coloratus* viper venom directly activate TRPV1. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1861, n.3, Mar, p. 615-623, 2017.

GEWEHR, C et al. Mechanisms involved in the nociception triggered by the venom of the armed spider *Phoneutria nigriventer*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n.4, Abr, e2198, 2013.

GOLD, B.S. et al. Bites of Venomous Snakes. **New England Journal of Medicine**. v. 347, n. 5, Aug, p. 347-356, 2002.

GONÇALVES, LR e MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediators of Inflammation**. v. 9, n.2, p. 101-7, 2000.

GUI, J et al. A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1-S4 gating domain. **Current Biology**. v. 24, n.5, Mar, p. 473-83, 2014.

GÜLER, AD. Heat-evoked activation of the ion channel TRPV4. **The Journal of Neuroscience**. v. 22, n.15, Ago, p. 6408-14, 2002.

GUTIÉRREZ JM, et al. Snakebite envenoming. **Nat Rev Dis Primers**. v. 3, n. 17079, Oct, 2017

GUTIÉRREZ, J et al. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Medicine**. v. 3, n.6, Jun, p. 727-731, 2006.

GUTIÉRREZ, J. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**. v. 5, n.1, Jun, p. 1-16, 2011.

GUTIÉRREZ, JM e OWNBY, CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**. v. 42, n. 8, Dec, p. 915-31, 2003.

GUTIÉRREZ, JS et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**. v. 56, n. 7, p. 1223-1235, Dez, 2010.

GUTIÉRREZ, J et al. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMs): novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. **Toxins (Basel)**, v. 8, n.10, Oct, pii: E304, 2016.

HÄCKER, H et al. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. **Nature Reviews Immunology**. v.11, n.7, Jun, p. 457-68, 2011.

HAKIM, MA et al. Scorpion Toxin, Bmp01, Induces Pain by Targeting TRPV1 Channel. **Toxins (Basel)**. v. 7, n.9, Set, p. 3671-87, 2015.

HARRISON, R. e GUTIÉRREZ, J. Priority actions and progress to substantially and sustainably reduce the mortality, morbidity and socioeconomic burden of tropical snakebite. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 351, Nov, pii: E351, 2016.

HARRISON, RA et al. Research strategies to improve snakebite treatment: challenges and progress. **Journal of Proteomics** v. 74, p. 1768–1780, 2011.

HOLZER, M e MACKESSY, SP. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**. v. 34, n.10, Out, p. 1149-55, 1996.

IADAROLA, MJ e GONELLA, GL. Resiniferatoxin for Pain Treatment: An Interventional Approach to Personalized Pain Medicine. **Open Pain Journal**. v. 6, Jan, p. 95–107, 2013.

JAMI, S et al. Pain-Causing Venom Peptides: Insights into Sensory Neuron Pharmacology. **Toxins (Basel)**. v. 10, n. 1, Dez, p. pii: E15, 2017.

JL,RR et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. **Neuron**. v. 36, n.1, Set, p. 57-68, 2002.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 29, Out, p. 355-84, 2013.

JULIUS, D e BASBAUM, AI. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. v. 413, n.6852, Sep, p.203-10, 2001.

KAWAI, T e AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**. v. 34, n.5, Maio, p. 637-50, 2011.

KAWAI, T e AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**. v. 11, n.5, Maio, p. 373-84, 2010.

LEOBAS, FG et al. Accidents by venomous animals in Tocantins state: clinical and epidemiological aspects. **DESAFIOS: Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**. v. 2, n. 02, Jan/Jun, p.269-282, 2016.

LOESER, JD e TREEDE, RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. v. 137, n.3, Jul, p. 473-7. 2008.

LOGASHINA, YA et al. Peptide from Sea Anemone *Metridium senile* Affects Transient Receptor Potential Ankyrin-repeat 1 (TRPA1) Function and Produces Analgesic Effect. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 292, n.7, Fev, p. 2992-3004, 2017.

MALAQUE, C e GUTIÉRREZ, J. Snakebite envenomation in Central and South America. In: *Critical Care Medicine* (Brendt et al., Eds.), Springer International, Switzerland, p. 1-22, 2016.

MAMEDE, CC et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**. v. 117, Jul, p. 37-45, 2016.

MARKLAND, FS Jr e SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**. v. 62, Fev, p. 3-18, 2013.

MARTINOV, T et al. Measuring Changes in Tactile Sensitivity in the Hind Paw of Mice Using an Electronic von Frey Apparatus. **Journal of Visualized Experiments**. n. 82, Dez, e51212, 2013.

MATERAZZI, S *et al.* TRPA1 and TRPV4 mediate paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice via a glutathione-sensitive mechanism. **Pflugers Archiv**. v. 463, n. 4, Abr, p. 561–569, 2012.

MCGETTRICK, AF e O'NEILL, LA. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion Immunology**. v. 22, n.1, Feb, p. 20-7, 2010.

MENALDO, DL et al. Effects of two serine proteases from Bothrops pirajai snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**. v. 15, n.4, Abr, p. 764–771, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. - Brasília, 2001.

MISE, YF et al. Envenomation by Bothrops in the State of Bahia: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 40, n.5, Out, p. 569-573, 2007.

MONTECUCCO, C et al. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell Mol Life Sci**. v.65, n.18, p. 2897-912, Sep, 2008.

MONTELL, C e RUBIN, GM. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**. v. 2, n. 4, Abr, p. 1313-23, 1989.

MORAN, MM e SZALLASI, A. Targeting nociceptive transient receptor potential channels to treat chronic pain: current state of the field. **British Journal of Pharmacology**. v. 175, Set, p. 2185-2203, 2017.

MOREIRA, V et al. The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by *Bothrops atrox* venom. **Toxicon**. v. 67, Jun, p. 37-46, 2013.

MOREIRA, V et al. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by *Bothrops atrox* snake venom. **Toxicon**. v. 118, Ago, p. 121-8, 2016.

MOTA-DA-SILVA, A. accidents with poisonous animals in Brazil by age and sex. **Journal of Human Growth and Development**. v. 25, n.1, Oct, p. 54-62, 2015.

NASCIMENTO, LF. Efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Piper aleyreanum* C.DC. (PIPERACEAE) na hiperalgesia induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* (VIPERIDAE). 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Rondônia. 2014.

NASSINI, R *et al.* The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. **British Journal of Pharmacology**. v. 172, n. 1, Jan, p. 3397–341., 2015.

NICOLAU, CA et al. An in-depth Snake venom Proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **J Proteomics**. v. 16, n. 151, Jan, p. 214-231, 2017.

NOGUEIRA-JUNIOR, FA Análise dos casos de acidentes ofídicos em um centro de controle de intoxicação da Paraíba – Brasil. 2014. 42 p. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Bacharelado em

Farmácia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Estadual da Paraíba. 2014.

OLIVEIRA, FN et al. Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n.6, Nov/Dez, p. 662-667, 2010.

OWNBY, CL et al. Quantitation of myonecrosis induced by myotoxin a from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Toxicon**. v. 20, n.5, p. 877-85, 1982.

PALM, NW e MEDZHITOV, R. Role of the inflammasome in defense against venoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 110, n.5, Jan, p. 1809-14, 2013.

PARNAS, I e PARNAS, H Control of neurotransmitter release: From Ca^{2+} to voltage dependent G-protein coupled receptors. **Pflugers Arch**. v. 460, n.6, Nov, p.975-90, 2010.

PATAPOUTIAN, A et al. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 8, n. 1, Jan, p. 55–68, 2009.

PICOLO, G et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, n.10, Out, p. 1221-8, 2002.

RÄGO, L. et al. Treating snake bites - a call for partnership. **The Lancet**. v. 386, n. 10010, Dez, p.2252, 2015.

RIBEIRO, AL e JORGE, MT Acidente por serpentes do gênero bothrops: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 30, n.6, Nov/Dez, p. 475-480, 1997.

RIOL-BLANCO, L et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. **Nature**. v. 510, n. 7503, Jun, p-157-61, 2014.

ROCHA, SLG et al. Inhibition of the hyperalgesic activity of *Bothrops jararaca* venom by an antiothropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon**. v.38, n. 6, Jun, p. 875-880, 2000.

ROHR, JF. Estudo clínico-epidemiológico dos acidentes botrópicos atendidos no hu/ufsc em 2005 e 2006. 2007. 41 p. Trabalho de conclusão de curso. Curso de Graduação em Medicina. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

RUCAVADO, A et al. Viperid Envenomation Wound Exudate Contributes to Increased Vascular Permeability via a DAMPs/TLR-4 Mediated Pathway. **Toxins (Basel)**. v.8, n.12, Nov, pii: E349, 2016.

SAKURAI, Y et al. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1649, n. 1, Jun, p. 51-7, 2003.

SANTANA, V.T.P. et al. Clinical and epidemiological aspects related to accidents with venomous animals. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v. 14, n. 2, Maio/Ago, p. 153-159, 2015.

SANTONI, G et al. Danger- and pathogen-associated molecular patterns recognition by pattern-recognition receptors and ion channels of the transient receptor potential family triggers the inflammasome activation in immune cells and sensory neurons. **Journal of Neuroinflammation** v. 12, n. 21, Fev, 2015.

SAWADA, Y et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. **European Journal of Neuroscience** v. 27, n.5, Mar, p. 1131-42, 2008.

SHERRINGTON, CS. The integrative action of the nervous system. Scribner, New York, p. 446, 1906.

SIEMENS, J e HANACK, C. Modulation of TRP ion channels by venomous toxins. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v. 223, p. 1119-42, 2014.

SIEMENS, J et al. Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain. **Nature**. v. 444, n. 7116, Nov, p. 208-12, 2006.

SMITH, J & BUSH, S. Envenomations by Reptiles in the United States. In: Mackssey, S. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Taylor & Francis, 2010.

SOARES, KSR et al. Antivenom Production against *Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* Snake Venoms Using Cross-Linked Chitosan Nanoparticles as an Adjuvant. **Toxins (Basel)**. v. 10, n. 4, Apr, pii: E158, 2018.

SOUSA, LF, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Negl. Trop. Dis**. v. 7, n.9, Set, e2442, 2013.

SOUSA-VALENTE, S et al. Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. **British Journal of Pharmacology**. v.171, n. 10, Maio, p. 2508–2527, 2014.

STORY, GM et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**. v. 112, n. 6, Mar, p. 819–829, 2003.

SWAROOP, S e GRAB, B. Snake bite mortality in the world. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 10, n. 1, p. 35-70, 1954.

TAN, NH e PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v. 100, n. 2, p. 361-5, 1991.

TEIXEIRA, CF et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**. v. 42, n. 8, Dez, p. 947-62, 2003.

TEIXEIRA, CFP et al. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**. v. 32, n. 4, Abr, p. 419-426, 1994.

THE LANCET. Snake-bite envenoming: a priority neglected tropical disease. **Lancet**. v. 390, n. 10089, Jul, p. 2, 2017.

TONELLO, R et al. The peptide Ph α 1 β , from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice. **British Journal Pharmacology**. v. 174, n.1, Jan, p. 57-69, 2017.

TREBIEN, H e CALIXTO, JB. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents Actions**. v. 26, n. 3-4, Mar, p. 292-300, 1989.

TREVISAN, G et al. Novel therapeutic strategy to prevent chemotherapy-induced persistent sensory neuropathy by TRPA1 blockade. **Cancer Research**. v. 73, n.10, Maio, p. 3120-31, 2013.

VAZ, E. Vital Brazil. **Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia**. v. 60, p. 347-366, 1950.

VETTER, I et al. Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. **EMBO Journal**. v. 31, n.19, Out, p. 3795-808, 2012.

VILCA-QUISPE, A et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**. v. 55, n.4, Abr, p. 745-53, 2010.

VON MOLTKE, J et al. Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome *in vivo*. **Nature**. v. 490, n.7418, Out, p. 107–111, 2012.

WANG, S et al. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**. v. 131, n. Pt-5, Maio, p. 1241–1251, 2007.

WARRELL, DA. In: *Venomous Reptiles of the Western Hemisphere* (eds Campbell, JR & Lamar, WW) 709–761 (Cornell Univ. Press, 2004).

WHITE JP, et al. TRPV1 function in health and disease. **Current Pharmacology Biotechnology**. v. 12, n,1, Jan, p. 130–44, 2011.

WHO. Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins. 2010b. Disponível em: < http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguideline.pdf >. Acesso em: 10 Out. 2017.

WHO. Venomous snakes distribution and species risk categories. 2010a. Disponível em: < <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/> >. Acesso em: 10 Out. 2017.

WILLIAMS, D. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**. v. 375, n. 9708, Jan, p. 89-91, 2010.

XIONG, S e HUANG, C. Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms. **Toxicology Letters**. v. 287, Maio, p. 142-154, 2018.

YAMASHITA, KM et al. Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and Bothrops jararaca snake venom. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. v.9, n. 10, Out, p. 2057–2066, 2011.

YANG, S et al. A pain-inducing centipede toxin targets the heat activation machinery of nociceptor TRPV1. **Nature Communications**. v.6:8297, 2015.

ZAMBELLI, V.O. et al. Structural determinants of the hyperalgesic activity of myotoxic Lys49-phospholipase A2. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 23, n. 7, Fev, eCollection, 2017.

ZHANG, C et al. Lys49 myotoxin from the Brazilian lancehead pit viper elicits pain through regulated ATP release. **Proceeding of National Academy of Sciences**, v. 114, n.12, Mar, p. E2524-E2532, 2017.

ZHANG, X et al. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. **EMBO Journal**. v.24, n.24, Dez, p. 4211-23, 2005.

ZOCCAL, KF et al. Opposing roles of LTB4 and PGE2 in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communication**, v. 7, n. 10760, Feb, 2016.

ZOCCAL, KF et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from Tityus serrulatus to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PLoS One**. v. 9, n. 2, Fev, e88174, 2014.

ZYCHAR, BC et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca crude venom in mice. **Toxicon**. v. 55, n. 2-3, Fev/Mar, p. 227–234, 2010.

8. Apêndices

Figura Suplementar 1. Caracterização da nociceção e edema induzidos pela injeção intraplantar do veneno da *Bothrops jararaca* (1 µg/pata) em camundongos machos e fêmeas. (A) Nociceção espontânea – tempo de lambida/agitação da pata; (B) Hiperalgesia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.* indica diferença estatisticamente significativa quando comparado os grupos que receberam BjV (1 µg/pata) com os seus respectivos grupos veículo (20 µl/pata). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A linha cinza representa média±E.P.M. dos valores basais. BjV – *Bothrops jararaca* venom; s.c. - subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.

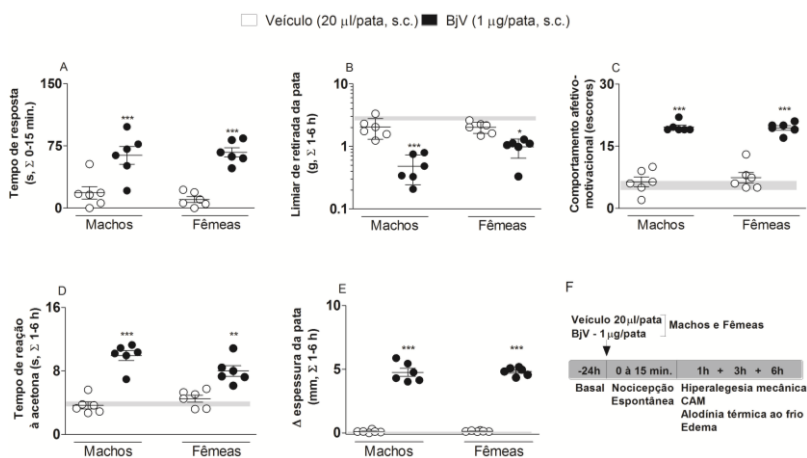


Figura Suplementar 2. Nociceção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica de caspase 1/11. (A) Nociceção espontânea – lambida da pata; (B) Hiperalgesia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pelo Teste t de Student ou pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett, comparando o resultado de cada grupo experimental com os valores basais (linha cinza). # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo Cas^{+/+}. ##p<0,01. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com os valores basais (linha cinza). *p<0,05; e ***p<0,001. BjV – Veneno da *Bothrops jararaca* ; Cas – caspase; s.c. – subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.

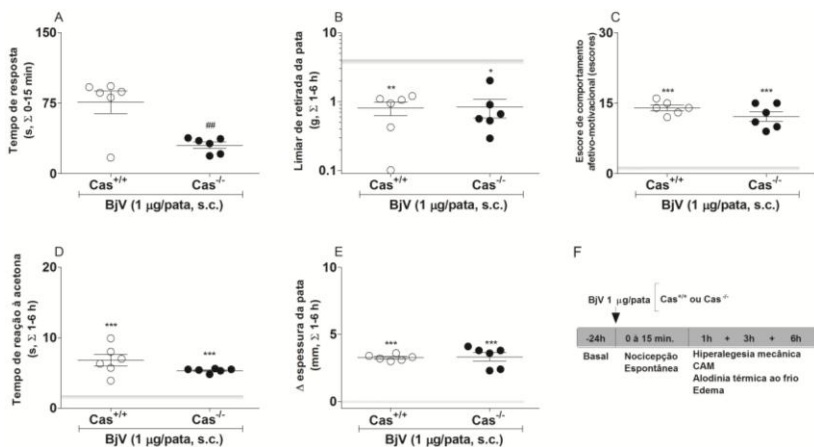


Figura suplementar 3. Nociceção e edema induzidos pelo veneno da *Bothrops jararaca* em camundongos com deleção gênica de receptores toll-like 2 ou receptores toll-like 4. (A) Nociceção espontânea – lambida da pata; (B) Hiperalgisia mecânica – Teste de von Frey; (C) Nociceção espontânea – comportamento afetivo-motivacional; (D) Alodínea térmica ao frio – teste da acetona; (E) Edema – espessura da pata; (F) Representação da linha do tempo para o protocolo utilizado. Os dados estão expressos como média±E.P.M. do somatório das respostas obtidas de 0 à 15 minutos (A) ou de 1 à 6 horas (B-E) após a administração subcutânea do BjV (1 µg/pata), sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett, comparando o resultado de cada grupo experimental com os valores basais (linha cinza). * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado com os valores basais (linha cinza). **p<0,01 e ***p<0,001; BjV – Veneno da *Bothrops jararaca*; TLR – do inglês *toll-like receptor*; TLR2 – do inglês *toll-like receptor 2*; TLR4 – do inglês *toll-like receptor 4*; s.c. – subcutâneo; s – segundos; min. – minutos; h – horas; mm – milímetros.

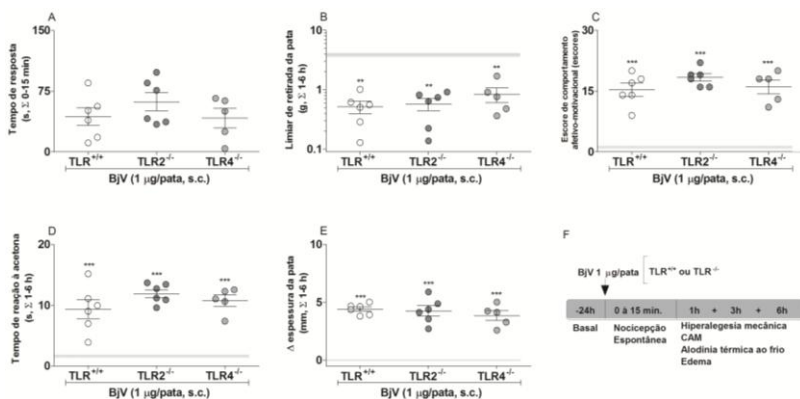


Figura Suplementar 4. Teste de limpeza do olho frente a estimulação corneal com agonistas dos canais TRPA1 ou TRPV1 em camundongos pretratados com resiniferatoxina. Número de comportamentos de limpeza do olho após estimulação corneal com agonista o TRPA1, AITC (A), ou com o agonista TRPV1, capsaicina (B), em camundongos pretratados com veículo (RTX-) ou resiniferatoxina (RTX+). Os dados são expressos como média±E.P.M., sendo realizados de 2-3 blocos experimentais independentes. Análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo RTX-/AITC (50 μ L – 1 mM) com o grupo RTX-/ Veículo (50 μ L) ou quando comparado o grupo RTX-/Capsaicina (50 μ L – 100 μ M) com o grupo RTX-/Veículo (50 μ L). *** p <0,001. # indica diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo RTX+/AITC (50 μ L – 1 mM) com o grupo RTX+/Veículo (50 μ L) ou quando comparado o grupo RTX+/Capsaicina (50 μ L – 100 μ M) com o grupo RTX+/Veículo (50 μ L). ### p <0,001. RTX – Resniferatoxina; AITC – Alil isotiocianato (agonista TRPA1).

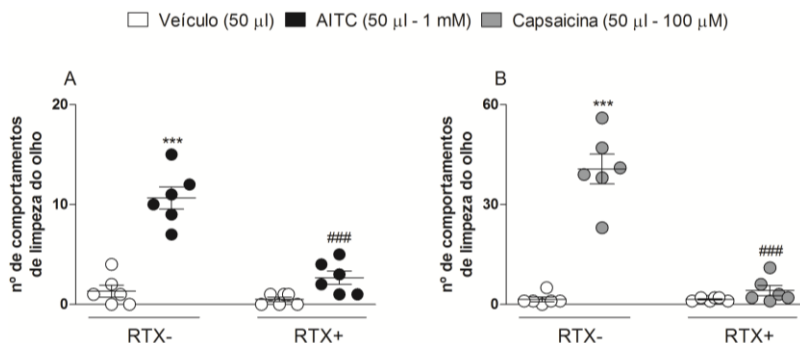


Figura Suplementar 5. Parâmetros cinéticos dos ensaios in vitro para determinação da atividade enzimática de componentes específicos do veneno da *Bothrops jararaca*. Constante de Michaelis-Menten (K_m) e Velocidade máxima (V_{max}) obtidos no (A) ensaio da azocaseína utilizado para determinação da atividade de metaloprotease; no (B) ensaio utilizado para determinação da atividade de serinoprotease; no (C) ensaio utilizado para determinação da atividade de fosfolipase A_2 ; no (D) ensaio utilizado para determinação da atividade de LAAO. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. da diferença de densidade óptica (Δ DO) para o controle (branco) da reação e corrigidos pela concentração de proteína detectada em cada amostra e pelo tempo total da reação, sendo realizadas 3 determinações independentes e 3 replicatas para cada concentração dos respectivos inibidores.

