

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

EDIGAR HENRIQUE VAZ DIAS

Peçonha de *Bothrops alternatus*: avaliação *in vitro* da atividade antiviral contra a infecção pelo vírus da dengue e a influência de uma toxina isolada na secreção de citocinas

UBERLÂNDIA

Julho/2015

EDIGAR HENRIQUE VAZ DIAS

Peçonha de *Bothrops alternatus*: avaliação *in vitro* da atividade antiviral contra a infecção pelo vírus da dengue e a influência de uma toxina isolada na secreção de citocinas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

UBERLÂNDIA

Julho/2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D541p
2015

Dias, Edigar Henrique Vaz

Peçonha de *Bothrops alternatus*: avaliação in vitro da atividade antiviral contra a infecção pelo vírus da dengue e a influência de uma toxina isolada na secreção de citocinas / Edigar Henrique Vaz Dias. - 2015.

62 f. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.

Coorientador: Jonny Yokosawa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. *Bothrops* - Teses. 3. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 4. Citocinas - Teses. I. Oliveira, Fábio de. II. Yokosawa, Jonny. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar a possibilidade de estudar e poder contribuir um pouco com a geração de conhecimento, objetivando futuramente auxiliar a melhoria da qualidade de vida das pessoas.

Agradeço aos meus pais, Divino Henrique e Keilah Maria, os quais são meus professores de vida desde que nasci, pelo carinho, apoio e dedicação durante todas minhas decisões.

Ao meu irmão, Alencar Henrique, pelo companheirismo e irmandade tão importantes nesses anos de estudo.

Também agradeço aos demais familiares, avôs, tios e primos, que mesmo longe sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente.

À minha namorada, Wanessa Nayara, pela paciência, atenção e companheirismo durante essa jornada.

Agradeço aos meus amigos pelo companheirismo, que mesmo indiretamente foram essenciais para que eu chegasse até um fim de mais uma etapa pessoal e profissional.

Ao meu orientador, prof. Dr. Fábio de Oliveira, pela atenção, dedicação, confiança em mim depositada e também pela sua importante contribuição para minha formação profissional.

Agradeço também ao meu co-orientador, prof. Dr. Jonny Yokosawa, pelos ensinamentos, atenção e disponibilidade em ajudar, sendo crucial para a concretização desse trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Molecular e Celular e do laboratório de Virologia pela amizade, apoio e ajuda nos experimentos.

À prof (a). Dr (a). Fernanda Maria Santiago, as alunas Vanessa dos Santos Miranda e Flávia Batista Ferreira do Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia pela atenção e ajuda nos experimentos de dosagem de citocinas.

À prof (a). Dr (a). Nadia Giaretta Biase da Faculdade de Matemática da Universidade Federal de Uberlândia pela atenção e disponibilidade em ajudar na análise estatística dos experimentos.

À Juliana Silva Miranda, doutoranda em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela Universidade Federal de Uberlândia, pela ajuda e disponibilidade na realização dos experimentos de antiviral.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Instituto de Ciências e Tecnologia Nanobiofarmacêutico (INCT NanoBiofar), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Uberlândia pelos ensinamentos e contribuições para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

Edigar Henrique Vaz Dias

*“...Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz.
E ser feliz...”*

Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

A peçonha de serpentes tem um futuro promissor para a medicina, pois seus componentes apresentam diversos efeitos fisiológicos e farmacológicos ao interagirem com moléculas das células. Esses componentes podem ser usados como agentes terapêuticos, marcadores para o diagnóstico de várias doenças e ferramentas de pesquisas para decifrar processos fisiológicos e patológicos em humanos. Nosso trabalho teve como objetivo isolar uma fosfolipase A2 da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* e caracterizar sua influência na liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como avaliar a sua ação sobre o efeito antiviral contra o vírus da dengue sorotipo 2. A toxina PLA₂ Ba3dP7 apresentou um peso molecular de aproximadamente 17 kDa e teve a capacidade de estimular a produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α , porém, a expressão das duas últimas foi estatisticamente significativa, quando comparada com a produção de IL-10, o que sugere um perfil pró-inflamatório dessa toxina ($p < 0,05$). Os resultados obtidos mostraram ainda que a toxina estimulou a produção de óxido nítrico, o que reforça o papel pró-inflamatório da PLA₂ Ba3dP7, dessa forma, essa toxina pode ser uma importante proteína relacionada aos processos inflamatórios gerados pelo envenenamentos por serpentes da espécie *B. alternatus*. Foi observado que a peçonha bruta diminuiu a citotoxicidade gerada pelo DENV 2 após o pré-tratamento das células C6/36 com a mesma, caracterizando possivelmente seu papel protetor contra a infecção viral. Além disso, a peçonha bruta apresentou atividade virucida ($p < 0,05$). É importante ressaltar que mais estudos são necessários para determinar qual (ais) componente (s) presente na peçonha é (são) responsável (is) pela a atividade de proteção e pela ação virucida.

Palavras-chave: Antiviral; *B. alternatus*; citocinas; dengue; peçonha de serpentes

ABSTRACT

The snake venom has a promising future for medicine because their components have various physiological and pharmacological effects when interacting with molecules of cells. These components can be used as therapeutic agents, diagnostic markers for various diseases and research tools for deciphering physiological and pathological processes in humans. Our study aimed to isolate a phospholipase A2 from the venom of *Bothrops alternatus* and characterize their influence on the release of pro and anti-inflammatory cytokines and analyze its action on the antiviral effect against dengue virus serotype 2. The toxin PLA2 Ba3dP7 had a molecular weight of approximately 17 kDa and has the ability to stimulate the production of IL-10, IL-12 and TNF- α , however, the expression of the latter two was statistically significant compared with the production of IL-10, suggesting a proinflammatory profile of this toxin ($p < 0.05$). The results also showed that the toxin stimulated nitric oxide production, which enhances the proinflammatory role of PLA2 Ba3dP7, thus this toxin may be an important protein related to inflammatory processes generated by poisoning by snakes of the species *B. alternatus*. It was observed that the crude venom decreased cytotoxicity generated by DENV 2 after pre-treatment of C6/36 cells with the same, possibly featuring its protective role against viral infection. Furthermore, the crude venom showed virucidal activity ($p < 0.05$). Importantly, more studies are needed to determine which (es) component (s) present in the venom is (are) responsible (s) for the protection activity and for virucidal action.

Keywords: Antiviral; *B. alternatus*; cytokines; dengue; Snake venoms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Composição proteica da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i>	15
FIGURA 2	Esquema da hidrólise da fosfatidilcolina pelas diversas fosfolipases (PLA1, PLA2, PLB, PLC e PLD).....	16
FIGURA 3	Classificação das fosfolipases A2.....	17
FIGURA 4	Componentes da resposta inflamatória.....	21
FIGURA 5	Crioeletromicrografia mostrando a estrutura da partícula do vírus da dengue	25
FIGURA 6	Fracionamento da peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> em DEAE Sephacel.....	36
FIGURA 7	Purificação da PLA2 Ba3dP7.....	37
FIGURA 8	Atividade hemólise indireta.....	38
FIGURA 9	Dosagem da produção da citocina IL-10 por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> e Ba3dP7.....	39
FIGURA 10	Dosagem da produção da citocina IL-12 por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> e Ba3dP7.....	40
FIGURA 11	Dosagem da produção de TNF- α por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> e Ba3dP7.....	41

FIGURA 12 Dosagem da produção de IL-10, IL-12 e TNF- α por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de PLA2 Ba3dP7.....	42
FIGURA 13 Dosagem da produção de nitrito por macrófagos estimulados com diferentes concentrações da peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> e da PLA2 Ba3dP7.....	43
FIGURA 14 Citotoxicidade da peçonha bruta e da PLA2 Ba3dP7 isolada de <i>B. alternatus</i> em células C6/36 avaliada pelo método colorimétrico de MTT.....	45
FIGURA 15 Pré-tratamento das células C6/36 com 50 ng/ μ L de peçonha bruta e posterior adição das diluições seriadas do DENV 2.....	46
FIGURA 16 Atividade virucida de 50 ng/ μ L da peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> contra o DENV 2.....	47
FIGURA 17 Atividade virucidade da PLA2 Ba3dP7 (50 ng/ μ L) contra o DENV 2.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD4+	Linfócitos T auxiliares
CD8+	T citotóxicos
CEBEA	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
cPLA2	PLA2 citosólicas
DENV 2	Vírus da dengue sorotipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
INF-γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
iPLA2	PLA ₂ Ca ²⁺ independentes
LAAOs	L-amino ácido oxidases
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NOs	NO sintases
PAF-AH	Acetilhidrolases ativadoras do fator ativador de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada em fosfato
PLA2	Fosfolipases A ₂
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
svMPs	Metaloproteases de peçonha de serpentes
svSPs	Serinoproteases de peçonhas de serpentes
sPLA2	PLA ₂ secretadas
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. Biodiversidade brasileira.....	12
2.2. Serpentes brasileiras	13
2.2.1. Gênero <i>Bothrops</i>	13
2.3. Peçonha ofídica	14
2.3.1. Metaloproteases	15
2.3.2. Serinoproteases	15
2.3.3. L-aminoácido oxidase	16
2.3.4. Fosfolipases	16
2.4. Peçonha de serpentes: características e aplicações terapêutica	18
2.5. Sistema imunológico e inflamação	21
2.6. Dengue	24
3. OBJETIVOS	27
3.1. Geral	27
3.2. Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Material	28
4.1.1. Obtenção da peçonha	28
4.1.2. Animais	28
4.1.3. Obtenção do sangue humano	28
4.2. Determinação quantitativa de proteínas	28
4.3. Isolamento da PLA ₂ Ba3dP7 da peçonha bruta da serpente <i>B. alternatus</i>	29
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida	29
4.5. Atividade hemolítica indireta da peçonha bruta e da PLA ₂ Ba3dP7 isolada de <i>B. alternatus</i>	30
4.6. Ensaio imunológicos	30
4.6.1. Estimulação de macrófagos provenientes da medula óssea com a peçonha bruta e com a PLA ₂ Ba3dP7.....	30
4.6.2. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de células.....	31
4.6.3. Determinação de óxido nítrico	31

4.7. Atividade antiviral da peçonha bruta de <i>B. alternatus</i> e da PLA ₂ Ba3dP7 isolada contra o vírus da dengue sorotipo 2	31
4.7.1. Cultura de células C6/36	31
4.7.2. Estoque viral	32
4.7.3. Citotoxicidade da peçonha bruta e da PLA ₂ Ba3dP7 isolada.....	32
4.7.4. Avaliação da atividade antiviral	33
4.7.4.1. Pré-tratamento das células com a peçonha bruta antes da infecção viral.....	33
4.7.4.2. Atividade virucida da peçonha bruta e da PLA ₂ Ba3dP7 isolada.....	34
4.8. Análise estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Isolamento da PLA ₂ Ba3dP7	35
5.2. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias	38
5.3. Atividade antiviral	44
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com maior biodiversidade do mundo. Essa rica variedade de fauna e flora é devido ao clima e aos inúmeros biomas existentes. Dentre as espécies brasileiras, encontram-se as serpentes, as quais são de grande importância para a saúde pública, pois produzem toxinas capazes de alterar o metabolismo do organismo e ocasionar danos à vítima.

As peçonhas de serpentes contêm uma gama de componentes físico e farmacologicamente ativos. Esses componentes são instrumentos de grande relevância para pesquisas em várias áreas do conhecimento, motivo pelo qual existem muitos estudos que demonstram o papel medicinal dos mesmos. A partir disso, a purificação de componentes das peçonhas de serpentes tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas capazes de auxiliar no tratamento de doenças. Além disso, proporciona o entendimento do mecanismo fisiopatológico do envenenamento.

Dentre as serpentes estudadas, destaca-se a espécie *Bothrops alternatus*, uma serpente de grande importância epidemiológica no Brasil. Sua peçonha é uma fonte rica em fosfolipases A₂. Essas proteínas são um dos principais componentes da peçonha de serpente e estão envolvidas diretamente em muitas ações deletérias causadas pelos envenenamentos ofídicos. Por consequência, o estudo de suas características estruturais e funcionais se torna importante para a medicina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biodiversidade brasileira

Biodiversidade é a exuberância da vida na Terra que reflete o número de diversas categorias biológicas existentes, representando a chave para a manutenção da vida, resultante da evolução biológica, o que a torna área de prioridade das pesquisas científicas em todo o mundo. O conhecimento gerado por essas pesquisas são de grande importância para a conservação ambiental e para a utilização sustentável dos recursos naturais (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015).

O Brasil, um país de grandes proporções territoriais, também apresenta uma grande diversidade climática, influenciando os biomas e possibilitando que o país abrigue a maior biodiversidade do mundo. A variedade de biomas reflete, diretamente, na enorme riqueza da

flora e fauna brasileira. Mais de 20% do total de espécies constatadas no mundo encontra-se em nosso país. Muitas delas apresentam um papel de importância para a medicina, devido a ocorrência de danos à saúde humana (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2015).

2.2. Serpentes brasileiras

A fauna brasileira apresenta grande variedade de répteis. Até setembro de 2012, foram catalogadas 744 espécies, das quais 36 são quelônios, seis jacarés, 248 lagartos, 68 anfisbenas e 386 serpentes (BÉRNILS; COSTA, 2012). Essas serpentes pertencem ao reino Animalia, Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Classe Reptilia e Ordem Ophidia. No Brasil, existem nove famílias de serpentes, sendo a maioria classificada como não-peçonhentas. Elas são encontradas em todos os biomas brasileiros (BORGES, 2001).

A classificação das serpentes em peçonhentas ou não-peçonhentas refere-se a presença ou não de um aparelho inoculador da peçonha: as peçonhentas são aquelas dotadas de glândulas produtoras de peçonha associadas a um aparelho inoculador, enquanto as não-peçonhentas não possuem esse aparato (KARDONG, 1982).

2.2.1. Gênero *Bothrops*

Dentre as serpentes encontradas no Brasil, existem cerca de 30 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*. As mais conhecidas são: *B. moojeni*, *B. atrox*, *B. erythromelas*, *B. neuwiedi*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. alternatus*. Essas serpentes são popularmente conhecidas como jararaca, ouricana, jararacuçu, urutu-cruzeiro, jararaca-do-rabo-branco, malha-de-sapo, patrona, surucucurana, cambóia, caiçaca, entre outras denominações (BERNARDE, 2015). São serpentes que estão presentes em todo território nacional, possuem hábitos noturnos ou crepusculares, com preferência por locais úmidos e com proliferação de roedores. São encontradas, principalmente, em áreas rurais, como matas, campos e plantações, e em periferias de grandes cidades (PINHO; PEREIRA, 2001).

Morfologicamente, essas serpentes são dotadas de uma cabeça triangular e pupilas verticais para melhor adaptação a ambientes escuros, de fosseta loreal entre os olhos e as narinas, auxiliando na captura de presas pela sua função de termorrecepção. Além disso, suas presas são localizadas anteriormente à cavidade bucal e perpendicular ao palato, quando a serpente está em repouso. No momento do ataque, essas presas são projetadas para frente, na tentativa de inocular a peçonha em sua vítima (CUNHA; MARTINS et al., 2012).

Cerca de 90% dos casos de ofidismo são causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*. Uma possível explicação para esse fato é a ampla distribuição geográfica e o comportamento agressivo desses animais (BORGES, 2001). O quadro clínico dos acidentes botrópicos caracteriza-se por manifestações locais de dor e edema e, em casos mais graves, o indivíduo apresenta ferimentos cutâneos, necrose de tecidos moles, hemorragias, hipotensão arterial, náuseas, vômitos e sudorese, podendo ocorrer, ainda, choque, insuficiência renal e coagulação intravascular disseminada (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; BUCARETCHI et al., 2001; RIBEIRO et al., 1998).

2.3. Peçonha ofídica

As serpentes produzem e mantêm a peçonha em uma glândula encontrada na base da cabeça. Esta glândula, além de ser envolvida por músculos que promovem sua contração, possui um ducto que se estende até o aparelho inoculador (presas), onde ocorre a transferência da peçonha à vítima (BORGES, 2001).

A peçonha das serpentes é uma mistura de componentes proteicos produzida com o objetivo de matar e digerir suas presas e/ou, secundariamente, ser utilizado na defesa contra possíveis ameaças (KARDONG, 1982). Além disso, sua composição proteica atinge cerca de 90% a 95% do peso seco da peçonha e exibe inúmeras atividades biológicas, as quais, no ser humano podem ser proteolítica, coagulante, neurotóxica, hemorrágica, miotóxica e nefrotóxica. A parte não proteica da peçonha é composta por lipídeos, carboidratos, cátions metálicos, nucleosídeos, aminoácidos e aminas biogênicas (CUNHA; MARTINS et al., 2012; BORGES, 2001; CHIPPAUX et al., 1991).

Dentre as inúmeras toxinas presentes na peçonha de serpentes, encontram-se várias enzimas como fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases e L-aminoácido oxidase. Essas toxinas apresentam uma variedade de ações fisiológicas ao serem inoculadas em outros organismos. Por outro lado, são promissoras para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos por apresentarem ações fibrinogenolíticas, fibrinolíticas, antineoplásicas, anticoagulantes, antimicrobianas, antifúngicas e antiparasitárias. (JAIN; KUMAR, 2012; HODGSON; ISBISTER, 2009; PAL et al., 2001).

A peçonha botrópica é composta, principalmente, por metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, entre outras, como mostrado na figura 1 (MENALDO, 2013; CUNHA; MARTINS, 2012; QUEIROZ et al., 2011; OHLER et al., 2010; GOMES et al., 2009).

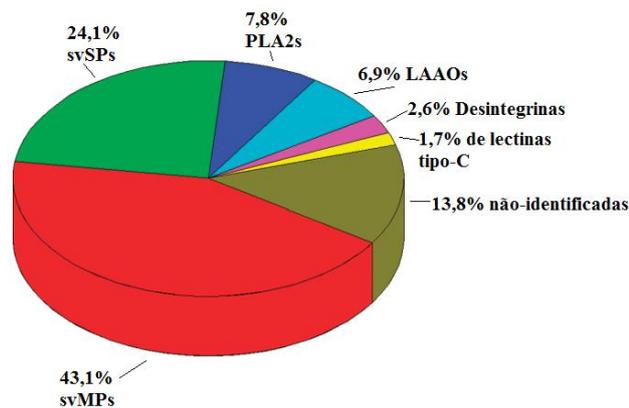


Figura 1. Composição proteica da peçonha de *B. alternatus*. (svSPs) serinoproteases; (PLA2s) fosfolipases; (svMPs) metaloproteases; (LAAOs) L-aminoácido oxidases. Fonte: adaptado de OHLER et al (2010).

2.3.1. Metaloproteases

As peçonhas de serpentes botrópicas apresentam, predominantemente, ações proteolíticas. Essas ações, muitas vezes, são devido a uma classe de enzimas denominadas de metaloproteases (do inglês: snake venom metalloproteinases – svMPs), caracterizadas por proteínas dependentes de íons metálicos, principalmente de zinco (Zn^{2+}). As metaloproteases interferem na cascata de coagulação sanguínea, em mecanismos inflamatórios, em componentes da matriz extracelular e na agregação plaquetária, caracterizando quadros hemorrágicos graves (BALDO et al., 2014; QUEIROZ et al., 2014; MOURA-DA-SILVA, 2012; MATSUI et al., 2000).

2.3.2. Serinoproteases

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (do inglês: snake venom serine proteinases – svSPs) podem chegar a 20% do total de proteínas presentes na peçonha, dependendo da espécie (ZAQUEO et al., 2014; SERRANO; MAROUN, 2005). Possuem uma região catalítica altamente conservada, somado a um resíduo de serina altamente reativo, o qual apresenta um papel relevante na ação catalítica dessa proteína. Além de estarem envolvidas na digestão de presas, podem englobar inúmeras atividades biológicas, como a

ativação do sistema complemento, a diferenciação celular e a homeostase (OLIVEIRA et al., 2013; OHLER et al., 2010; BRAUD et al., 2000).

2.3.3. L-aminoácido oxidases

As L-aminoácido oxidases (LAAO) estão presentes em diversos organismos como bactérias, fungos, peixes, algas e na peçonha de serpentes (COSTA et al., 2014; MATSUI et al., 2014; TURVEY; BROIDE, 2010; ITO et al., 1987). Em geral, as L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes são estruturas diméricas de 120 a 150 kDa, podendo ser classificadas como ácidas, neutras ou básicas. Essas proteínas podem estar envolvidas em processos de agregação plaquetária, citotoxicidade, hemorragias e na indução de apoptose (ALVES et al., 2008; DU; CLEMETSON, 2002).

2.3.4. Fosfolipases

As fosfolipases (PL) são proteínas constitutivas do organismo e localizam-se em diversos tecidos, sendo classificadas em A1, A2, B, C e D de acordo com o seu sítio de clivagem, como mostrado na figura 2 (MACÊDO, 2011).

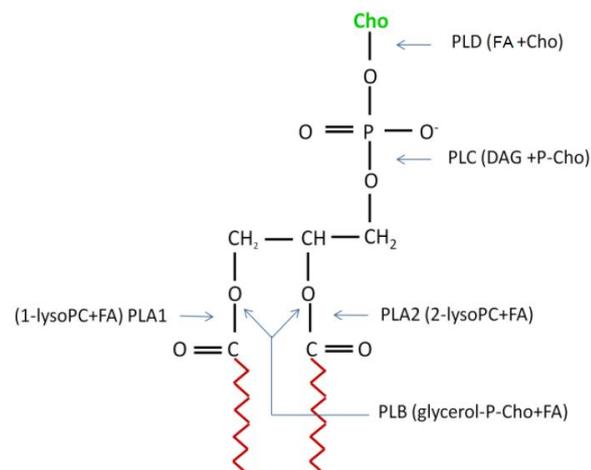


Figura 2. Esquema da hidrólise da fosfatidilcolina pelas diversas fosfolipases (PLA₁, PLA₂, PL_B, PL_C e PL_D) e seus produtos indicados nos parênteses. Os ácidos graxos estão destacados em vermelho e, em verde, o grupo colina ligado ao fosfato. Cho, DAG, P-Cho e FA significam, respectivamente, colina, diacilglicerol, fosfocolina e ácido graxo. Fonte: adaptado de MACÊDO (2011).

Dentre as PLs destaca-se uma superfamília denominada fosfolipases A₂ (PLA₂s), proteínas com um massa molecular de 14 a 21 kDa, as quais são agrupadas da seguinte forma: as PLA₂ secretadas (sPLA₂), as PLA₂ citosólicas (cPLA₂), as PLA₂ Ca²⁺ independentes (iPLA₂), as PLA₂ lisossomais e, por fim, as acetilhidrolases, ativadoras do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) (figura 3) (MACÊDO, 2011; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DENNIS, 1994).

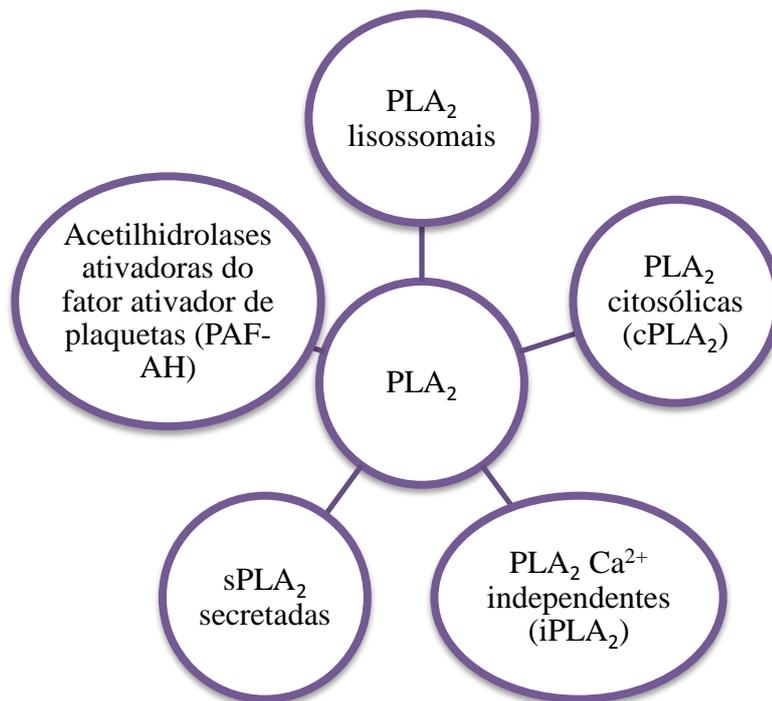


Figura 3. Classificação das fosfolipases A₂.

As fosfolipases A₂ tem a capacidade de liberar o ácido araquidônico a partir da hidrólise da ligação 2-acil-éster na posição sn-2 dos fosfolípidos da membrana plasmática (LESLIE; GELB, 2004; MARSHALL et al., 2000). O ácido araquidônico é precursor de eicosanoides, potentes mediadores inflamatórios, incluindo as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. Por esse motivo, as fosfolipases A₂ têm a capacidade de interferir na resposta inflamatória do organismo (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; BALSINDE et al., 2002; MARSHALL et al., 2000).

A peçonha de serpentes é uma fonte rica em fosfolipases A₂ pertencentes ao grupo das sPLA₂ secretadas. Elas estão envolvidas no surgimento de efeitos tóxicos após os acidentes ofídicos, tais como miotoxicidade, alterações inflamatórias, cardiotoxicidade, neurotoxicidade e hipertensão (MONTECUCCO et al., 2008). Elas podem ser classificadas em PLA₂s ácidas e

básicas, variando em quantidade, dependendo da espécie. As isoformas básicas associam-se a uma toxicidade elevada, enquanto as isoformas ácidas, geralmente, têm a atividade catalítica aumentada em relação às básicas (SANTOS-FILHO et al., 2008; KRIZAJ et al., 1993; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995).

Alguns estudos já descreveram a atividade pró-inflamatória de PLA₂s ácidas. Nunes et al. (2011) demonstraram que essas proteínas estimulam a produção de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, sem variar a expressão de IL-8 e IL-10 em células mononucleares *in vitro*, o que caracteriza uma ação pró-inflamatória. Outras PLA₂ ácidas também já foram descritas e suas atividades caracterizadas. Essas enzimas são caracterizadas por causar miotoxicidade, formação de edema, surgimento de infiltrado leucocitário e alterações na agregação plaquetária (MARQUES et al., 2015; SANTOS-FILHO et al., 2008).

Há, também, PLA₂ básicas nas peçonhas botrópicas. Marunak et al (2007) descreveram uma PLA₂ básica, isolada de *B. jararacussu*, capaz de causar danos aos tecidos, como por exemplo, atividades endematogênicas e miotóxicas. As mesmas atividades foram demonstradas por Calgarotto et al (2008) com a PLA₂ BmTX-I, isolada da peçonha de *B. moojeni*. Furtado et al (2014) descreveram a indução de inflamação pelas PLA₂s BaTX-I e BaTX-II em macrófagos. Em adição, BaTX-I foi capaz de induzir a fagocitose mediada por receptores do sistema complemento.

As PLA₂s apresentam um importante papel em casos de envenenamento, o que explica a importância de estudá-las e entender suas funções, seus mecanismos catalíticos e sua estrutura, assim como propiciar o desenvolvimento de agentes terapêuticos baseados nessas proteínas.

2.4. Peçonha de serpentes: características e aplicação terapêutica

A peçonha de serpentes tem um futuro promissor para a medicina. Algumas de suas proteínas têm interesses clínicos, devido a seus diversos efeitos fisiológicos e farmacológicos ao interagirem com componentes moleculares das células. Essas proteínas são usadas como agentes terapêuticos, marcadores para o diagnóstico de várias doenças e ferramentas de pesquisas para decifrar processos fisiopatológicos (VYAS et al., 2013; SOARES, 2012; MUKHERJEE et al., 2011; MARSH, 2001). Um exemplo clássico da utilização terapêutica dessas proteínas é o surgimento do medicamento Captopril, o qual contém um peptídeo ativo derivado da peçonha de *B. jararaca*. Esse componente atua inibindo a enzima conversora de angiotensina e, conseqüentemente, atua como antihipertensivo (FERREIRA, 1965).

Toxinas isoladas de peçonha de serpentes têm sido cada vez mais estudadas devido seu potencial terapêutico para o câncer. Essas toxinas estão relacionadas basicamente à capacidade das mesmas de inibir a proliferação celular e de promover a morte das células. Os mecanismos de ação consistem no aumento ou diminuição da expressão de proteínas que controlam o ciclo celular, no aumento do influxo de cálcio, incluindo a liberação de citocromo c, na prevenção de metástases induzidas por trombina, na diminuição da expressão e atividade de metaloproteases de matriz celular, no aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas (CALDERON et al., 2014; JAIN; KUMAR, 2012; PARK et al., 2009; ZHANG; WEI, 2007; FEOFANOV et al., 2005). Outro alvo dessas toxinas são as proteínas integrinas, as quais apresentam um papel importante no processo de proliferação, angiogênese, invasão e metástase das células cancerígenas (MORJEN et al., 2014; BAZAA et al., 2010).

As L-aminoácido oxidases formam um outro grupo de proteínas que apresentam citotoxicidade em várias linhagens tumorais, como em células de câncer de mama, melanoma e no tumor ascítico de Ehrlich. No entanto, o mecanismo pelo qual essas proteínas causam a citotoxicidade, ainda, não foi elucidado totalmente. Especula-se que o peróxido de hidrogênio, produzido por elas, provoca danos à membrana plasmática das células tumorais, com baixa toxicidade em células normais (COSTA et al., 2014; GUO et al., 2012).

As toxinas presentes na peçonha de serpentes também apresentam importante papel antimicrobiano. Borkow et al. (2008) demonstraram a inibição da atividade hemolítica causada pelo vírus Sendai, após o pré-tratamento da partícula viral com a peçonha bruta da serpente *Echis carinatus sochureki*. Em outro estudo, Petricevich e Mendonça (2003) descreveram a atividade antiviral de toxinas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* na infecção pelo vírus measles, um vírus altamente contagioso causador de infecções no trato respiratório humano (CDC, 2013).

Recentemente, Muller et al. (2014) comprovaram a capacidade de uma PLA₂ isolada de *Crotalus durissus terrificus* de inibir a infecção do vírus da dengue e do vírus da febre amarela. Essa inibição é devido à atividade catalítica da PLA₂ em clivar a bicamada lipídica do envelope viral, ocasionando uma desestabilização das proteínas de superfície virais e, conseqüentemente, inativação desses vírus. Dessa forma, as toxinas presentes na peçonha de serpentes podem apresentar um papel antiviral, sendo importantes para terapias futuras.

É importante ressaltar o papel antibacteriano da peçonha de serpentes, visto que já foi demonstrada a inibição da proliferação de certas bactérias ao serem tratadas com toxinas, destacando a importância de estudar essas substâncias para o desenvolvimento de novas drogas (JALAEI et al., 2014; BUSTILLO et al., 2008). Ultimamente, tem sido estudado o

papel das peçonhas de serpentes no combate de bactérias gram-positivas e negativas, caracterizando atividade bactericida e bacteriostática dessas toxinas (SAMY et al., 2014; JUNIOR et al., 2013; FERREIRA et al., 2011; CHELLAPANDI; JEBAKUMAR, 2008; SAMY et al., 2007). O papel terapêutico das toxinas presentes na peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* está cada vez mais em evidência. Sabe-se que alguns desses componentes podem ser utilizados como agentes terapêuticos antiparasitários, em distúrbios de coagulação, com ação anticoagulante e fibrinogenolítica, bem como podem ser usadas em processos biológicos ocasionados pelo sistema complemento (MENALDO et al., 2013; MORAIS et al., 2012).

O papel antiparasitário de toxinas da peçonha botrópica foi evidenciado por Torres et al. (2010). Nesse estudo, os autores isolaram uma L-aminoácido oxidase denominada BmarLAAO da peçonha de *B. marajoensis*, a qual foi capaz de inibir o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis*. Costa et al. (2008) demonstrou a atividade antiparasitária em *L. braziliensis* e *L. amazonensis* de duas miotoxinas (MTX-I e II) isoladas da peçonha de *Bothrops braziliensis*. Izidoro et al. (2011), após testes *in vitro*, verificaram uma diminuição da infecção pelo *Toxoplasma gondii* em cultura de células, após tratar as formas taquezoítas com uma proteína isolada de *B. pirajai*.

As toxinas botrópicas também apresentam atividade nos processos inflamatórios do organismo. Duas serinoproteases isoladas de *B. pirajai*, BpirSP27 e BpirSP41, foram capazes de modular as vias clássica/lectina e alternativa do sistema complemento, sendo que a BpirSP41 foi mais expressiva na inibição da atividade hemolítica da via clássica do que a BpirSP27. Quanto aos processos pró-inflamatórios, foi avaliado a habilidade dessas proteínas em induzir edema na pata de camundongos, além da capacidade das mesmas de recrutar leucócitos no sítio de infecção. No entanto, não foi observado os aumentos significativos no volume da pata e nem na quantidade de leucócitos no exsudato inflamatório, o que sugere que essas serinoproteases não apresentam atividade significativa na inflamação (MENALDO et al., 2013).

Dessa forma, as toxinas presentes na peçonha de serpentes são importantes alvos de investigação terapêutica, auxiliando no tratamento de doenças parasitárias, microbianas, cardiovasculares e no câncer.

2.5. Inflamação

A inflamação é um fenômeno imunológico generalizado de defesa que acontece durante a perturbação da homeostase do organismo, podendo ser ocasionado por diversos indutores, tais como infecções, injúrias e exposição a contaminantes, dentre outros (MEDZHITOV, 2008). No seu nível mais básico, é caracterizada por um processo de destruição de tecido que envolve o recrutamento de produtos derivados do sangue, tais como proteínas do plasma, fluido e leucócitos, no tecido perturbado. Esta migração é facilitada por alterações na vasculatura local que conduzem à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo. Além disso, a inflamação é essencial para o processo de restauração do tecido lesado denominado cicatrização (HUANG et al., 2014; ASHLEY et al., 2012; PRANDINI et al., 2005).

Dessa forma, o mecanismo inflamatório consiste basicamente em uma cascata fortemente regulada de processos imunológicos, fisiológicos e comportamentais que são controlados por moléculas sinalizadoras do sistema imunológico. O primeiro passo para o início da inflamação consiste no reconhecimento do agente lesivo (indutor) por meio de receptores celulares, os quais irão induzir a produção de mediadores inflamatórios. Esses mediadores alteram o estado funcional de tecidos e órgãos de forma que lhes permitam adaptarem-se às condições indicadas pelo causador da inflamação (Figura 4) (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010). Os mediadores podem ser classificados em sete grupos de acordo com as suas propriedades bioquímicas: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, os mediadores de lipídeos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (SOLOSKI et al., 2014; YUAN, 2014; BARNES et al., 1998).

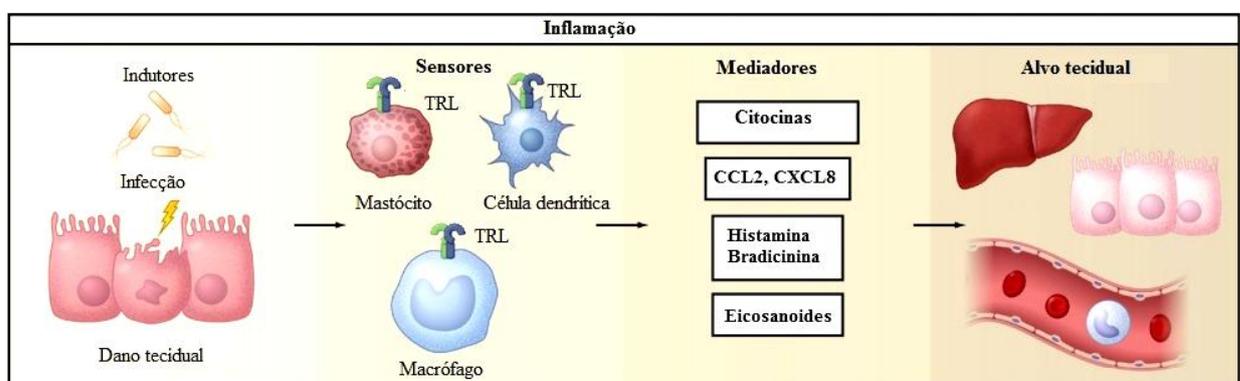


Figura 4. Componentes da resposta inflamatória. Fonte: adaptado de MEDZHITOV (2010).

As citocinas são pequenas proteínas secretadas pelas células, tornando-se importantes reguladores da resposta imunológica devido a sua capacidade de transferir a outras células informações que irão induzir modificações funcionais, multiplicação ou até mesmo a morte por apoptose (SHAIKH, 2011; KOPF et al., 2010). Citocina é um nome genérico, também pode adquirir outras denominações de acordo com a célula que a produz, como as monocinas (liberadas por monócitos), as interleucinas (liberadas por leucócitos) e as quimioquinas (aquelas que possuem atividade quimiotática). A ação dessas proteínas pode ser sobre a própria célula que as secretam (ação autócrina), sobre as células vizinhas (ação parácrina) ou sobre células distantes (ação endócrina) (NITTA, 2013; ABBAS et al., 2012; HSIAO; PATTERSON, 2011; JUNGER, 2011).

As interleucinas foram descobertas em 1970 e apresentam uma variedade de funções imunomoduladoras que orienta a célula do sistema imunológico à maturação, à diferenciação, à migração e à adesão. Esses mediadores são liberados pelos leucócitos a fim de localizar uma célula-alvo, anexar a receptores de alta afinidade presentes na superfície e transmitir a mensagem, desencadeando uma cascata de sinalização intracelular. Assim, as interleucinas podem exercer as funções pró e anti-inflamatórias, auxiliando na resposta imune (BANCHEREAU et al., 2012; BROCKER et al., 2010).

Dentre as inúmeras interleucinas destaca-se a IL-10, pois apresenta um papel anti-inflamatório crucial para o controle de algumas doenças inflamatórias e autoimunes. Essa citocina é liberada por inúmeras células imunológicas, principalmente aquelas do sistema imune adaptativo como os linfócitos T e B (TRINCHIERI, 2007). Por outro lado, células da imunidade inata também são capazes de liberá-la, incluindo as células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e macrófagos (SARAIVA; O'GARRA, 2010; MAYNARD et al., 2008; SIEWE et al., 2006; MCGUIRK et al., 2002; MOORE et al., 2001).

A IL-10 tem a capacidade de regular outras proteínas pró-inflamatórias durante a fase de reparo pós infecção e inflamação, prevenindo o dano tecidual (YOKOYAMA et al., 2004). Dentre as citocinas inibidas pela IL-10 encontra-se a IL-12, IL-1 α e β , o fator de necrose tumoral (TNF), IL-18 e IL-6, dentre outras (SMALLIE et al., 2010; MALEFYT et al., 1991). O efeito inibitório sobre a IL-1 e o TNF é crucial para caracterizar a atividade anti-inflamatória da IL-10, já que muitas vezes a mesma tem atividade sinérgica a precursores inflamatórios (YILMA et al., 2012; BRENNAN et al., 2008; DAGVADORJ et al., 2008).

Outra citocina de extrema importância para o sistema imunológico é o fator de Necrose Tumoral (TNF), o qual compreende uma superfamília de 19 ligantes e 29 receptores, desempenhando papéis diversificados em todo o organismo. Todos os membros da família

TNF apresentam atividade pró-inflamatória mediante ativação do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) (KWON et al., 2004; AGGARWAL, 2003; GAUR et al., 2003). Alguns membros dessa família estão envolvidos com a proliferação de células hematopoéticas e com processos apoptóticos de células cancerígenas, bem como estão relacionados com mudanças morfogenéticas e diferenciação (CHERRY et al., 2015; PERRI et al., 2015; RICKERT et al., 2011; HUANG et al., 2011; AZUMA et al., 2000).

Os macrófagos e linfócitos T são os principais produtores de TNF, porém, não são os únicos, uma vez que mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células linfóides também podem produzir essa citocina (THEOHARIDES et al., 2012; BRADLEY et al., 2008; YOKOYAMA et al., 1999). A atividade pró-inflamatória do TNF pode ser explicada pela sua capacidade de interagir com as células do endotélio vascular e com os leucócitos endoteliais. Dessa forma, essas células endoteliais promovem a inflamação após exibirem diferentes combinações de moléculas de adesão leucocitárias tais como E-selectina, molécula intercelular-1 de adesão (ICAM-1) e moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1) (BRADLEY, 2008; KIM et al., 2008; LEE et al., 2006; RAHMAN et al., 1998). O TNF também está envolvido na vasodilatação devida sua capacidade de induzir a expressão de ciclo-oxigenase-2, promovendo produção de um potente vasodilatador chamado prostaciclina, resultando no aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, rubor, calor e edema, caracterizando um quadro inflamatório (BRADLEY, 2008; LIN et al., 2004; MARK et al., 2001).

Dentre as inúmeras citocinas bioativas, existe a Interleucina-12 (IL-12), produzida pelas células dendríticas, microglia, macrófagos e linfócitos B em resposta a algum patógeno e também apresenta atividade pró-inflamatória (DURALI et al., 2003; SUZUMURA et al., 2003; MAHON et al., 1996). A IL-12 induz a proliferação de células T CD4⁺, além disso, é importante para a produção de interferon-gama (INF- γ), outra citocina pró-inflamatória (HOLMKVIST et al., 2015; DULUC et al., 2009). A IL-12 é de extrema importância nas respostas imunes contra infecções bacterianas e parasitárias. Nesse caso, a IL-12, produzida pelas células dendríticas, ativa a produção de IFN- γ pelas células NKs, estimulando os macrófagos e aumenta a atividade bactericida (CHEN et al., 2012; HAMZA et al., 2010; HENRY et al., 2008; KAKA et al., 2008; ALIBERTI et al., 1998).

Outra molécula importante na imunoregulação, mais especificamente na reação inflamatória, é o óxido nítrico (NO). O mesmo é caracterizado como um importante mensageiro intracelular de mamíferos e pode ser produzido por inúmeras células através de hemoproteínas da família citocromo P450-Like denominadas, NO sintases (NOs) (ZANGER; MATTHIAS, 2013; GORREN et al., 2007; AKTAN, 2004; PRIVAT et al., 1997). Sendo

assim, o organismo utiliza o NO para suas inúmeras funções biológicas (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Um dos sinais cardinais da inflamação é a vasodilatação, originada de um processo NO-dependente. Diversos mediadores inflamatórios, como a bradicinina e a histamina, são capazes de induzir a vasodilatação devido as suas capacidades de estimulação endotelial de NO. Outra importante função dessa molécula é sua habilidade de regular a expressão de P-selectina, influenciando na aderência dos leucócitos ao endotélio (HEYLEN et al., 2009). O NO também pode promover o aumento da atividade das ciclooxigenases, outra hemeoproteína, resultando na conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, desencadeando inúmeros efeitos fisiológicos e fisiopatológicos, inclusive na inflamação (FANG et al., 2015; CHUN et al., 2004; AHMAD et al., 2002; SALVEMINI et al., 1993). A atividade dos macrófagos também pode ser afetada pelo NO que, por sua vez, pode inibir citocinas pró-inflamatórias produzidas por essas células, tais como IL-12 E IL-1 (BODDUPALLI et al., 2007; WALLACE, 2005; OBERMEIAR et al., 1999).

2.6. Dengue

A dengue é a infecção viral transmitida por artrópode mais comum no mundo. De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2015) o vírus causador da dengue pertence à família *Flaviviridae*, ao gênero *Flavivirus* e é representado por quatro sorotipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4), os quais apresentam as mesmas características epidemiológicas e causam doenças semelhantes, porém diferenciam-se antigenicamente e não induzem proteção imunológica cruzada. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2015) a transmissão do vírus para o humano ocorre principalmente pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectados.

O vírus da dengue compreende em uma partícula esférica com cerca de 40-50 nm de diâmetro, apresentando um envelope lipídico contendo as proteínas de envelope (E) e de membrana (M), um capsídeo de simetria icosaédrica formado pela proteína C e o genoma viral, constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva com 10,2 quilobases (kb) (figura 5A). Além disso, seu material genético codifica uma única poliproteína, que é clivada, dando origem a três proteínas estruturais (C, M e E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) relacionadas ao processo de replicação do vírus (figura 5B) (VASILAKIS et al., 2012; NOISAKRAN; PERNG, 2008; KUHN et al., 2002).

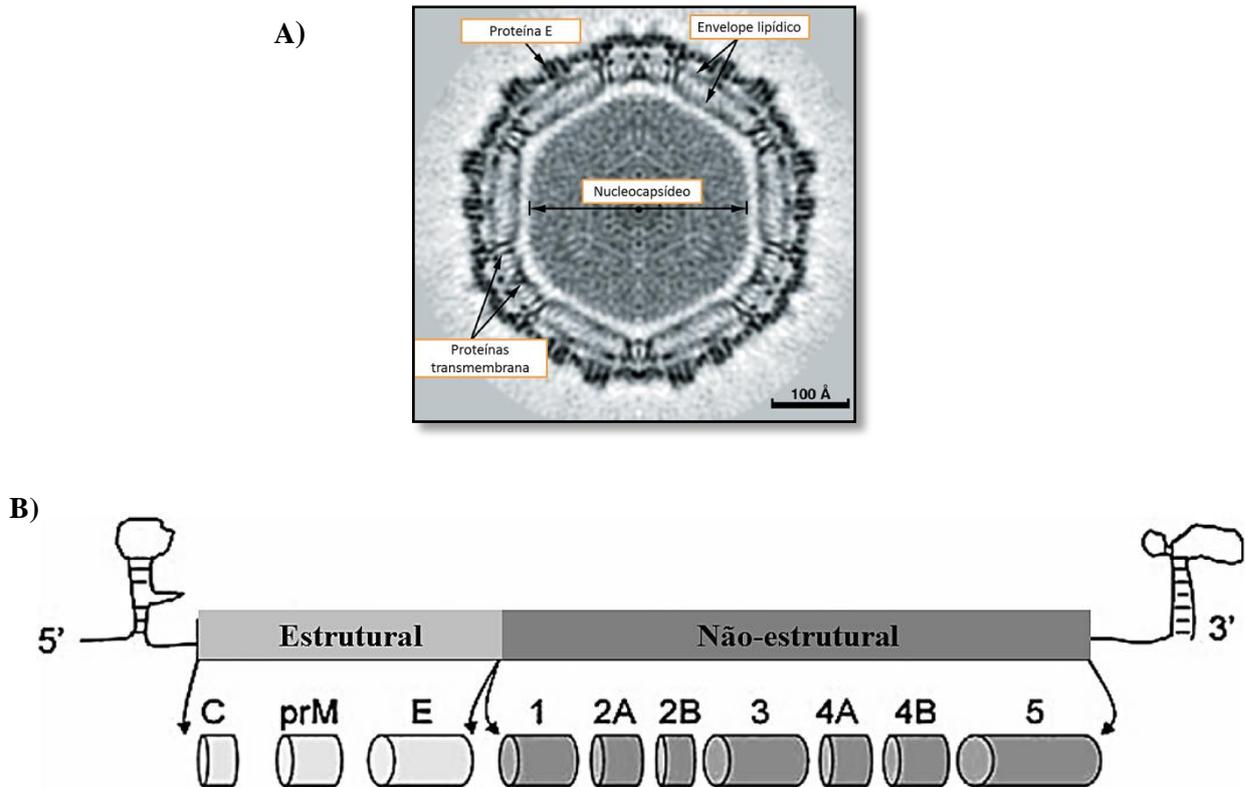


Figura 5. A) Crio-eletromicrografia mostrando a estrutura da partícula do vírus da dengue. B) Organização esquemática do material genético do vírus da dengue: localização da região codificante da poliproteína e os sítios de clivagem enzimática em proteínas estruturais e não-estruturais. Fonte: adaptadas de NOISAKRAN e PERNG (2008) e ZHANG et al. (2003).

Cerca de 40% da população mundial vive em regiões com risco de infecção pelo vírus da dengue. Na última década a incidência de dengue aumentou consideravelmente. Estimativas recentes indicam que o vírus atinge cerca 390 milhões de pessoas por ano. Antes de 1970, apenas nove países tinham tido epidemias de dengue. Atualmente, mais de 100 países sofrem com essa endemia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

No Brasil, a dengue tornou-se uma das maiores causas de morbidade e mortalidade. O país sofre com epidemias da doença desde 1981-1982, quando surgiu a primeira detecção laboratorial dos sorotipos virais 1 e 4, em Boa Vista (RR) (VIANA; IGNOTTI, 2013; BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Em 2015, até o mês de abril, já foram catalogados mais de 700 mil casos de dengue no Brasil, sendo o maior número de casos (66,2%) encontrado no Sudeste, seguido das regiões: Centro-Oeste (12,4%), Nordeste (11,5%), Sul (5,8%) e Norte (4,1%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O resultado de uma infecção por dengue pode estar ligado ao tropismo do vírus aos diversos tecidos do organismo. Esses vírus têm a capacidade de infectar o próprio sistema imunológico, o fígado e células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. Entretanto, a falta de um modelo de estudo adequado para a doença dificulta a compreensão desse tropismo e como isso pode alterar a evolução da doença (DALRYMPLE; MACKOW, 2012; PAES et al., 2009; WATI et al., 2007; LIMON-FLORES et al., 2005). Além disso, os sorotipos virais e seus genótipos, caracterizados de acordo com suas variações nucleotídicas, também influenciam na virulência e, conseqüentemente, na progressão da infecção (HALSEY et al., 2012; THAI et al., 2011; FRIED et al., 2010; COLOGNA; RICO-HESSE, 2003; LEITMEYER et al., 1999).

A infecção, por qualquer sorotipo da dengue, pode resultar em um amplo espectro de sintomas clínicos que vão desde uma síndrome semelhante a uma gripe, com febre, dor de cabeça severa, mialgia, artralgia, dor retro-orbital, desconforto gastrointestinal até sua forma mais grave. A forma mais severa da doença, chamada de febre hemorrágica, caracteriza-se por coagulopatia, aumento da fragilidade e permeabilidade vascular, podendo levar a morte em alguns casos (CDC, 2015; CALZAVARA-SILVA et al., 2009). Atualmente, não há vacina para dengue. O tratamento existente, ainda, é inespecífico e baseia-se no uso de analgésicos, como o paracetamol (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Por tudo isso, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas é de grande importância para auxiliar o combate à doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Isolar uma fosfolipase A₂ da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* e caracterizar sua influência na liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como avaliar a sua ação sobre o efeito antiviral contra o vírus da dengue sorotipo 2.

3.2. Específicos

- Isolar uma PLA₂ da peçonha de *B. alternatus*, a partir da combinação de cromatografia de troca iônica seguida pela cromatografia de interação hidrofóbica.
- Avaliar, *in vitro*, a capacidade da peçonha bruta e da PLA₂ isolada em estimular a produção de interleucina 12 (IL-12), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico (NO);
- Avaliar a atividade antiviral da peçonha bruta e da PLA₂ isolada contra o vírus da dengue sorotipo 2, *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1. 1. Obtenção da peçonha

A peçonha de *B. alternatus* foi adquirida do Serpentário Bioagents, Batatais/SP, sob responsabilidade do biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo, em temperatura ambiente, e conservada a -20°C até o momento do uso.

4.1.2. Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram camundongos Balb/c mice (20-25 g), obtidos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (60-70%) e ciclos de claro/escuro (12 horas), com livre acesso a comida e água. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo de número 108/12.

4.1.3. Obtenção do sangue humano

O sangue humano foi obtido em conformidade com as diretrizes atuais para investigações com seres humanos, estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo de registro n° 055/11).

4.2. Determinação quantitativa de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada por um software de análise de proteínas em um espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Japão). Nesse método, as amostras foram lidas a um comprimento de onda Ultravioleta (UV) de 280 nm e comparadas a um

branco (sem proteínas), conforme descrito por Layne (1957). O software desse equipamento mostra a quantidade de proteínas na amostra em mg/mL.

4.3. Isolamento da PLA₂ Ba3dP7 da peçonha bruta da serpente *B. alternatus*

Inicialmente, cerca de 400 mg da peçonha bruta de *B. alternatus* foi submetido a uma cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel) de acordo com o método descrito por Paschoal (2015). Cerca de 40 mg do pico A3d foi submetida a uma cromatografia de interações hidrofóbicas em sistema aberto em resina Phenyl Sepharose (20 mL – 1,5 x 2,5 cm). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-NaCl 4,0 M (pH 8,5) e eluída com gradiente contínuo de concentração decrescente do mesmo tampão, utilizando Tris-HCl 0,01 M (pH8,5). A cromatografia foi finalizada após eluição da resina com água ultrapura. Frações de 3 mL/tubo foram coletadas sob um fluxo de 20 mL/hora pelo coletor BioRad e suas absorvâncias (280 nm) foram monitoradas por meio de leituras no espectrofotômetro BioSpec-Mini.

4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi realizada conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Utilizou-se um gel de empilhamento a 5% em pH=6,8, contendo Tris-HCl 0,125 M e SDS 0,1% e um gel de separação a 14% em pH=8,8 e SDS 0,1%, mantendo a relação acrilamida: bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m) e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol como corante. Em seguida, foi aplicado cerca de 5 a 30 µL de amostra no gel. Paralelamente, foi aplicado no gel o padrão de massa molecular LMW (Low Molecular Weight) — fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa), dissolvido no mesmo tampão. Após a corrida a 25 mA constante, o gel foi corado por uma solução de Coomassie Blue R-250 a 0,2% (m/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v). Os géis foram descorados em uma solução contendo água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v), sendo que apenas as bandas proteicas permaneceram coradas.

4.5. Atividade hemolítica indireta da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7 isolada de *B. alternatus*

A capacidade da peçonha bruta e da proteína isolada de hidrolisar fosfolipídeos foi analisada pelo método de hemólise radial indireta em placas, como descrito por Gutiérrez et al. (1988). Utilizou-se um gel de agarose 1%, suplementado com gema de ovo e eritrócitos humanos lavados com PBS (salina tamponada com fosfato – pH 7,2). Cerca de 10 µg da peçonha bruta e da PLA₂ isolada foi diluída, separadamente, em 50 µL de PBS e aplicadas em seus respectivos orifícios de tamanho uniforme feitos no gel. Após esse processo, o gel foi colocado em temperatura ambiente por 24 horas e a atividade hemolítica avaliada pela formação de halos translúcidos. Esses halos indicam a capacidade das amostras em hidrolisar fosfolipídeos. Dessa forma, a área do halo formado foi utilizada para a quantificação da atividade fosfolipásica da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7.

4.6. Ensaios imunológicos

4.6.1. Estimulação de macrófagos provenientes da medula óssea com a peçonha bruta e com a PLA₂ Ba3dP7

A determinação da habilidade da peçonha bruta de *B. alternatus* e da PLA₂ Ba3dP7 isolada em estimular a produção de citocinas foi realizada em cultura de células precursoras de macrófagos (Mφ). Essas células foram obtidas da medula óssea do fêmur e tíbia de camundongos Balb/c (20-25 g). O processo de diferenciação dessas células em macrófagos foi feito incubando-as em meio RPMI-1640 suplementado com 30% de sobrenadante de cultura de L929 (LCCM) em placas de petri estéreis. Inicialmente, os macrófagos foram ajustados para a concentração final de 1×10^5 células/poço, distribuídos em placa de poliestireno de 96 poços e incubados por 18 horas a 37° C e atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, os macrófagos foram incubados por 24 horas com diferentes diluições (60, 30, 10, e 3 µg/mL) da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7 isolada em triplicatas. Após esse tempo, as placas foram centrifugadas a 500 xg por 5 minutos e o sobrenadante coletado foi estocado à -70° C até o teste de análise de citocinas IL-10, IL-12 e TNF-α.

4.6.2. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura de células

A detecção de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF- α) no sobrenadante de cultura de células obtido no item 4.6.1. foi realizada por ELISA sanduíche de acordo com especificações do fabricante. Placas poliestireno de 96 poços foram revestidas com anticorpos monoclonais anti-citocinas conjugados com o alvo biotina (a qual tem afinidade pela avidina). Após a formação do complexo biotina-avidina, adicionou-se TMB (tetrametilbenzidina) às placas e a reação foi paralisada com 2 M de ácido sulfúrico e a leitura feita a 450 nm em espectrofotômetro.

4.6.3. Determinação de óxido nítrico

Para análise da produção de óxido nítrico (NO), macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos Balb/c após 72 horas com 3% de tioglicolato de sódio. Posteriormente os macrófagos foram ajustados para 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços e posterior incubação à 37° C, por 18 horas. Em seguida, os macrófagos foram tratados por 48 horas na presença e ausência de peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7 isolada nas seguintes concentrações: 60, 30, 10 e 3 $\mu\text{g/mL}$. O LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como controle positivo e o meio RPMI, como controle negativo. Dessa forma, a quantificação de NO foi aferida pela acumulação de nitrito no sobrenadante pelo método de Griess Assay. Para isso, usou-se 50 μL de sobrenadante incubado com Griess (1% sulfanilamida, 0,1% de naftil etilenodiamina dihidroclorato, 2,5% de H₃PO₄) por 10 minutos e para a curva padrão utilizou-se NaNO₂ diluído em meio RPMI. Ao final, a absorbância foi mensurada por um comprimento de onda de 550 nm.

4.7. Atividade antiviral da peçonha bruta de *B. alternatus* e da PLA₂ Ba3dP7 isolada contra o vírus da dengue sorotipo 2

4.7.1. Cultura de células C6/36

Foi realizado o cultivo da linhagem celular C6/36 (células de *Aedes albopictus* – clone CRL 1660. ATCC. Manassas, VA, EUA) em garrafas de 25 cm² para inoculação viral. Essas células foram mantidas em cultura no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas a 29° C em meio Leibowitz L-15 (Cultilab,

Campinas, SP, BRA), suplementado com penicilina/estreptomicina (10000 U/mL), soro fetal bovino (SFB) a 10%, anfotericina B (2 mg/mL) e aminoácidos não-essenciais (1X).

4.7.2. Estoque viral

Os experimentos da atividade antiviral foram realizados contra o vírus da dengue sorotipo 2 (DENV 2) (cepa New Guinea C – clone VR 1584, número de acesso do GenBank: AF038403). Primeiramente, o vírus, já existente no Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia, foi inoculado em garrafa de cultura de células de 25 cm², contendo C6/36 a uma confluência de 80%, seguido de incubação a 29° C durante sete dias. Após esse tempo, uma alíquota de 2,5 mL do sobrenadante foi retirada e inoculada em garrafa de 75 cm², contendo C6/36 para aumentar o título viral. Essa garrafa foi incubada por sete dias até o aparecimento de efeito citopático evidente, seguido da retirada do sobrenadante e estocagem a – 70° C.

4.7.3. Citotoxicidade da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7 isolada

A citotoxicidade da peçonha bruta e da PLA₂ isolada foi avaliada nas células C6/36. O método colorimétrico MTT ([brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), um ensaio colorimétrico para avaliar a atividade metabólica da célula, determinando a viabilidade celular, como descrito por Mosmann (1983), com modificações propostas por Sieuwersts et al, (1995).

Aproximadamente $2,0 \times 10^4$ células foram colocadas em cada poço de uma placa de 96 poços com 100 µL de meio L-15 a 10% de soro fetal bovino/cavidade, seguido de incubação da placa por 24 horas a 29° C, até atingir uma confluência em torno de 80%. Após esse tempo, retirou-se o meio e realizou-se a lavagem das células com PBS 1X e adicionado, em seus respectivos poços, 200 µL de meio L-15 suplementado com SFB a 2% contendo as concentrações de peçonha bruta (50 e 25 ng/µL) e da PLA₂ Ba3dP7 isolada (50 e 25 ng/µL). A placa foi incubada por sete dias a 29° C. Posteriormente, removeu-se o meio e adicionou-se 50 µL de MTT (AMRESCO®) a 1 mg/mL/poço. A placa foi novamente incubada por 4 horas, sendo a solução de MTT substituída por 100 µL de DMSO (VETEC®). Após esse tempo foi feito a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Assim, calculou-se a citotoxicidade utilizando-se as absorbâncias das células tratadas com a peçonha bruta e PLA₂ isolada, comparando-as ao controle (células incubadas na ausência da peçonha), utilizando a seguinte fórmula:

$$Ct (\%) = 100 - \left(\frac{DO_{mt}}{DO_{cc}} \times 100 \right)$$

Onde:

Ct (%) = citotoxicidade em porcentagem

DO_{mt} = Absorbância das células incubadas com peçonhas

DO_{cc} = média da absorbância do controle (não tratado)

Dessa forma, a concentração da amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular (CC50) foi obtida por meio da análise no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) dos percentuais referentes às diferentes concentrações da peçonha bruta e PLA₂ Ba3dP7.

4.7.4. Avaliação da atividade antiviral

Para a avaliação da ação antiviral, tanto da peçonha bruta quanto da PLA₂, foi utilizado o ensaio de MTT, como descrito no item 4.7.3.

4.7.4.1. Pré-tratamento das células com a peçonha bruta antes da infecção viral

Esse ensaio foi realizado para determinar se os componentes testados podem conferir proteção contra a infecção pelo DENV 2. Aproximadamente $1,5 \times 10^4$ células C6/36 foram adicionadas por poço em placa de 96 poços e incubadas a 29° C por 24 horas. Após cerca de 70% de confluência, o meio foi removido e as células foram incubadas com as concentrações de peçonha bruta (50 ng/μL). Após três horas de incubação a 29° C, o sobrenadante foi removido e as células infectadas com diluições seriadas do DENV 2 (Sem diluir, 1/10 e 1/100) contendo 200 μL de meio L-15 por uma hora. O sobrenadante foi removido e acrescido de 200 μL de L-15, suplementado com 2% de SFB, seguido de incubação por cinco dias. No quinto dia, o ensaio de MTT foi realizado e a citotoxicidade calculada de acordo com o item 4.7.3.

O controle viral para o pré-tratamento foi realizado incubando-se as células com as diluições do vírus da dengue por uma hora, seguido da retirada do sobrenadante e adição de 200 μ L de meio L-15, suplementado com 2% de SFB.

4.7.4.2. Atividade virucida da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7 isolada

O teste de atividade virucida avalia a habilidade dos componentes testados em atuar diretamente na partícula viral. Diluições seriadas do DENV 2 (Sem diluir, 1/10 e 1/100) foram incubadas a 29° C durante uma hora com as concentrações de peçonha bruta (50 ng/ μ L) e PLA₂ Ba3dP7 isolada (50 ng/ μ L). Em seguida, a mistura foi adicionada à monocamada de células C6/36, seguido de incubação por cinco dias. Após esse tempo, foi realizado o ensaio de MTT e a citotoxicidade foi calculada de acordo com o item 4.7.4. O controle viral consiste apenas na inoculação do DENV 2 e suas diluições nas células C6/36 e o volume completado para 200 μ L com meio L-15, suplementado com 2% de SFB.

4.8. Análise estatística

A análise estatística para os ensaios imunológicos e testes antivirais foi realizada utilizando o software GraphPad Prism versão 5.0 por meio do método one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Porém, utilizou-se o método two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os níveis de produção de IL-10, IL-12 e TNF- α induzidos pela PLA₂ Ba3dP7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento da PLA₂ Ba3dP7

Estudar os componentes presentes na peçonha de serpentes é importante devido aos diversos efeitos fisiológicos e farmacológicos que interagem com componentes moleculares das células. Esses componentes auxiliam no entendimento de processos fisiológicos e patológicos, além disso, podem ser agentes terapêuticos cruciais para a medicina (VYAS et al., 2013; SOARES, 2012; MUKHERJEE et al., 2011; MARSH, 2001).

A peçonha das serpentes botrópicas é uma fonte rica em fosfolipases A₂ (PLA₂s). Essas enzimas assumem um papel de grande importância no envenenamento por essas serpentes. Além de sua participação na digestão das presas, elas apresentam várias outras atividades como, por exemplo, ação hemolítica indireta, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, ação agregadora de plaquetas, atividade anticoagulante, edematogênica, miotóxica e inflamatória (ABREU et al., 2007; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ÂNGULO e LOMONTE, 2009; BARBOSA et al., 2005; CALGAROTTO et al., 2008). Neste trabalho, descreveu-se o isolamento de uma PLA₂ denominada Ba3dP7 da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* e a sua influência na liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Nós também avaliamos ação da PLA₂ Ba3dP7 isolada e da peçonha bruta sobre o efeito antiviral contra o vírus da dengue sorotipo 2.

Inicialmente, a peçonha bruta de *B. alternatus* foi submetida a uma cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel) por Paschoal (2015) e resultou em nove frações principais, as quais foram denominadas de A1 a A9 (Figura 6).

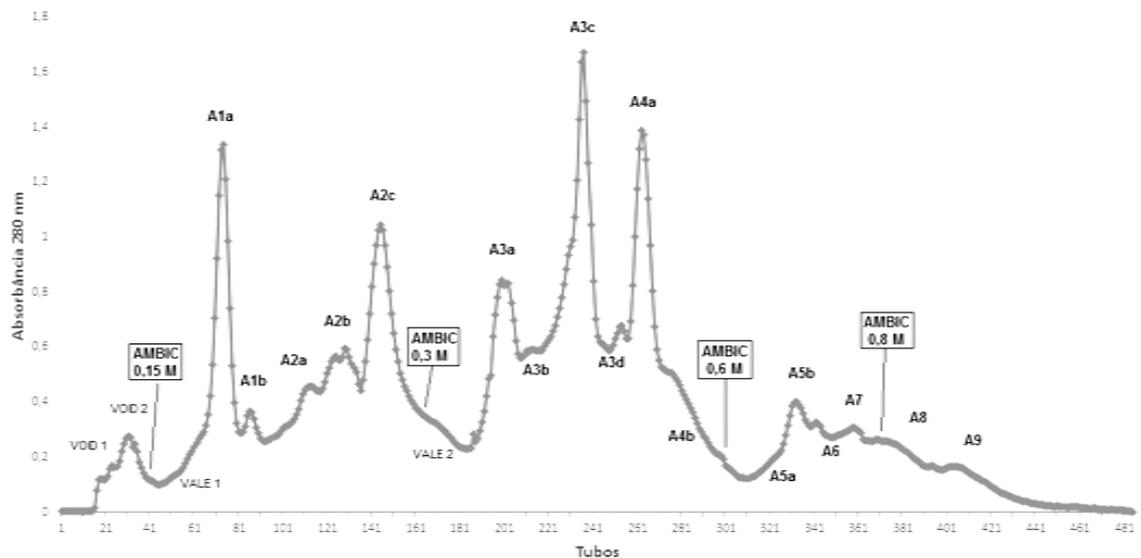


Figura 6: Fracionamento da peçonha bruta de *B. alternatus* em DEAE Sephacel. As amostras foram eluídas com um gradiente contínuo de concentração crescente (0,05 M a 0,8 M) do tampão AMBIC, sob fluxo de 20 mL/hora. Trocas de tampão: tubo 01: 0,05 M; 41: 0,15 M; 161: 0,3 M; 300: 0,6 M; 364: 0,8 M. A fração, denominada de A3d, foi submetida em uma coluna de Phenyl Sepharose.

Cerca de 40 mg da fração A3d foi submetida a um novo passo de cromatografia em resina de interações hidrofóbicas (Phenyl Sepharose). Nesse tipo de cromatografia, os aminoácidos apolares das proteínas interagem com uma matriz hidrofóbica. Essa interação aumenta na presença de altas concentrações de íons. Dessa forma, as proteínas hidrofílicas pouco interagem com a resina e são eluídas primeiro, ao contrário das proteínas menos hidrofílicas, as quais ficam fortemente ligadas à resina e são eluídas a partir da diminuição da concentração de sal no tampão.

Esta cromatografia resultou em 7 frações principais denominadas de P1 a P7 (figura 7A). A fração P7 foi submetida à análise em SDS-PAGE para determinar a sua massa molecular, bem como o seu grau de pureza. O gel de eletroforese (figura 8B) mostrou que a fração P7 apresenta uma só banda de polipeptídeo, com elevado grau de pureza e com massa molecular aparente de 17 kDa. A fração P7 foi denominada de Ba3dP7 e utilizada para atingir os objetivos propostos para este trabalho.

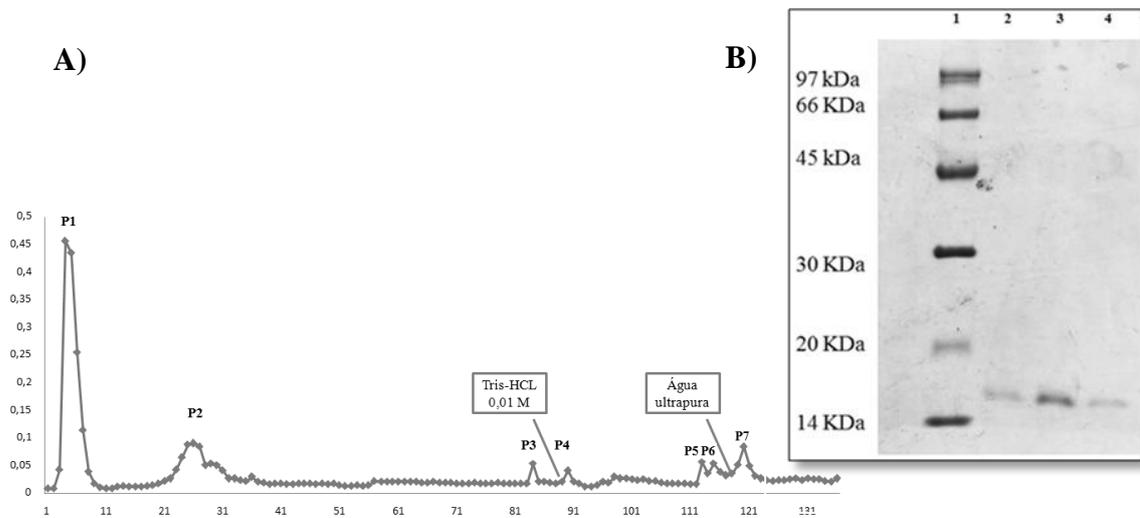


Figura 7. Purificação da PLA₂ Ba3dP7. (A) Cromatografia da fração A3d em coluna de Phenyl Sepharose. Cerca de 40 mg da fração A3d foram submetidos à coluna de interação hidrofóbica previamente equilibrada com tampão Tris-NaCl 4,0 M (pH 8,5). Trocas de tampão: tubo 90: Tris-HCl; 112: água ultrapura. (B) SDS-PAGE (14%). A migração das amostras foi comparada ao padrão de massa molecular: fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa). Linha 1: padrão de massa molecular. Linhas 2, 3 e 4: PLA₂ Ba3dP7 reduzida.

A utilização da cromatografia de interação hidrofóbica já se mostrou eficiente na obtenção de outras PLA₂, tais como a BmoTX-I isolada por Santos-Filho et al. (2008) e a BmoPLA₂, isolada por Silveira et al. (2013). Ao julgar pelo perfil eletroforético, a massa molecular da PLA₂ Ba3dP7 foi semelhante a outras PLA₂s, como a BaTX e a BaSpII RP4 isoladas por Ponce-Soto et al. (2007) e Denegri et al. (2010), respectivamente.

Nossos resultados mostraram que a PLA₂ Ba3dP7 é desprovida de atividades coagulantes, proteolítica e hemorrágica. Todavia, essa toxina apresentou uma atividade fosfolipásica elevada devido à ação hemolítica indireta. As figuras 8A e 8B mostram que a PLA₂ Ba3dP7 apresentou uma atividade PLA₂ maior que a peçonha bruta.

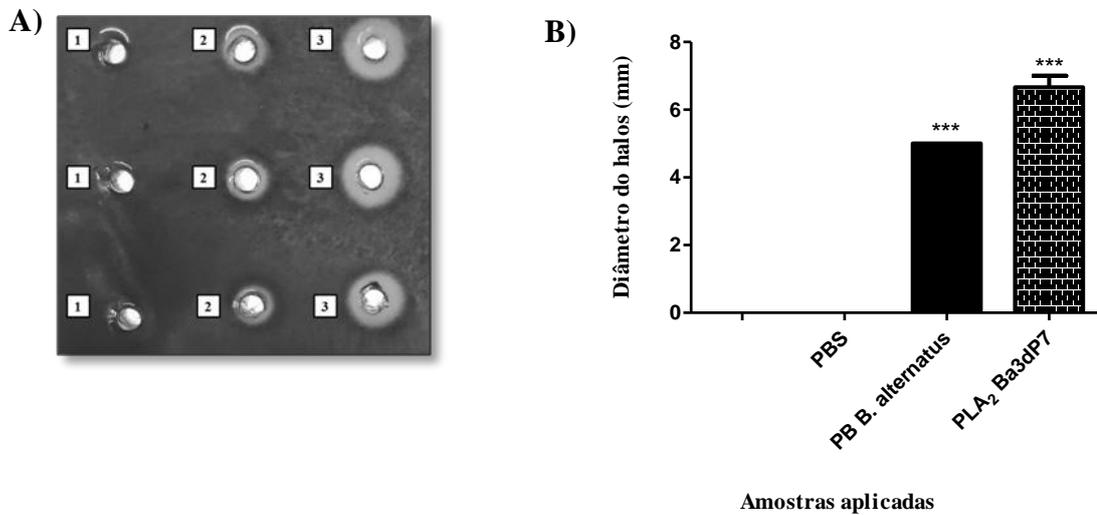


Figura 8. Atividade hemólise indireta. A) Comparação qualitativa das áreas dos halos hemolíticos induzidos pela peçonha bruta e por Ba3dP7. 1: controle negativo com PBS. 2: controle positivo com 10 µg de peçonha bruta de *B. alternatus*. 3: 10 µg de Ba3dP7. B) Comparação quantitativa do diâmetro dos halos (***) $p < 0,001$.

As PLA₂s encontradas em peçonhas de serpentes possuem cerca de 119 a 143 resíduos de aminoácidos e são classificadas de acordo com sua estrutura primária e ao estado de agregação (DENEGRÍ et al., 2010). Também, podem ser classificadas em ácidas e básicas, variando em quantidade, dependendo da espécie. As isoformas básicas estão associadas uma toxicidade elevada, enquanto as ácidas, geralmente, têm a atividade catalítica aumentada em relação às básicas (SANTOS-FILHO et al., 2008; KRIZAJ et al., 1993).

5.2. Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias

As PLA₂s de peçonhas de serpentes possuem um papel fundamental na reação inflamatória decorrente dos envenenamentos ofídicos. A formação de edema e a diminuição do limiar nociceptivo, no local da picada, são resultados da ação dessas moléculas (KINI, 2003; DENNIS, 1997).

Após a estimulação da cultura de macrófagos com a peçonha bruta de *B. alternatus* e com a Ba3dP7, em concentrações com citotoxicidade abaixo de 50%, foi feita a dosagem de citocinas IL-10, IL-12, TNF e óxido nítrico pelo método de ELISA Sanduíche.

No presente estudo, a produção de IL-10 estimulada pela peçonha bruta foi cinco e três vezes maior nas concentrações de 30 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, que aquela ocasionada pela PLA₂ Ba3dP7. Já na dosagem de 60 $\mu\text{g/mL}$, não houve diferença estatisticamente significativa, provavelmente devido a uma concentração maior de outros componentes presentes na peçonha bruta (figura 9).

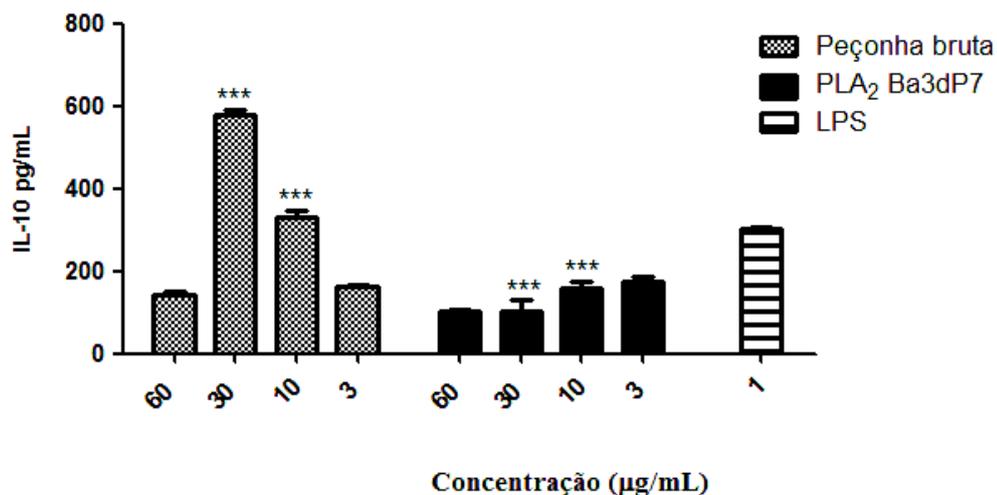


Figura 9. Dosagem da produção da citocina IL-10 por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de peçonha bruta de *B. alternatus* e Ba3dP7. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Utilizou-se o método estatístico one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

As citocinas são importantes reguladoras da inflamação devido a sua capacidade de transferir a outras células informações que induzem modificações funcionais, multiplicação celular ou até mesmo a morte por apoptose (SHAIKH, 2011; KOPF et al., 2010).

A IL-10 é uma importante citocina para as respostas imunes, pois tem a capacidade de inibir macrófagos ativado pela supressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como a IL-12 e o TNF, fato crucial para a caracterização da atividade anti-inflamatória dessa citocina (YILMA et al., 2012; BRENNAN et al., 2008).

As citocinas pró-inflamatórias, dosadas nesse trabalho, foram a IL-12 e o TNF- α . A produção de IL-12 induzida pela peçonha bruta na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ foi estatisticamente maior comparada àquela produzida pela PLA₂ Ba3dP7. Além disso, essa estimulou de forma constante os níveis de IL-12 e a presença de outros componentes em maior quantidade na peçonha bruta na dosagem de 60 $\mu\text{g/mL}$ pode estar relacionada com a baixa produção de IL-12 (figura 10).

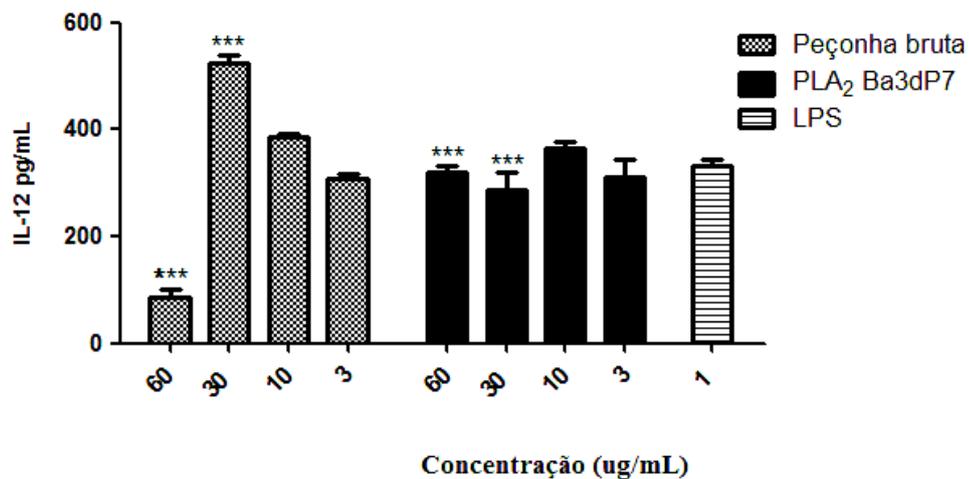


Figura 10. Dosagem da produção da citocina IL-12 por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de peçonha bruta de *B. alternatus* e Ba3dP7. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (***) $p < 0,001$). Utilizou-se o método estatístico one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Como observado na figura 11, a produção de TNF- α estimulado pela PLA₂ Ba3dP7 nas concentrações 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$ foi, respectivamente, dez e duas vezes maior que aquela induzida pela peçonha bruta.

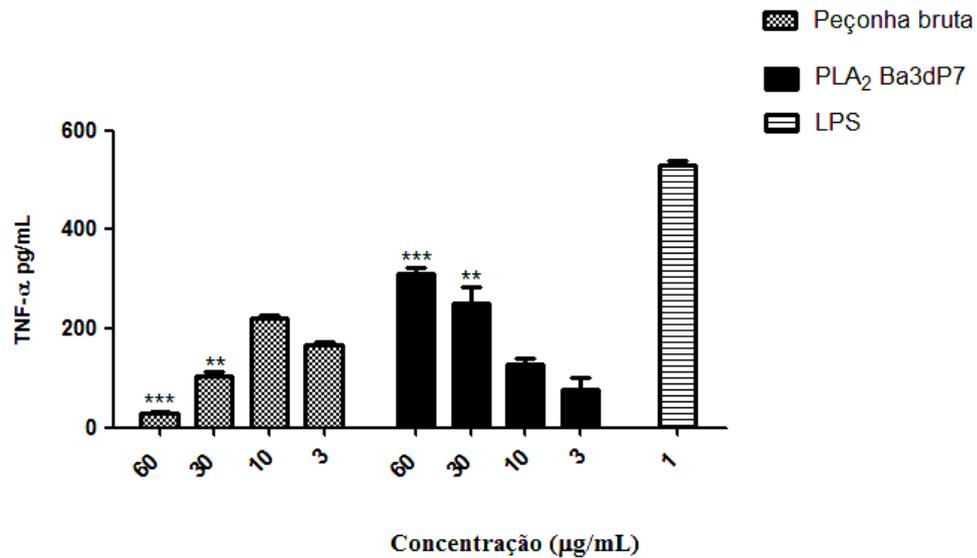


Figura 11. Dosagem da produção de TNF- α por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de peçonha bruta de *B. alternatus* e Ba3dP7. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). Utilizou-se o método estatístico one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Os níveis de produção da citocina IL-12, comparados com os de IL-10, após a estimulação dos macrófagos com a Ba3dP7, foram no mínimo duas vezes maiores. Ao compararmos as dosagens de TNF- α e IL-10, percebe-se que a produção do TNF- α é pelo menos duas vezes maior. Dessa forma, esses resultados sugerem que a Ba3dP7 tem um perfil pró-inflamatório (figura 12).

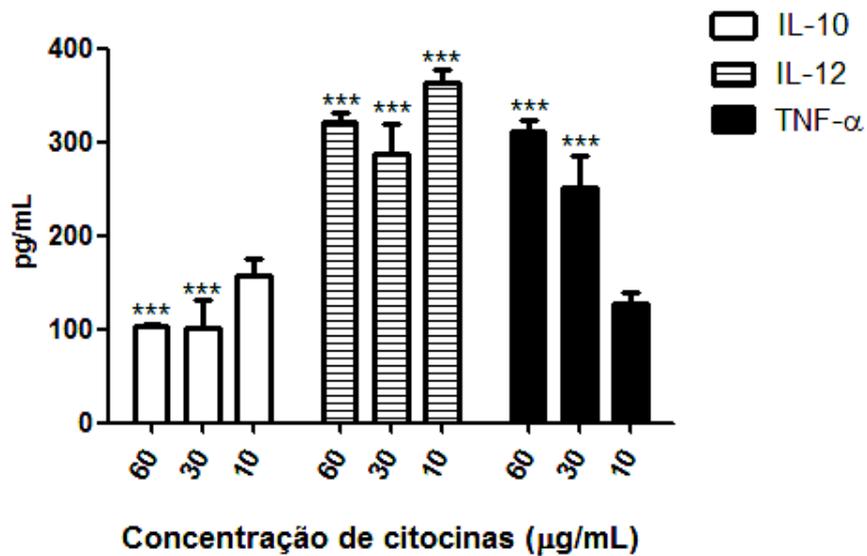


Figura 12. Dosagem da produção de IL-10, IL-12 e TNF- α por macrófagos estimulados com diferentes concentrações de PLA₂ Ba3dP7 (**p < 0,001). Utilizou-se o método estatístico two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Os macrófagos, em resposta a algum patógeno, têm a capacidade de produzir a citocina pró-inflamatória IL-12. Sua principal função é estimular a produção de interferon-gama (IFN- γ) pelas células NKs e pelos linfócitos T CD4⁺, estimulando os macrófagos e aumenta a atividade bactericida, auxiliando na resposta imune contra infecções (HOLMKVIST et al., 2015; CHEN et al., 2012; HAMZA et al., 2010; DULUC et al., 2009).

Além da IL-12, os macrófagos também produzem o TNF- α , uma citocina que está envolvida na proliferação de células hematopoéticas e com processos apoptóticos de células cancerígenas, bem como está relacionado com mudanças morfológicas e diferenciação (CHERRY et al., 2015; PERRI et al., 2015). A atividade pró-inflamatória do TNF está relacionada com a sua capacidade de interação com as células do endotélio vasculare com os leucócitos endoteliais. Assim, as células endoteliais auxiliam a inflamação após apresentarem diferentes moléculas de adesão leucocitária, tais como E-selectina, molécula intercelular-1 de adesão (ICAM-1) e moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1) (BRADLEY, 2008; KIM et al., 2008; LEE et al., 2006; RAHMAN et al., 1998).

Avaliou-se também a liberação do óxido nítrico pela ação da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7. A determinação da concentração de óxido nítrico foi baseada na produção de nitrito

pelos macrófagos ativados. Os níveis de nitrito entre as duas amostras testadas foram semelhantes, não havendo diferenças significativas entre os dois componentes testados (figura 13). A estimulação da produção de nitrito sugere que a peçonha bruta e a toxina isolada são capazes de estimular os macrófagos a aumentar os níveis de óxido nítrico e, conseqüentemente, influenciar no surgimento de uma resposta inflamatória.

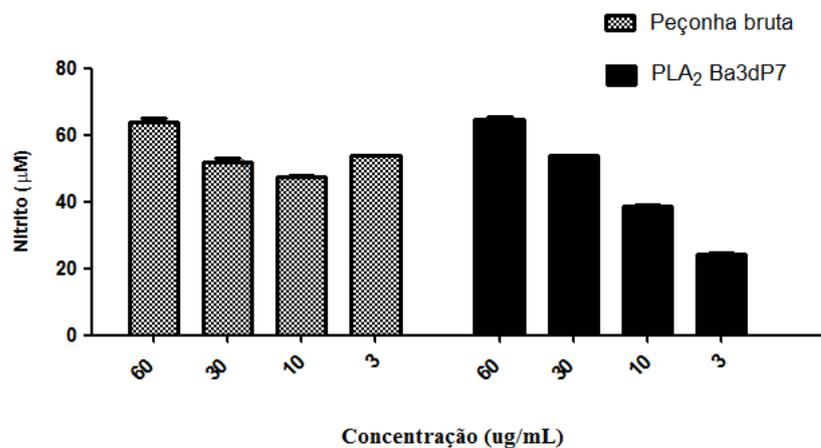


Figura 13. Dosagem da produção de nitrito por macrófagos estimulados com diferentes concentrações da peçonha bruta de *B. alternatus* e da PLA₂ Ba3dP7. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Utilizou-se o método estatístico one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

O óxido nítrico é um importante modulador das respostas imunes. Essa molécula é produzida por células endoteliais e macrófagos e influencia na vasodilatação, processo fundamental na inflamação. O NO pode ocasionar o aumento da atividade das ciclooxigenases e conseqüente conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas e tromboxanos, desencadeando inúmeros efeitos fisiológicos e fisiopatológicos, inclusive na inflamação (FANG et al., 2014; CHUN et al., 2004; AHMAD et al., 2002; SALVEMINI et al., 1993). Os macrófagos também produzem o NO na tentativa de conter e/ou controlar alguma infecção bacteriana (JONES-CARSON et al., 2014; MCMULLIN et al., 2005; HUANG et al., 2002).

As toxinas presentes na peçonha de serpentes são moléculas bioativas com inúmeras funções no organismo. A atuação dessas toxinas nas respostas inflamatórias já foi descrita

principalmente na estimulação ou supressão da produção de citocinas pró e/ou anti-inflamatórias (MENALDO et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2005; CLISSA et al., 2001).

Os mecanismos envolvidos na ação pró-inflamatória de toxinas presentes na peçonha de serpentes têm sido muito estudados. Essa ação pode ser devido à hidrólise enzimática de fosfolipídeos por meio da ação direta no ácido aracdônico, na membrana plasmática, e ativação de processos intracelulares (ZULIANI et al., 2005). Nunes et al. (2011) isolaram uma PLA₂ da peçonha de *Bothrops leucurus*, a qual foi capaz de induzir a produção de TNF- α , IL-12 e IL-1 β , em cultura de célula mononucleares do sangue periférico (PBMC). Esses dados sugerem que essa PLA₂ é capaz de induzir citocinas pró-inflamatórias. Furtado et al. (2014) analisaram a atividade de três PLA₂ de *Bothrops atrox*, as quais foram capazes de estimular a produção de TNF- α por macrófagos em cultura de células, o que caracteriza a habilidade dessas enzimas de induzir eventos inflamatórios.

5.3. Atividade antiviral

Neste trabalho, também avaliou-se a atividade virucida da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7 sobre o vírus da dengue. Considerada a principal arbovirose humana, a dengue constitui um sério problema de saúde pública mundial, principalmente em países de clima tropical e subtropical. A incidência de dengue cresceu drasticamente em todo o mundo nas últimas décadas. Apesar dos casos da doença serem muitas vezes subnotificados, ela acomete cerca de 390 milhões de pessoas por ano. Estima-se que 3,9 bilhões de pessoas estão em risco de infecção pelo vírus, concentrando-se principalmente nas regiões urbanas e suburbanas das Américas, do Sudeste da Ásia, do Mediterrâneo Oriental e do Pacífico Ocidental (WHO, 2015).

Primeiramente, foi calculado o valor de CC50, ou seja, a concentração de um determinado composto que é capaz de reduzir 50% da viabilidade celular. A peçonha bruta apresentou um CC50 de 57 ng/ μ L, enquanto a dose máxima testada de PLA₂ Ba3dP7 não reduziu a viabilidade celular em 50% (figura 14). Curiosamente, essa toxina aumentou a proliferação celular.

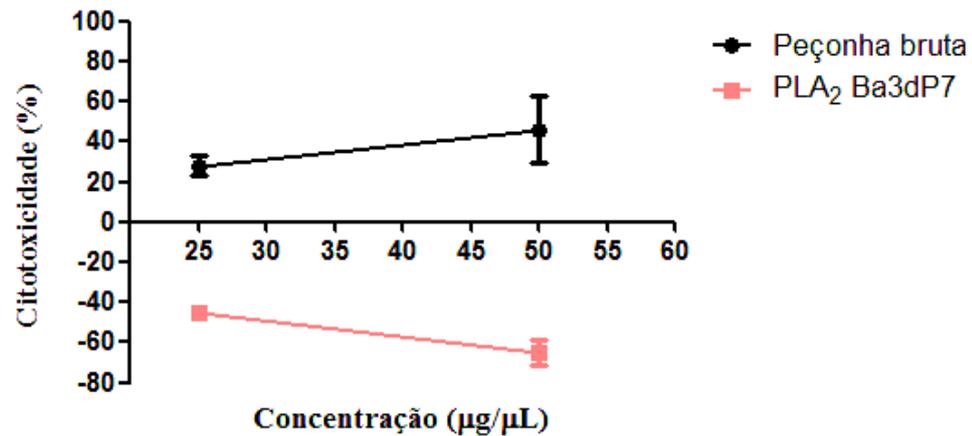


Figura 14. Citotoxicidade da peçonha bruta e da PLA₂ Ba3dP7 isolada de *B. alternatus* em células C6/36 avaliada pelo método colorimétrico de MTT.

No pré-tratamento, foi avaliada a capacidade da peçonha bruta de *B. alternatus* de conferir resistência das células C6/36 à infecção pelo vírus da dengue sorotipo 2. Dessa maneira, as células foram tratadas por três horas com a peçonha bruta na concentração de 50 ng/µL. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se o vírus DENV 2 em diluições seriadas.

Nossos resultados mostram que houve uma redução da citotoxicidade gerada pelas diluições 1/10 (14%) e 1/100 (19%) do DENV 2 ao tratar as células previamente com 50 ng/µL da peçonha bruta quando comparada aquela causada apenas pelo controle viral. Esses dados podem sugerir que a peçonha bruta confere atividade protetora às células contra a infecção em baixas quantidades virais (figura 15).

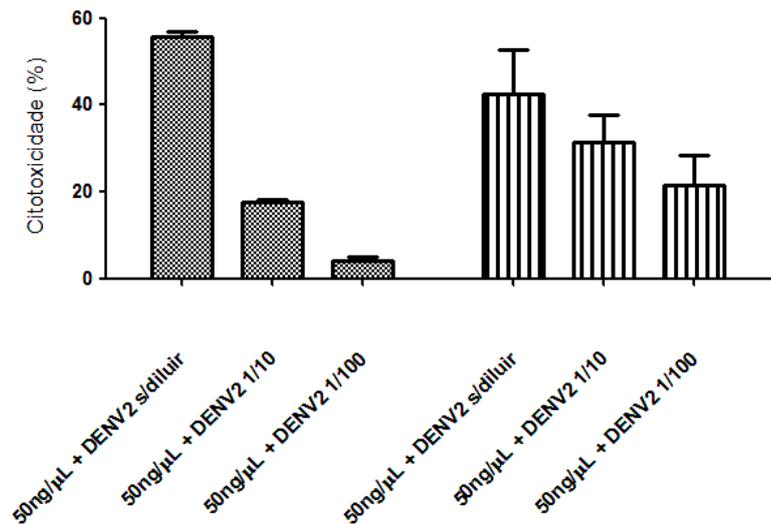


Figura 15. Pré-tratamento das células C6/36 com 50 ng/μL de peçonha bruta e posterior adição das diluições seriadas do DENV 2. Os dados mostrados não foram estatisticamente significativos entre os grupos ($p > 0,05$).

Muller et al. (2012) descreveram o papel da peçonha bruta e de algumas toxinas, dentre elas uma fosfolipase A_2 , isoladas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* em conferir resistência de células VERO E6 ao vírus da dengue sorotipo 2 e ao vírus da febre amarela. Assim, demonstraram que a peçonha bruta e a fosfolipase A_2 foram capazes de inibir em 100% a infecção por esses dois vírus. Além disso, outra toxina, a crotapotina, também purificada por esses mesmos autores, foi capaz de inibir 68% da infecção pelo DENV 2 e 50% pelo vírus da febre amarela.

A atividade virucida contra o DENV 2 foi realizada por meio da incubação a 29° C, durante uma hora, das diluições seriadas do vírus DENV 2 com a concentração de 50 ng/μL tanto da peçonha bruta quanto da PLA₂ Ba3dP7. A peçonha bruta apresentou atividade virucida contra o DENV 2 sem diluir e nas diluições 1/10 e 1/100, sendo que nessas duas últimas houve a proliferação celular, o que sugere a atividade protetora em baixas quantidades virais. Os resultados foram estatisticamente significativos ao comparar o vírus tratado ao controle viral, como mostrado na figura 16.

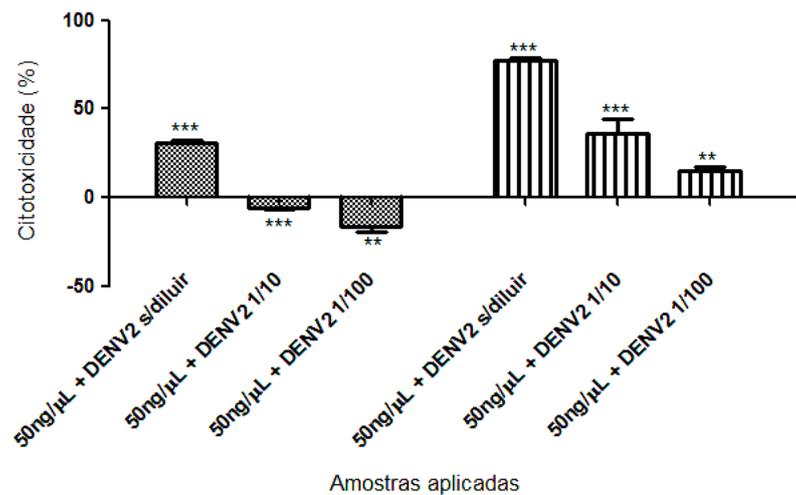


Figura 16. Atividade virucida de 50 ng/μL da peçonha bruta de *B. alternatus* contra o DENV 2. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados (**p < 0,01 e ***p < 0,001).

Por outro lado, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com a PLA₂ Ba3dP7 (50 ng/μL) e não-tratado, visto que a citotoxicidade, ocasionada pelo vírus, após a incubação com a toxina, foi próxima aquela apresentada pelo controle viral (figura 17). Nossos resultados apontam para a ineficiência da PLA₂ Ba3dP7 sobre a partícula viral na dose utilizada.

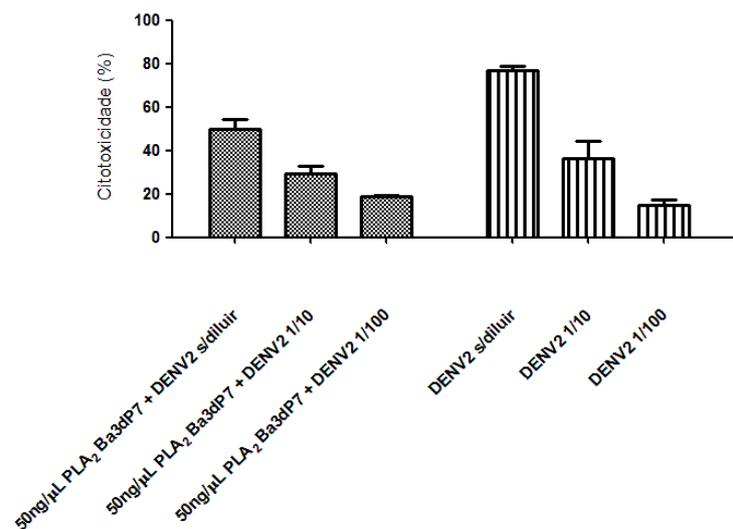


Figura 17. Atividade virucida da PLA₂ Ba3dP7 (50 ng/μL) contra o DENV 2. Os dados mostrados não foram estatisticamente significativos entre o grupo tratado (p > 0,05).

Muller et al. (2014) demonstraram que a característica virucida da PLA₂, isolada em 2012, contra o DENV 2, baseia-se na sua capacidade de clivar glicerofosfolipídeos presentes na bicamada lipídica do envelope viral. Assim, é gerada a desestabilização da proteína E de superfície do vírus, resultando em sua inativação. O papel virucida desse componente também foi comprovado contra o vírus da febre amarela, o vírus Oropouche e o vírus Rocio. Essa capacidade de clivar fosfolipídeos é uma característica geral das fosfolipases, o que desperta o interesse médico-científico (LESLIE; GELB, 2004; MARSHALL et al., 2000).

Um estudo realizado por Borkow et al. (2008) constatou que a peçonha bruta de *Echis carinatus sochureki* foi capaz de suprimir a atividade hemolítica do vírus Sendai em eritrócitos humanos. Essa atividade virucida é ocasionada pela atuação da peçonha bruta na clivagem das proteínas de superfície virais, tais como a glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase, encontradas no envelope viral, a qual medeia a adsorção do vírus pelas células. O vírus Sendai é um vírus envelopado da família *Paramyxoviridae*, responsável por infecções no trato respiratório humano.

Após testes *in vitro*, Cecilio et al. (2013) quantificaram o número de cópias de RNA de três sorotipos da dengue (DENV 1, 2 e 3) após tratamento com uma PLA₂, a qual causou uma redução no número de cópias de RNA viral. Esses dados fornecem mais conhecimentos sobre as propriedades estruturais e atividade antiviral de toxinas isoladas da peçonha de serpentes contra o DENV e outras viroses, abrindo possibilidades para aplicações biotecnológicas destes como ferramentas de pesquisa e terapêuticas.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, descrevemos o isolamento de uma PLA₂ (denominada de Ba3dP7) da peçonha de *B. alternatus*. Essa PLA₂ apresenta massa molecular aparente de 17 kDa e mostrou ser capaz de induzir a produção de óxido nítrico e interleucinas pró-inflamatórias. Observou-se também que a peçonha bruta da serpente *B. alternatus* apresentou atividade virucida contra o vírus da dengue sorotipo 2, o que a torna um importante candidato para o desenvolvimento de futuras alternativas terapêuticas.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, V. *Imunologia Celular e Molecular*. 7. ed: Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008. 560 p.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology*, v. 3, n. 9, p. 745–756, 2003.

AHMAD, N.; CHEN, L. C.; GORDON, M. A.; et al. Regulation of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in activated hepatic macrophages during acute endotoxemia. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 6, p. 1005–1011, 2002.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–653, 2004.

ALIBERTI, J. C. S.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; et al. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 111–115, 1998.

ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 151, n. 4, p. 542–550, 2008.

ANASTASSOVA-KRISTEVA, M. The origin and development of the immune system with a view to stem cell therapy. **Journal of hematotherapy & stem cell research**, v. 12, n. 2, p. 137–154, 2003.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 385–406, 2012.

AZEVEDO-MARQUES, M. M. DE; CUPO, P.; HERING, S. E. **Acidentes por animais peçonhentos** : Serpentes peçonhentas. , p. 480–489, 2003.

AZUMA, Y.; KAJI, K.; KATOGLI, R.; TAKESHITA, S.; KUDO, A. Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4858–4864, 2000.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in Situ hydrolysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, 2010.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A 2 regulation of arachidonic acid mobilization. **Signal Transduction**, v. 531, p. 2–6, 2002.

BANCHEREAU, J.; PASCUAL, V.; O’GARRA, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. **Nature**, v. 13, n. 10, p. 925–931, 2012.

- BARNES, P. J.; CHUNG, K. F.; PAGE, C. P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacological reviews**, v. 50, n. 4, p. 515–596, 1998.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.
- BAZAA, A.; PASQUIER, E.; DEFILLES, C.; et al. MVL-PLA2, a snake venom phospholipase A2, inhibits angiogenesis through an increase in microtubule dynamics and disorganization of focal adhesions. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.
- BERNARDE, P. S. Herpetofauna, Cruzeiro do Sul, 2015. Disponível em: <<http://www.herpetofauna.com.br/>>. Acesso em: 05 jun. 2015.
- BODDUPALLI, C. S.; GHOSH, S.; SHOWKAT RAHIM, S.; et al. Nitric oxide inhibits interleukin-12 p40 through p38 MAPK-mediated regulation of calmodulin and c-rel. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 686–697, 2007.
- BORGES, R. C. Serpentes peçonhentas brasileiras. 1. ed: Belo Horizonte: **Atheneu**, 2001. 164 p.
- BORKOW, G.; MARCO, D.; OVADIA, M. Isolation and Partial Characterization of an Antiviral Proteolytic Fraction from the Venom of *Echis Carinatus Sochureki*. **The Open Biology Journal**, v. 1, n. 1, p. 21–26, 2008.
- BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 149–160, 2008.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 851–859, 2000.
- BRENNAN, F. M.; GREEN, P.; AMJADI, P.; et al. Interleukin-10 regulates TNF- α -converting enzyme (TACE/ADAM-17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 1106–1117, 2008.
- BROCKER, C.; THOMPSON, D.; MATSUMOTO, A.; NEBERT, D. W.; VASILIOU, V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. **Human genomics**, v. 5, n. 1, p. 30–55, 2010.
- BUCARETCHI, F.; HERRERA, S. R. F.; HYSLOP, S.; BARACAT, E. C. E.; VIEIRA, R. J. Snakebites by *Bothrops spp* in children in Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 6, p. 329–333, 2001.
- BUSTILLO, S.; LEIVA, L. C.; MERINO, L.; et al. Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 50, n. 3-4, p. 79–82, 2008.

CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C. S.; PONCE-SOTO, L. A.; et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1509–1519, 2008.

CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; et al. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins : New Trends in Cancer Therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

CALZAVARA-SILVA, C. E.; GOMES, A. L. V; MAIA, R. C. C.; et al. Early molecular markers predictive of dengue hemorrhagic fever. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 671–677, 2009.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Dengue**. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/Dengue/>>. Acesso em: 28 mai. 2015.

CECILIO, A. B.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, R. A. DE; et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A2 from snake venom and their antiviral activities against dengue virus. **Toxins**, v. 220, p. 1780–1798, 2013.

CHELLAPANDI, P.; SRD, J. Purification and Antibacterial Activity of Indian Cobra and Viper Venoms. **Electronic Journal of Biology**, v. 4, n. 1, p. 11–16, 2008.

CHEN, R.-F.; WANG, L.; CHENG, J.-T.; YANG, K. D. Induction of IFN α or IL-12 depends on differentiation of THP-1 cells in dengue infections without and with antibody enhancement. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 340, 2012.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279–1303, 1991.

CHUN, K.-S.; CHA, H.-H.; SHIN, J.-W.; et al. Nitric oxide induces expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through activation of NF-kappaB. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 3, p. 445–454, 2004.

CLISSA, P. B.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567–1573, 2001.

COLOGNA, R.; RICO-HESSE, R. American Genotype Structures Decrease Dengue Virus Output from Human Monocytes and Dendritic Cells, **Journal of Virology**, v. 77, n. 7, p. 3929–3938, 2003.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 3, n. 3, p. 74-84, 2014.

COSTA, T. R.; BURIN, S. M.; MENALDO, D. L.; CASTRO, F. A DE; SAMPAIO, S. V. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 23, 2014.

COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; OLIVEIRA, C.Z.; et al. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-

terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1645-1656, 2008.

DAGVADORJ, J.; NAIKI, Y.; TUMURKHUU, G.; et al. Interleukin-10 inhibits tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells through reduced MyD88 expression. **Innate immunity**, v. 14, n. 2, p. 109–115, 2008.

DALRYMPLE, N. A.; MACKOW, E. R. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. **Advances in Virology**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

DENEGRI, M.E.G.; ACOSTA, O.C.; HUANCAHUIRE-VEGA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; et al. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 64-74, 2010.

DING, L.; MORRISON, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 231–5, 2013.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002.

DULUC, D.; TAN, F.; SCOTET, M.; et al. PolyI: C plus IL-2 or IL-12 induce IFN-gamma production by human NK cells via autocrine IFN-beta. **European journal of immunology**, v. 39, n. 10, p. 2877–2884, 2009.

DURALI, D.; HEVER, M. G. G.; GIRON-MICHEL, J.; et al. In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. **Blood**, v. 102, p. 4084-4089, 2003.

FANG, L.; CHANG, H. S.; CHENG, J. C. Nitric oxide and cGMP induce COX-2 expression and PEG2 production in human granulosa cells through CREB signaling pathway, **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, p. E262-E269, 2015.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of *bothrops jararaca*. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163–169, 1965.

FERREIRA, B. L.; SANTOS, D. O.; SANTOS, A. L.; et al. Comparative analysis of Viperidae venoms antibacterial profile: A short communication for proteomics. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

FERNANDES DE OLIVEIRA, L. M.; ULLAH, A.; MASOOD, R.; et al. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. **Toxicon**, v. 76, p. 282–290, 2013.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FURTADO, J. L.; OLIVEIRA, G. A.; PONTES, A. S.; et al. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A2 isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, n. i, 2014.

GAUR, U.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1403–1408, 2003.

GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, F. DE; et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 24–32, 2009.

GORREN, A. C. F.; MAYER, B. Nitric-oxide synthase: A cytochrome P450 family foster child. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 3, p. 432–445, 2007.

GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; SUN, M. Z. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 302–311, 2012.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

HALSEY, E. S.; MARKS, M. A.; GOTUZZO, E.; et al. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

HATO, T.; DAGHER, P. C. How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, , n. 8, p. 1–11, 2014.

HAMZA, T.; BARNETT, J. B.; LI, B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 3, p. 789–806, 2010.

HENRY, C. J.; ORNELLES, D. A.; MITCHELL, L. M.; BRZOZA-LEWIS, K. L.; HILTBOLD, E. M. IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. **Journal of immunology**, v. 181, n. 12, p. 8576–8584, 2008.

HEYLEN, E.; HUANG, A.; SUN, D.; KALEY, G. Nitric oxide-mediated dilation of arterioles to intraluminal administration of aldosterone. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 54, n. 6, p. 535–542, 2009.

HODGSON, W. C.; ISBISTER, G. K. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 2, p. 173–176, 2009.

HOLMKVIST, P.; ROEPSTORFF, K.; URONEN-HANSSON, H.; et al. A major population of mucosal memory CD4⁺ T cells, coexpressing IL-18R α and DR3, display innate lymphocyte functionality. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 3, p. 545-558, 2014.

HUANG, J.; DEGRAVES, F. J.; LENZ, S. D.; et al. The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates Chlamydia-induced disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3914–3919, 2002.

HSIAO, E. Y.; PATTERSON, P. H. Activation of the maternal immune system induces endocrine changes in the placenta via IL-6. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 4, p. 604–615, 2011.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. **Dengue**. 2015. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 01 jun. 2015.

ITO, K.; HORI, K.; MIYAZAWA, K. Purification and some properties of L-amino oxidase from *Amphiroa crassissima* Yendo, n. 151/152, p. 563-569, 1987.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 291–295, 2010.

IZIDORO, L. F. M.; ALVES, L. M.; RODRIGUES, V. M.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. *Bothrops pirajai* snake venom L-amino acid oxidase: In vitro effects on infection of *toxoplasma gondii* in human foreskin fibroblasts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 477–485, 2011.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snake venom: A potent anticancer agent. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 10, p. 4855–4860, 2012.

JALAEI, J.; FAZELI, M.; RAJAIAN, H.; SHEKARFOROUSH, S. S. In vitro antibacterial effect of wasp (*Vespa orientalis*) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 22, 2014.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 2, p. 197–216, 2002.

JONES-CARSON, J.; ZWEIFEL, A. E.; TAPSCOTT, T.; et al. Nitric Oxide from IFN γ -Primed Macrophages Modulates the Antimicrobial Activity of β -Lactams against the Intracellular Pathogens *Burkholderia pseudomallei* and Nontyphoidal *Salmonella*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3079, 2014.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature**, v. 11, n. 3, p. 201-212, 2011.

JUNIOR, N. G. O.; CARDOSO, M. H. S.; FRANCO, O. L. Snake venoms: Attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 24, p. 4645–4658, 2013.

KAKA, A. S.; FOSTER, A. E.; WEISS, H. L.; et al. Using Dendritic Cell Maturation and IL-12 Producing Capacity as Markers of Function: A Cautionary Tale. **Journal of Immunotherapy**, v. 31, n. 4, p. 359-369, 2008.

KARDONG K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids & elapids. **Memórias do Instituto Butantan**, n. 46, p. 106–118, 1982.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; et al. Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, 2002.

KIM, H.; HWANG, J. S.; WOO, C. H.; et al. TNF-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 is regulated by a Rac-ROS-dependent cascade in human airway epithelial cells. **Experimental & molecular medicine**, v. 40, n. 2, p. 167–175, 2008.

KINI, R. M. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827–840, 2003.

KONDO, M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. **Immunological Reviews**, v. 238, n. 1, p. 37–46, 2010.

KOPF, M.; BACHMANN, M. F.; MARSLAND, B. J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nature reviews*. **Drug discovery**, v. 9, n. 9, p. 703–718, 2010.

KRIZAJ, I.; SIIGUR, J.; SAMEL, M.; COTIC, V.; GUBENSEK, F. Isolation, partial characterization and complete amino acid sequence of the toxic phospholipase A2 from the venom of the common viper, *Vipera berus berus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1157, p. 81–85, 1993.

KWON, H.; BREESE, E. H.; VIG-VARGA, E.; et al. Tumor Necrosis Factor Alpha Induction of NF- κ B Requires the Novel Coactivator SIMPL. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9317–9326, 2004.

LAYNE, E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. **Methods in Enzymology**, v. 3, p. 447-454, 1957.

LEE, C. W.; LIN, W. N.; LUO, S. F.; et al. Transcriptional Regulation of VCAM-1 Expression by Tumor Necrosis Factor- α in Human Tracheal Smooth Muscle Cells: Involvement of MAPKs, NF- κ B, p300, and Histone Acetylation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 207, p. 174-186, 2006.

LEITMEYER, K. C.; CHACON, DE; LEITMEYER, K. C.; et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–47, 1999.

LESLIE, C. C.; GELB, M. H. Assaying Phospholipase A2 Activity. **Methods in Molecular Biology**, v. 284, p. 229-242, 2004.

LIMON-FLORES, A. Y.; PEREZ-TAPIA, M.; ESTRADA-GARCIA, I.; et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: An effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, n. 5, p. 323–334, 2005.

LIN, C. C.; HSIAO, L. D.; CHIEN, S. S.; et al. Tumor necrosis factor- α -induced cyclooxygenase-2 expression in human tracheal smooth muscle cells: involvement of p42/p44 and p38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B. **Cellular Signalling**, v. 16, n. 5, p. 597–607, 2004.

MACÊDO, J. K. A. **Análise da peçonha de *Bothropoides marmoratus*, com ênfase na caracterização de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília. 2011.

MAHON, B. P.; RYAN, M. S.; GRIFFIN, F.; KINGSTON, H.; MILLS, G. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5295–5301, 1996.

MALEFYT, R. DE W.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; VRIES, J. E. DE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209–1220, 1991.

MARK, K. S.; TRICKLER, W. J.; MILLER, D. W. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 297, n. 3, p. 1051–1058, 2001.

MARQUES, P. P.; ESTEVES, A.; LANCELLOTTI, M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S. Novel acidic phospholipase A2 from *Porthidium hyoprora* causes inflammation with mast cell rich infiltrate. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 1, p. 78–84, 2015.

MARSHALL, J.; KRUMP, E.; LINDSAY, T.; et al. Involvement of cytosolic phospholipase A2 and secretory phospholipase A2 in arachidonic acid release from human neutrophils. **Journal of immunology**, v. 164, n. 4, p. 2084–2091, 2000.

MARSH, N. A. Diagnostic uses of snake venom. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 211–217, 2002.

MARUÑAK, S.L.; LEIVA, L.; DENEGRI, M.E.G.; TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O. Isolation and biological characterization of a basic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biocell**, v. 31, n. 3, p. 355-364, 2007.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2897-2912, 2008.

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *bothrops* e *crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 02, p. 21-26, 2012.

MATSUI, D.; IM, D. H.; SUGAWARA, A.; et al. Mutational and crystallographic analysis of l-amino acid oxidase/monooxygenase from *Pseudomonas sp.* AIU 813: Interconversion between oxidase and monooxygenase activities. **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 220–228, 2014.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1-2, p. 146–156, 2000.

MAYNARD, C. L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of IL-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Nature**, v. 226, p. 219-233, 2008.

MCGUIRK, P.; MCCANN, C.; MILLS, K. H. G. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 2, p. 221–231, 2002.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; 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, p. 764–771, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança**. 4. ed. 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_diagnostico_manejo_clinico_adulto.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2015.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Biodiversidade brasileira**. 2015. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 18 mai. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue**. 2015. Disponível em: <www.portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/dengue>. Acesso em: 18 mai. 2015.

MOORE, K. W.; MALEFYT, R. D. W.; ROBERT, L.; GARRA, A. O. I Nterleukin -10 and the I Nterleukin -10. **Molecular and Cellular Biology**, v. 1, n. 1, p. 683–765, 2001.

MORAIS, N. C. G. DE; NEVES MAMEDE, C. C.; FONSECA, K. C.; et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 60, n. 7, p. 1251–1258, 2012.

MORJEN, M.; HONORÉ, S.; BAZAA, A.; et al. PIVL, a snake venom Kunitz-type serine protease inhibitor, inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. **Microvascular Research**, v. 95, p. 149–156, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation in cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BALDO, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 280–289, 2012.

MUKHERJEE, A. K.; SAIKIA, D.; THAKUR, R. Medical and diagnostic applications of snake venom proteomes. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 2, n. June, p. 31–40, 2011.

MULLER, V. D. M.; RUSSO, R. R.; OLIVEIRA CINTRA, A. C.; et al. Crotoxin and phospholipases A 2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507–515, 2012.

MULLER, V. D.; SOARES, R. O.; SANTOS-JUNIOR, N. N. DOS; et al. Phospholipase A2 Isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112351, 2014.

NITTA, C. F.; ORLANDO, R. A. Crosstalk between Immune Cells and Adipocytes Requires Both Paracrine Factors and Cell Contact to Modify Cytokine Secretion. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

NOISAKRAN, S.; PERNG, G.C. Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/ Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 4, p. 401-408, 2008.

NUNES, D. C. O.; RODRIGUES, R. S.; LUCENA, M. N.; et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A 2 from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 154, n. 3, p. 226–233, 2011.

OBERMEIER, F.; GROSS, V.; SCHÖLMERICH, J.; FALK, W. Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide. **Journal of leukocyte biology**, v. 66, n. 5, p. 829–836, 1999.

ÖHLER, M.; GEORGIEVA, D.; SEIFERT, J.; et al. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2422–2437, 2010.

OLIVEIRA, F. **Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca)**: Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthos) e caracterização bioquímica da BthTl. 2001. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

PAES, M. V.; LENZI, H. L.; NOGUEIRA, A. C. M.; et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c mice. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 89, n. 10, p. 1140–1151, 2009.

PAL, S. K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S. C.; GOMES, A. Snake venom as therapeutic agents: From toxin to drug development. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2002.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D.. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p.24-29, fev. 2001.

PARK, M. H.; SON, D. J.; KWAK, D. H.; et al. Snake venom toxin inhibits cell growth through induction of apoptosis in neuroblastoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 11, p. 1545–1554, 2009.

PASCHOAL, T. S. **Caracterização bioquímica e funcional de uma Fosfolipase A2 isolada da peçonha de *Bothrops alternatus***. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

PELAYO, R.; WELNER, R.; PERRY, S. S.; et al. Lymphoid progenitors and primary routes to becoming cells of the immune system. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 2, p. 100–107, 2005.

PERRI, P.; ZAULI, G.; GONELLI, A.; et al. TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand in Ocular Cancers and Ocular Diabetic Complications. **BioMed Research International**, v. 2015, n. i, p. 1-8, 2015.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature**, v. 14, p. 141-153, 2014.

PETRICEVICH, V. L.; MENDONÇA, R. Z. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon**, v. 42, n. 2, p. 143–153, 2003.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; et al. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 4, p. 585-593, 2007.

PRANDINI, M. N.; NEVES FILHO, A.; LAPA, A. J.; et al. Mild hypothermia reduces polymorphonuclear leukocytes infiltration in induced brain inflammation. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 3 B, p. 779–781, 2005.

PRIVAT, C.; LANTOINE, F.; BEDIQUI, F.; et al. Nitric oxide production by endothelial cells: Comparison of three methods of quantification. **Life Sciences**, v. 61, n. 12, p. 1193–1202, 1997.

QUEIROZ, M.; MAMEDE, C.; FONSECA, K.; et al. Biological characterization of a myotoxin phospholipase A2 homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. 49–58, 2011.

RAHMAN, A.; KEFER, J.; BANDO, M.; NILES, W. D.; MALIK, A. B. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation. **The American journal of physiology**, v. 275, n. 3 Pt 1, p. L533–L544, 1998.

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J.; PIRES DE CAMPOS, V. A. F.; et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 312–318, 1998.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011.

RICKERT, R. C.; JELLUSOVA, J.; MILETIC, A. V. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 244, p. 115–133, 2011.

SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L.; et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 15, p. 7240–7244, 1993.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: A comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 650–659, 2007.

SAMY, R.; MANIKANDAN, J.; SETHI, G.; et al. Snake Venom Proteins: Development into Antimicrobial and Wound Healing Agents. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 4–14, 2014.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inducer phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 908–917, 2008.

SARAIVA, M.; O’GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nature reviews. **Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 2005.

SHAIKH, P. Z. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation : A review. **International Journal of Pharmacy and Life Sciences**, v. 2, n. 11, p. 1247–1263, 2011.

SIEWE, L.; BOLLATI-FOGOLIN, M.; WICKENHAUSER, C.; et al. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3248–3255, 2006.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJIN, J. G.; PETERS, A. H.; et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**, v. 11, p. 813-823, 1995.

SMALLIE, T.; RICCHETTI, G.; HORWOOD, N. J.; et al. IL-10 inhibits transcription elongation of the human TNF gene in primary macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 10, p. 2081–2088, 2010.

SOARES, A.M. Use of Snake Venom for Biomedical Researches and Drug Development. **SOAJ of Biochemistry and Biotechnology**, v. 1, p. 1-3, 2012.

SOLOSKI, M. J.; CROWDER, L. A.; LAHEY, L. J.; et al. Serum inflammatory mediators as markers of human lyme disease activity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

SUZUMURA, A.; ITO, A.; MIZUNO, T. Phosphodiesterase inhibitors suppress IL-12 production with microglia and T helper 1 development. **Multiple Sclerosis**, p. 574–578, 2003.

THAI, K. T. D.; HENN, M. R.; ZODY, M. C.; et al. High-Resolution Analysis of Intrahost Genetic Diversity in Dengue Virus Serotype 1 Infection Identifies Mixed Infections. **Journal of Virology**, v. 86, n. 2, p. 835–843, 2012.

TODAR, K. **Immune Defense against Bacterial Pathogens: Adaptive or Acquired Immunity**. 2015. Disponível em: <<http://www.bu.ufsc.br>>. Acesso em: 10 maio 2015.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A 2 and l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 795–804, 2010.

THEOHARIDES, T. C.; ALYSANDRATOS, K. D.; ANGELIDOU, A.; et al. Mast cells and inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 1, p. 21–33, 2012.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 2, p. 239–243, 2007.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S24–S32, 2010.

VASILAKIS, N.; CARDOSA, J.; HANLEY, K. A.; et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 2012.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil : revisão sistemática The occurrence of dengue and systematic review. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240–256, 2013.

VYAS, V.; BRAHMBHATT, K.; BHATT, H.; PARMAR, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156–162, 2013.

YILMA, A. N.; SINGH, S. R.; FAIRLEY, S. J.; TAHA, M. A.; DENNIS, V. A. The anti-inflammatory cytokine, interleukin-10, inhibits inflammatory mediators in human epithelial cells and mouse macrophages exposed to live and UV-inactivated chlamydia trachomatis. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

YOKOYAMA, T.; SEKIGUCHI, K.; TANAKA, T.; et al. Angiotensin II and mechanical stretch induce production of tumor necrosis factor in cardiac fibroblasts. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 6 Pt 2, p. H1968–H1976, 1999.

YUAN, S. Inflammatory mediators of coronary artery ectasia. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 3, p. 198–207, 2014.

ZHANG, W; CHIPMAN, P.R.; CORVER, J.; et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, v. 10, p. 907-912, 2003.

ZANGER, U. M.; SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138, n. 1, p. 103–141, 2013.

ZHANG, L.; WEI, L. J. ACTX-8, a cytotoxic l-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. **Life Sciences**, v. 80, n. 13, p. 1189–1197, 2007.

ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; et al. Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A 2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: Role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 335–346, 2005.

WALLACE, J. L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 5–9, 2005.

WATI, S.; LI, P.; BURRELL, C. J.; CARR, J. M. Dengue virus (DV) replication in monocyte-derived macrophages is not affected by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and DV infection induces altered responsiveness to TNF-alpha stimulation. **Journal of virology**, v. 81, n. 18, p. 10161–10171, 2007.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 05 jun. 2015.