

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

**EFEITO DO VENENO BRUTO E DE DUAS FOSFOLIPASES A₂
(BALTTX-I – LYS49 E BALTTX-II – ASP49) ISOLADAS DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops alternatus* SOBRE A FUNCIONALIDADE DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS ELICITADOS.**

Sulamita da Silva Setúbal

PORTO VELHO/RO

2010

SULAMITA DA SILVA SETÚBAL

**EFEITO DO VENENO BRUTO E DE DUAS FOSFOLIPASES A₂
(BALTTX-I – LYS49 E BALTTX-II – ASP49) ISOLADAS DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops alternatus* SOBRE A FUNCIONALIDADE DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS ELICITADOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra Juliana Pavan Zuliani

PORTO VELHO/RO

2010

SULAMITA DA SILVA SETÚBAL

EFEITO DO VENENO BRUTO E DE DUAS FOSFOLIPASES A₂
(BALTTX-I – LYS49 E BALTTX-II – ASP49) ISOLADAS DO VENENO DA
SERPENTE *Bothrops alternatus* SOBRE A FUNCIONALIDADE DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS ELICITADOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientadora

Dra Juliana Pavan Zuliani

Dra Izaltina Silva Jardim

Dr. Fabrício Calvo

Porto Velho, _____ de _____ de _____

Resultado _____

AGRADECIMENTOS

Em especial a minha orientadora, Prof. Dra. Juliana Pavan Zuliani, pela paciência, amizade, confiança, orientação e oportunidade para realização deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Guerino Stábeli pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Andreimar Martins Soares pela assistência oferecida.

A todos os meus Professores do PGBio/Exp.

Aos colegas do mestrado.

Aos amigos do laboratório, Adriana, Juliana, Fabiane, Caroline, Géssica, Kayena, Kayano, Elis e Neuza, pelo apoio, companheirismo e amizade.

À Aline Schimtz pela confiança e amizade.

A todos os funcionários do IPEPATRO.

Ao Allysson Carvalho pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos, parentes, amigos e em especial aos meus pais.

A todos que de forma direta ou indireta vieram a ajudar na realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Os venenos de serpentes da família Viperidae consistem em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias inorgânicas. Várias miotoxinas, com características estruturais de fosfolipases A₂ (FLA₂s), foram isoladas dos venenos serpentes da família Viperidae. Os venenos contêm FLA₂s, que apresentam homologia estrutural com as de mamíferos. Essas enzimas, por hidrolizarem fosfolipídio de membrana, liberam ácido araquidônico, precursor de eicosanóides, segundos mensageiros de processos fisiológicos e fisiopatológicos. Por catalizarem essas reações, as fosfolipases possuem importantes funções em vários processos biológicos, através da formação de segundos mensageiros que exercem ações biológicas importantes e transdução de sinais celulares. Desse modo este estudo teve por objetivo avaliar o efeito de duas FLA₂s, isoladas do veneno de *Bothrops alternatus*, a miotoxina BaltTX-I, uma Lys-49 cataliticamente inativa e a BaltTX-II, uma Asp-49 enzimaticamente ativa, bem como o veneno bruto sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que o tanto o veneno quanto as toxinas não interferem na capacidade de adesão e no com o descolamento dos macrófagos. Além disso, o veneno e a toxina BaltTX-I, mas não a BaltTX-II, nas concentrações de 6, 3 e 1,5 µg/mL induziram o aumento da taxa de fagocitose via receptor de complemento após uma hora de incubação. Adicionalmente foi avaliada a participação da proteína kinase C (PKC) na fagocitose via receptor de complemento. A inibição da PKC, pelo pré-tratamento dos macrófagos com estaurosporina, aboliu a fagocitose induzida pelo veneno e pela BaltTX-I. Ainda, o veneno bruto, assim como as duas toxinas induzem a produção de superóxido, sugerindo que a atividade de fosfolipase não é essencial para o desencadeamento desse efeito. Esses estudos contribuem para a melhor compreensão da fisiopatologia do envenenamento e para o mecanismo de ação do veneno botrópico e das fosfolipases, presentes nesses venenos, para a ativação dos macrófagos.

Palavras-chave: veneno de serpente, FLA₂ secretadas, fagocitose, superóxido, macrófagos.

ABSTRACT

The snake venoms from the Viperidae family are a complex mixture of proteins, peptides, lipids, polysaccharides and inorganic chemicals. Various myotoxins with structural features of phospholipases A₂ (PLA₂s) were isolated from venom of the snake of the Viperidae family. The venoms contain PLA₂s which are structurally homologue with those of mammals. These enzymes hydrolyze phospholipids of membrane and releasing arachidonic acid, precursors of eicosanoids, second messengers of physiological and pathophysiological processes. These reactions are catalysed by the phospholipases which important roles in various biological processes through the formation of second messengers that have important biological activities and cellular signal transduction. The aim of this study in order to the effect of two PLA₂s isolated from the venom of *Bothrops alternatus*, BaltTX-I, a Lys-49 catalytically inactive and the BaltTX-II, an Asp-49 enzymatically active, and the crude venom on the peritoneal macrophages function *in vitro*. Both the venom and the toxins do not interfere with macrophages to adhere and detachment from the support. In addition the venom and the toxin BaltTX-I, but not BaltTX-II, at the concentrations 6, 3 and 1,5 µg/mL induced an increase in phagocytosis via complement receptor one hour after incubation. Moreover, we evaluated the role of protein kinase C (PKC) in phagocytosis via complement receptor. Inhibition of PKC by pretreatment of macrophages with staurosporine abolished phagocytosis induced by crude venom and BaltTX-I. The crude venom, and also the two myotoxins, induce the production of superoxide suggesting that PLA₂s activity is not essential for triggering this effect. These studies contribute to a better understanding of the pathophysiology of envenomation and the mechanism of action of *Bothrops* venom and phospholipases in the activation of macrophages.

Key-words: snake venom, secretory PLA₂, phagocytosis, superoxide, macrophages.

LSTA DE FIGURAS

Fig.1: Indivíduo da espécie <i>Bothrops alternatus</i>	12
Fig. 2: Formação das espécies ativas de oxigênio e nitrogênio.....	27
Fig. 3: Efeito do veneno bruto e das fosfolipases BaltTX-I (Lys-49) e BaltTX-II (Asp-49) de <i>Bothrops alternatus</i> sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais <i>in vitro</i>	36
Fig. 4: Efeito do veneno e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos.	37
Fig. 5: Efeito da estaurosporina, inibidor de PKC sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais.....	38
Fig. 6: Efeito do veneno bruto e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II da serpente <i>Bothrops alternatus</i> na capacidade fagocítica de macrófagos, via receptor de complemento.....	40
Fig. 7: Efeito do inibidor de PKC na capacidade fagocítica de macrófagos via receptor de complemento induzida pelo veneno bruto e pela toxina BaltTX-I.	41
Fig. 8: Efeito do veneno e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre a produção de superóxido <i>in vitro</i>	42
Fig. 9: Efeito do inibidor de PKC na produção de superóxido por macrófagos estimulados pelo veneno ou toxinas BaltTX-I e BaltTX-II.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupo de FLA ₂ secretadas.....	17
Tabela 2: Grupos de fosfolipases A ₂ intracelulares.....	18
Tabela 3: Viabilidade de macrófagos (%) peritoneais incubados com veneno bruto e toxinas BaltTX-I e BaltTX-II.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA – Ácido Araquidônico
- BaltTX-I – Toxina I de *Bothrops alternatus*
- BaltTX-II – Toxina II de *Bothrops alternatus*
- cFLA₂ - Fosfolipase A₂ citosólica
- COX – Ciclooxygenase
- DAG – Diacilglicerol
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- E.P.M – Erro padrão da média
- FLA₂ – Fosfolipase A₂
- iFLA₂ - Fosfolipase A₂ independente de cálcio
- INF γ – Interferon gama
- IP3 – Inositol 1,4,5 – trifosfato
- KOH – Hidróxido de potássio
- LO – Lipoxigenase
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTB₄ – Leucotrieno B₄
- MT I – Miotoxina I
- MT II – Miotoxina II
- NBT – Corante azul de nitrotetrazólio
- NO – Óxido nítrico
- NOS – Óxido nítrico sintase
- PAF – Fator ativador de plaquetas
- PBS – Phosphate buffered saline – solução salina tamponada com fosfato
- PGE₂ – Prostaglandina E₂
- PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase
- PIP₂ – Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
- PKC - Proteína kinase C
- PMA – Acetato de Forbol Meristato
- sFLA₂ - Fosfolipase A₂ secretada
- STS – Estaurosporina
- VBa – Veneno de *Bothrops alternatus*

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	11
1.1- Considerações gerais.....	11
1.2- <i>Bothrops alternatus</i>	12
1.3- Composição dos venenos de serpentes.....	13
1.4- Fosfolipases A ₂ (FLA2).....	14
1.5- Fosfolipases A ₂ secretadas isoladas do veneno de serpentes.....	20
1.6- Inflamação aguda.....	21
1.7- Papel dos leucócitos na reação inflamatória causada pelos venenos botrópicos.....	23
2- OBJETIVO.....	28
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1- Animais.....	29
3.2- Veneno.....	29
3.3- Fosfolipases A ₂	29
3.4- Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongo.....	30
3.5- Teste de viabilidade celular por exclusão do azul de tripan.....	30
3.6- Determinação da fagocitose via receptor de complemento.....	30
3.6.1- Obtenção do zimosan e opsonização com soro de camundongo normal	30
3.6.2- Determinação da fagocitose.....	31
3.7- Determinação da capacidade de adesão.....	31
3.8- Determinação da capacidade de descolamento.....	32
3.9- Avaliação da participação da PKC na fagocitose via receptor de complemento.....	32
3.10- Determinação da produção do ânion superóxido por densidade óptica.....	32
3.11- Avaliação da participação da PKC na produção de ânion superóxido.....	33
3.12- Análise estatística.....	33
4- RESULTADOS.....	34
4.1- Efeito do veneno e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II da serpente <i>Bothrops alternatus</i> sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais.....	34
4.2- Efeito do veneno e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos.....	37
4.3- Efeito da estaurosporina, inibidor de PKC, sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais.....	38
4.4- Efeito do veneno bruto e das duas toxinas BaltTX-I e BaltTX-II isoladas do veneno da serpente <i>Bothrops alternatus</i> sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos, via receptor de complemento.....	39
4.5- Efeito do inibidor PKC sobre a fagocitose.....	41
4.6- Efeito do veneno bruto e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre a produção de superóxido por macrófagos.....	42
4.7- Efeito do inibidor de PKC sobre a produção de superóxido por macrófagos estimulados pelo veneno bruto e toxinas BaltTX-I e BaltTX-II.....	43

5- DISCUSSÃO.....	45
6- CONCLUSÕES.....	53
7- REFERÊNCIAS.....	54
8- ANEXOS.....	73
8.1 - Soluções Utilizadas.....	73
8.2 - Drogas e reagentes.....	74

1- INTRODUÇÃO

1.1- Considerações gerais

As serpentes, responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos, na América Latina, pertencem ao gênero *Bothrops*, da família Viperidae. Essas serpentes estão distribuídas desde o México até a Argentina (HOGE & ROMANO-HOGE, 1978). No Brasil, as serpentes do gênero *Bothrops* têm recebido grande atenção devido à elevada incidência de acidentes, sendo mais de 90% dos casos oficialmente registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998). A incidência de acidentes ofídicos notificados, entre 2000 a 2007, foi de 192.703 casos dos quais 27% foram registrados na região Norte, 28% na região sudeste, 24% no Nordeste e 11 e 10% nas regiões Sul e Centro-Oeste, respectivamente (CARDOSO *et al.*, 2009). Esses acidentes estão relacionados a fatores climáticos e a atividade humana em áreas rurais, onde existe maior concentração desses animais (AMORIM *et al.*, 1951; BARRAVIERA, 1990; 1993). Uma vez que os acidentes ofídicos são, ainda, freqüentes e graves, particularmente nas regiões tropicais do mundo, o estudo dos venenos de serpentes possui papel importante tanto para a clínica médica quanto para a pesquisa científica (CHIPPAUX & GOYFFON, 1998).

Os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados, de modo geral, pela presença de manifestações clínicas sistêmicas e locais (ROSENFELD, 1971). Com relação ao quadro sistêmico, as atividades coagulantes, hemorrágicas e proteolíticas estão bem estudadas. Os coeficientes de letalidade, decorrentes de acidentes ofídicos, têm decrescido ao longo do tempo. Esse fato deve-se à eficácia do soro antibotrópico em neutralizar os efeitos sistêmicos (CARDOSO *et al.*, 2003). E dentre as alterações locais predominantes, estão as lesões hemorrágicas, a mionecrose e a resposta inflamatória eminente, com a presença de edema intenso, exsudato purulento e dor forte no local da mordida (BRAZIL & PESTANA, 1909; ROSENFELD, 1971). Em casos mais graves, pode haver dano tecidual que pode resultar em perda funcional ou permanente do tecido ou do membro afetado (ROSENFELD, 1971). O soro antibotrópico, diferentemente de sua ação no quadro sistêmico, não neutraliza de modo eficaz essas reações locais, mesmo quando administrado

imediatamente após o acidente (EICHBAUM, 1947; ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981; 1986a). Por este motivo, os estudos sobre os efeitos locais e sistêmicos dos venenos revestem-se de importância.

1.2- *Bothrops alternatus*

Atualmente, o gênero *Bothrops* está subdividido nos gêneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Bothriopsis*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis* (BÉRNILS, 2009). A serpente do estudo em questão está inserida no gênero *Rhinocerophis*, porém durante o texto será retratada como *Bothrops alternatus*, taxonomia utilizada durante o período do referido estudo.

A serpente *Bothrops alternatus* (Figura 1) é encontrada no norte e nordeste da Argentina, sul do Paraguai e nas regiões sul, sudeste e parte do centro oeste do Brasil (CAMPBELL *et al.*, 1989), sendo o seu hábitat próprio das regiões úmidas de florestas tropicais, subtropicais e temperadas. O tamanho médio desta serpente é em torno de 1 metro de comprimento, podendo chegar a dois metros.



Fig. 1: Indivíduo da espécie *Bothrops alternatus*, é evidenciado o padrão de desenhos na região dorsal do animal. Foto: Kayena Delaix Zaqueo, Belo Horizonte – MG, 2006.

Devido à elevada quantidade de veneno produzido por esta serpente, pode-se explicar, pelo menos em parte, a gravidade do envenenamento causado pela mesma. O rendimento máximo de peçonha está acima de 200 mg (peso seco) por espécime em relação a *B. atrox*, *B. insularis*, *B. moojeni*, e *B. jararacussu* (ROSENFELD 1971; FURTADO, *et al.*, 1991; ROODT *et al.*, 1998). Por outro lado, embora a *B. alternatus* seja uma espécie agressiva e perigosa, seu veneno foi pouco estudado quando comparado ao veneno de outras espécies botrópicas, principalmente em relação a *B. jararaca*, amplamente estudada pela importância clínica que tem em termos de incidência de acidentes ofídicos.

De fato, os efeitos locais, observados no envenenamento de *B. alternatus*, segundo os casos clínicos, assim como os trabalhos experimentais reportados (BAUAB *et al.*, 1994) referem-se, fundamentalmente, ao aparecimento de edema (MARUNAK *et al.*, 1994), hemorragia (MARUNAK *et al.*, 1994; DE ROODT *et al.*, 2000) e necrose (QUEIROZ *et al.*, 1984; MARUNAK *et al.*, 1994). Além disso, a literatura mostra que, sistemicamente, o veneno de *B. alternatus* causa distúrbios na cascata de coagulação sangüínea em humanos e em animais, como o cão, sendo que 97% dos acidentes apresentam alterações nos tempos de coagulação (BAUAB *et al.*, 1994).

Quanto á toxicidade do veneno, o de *B. alternatus* é similar ao de outras espécies do gênero *Bothrops*, sendo a dose letal - DL50 2.2-11.5 mg/kg, intraperitonealmente, em camundongos (FURTADO *et al.*, 1991; SANCHEZ *et al.*, 1992).

1.3- Composição dos venenos de serpentes

O veneno consiste em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas (GANS, 1978). Polipeptídeos e proteínas estão presentes em maiores proporções, chegando a 90-95% do seu peso seco (CHIPPAUX, 1991). Os venenos podem apresentar amplas variações em sua composição. Foram descritas cerca de 50 a 60

proteínas/peptídeos com diferentes estruturas e funções, ativos ou na forma de precursores inativos no veneno (SARKAR; DEVI, 1968; AIRD, 2002).

A letalidade e sintomas decorrentes de acidentes ofídicos no homem, ou verificados experimentalmente em animais, dependem da composição dos venenos. Vários dos mediadores bioquímicos e farmacológicos presentes nos venenos já foram isolados e caracterizados como sendo neurotoxinas, citotoxinas, lectinas, fatores de crescimento, desintegrinas, peptídios funcionais e enzimas. Dentre essas, encontram-se proteases, fosfolipases, fosfodiesterase, fosfomonoesterases, 5'nucleotidasas, NAD-nucleotidasas, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido oxidases, catalases, ATPases, hialuronidasas, além de alguns inibidores enzimáticos (RUSSEL, 1988; OUYANG *et al.*, 1990; TU, 1996; SOARES *et al.*, 2003).

Em comum com outras espécies de *Bothrops*, os venenos de *Bothrops alternatus* contêm uma variedade de proteínas e enzimas (MEBS, 1970; TAN e PONNUDURAI, 1991,) que incluem L-aminoácido oxidase (LAAO) (STÁBELI *et al.*, 2004), fosfolipases A₂ (FLA₂) (NISEMBON *et al.*, 1986), trombina-like (balterobim) (SMOLKA *et al.*, 1998), inibidor de trombina (brotoalternim) (CASTRO *et al.*, 1998), metaloproteinases e desintegrinas (SOUZA *et al.*, 2000; MARIANO-OLIVEIRA., *et al.*, 2003; COMINETTI *et al.*, 2003, 2004; GAY *et al.*, 2005; SELISTRE-DE-ARAUJO *et al.*, 2005), e fosfodiesterases (VALÉRIO *et al.*, 2002).

Assim, os venenos de serpentes e suas frações isoladas representam um importante alvo para a investigação biotecnológica.

1.4- Fosfolipases A₂ (FLA₂)

A superfamília de FLA₂s ou fosfatidil-acil-hidrolases é constituída por grupos de enzimas que catalizam a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de diferentes fosfolipídios liberando ácidos graxos (KINI, 1997). Os produtos gerados da catálise dessas enzimas são ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico (AA), precursor de eicosanóides. Por catalisarem essas reações, as fosfolipases possuem importantes funções em vários processos biológicos, através da formação de segundos mensageiros que exercem ações biológicas

importantes e transdução de sinais celulares (VALENTIN e LAMBEAU, 2000; BROWN, *et al.*, 2003). Adicionalmente, a atividade catalítica de FLA₂ leva a produção de lisofosfolípido, o liso-PAF, que é precursor do fator ativador de plaquetas (PAF), um mediador inflamatório importante, que induz a agregação plaquetária (QUIN *et al.*, 1998). Os derivados do ácido araquidônico e o PAF são mediadores de diversos fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos (LENNARTZ, 1999; MURAKAMI *et al.*, 1995; VISHWANATH *et al.*, 1987). Dessa forma, atribui-se, um papel fisiológico às fosfolipases A₂ na manutenção da homeostasia celular e remodelação de membrana.

As fosfolipases estão classificadas em cinco principais categorias, que incluem as FLA₂ secretadas (sFLA₂s) (Tabela 1), possuem baixo peso molecular, as FLA₂s citosólicas (cFLA₂) dependentes de cálcio, as FLA₂s independentes de cálcio (iFLA₂), as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) (MURAKAMI, *et al.*, 1997) e as FLA₂ lisossomais (Tabela 2) (ABE e SHAYMAN, 1998). Por outro lado, os avanços da biologia molecular e celular conduziram à identificação de diversas isoenzimas de FLA₂s. Atualmente as FLA₂ estão subdivididas em 15 grupos (I-XV) (BROWN *et al.*, 2003; BALSINDE *et al.* 2002; BURKE e DENNIS, 2009), com base em critérios como localização celular, a sequência de aminoácidos, o peso molecular, a presença de pontes dissulfeto intramoleculares e a dependência de cálcio, para a atividade enzimática (SIX e DENNIS, 2000; BALSINDE *et al.*, 2009).

As fosfolipases secretadas estão classificadas nos grupos I, II, III, V e IX a XIV. Essas enzimas são de baixo peso molecular (12 KDa a 55 KDa), contêm 2 a 8 ligações dissulfeto, possuem resíduos de histidina no sítio catalítico e dependem do cálcio para o processo de catálise. O grupo I compreende enzimas do tipo secretadas que são encontradas em venenos de serpentes das Famílias Elapidae e Hydrofiidae e no pâncreas de mamíferos. As fosfolipases dos venenos de serpentes da família Viperidae estão classificadas no grupo II, que também engloba as enzimas presentes no fluido sinovial humano e em plaquetas (MURAKAMI *et al.*, 1995). O grupo III compreende as sFLA₂s de venenos de abelhas e de lagartos do gênero *Heloderma* e o grupo V contém as FLA₂s expressas em tecidos de mamíferos, como do coração e pulmão, em resposta a

estímulos inflamatórios. O grupo IX é constituído pela sFLA₂ isolada do veneno de caracol marinho, denominada de conodipina M. O grupo X compreende FLA₂s encontradas em leucócitos e em células endoteliais alveolares de humanos e o grupo XI é constituído por FLA₂s de plantas (RIZZO *et al.*, 2000; SIX & DENNIS, 2000). As sFLA₂ do grupo XII são localizadas nos músculos cardíaco e esquelético, nos rins e pâncreas de mamíferos (MURAKAMI & KUDO, 2002). As sFLA₂ do grupo XIII são encontradas em vírus. As sFLA₂s do grupo XIV são encontradas em fungos simbióticos e bactérias e as sFLA₂s do grupo XV, encontrada em lisossomos humanos, murinos e bovinos (ABE & SHAYMAN, 1998; HIRAOKA, 2002; BURKE & DENNIS, 2009).

Tabela 1: Grupo de FLA₂ secretadas (SAMPAIO, 2002)

GRUPO	FLA ₂ DE VENENOS	TAMANHO (kDa)	FLA ₂ DE MAMÍFEROS		
			NOME COMUM	FONTES	PAPEL BIOLÓGICO
IA	Sepentes Elapidae, Hydrophiidae	13-15	Não equivalentes aos mamíferos		
IB	Alguns tipos de serpentes	13-15	FLA ₂ pancreática	Pâncreas, pulmão e baço	Digestão de lipídios, formação de eicosanóides, proliferação, migração
IIA	Serpentes viperidae	13-15	FLA ₂ inflamatória	Diversos tecidos e células inflamatórias	Formação de eicosanóides
IIB	Alguns tipos de serpentes	15	Não equivalente aos mamíferos		
IIC	Não equivalente aos venenos	14-15	FLA ₂ grupo IIC	Testículos	Desconhecido
IIIA	Abelhas, lagartos	14	Não equivalente aos mamíferos		
IIIB	Escorpiões	14	Não equivalente aos mamíferos		
V	Não equivalentes aos vertebrados	14	FLA ₂ grupo V	Coração, placenta, macrófagos	Formação de eicosanóides
IX	Caracóis marinhos	14	Não equivalente aos mamíferos		
X	Não equivalente aos venenos	14	FLA ₂	Baço, timo, leucócitos e pâncreas	Desconhecido
XIA	Não equivalente	12, 4-12, 9	Não equivalente		

			aos mamíferos		
XII	Não equivalente aos venenos	18,7	FLA ₂ grupo XII	Coração, rins e pâncreas	Desconhecido
XIII	Parvovírus	<10	Não equivalentes aos mamíferos		
XIV	Fungos	13-19	Não equivalentes aos mamíferos		

Tabela 2: Grupos de fosfolipases A₂ intracelulares (SIX e DENNIS, 2000)

GRUPO	FONTES	SIGLAS	TAMANHO (kDa)
IVA	Células humanas U937, plaquetas, rins de ratos	cFLA ₂ α	85
IVB	Pâncreas humano, fígado, coração, cérebro	cFLA ₂ β	114
IVC	Coração humano, músculo esquelético	cFLA ₂ γ	61
VIA-1	Macrófagos P388D ₁	iFLA ₂ ou iFLA ₂	84-85
VIA-2	Linfócito B, testículos	iFLA ₂ -B	88-90
VIB	Coração, músculo esquelético	iFLA ₂ γ ou iFLA ₂ -2	88
VIIA	Plasma humano, de porco e camundongo e cérebro bovino	PAF-AH	45
VIIIB	Fígado, rim humano	PAF-AH (II)	40
VIIIA	Cérebro humano	PAF-AH 1bα ₁	26
VIIIB	Cérebro humano	PAF-AH 1bα ₂	26
XV	Lisossomo – humano, murino, bovino	LFLA ₂ ou LLPL	40-45

Alguns dos efeitos das sFLA₂s na função celular são dependentes da liberação de mediadores, dentre os quais estão ácidos graxos, como o ácido araquidônico e lisofosfolídeos. Outros efeitos são dependentes da ligação da

enzima a receptores específicos presentes nas membranas. Dois tipos de receptores para as sFLA₂s foram descritos: o receptor do tipo N (*neuronal*), expresso principalmente em células neuronais e o receptor do tipo M (*músculo*), expresso por células do músculo esquelético e por outras células teciduais que incluem os fibroblastos, astrócitos e células Swiss 3T3 (CUPILLARD *et al.*, 1999). Além disso, a presença desses receptores também foi verificada em neutrófilos e monócitos humanos (SILLIMAN *et al.*, 2002). Recentemente, os receptores de FLA₂s, do tipo M, foram encontrados em macrófagos alveolares humanos (GRANATA *et al.*, 2005). O receptor de FLA₂s, do tipo M possui organização estrutural semelhante ao receptor de manose de macrófagos, isto é, contém uma região extracelular, composta de um domínio amino-terminal, rico em cisteína, um domínio de fibronectina, do tipo II e oito ou dez domínios de lectina do tipo C (CTLD). Estes são seguidos por um domínio transmembrânico e um domínio carboxi-terminal intracelular, que confere propriedades endocíticas ao receptor (NICOLAS *et al.*, 1995; EAST & ISACKE, 2002). No entanto, diferentemente do receptor de manose, o receptor de FLA₂, do tipo M, não contém os resíduos necessários para ligação aos açúcares e, desta forma, não se liga a carboidratos (NAPPER *et al.*, 2001; EAST & ISACKE, 2002).

Pela sua capacidade de hidrolisar fosfolipídios de membranas celulares e acarretar a formação de importantes mediadores de processos inflamatórios, as fosfolipases de mamíferos compreendem o grupo de enzimas mais amplamente estudado e estão envolvidos na gênese de diversas patologias de origem inflamatória, como síndrome do desconforto respiratório do adulto, choque séptico, pancreatite aguda (VADAS & PRUZANSK, 1986), desordens imunológicas (artrite reumatóide, doença de Crohn e colite ulcerativa) (HAAPAMAKI *et al.*, 1998; 1999; LIN *et al.*, 1996) além da asma brônquica e rinite alérgica (CHILTON *et al.*, 1996; STADEL *et al.*, 1994). O envolvimento das sFLA₂s no processo inflamatório da artrite reumatóide e da asma, está bem estabelecida. Esses estudos foram realizados, em grande parte, em modelos animais, pela administração de FLA₂s purificadas (VADAS & PRUZANSK, 1986). Além disso, as FLA₂ estão envolvidas na maturação das células dendríticas, contribuindo para a regulação das respostas imunológicas (RAMONER *et al.*,

2005) e na função das células T regulatórias (Tregs), suprimindo a proliferação de células T CD4+ e CD8+ (Von ALLMEN *et al.*, 2009). Essas observações implicam que tanto a inflamação local quanto a sistêmica estão associadas à liberação de sFLA₂s *in vivo*, emergindo, assim, a questão, não esclarecida do papel dessas enzimas em reações inflamatórias. Adicionalmente, foi verificado que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF- α , induzem em uma variedade de tecidos, a transcrição gênica de fosfolipases e o subsequente aumento da secreção dessas enzimas (SCHALKWIJK *et al.*, 1991; BECK *et al.*, 2003). Assim, as fosfolipases representam um importante alvo para a investigação no que tange aos mecanismos de eventos inflamatórios.

1.5- Fosfolipases A₂ secretadas isoladas do veneno de serpentes

As sFLA₂s são enzimas abundantes na natureza e, além de fluidos e tecidos de mamíferos, estão presentes em altas concentrações nos venenos de serpentes, abelhas e vespas (HARRIS, 1991). As FLA₂s pancreáticas de mamíferos, de caráter não tóxico e as FLA₂s de venenos, altamente ativas e tóxicas, possuem propriedades catalíticas comuns e considerável grau de homologia quanto às estruturas primária, secundária e terciária (VERHEIJ *et al.*, 1981; DUFTON *et al.*, 1983; RENETSENDER *et al.*, 1985). Em adição à sua participação na digestão de presas, as FLA₂s de venenos apresentam um grande espectro de atividades fisiológicas, que incluem ação hemolítica indireta, neurotóxica, cardiotoxica, agregadora de plaquetas, anticoagulante, edematogênica, miotóxica, bactericida e pró-inflamatória (KINI & EVANS, 1989).

Uma ação farmacológica relevante dos envenenamentos por serpentes é a miotoxicidade (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Várias miotoxinas, com características estruturais de sFLA₂s, foram isoladas dos venenos de serpentes da família Viperidae (OWNBY *et al.*, 1997; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995; MEBS & OWNBY, 1990). No caso particular das miotoxinas isoladas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, foi demonstrado que a atividade fosfolipásica parece ser importante, mas não suficiente para o efeito lesivo em células musculares (RUFINI *et al.*, 1992; FALCONI *et al.*, 2000; LOMONTE *et al.*, 2003).

Atualmente, são descritas dois tipos de sFLA₂s miotóxicas. As sFLA₂s, conhecidas como “clássicas” que contêm um aminoácido (aa) aspartato na posição 49 (Asp-49) e catalisam, de maneira dependente de Ca⁺², a hidrólise da ligação éster, na posição *sn*-2 de glicerofosfolípido. E, um outro tipo de sFLA₂s descrito como “variante” e que contêm uma lisina na mesma posição 49 (Lys-49), sem atividade ou com baixa atividade catalítica (KRIZAJ *et al.*, 1991; PÓLGAR *et al.*, 1996). Tal substituição afeta a habilidade dessas proteínas de se ligarem ao Ca⁺², que é um cofator essencial para estabilização do intermediário tetraédrico, que ocorre na reação catalítica, promovida pelas sFLA₂s Asp-49 (VAN DEN BERG *et al.*, 1995). Além disso, foi demonstrado, para algumas sFLA₂s Lys-49, a capacidade de estabelecer uma ligação de alta afinidade com o ácido araquidônico, presente na membrana, de forma que este produto não pode ser liberado do sítio catalítico da enzima, sem ser detectado por ensaios convencionais de atividade enzimática, levando à inibição das enzimas, após um ciclo de catálise (LEE *et al.*, 2001). No entanto um consenso sobre esta questão não foi alcançado.

A partir do veneno da serpente *Bothrops asper*, da América central, foram isoladas duas miotoxinas Lys- 49, que apesar da ausência de atividade enzimática, mantiveram a capacidade lesiva em membranas biológicas e sintéticas, por um mecanismo ainda pouco conhecido e independente de cálcio (DIAZ *et al.*, 1991). Nesse contexto, Lomonte *et al.*, (1994) relataram que uma região da molécula da miotoxina MT-II (Lys-49), de *Bothrops asper*, rica em grupamentos hidrofóbicos e catiônicos, próxima ao C-terminal, seja relevante para a atividade miotóxica da mesma. De fato, foi demonstrado que a região que compreende os resíduos de aminoácidos 115 a 129, da MT-II, está associada aos efeitos miotóxicos desta toxina (PÁRAMO *et al.*, 1998). Ainda, anticorpos, obtidos contra esse peptídeo, inibiram os efeitos miotóxicos e citotóxicos tanto do peptídeo quanto da MT-II *in vitro* (CALDERON & LOMONTE, 1998; 1999). No entanto são necessários estudos adicionais, que investiguem, de modo mais detalhado, a relação entre a atividade catalítica e os efeitos fisiopatológicos dessas sFLA₂s de veneno.

1.6- Inflamação aguda

A inflamação pode ser definida como a resposta do tecido conjuntivo vascularizado a uma agressão seja ela química, física ou biológica que, apesar da complexidade dos processos que a desencadeiam, se manifestam de maneira estereotipada, com objetivo principal de remover o agente etiológico lesivo e reparar o tecido lesado (COTRAN *et al.*, 1999).

A natureza sensivelmente padronizada da inflamação: rubor, tumor, calor e dor é a expressão de fenômenos estruturais e funcionais que ocorrem na microcirculação e no tecido intersticial adjacente, com a participação da inervação sensitiva local. Esses fenômenos decorrem, em grande parte, da ação de mediadores de origem plasmática ou celular, os quais podem ser pré-formados ou armazenados em grânulos ou recém sintetizados, que são liberados no decorrer da resposta inflamatória (GARCIA LEME, 1989; BUCKLEY & BRAIN, 1994).

A interação dos leucócitos circulantes, com o endotélio vascular, é o primeiro passo para o recrutamento de leucócitos (SHERWOOD *et al.*, 2004). Estes fenômenos decorrem da interação entre moléculas de adesão, expressas na superfície dos leucócitos, com seus ligantes, presentes na superfície das células endoteliais, proporcionando um movimento de rolamento e adesão firme dos leucócitos (GRANGER e KUBES, 1994; POLIOUT *et al.*, 1998). Estes eventos levam à migração de leucócitos, nas primeiras horas neutrófilos e, em seguida monócitos, através dos espaços intercelulares, entre as células endoteliais, em direção ao gradiente de mediadores quimiotáticos, presente no tecido injuriado (HUBBARD e ROTHLEIN, 2000).

O macrófago é a principal célula diferenciada do sistema fagocítico mononuclear e participa de inúmeros processos fisiológicos e patológicos. Os macrófagos estão normalmente distribuídos em diversos tecidos, tais como o hematopoiético e o linfóide (GORDON, 1992). Essas células se originam da medula óssea, a partir de um precursor comum à linhagem granulocítica (DAVIES, 1994). Após deixarem a medula, os monócitos permanecem na circulação sanguínea por 70 horas, até migrarem para diferentes tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos teciduais (JOHNSTON, 1988). Estes permanecem residentes por alguns meses e podem sofrer a estimulação de

agentes inflamatórios e/ou imunológicos e adquirirem características próprias, tanto morfológicas quanto funcionais, como a fagocitose e a capacidade microbicida, além do processamento e apresentação de antígenos e interação com o sistema linfóide (GRAF *et al.*, 1999; KAISER *et al.*, 1990; DAVIES, 1994).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção pela medula óssea (METCALF, 1971), que é acompanhado pela migração destas células até o foco da lesão, onde se diferenciam. No sítio inflamatório, o macrófago passa por um processo de ativação, por meio de seus receptores, que o capacita a desenvolver quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e atividade anti-tumoral. No desempenho de suas funções, estas células liberam uma grande quantidade de enzimas hidrolíticas, agentes oxidantes e microbicidas e diversos mediadores inflamatórios importantes, tais como citocinas e óxido nítrico (NO), além de apresentarem uma elevada produção de metabólitos do ácido araquidônico, como os prostanóides, pelas vias COX-1 e COX-2 (MACMICKING *et al.*, 1997; POLIOUT *et al.*, 1998; YU *et al.*, 1998).

Neste contexto, vale mencionar que os macrófagos, devido às várias funções que desempenham, constituem importantes modelos experimentais para a investigação de ações pró-inflamatórias de venenos e toxinas de serpentes.

1.7- Papel dos leucócitos na reação inflamatória causada pelos venenos botrópicos

A inflamação está freqüentemente associada ao envenenamento botrópico (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). A resposta edematogênica local envolve a participação de vários mediadores endógenos como a histamina, serotonina, eicosanóides, fator ativador de plaquetas, citocinas e óxido nítrico (TREBIEN & CALIXTO, 1989; CHAVES *et al.*, 1995; BARROS *et al.*, 1998; ZAMUNER *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2003). Além do edema, a resposta inflamatória provocada pelos venenos botrópicos é caracterizada pela presença de células inflamatórias como demonstrado por diferentes autores (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986b; FLORES *et al.*, 1993; LOMONTE *et al.*, 1993; BURIGO, *et al.*, 1996; ZAMUNER *et al.*, 2001; FARSKY *et al.*, 1997).

Flores *et al.* (1993) relataram a indução da migração de neutrófilos pela administração de venenos de *B. erythromelas* e *B. alternatus* na cavidade peritoneal de ratos. Está demonstrado também que o infiltrado leucocitário acompanha a liberação de mediadores lipídicos quimiotáticos, como o leucotrieno B₄ (LTB₄) e a tromboxana A₂ (TXA₂) e de citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), o interferon- γ (IFN- γ) e a interleucina-6 (IL-6) no foco de lesão (ZAMUNER *et al.*, 2002).

Os leucócitos desempenham papel relevante no desenvolvimento e resolução da reação inflamatória. Em situações particulares de ativação, ou seja, aquisição de competência para realizar funções complexas, como, por exemplo, a destruição de microorganismos e células tumorais (ADAMS & HAMILTON, 1986), essas células podem contribuir para a evolução de lesões teciduais e/ou vasculares causadas pelos diferentes componentes dos venenos. Os venenos botrópicos além de induzirem a liberação de mediadores inflamatórios, podem eventualmente ativar mecanismos intracelulares nessas células, e induzir a geração de substâncias capazes de ampliarem seu efeito lesivo, como as espécies reativas do oxigênio e nitrogênio.

Apesar do papel dos leucócitos estar bem demonstrado em diversas patologias de caráter inflamatório, pouco se sabe sobre o estado de ativação dessas células na vigência de ação dos venenos. Os macrófagos, quando ativados, adquirem características funcionais tecido-específicas, o que lhes permite exercer importantes funções efetoras, incluindo atividade peptidásica alterada, capacidade de produzir uma variedade de mediadores inflamatórios e de apresentar antígenos aos linfócitos (OLIVO *et al.*, 2005; STOY, 2001). Além disso, estas células apresentam a capacidade de exercer funções microbicidas e atividades citotóxicas. A função clássica destas células é a capacidade de fagocitar material estranho e *debris* celulares, descrita inicialmente por Metchnikoff (ZHENG *et al.*, 1999). Dessa maneira, estudos voltados para o esclarecimento desses efeitos, revestem-se de importância.

A fagocitose inicia-se com o espraiamento da célula e redistribuição das organelas citoplasmáticas (RABINOVITCH, 1975), com aumento da área de

contato da membrana plasmática da célula ao substrato a ser fagocitado. De modo geral, ocorrem interações seqüenciais entre receptores da superfície celular e, ligantes opsônicos, presentes na superfície das partículas a serem fagocitadas, levando à polimerização da actina e conseqüente internalização da partícula (GREENBERG, 1995; ADEREM & UNDERHILL, 1999). Em macrófagos, foram identificados alguns receptores da superfície celular. Dentre eles, encontram-se os receptores para a porção Fc da imunoglobulina G, para as frações C3b do sistema complemento, para os resíduos manose/fucose e β -glucano (BERKEN & BENACERREF, 1966; LAY & NUSSENZWEIG, 1968; EZEKOWITZ & STAHL, 1988; GORDON *et al.*, 1988; LAW *et al.*, 1988). A ativação desses três tipos de receptores desencadeia diferentes mecanismos de transdução de sinais, que causam diferentes rearranjos das proteínas do citoesqueleto e culminam com diferentes mecanismos de internalização. Os receptores para porção Fc da imunoglobulina G e para os resíduos manose/fucose levam a liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, intermediários reativos do oxigênio e metabólitos do ácido aracdônico (LENNARTZ *et al.*, 1993; CARON & HALL, 1998). No caso dos receptores para as frações C3b do sistema complemento, há controvérsias (ADEREM & UNDERHILL, 1999). Eventos de sinalização durante a fagocitose mediada pelo receptor Fc γ levam a extensão de pseudópodes na membrana plasmática e internalização da partícula (COX *et al.*, 2000). A ligação das partículas ao receptor Fc γ ocorre por uma via de sinalização mediada pelo imunoreceptor com motivos de ativação baseado em tirosina (ITAM) (SANCHEZ-MEJORADA E ROSALES, 1998). Os ITAMs recrutam kinases da família Syk e Src, levando a uma subseqüente ativação de PI3 Kinase e Rho da família GTPases (principalmente Rac 1 e Cdc 42) conduzindo à polimerização da actina e extensão da membrana (VIDARSSON & VAN DE WINKEL, 1998; COX *et al.*, 2000). Em comparação, o receptor 3 do complemento (CR3 também conhecido como integrina CD11b/CD18 ou Mac-1) necessita de um sinal de ativação adicional para uma eficiente ligação da partícula e conseqüente fagocitose. A ativação desses sinais pode ser desencadeada por um número variado de estímulos, como, ésteres de forbol, lipopolissacarídeo (LPS), citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, que ativam a proteína kinase C (PKC) e induz uma sinalização de dentro para fora pelo receptor de integrina (WRIGHT &

SILVERSTEIN, 1982; GRIFFIN & MULLINAX, 1985; ROSS & VETVICKA, 1993; WILLIAMS & SOLOMKIN, 1999; SHMIDT *et al.*, 2001). Membros da família da Proteína Kinase C (PKC) participam da sinalização intracelular no processo de fagocitose, mas também participam de muitas outras vias de sinalização. Das isoformas de PKCs descritas, pelo menos 5 (PKC α , δ , β , ϵ e ζ) são expressas em macrófagos e recrutadas para a membrana durante a fagocitose (ALLEN e ADEREM, 1995). As PKCs também são necessárias para produção de citocinas e ativação de mecanismos de morte induzidos durante a fagocitose de microorganismos. Além disso, as PKCs são participantes importantes de numerosas vias de sinalização para o citoesqueleto de actina e núcleo, incluindo sinais estimulados por hormônios, citocinas e adesão, sugerindo múltiplos níveis de regulação da eficiência fagocítica (ZHU *et al.*, 2001; KIKKAWA *et al.*, 1989).

Embora todos os tipos de fagocitose levem à polimerização de filamentos de actina no sítio de ingestão e reorganização dos filamentos de actina, as partículas opsonizadas por IgG ou pelo complemento são internalizadas de modo diferente pelos macrófagos. A ativação dos receptores para porção Fc da IgG leva ao processo de fagocitose caracterizado pela formação de pseudópodes enquanto a ativação dos receptores para o complemento leva à invaginação (ALLEN & ADEREM, 1996). Porém mais recentemente, extensões proeminentes da membrana foram observadas no sítio de ligação de partículas opsonizadas por C3bi (HALL *et al.*, 2006).

Concomitantemente ao processo de fagocitose, ocorre um aumento do metabolismo oxidativo dos leucócitos, conhecido como “burst” respiratório, resultando na produção de agentes microbicidas, como o ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BABIOR, 1984). Esses reativos do oxigênio são mediadores inflamatórios e desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro, destruindo patógenos invasores. O ânion superóxido é um reagente óxido-redutor, extremamente potente, capaz de sofrer oxidação para O_2 ou redução para H_2O_2 (BABIOR *et al.*, 1973). O H_2O_2 é um produto do metabolismo celular, formado pela redução de dois elétrons do oxigênio ou pela dismutação do ânion superóxido pela enzima superóxido dismutase (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1996).

Ainda, o vacúolo fagocítico dos leucócitos funde-se aos grânulos lisossomais acarretando a formação do fagolisossomo, com consequente liberação das enzimas presentes nestes grânulos, que auxiliam na eliminação do agente lesivo. Essas enzimas na presença do íon cloro (Cl^-), converte o H_2O_2 a ácido hipocloroso (HOCl), um outro agente microbicida (KING *et al.*, 1997). Além destes agentes, os leucócitos, ativados por citocinas, podem produzir óxido nítrico que, na forma de radical livre, atua também como agente microbicida (HIBBS *et al.*, 1989).

O óxido nítrico (NO) é um gás que se difunde rapidamente através de membranas celulares e atua como mediador de várias funções fisiológicas como a neurotransmissão (DOWNEN *et al.*, 1999) e vasodilatação (PALMER *et al.*, 1987) além de apresentar atividade tumoricida (HIBBS *et al.*, 1989) e/ou microbicida (MAUEL *et al.*, 1991). O NO é sintetizado a partir da L-arginina por uma família de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS), tendo sido identificadas três isoformas de NOS. Nas células endoteliais, a isoforma mais comumente encontrada é a NOS constitutiva (cNOS ou NOS tipo III) que é uma enzima dependente de cálcio. No tecido nervoso, a isoforma mais encontrada é a bNOS (nNOS ou NOS do tipo I). Da mesma forma que a cNOS, a bNOS é dependente de cálcio. A forma induzida da NOS (iNOS ou NOS do tipo II) é encontrada em vários tipos celulares e, ao contrário da cNOS e da bNOS, não é normalmente expressa nas células, mas induzida por citocinas como o $\text{TNF-}\alpha$, a IL-1 e $\text{INF-}\gamma$. Esta isoforma não depende de cálcio (FORSTERMANN *et al.*, 1995; ROBBINS & GRISHAM, 1997). Além disso, o óxido nítrico pode interagir com o ânion superóxido (O_2^-) e formar um potente agente oxidante, o ânion peroxinitrito (ONOO^-), mais tóxico que os seus precursores (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1996; ROHN *et al.*, 1999).

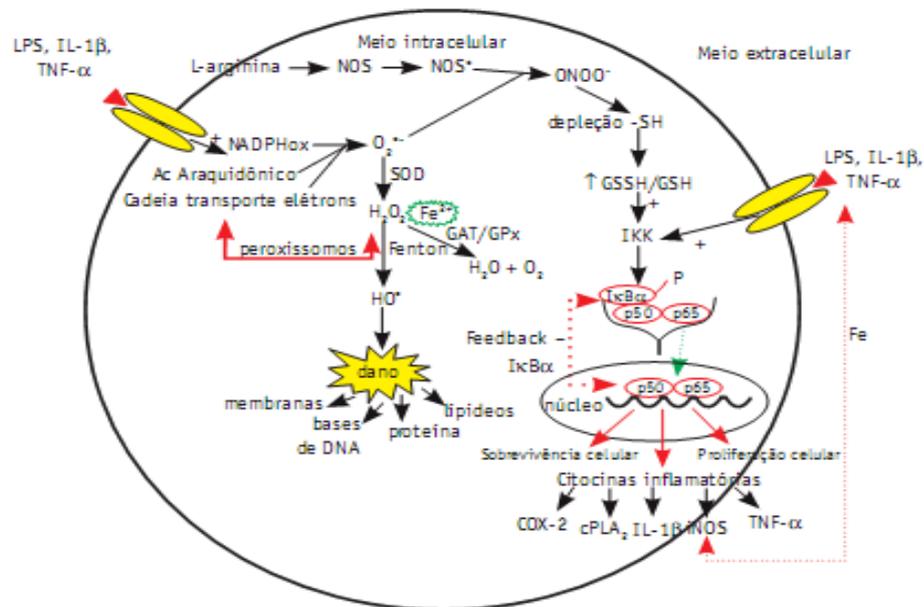


Fig. 2: Formação das espécies ativas de oxigênio e nitrogênio (canto superior esquerdo), alvos dessas espécies reativas (canto inferior esquerdo), relação das ROS com a ativação do NF-κB e transcrição de citocinas pró-inflamatórias (à direita). O₂^{•-} = radical ânion superóxido; H₂O₂ = peróxido de hidrogênio; HO• = radical hidroxila; SOD = enzima endógena superóxido dismutase; CAT = enzima endógena catalase; GPx = enzima endógena glutatona; L = arginina – enzima precursora do óxido nítrico; NO = óxido nítrico; NOS = óxido nítrico sintase; ONOO⁻ = pero-xinitrito; -SH = grupamento sulfidríla; GSSH/GSH = relação glutatona oxidada/reduzida; IKK = inibidor kappa quinase; IκBα = inibidor kappa B; P = fosforilação; cPLA₂ = fosfolipase A₂ citosólica; COX₂ = ciclooxigenase 2; iNOS = óxido nítrico sintase induzível; LPS = lipopolissacarídeos; TNF-α = fator de necrose tumoral alfa; IL-1β = interleucina 1 beta. FONTE: XAVIER, R. M. *et al.*, 2008.

2- OBJETIVO

Avaliar o efeito do veneno bruto da serpente *Bothrops alternatus* (vBa) e de duas fosfolipases A₂, a BaltTX-I – uma FLA₂ homóloga contendo lisina na posição 49 e a BaltTX-II – uma FLA₂ contendo aspartato na posição 49, sobre a funcionalidade de macrófagos, a partir de ensaios *in vitro*, através dos seguintes parâmetros: viabilidade celular; capacidade de adesão; capacidade de descolamento; taxa de fagocitose; produção de ânion superóxido (quantitativo e qualitativo); efeito do inibidor da Proteína Kinase C (PKC) na fagocitose e na produção de ânion superóxido.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, de peso entre 18 e 20 gramas, fornecidos pelo Biotério do IPEPATRO. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de biotério com temperatura e luz controlados, água e alimentação *ad libitum* até o momento dos experimentos. Estes estudos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética Para o Uso de Animais de Experimentação do IPEPATRO, protocolo nº 08/2008.

3.2- Veneno

Foi utilizado um pool de veneno bruto de *Bothrops alternatus* (vBa), fornecido pela FMRP-USP. Até o momento da sua utilização, o veneno liofilizado, foi mantido a -20 °C, cujas autorizações para atividades com finalidade científica são: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA e Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. Números: 11094-2, 11094-1, 10394-1 e 15484-1.

3.3- Fosfolipases A₂

As fosfolipases FLA₂-Asp49 (BaltTX-II) e a FLA₂-Lys-49 (BaltTX-I) do veneno da serpente *B. alternatus* foram fornecidas pelo Dr. Andreimar M. Soares, da Faculdade de Ciências Farmacológicas e Bromatológicas da Universidade de São Paulo. As toxinas foram purificadas em coluna *CM-Sepharose* e posteriormente, em coluna *phenyl-Sepharose* CL4B de acordo com a metodologia proposta por Andrião-Escarso *et al.*, (2000) e Costa *et al.*, (2008). A homogeneidade foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970).

3.4- Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal, 96 horas após a injeção intraperitoneal (i.p.) de 1 mL de solução estéril de tioglicolato a 3%. Para a coleta das células os animais foram eutanasiados e a cavidade peritoneal lavada com 3 mL de PBS (tampão fosfato-salina) filtrado, pH 7,2 .

3.5- Teste de viabilidade celular por exclusão do azul de Tripán

Os macrófagos peritoneais, obtidos como descrito no item 3.4, foram suspensos em meio de cultura RPMI, suplementado com gentamicina (100µg/mL), L-glutamina (2mM) e 10% de soro fetal bovino, de modo a obter-se 2×10^5 células/mL. A seguir, as células foram incubadas, em duplicata, com vBa, BaltTX-I ou BaltTX-II nas concentrações de 6, 12, 25, 50 e 100µg/mL ou RPMI (controle), por 1 hora, a 37°C, em atmosfera a 5% de CO₂. Para o teste de viabilidade, 20µL de solução de azul de Trypan (0,1%) foi adicionado a 100µL de suspensão de macrófagos. O índice de viabilidade foi determinado por contagem de células viáveis em hemocítômetro de Neubauer, ao microscópio de luz, num total de 100 células. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células.

3.6- Determinação da fagocitose via receptor de complemento

Para a avaliação da capacidade de fagocitose por esse receptor foram utilizadas partículas de zimosan opsonizado.

3.6.1 Obtenção do zimosan e opsonização com soro de camundongo normal

Uma suspensão contendo 57mg/mL de zimosan (parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*) foi diluída 20 vezes em PBS, pH 7,2. O material foi incubado com soro obtido de camundongos swiss normal, na proporção de 1:1, a 37°C, sob agitação constante. Após 30 minutos, esse material foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de PBS, pH 7,2.

3.6.2 Determinação da fagocitose

Para este ensaio, os macrófagos foram coletados como descrito no item 3.4. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/50\mu\text{L}$. Lamínulas de vidro foram colocadas em placas de 24 poços e, sobre essas lamínulas, adicionados os macrófagos, mantidos por 40 minutos, a 37 °C e 5% de CO₂, para aderência. Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com RPMI sem soro fetal bovino (controle) ou 50µL de solução

de vBa, nas concentrações de 6; 3 e 1,5 µg/mL, a 37 °C e 5% de CO₂, durante 60 minutos. Após nova lavagem em PBS adicionou-se 2x10⁶ partículas de zimosan opsonizadas mantendo-se a proporção de 1 célula para 10 partículas de zimosan, perfazendo um volume final de 500µL. As células foram, então incubadas à 37°C e 5% de CO₂ por 40 minutos, e em seguida lavadas em PBS e fixadas com 300µL de glutaraldeído tamponado (2,5%), por 15 minutos. Após nova lavagem com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio. Foi contado um total de 200 células, em microscópio óptico, sendo considerado positivo os macrófagos que englobaram 3 ou mais partículas de zimosan e negativos os que englobaram menos de 3 partícula.

3.7- Determinação da capacidade de adesão

Para este ensaio, os macrófagos foram coletados como descrito no item 3.4. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para 2x10⁵/50µL. Em placas de 96 poços, os macrófagos foram adicionados e incubados em duplicata com RPMI (controle) ou uma solução de 50µL de vBa, BaltTX-I ou BaltTX-II, nas concentrações de 6 e 12 µg/mL, a 37 °C e 5% de CO₂, durante 60 minutos. Após esse período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com 100µL de metanol 100%, por 10 minutos. Após nova lavagem com PBS, as células foram coradas com uma solução de Giemsa 0,1%, por 40 minutos. Foi utilizado 100uL de metanol 100% para solubilizar o corante. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 550nm. O resultado foi expresso pela comparação da absorbância do grupo controle em relação aos demais grupos. Sendo que no grupo controle as células foram consideradas 100% aderidas.

3.8- Determinação da capacidade de descolamento

Para este ensaio, os macrófagos foram coletados como descrito no item 3.4. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para 2x10⁵/50µL. Após 24 horas aderindo em placas de 96 poços, os macrófagos foram incubados em duplicata com RPMI (controle) ou uma solução de 50µL de

vBa, BaltTX-I ou BaltTX-II, nas concentrações de 6 e 12 µg/mL, a 37 °C e 5% de O₂, durante 60 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com 100µL de metanol 100%, por 10 minutos. Após nova lavagem com PBS, as células foram coradas com uma solução de Giemsa 0,1%, por 40 minutos. Foi adicionado 100uL de metanol 100% para solubilizar o corante. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 550nm. O grupo controle foi considerado 100% aderido.

3.9- Avaliação da participação da proteína kinase C na fagocitose via receptor de complemento.

Para avaliar a participação da PKC na fagocitose induzida pelo vBa ou pelas FLA₂s, lamínulas de vidro contendo macrófagos aderidos, como descrito no item 3.6.2, foram incubados com 40µL de estaurosporina (14nM/mL por 15 minutos, ALLEN & ADEREM, 1995), um inibidor da PKC, antes da adição do vBa ou das toxinas (6 µg/mL), e a fagocitose determinada como descrito no item 3.6. A concentração do inibidor, neste estudo, foi baseada naquelas descritas como efetivas pela literatura apresentada acima e que não causavam efeitos adversos na viabilidade celular durante o ensaio. Nos diferentes protocolos experimentais, as células controles foram incubadas com a mesma concentração do veículo utilizado para dissolver cada inibidor.

3.10- Determinação da produção do ânion superóxido por densidade óptica

A geração de superóxido foi estimada através da redução de “*nitroblue tetrazolium*” (NBT), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Para este ensaio, os macrófagos foram coletados como descrito no item 3.4. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para 2×10^5 /150µL e foram incubados por 1 hora com meio de cultura RPMI, 0,1% de NBT, 10µL de PMA (500ng/mL) (controle positivo) e com o vBa nas concentrações de 6 e 3 µg/mL a 37°C. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial. A mistura foi centrifugada rapidamente (30 segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado sob agitação em 300µL KOH/DMSO. Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do

sobrenadante foi determinada a 620nm em espectrofotômetro. Os resultados da DO foram comparados com o controle.

3.11- Avaliação da participação da PKC na produção de ânion superóxido

Para este ensaio, os macrófagos foram coletados como descrito no item 3.4. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{L}$ e foram incubados por 1 hora com meio de cultura RPMI (com ou sem estaurosporina), 0,1% de NBT, $10 \mu\text{L}$ de PMA (500ng/mL) (controle positivo) e com o VBa ou com as toxinas BaltTX-I e BaltTX-II na concentração de $6 \mu\text{g/mL}$ a 37°C e 5% de CO_2 . O veneno e as toxinas foram adicionados 15 minutos após a staurosporina. Após a incubação, as amostras foram colocadas em citocentrífuga para preparo das lâminas. Após a centrifugação 1000 rpm/5 minutos, as lâminas foram fixadas com metanol 100% por 5 minutos, e coradas com safranina 1%, por mais 5 minutos. Ao final do processo, as lâminas foram lavadas com água destilada. A visualização foi feita por meio de microscopia óptica em objetiva de 100. Fez-se a contagem de 100 células, considerando-se positivas as células que apresentaram cristais de formazan, decorrentes da redução do NBT.

3.12- Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média +/- erro padrão e analisados estatisticamente pelo teste "t" de Student ou Análise de variância (ANOVA), após teste de normalidade. Sendo considerados valores de $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Efeito do veneno bruto e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II da serpente *Bothrops alternatus* sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais.

A viabilidade de macrófagos peritoneais elicitados foi avaliada 1 hora após a sua incubação com diferentes concentrações de veneno bruto ou de toxinas, BalTX-I ou BalTX-II isoladas de *B. alternatus* (Tabela 3). O veneno bruto nas concentrações de 100, 50, 25, 12 e 6 µg/mL não afetou a viabilidade dos macrófagos no período de tempo estudado, comparado ao controle (Figura 2). Diferentemente do veneno bruto, concentrações acima de 25 µg/mL de toxinas, afetaram a viabilidade dessas células. Tanto a BalTX-I quanto a BalTX-II na concentração de 25 µg/mL afetaram, em torno de 25%, a viabilidade celular, na concentração de 50 µg/mL, 40% da viabilidade celular, sendo que na concentração de 100 µg/mL, as fosfolipases mataram 50% dos macrófagos, não sendo observado diferença significativa na toxicidade das mesmas (Figura 3).

Tabela 3- Viabilidade de macrófagos peritoneais (%) incubados com veneno bruto e toxinas BaltTX-I e BaltTX-II.

ESTÍMULO	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	ERRO
Controle	93,25	1,89	0,94
VBa 100µg	83	5,71	2,86
VBa 50 µg	86	4,39	2,2
VBa 25µg	90	3,46	1,73
VBa12 µg	97,7	2,2	1,2
VBa 6µg	98,3	1,53	0,88
BaltTX-I 100µg	46,5	0,02	3,01 ***
BaltTX-I 50 µg	50	12,6	6,3 ***
BaltTX-I 25µg	74,75	9,53	4,8 **
BaltTX-I 12 µg	93	2	1,15
BaltTX-I 6µg	96,7	2,9	1,7
BaltTX-II 100 µg	47,5	8,3	4,1 ***
BaltTX-II 50 µg	54	6,7	3,3 ***
BaltTX-II 25 µg	73,75	7,8	3,9 **
BaltTX-II 12 µg	92,7	1,53	0,9
BaltTX-II 6 µg	95,3	1,5	0,9

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos 96 horas após a injeção de tioglicolato. 2×10^5 células/mL foram incubadas por 1 hora com o veneno, nas concentrações descritas acima ou RPMI (controle). A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripán.

Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle (ANOVA).

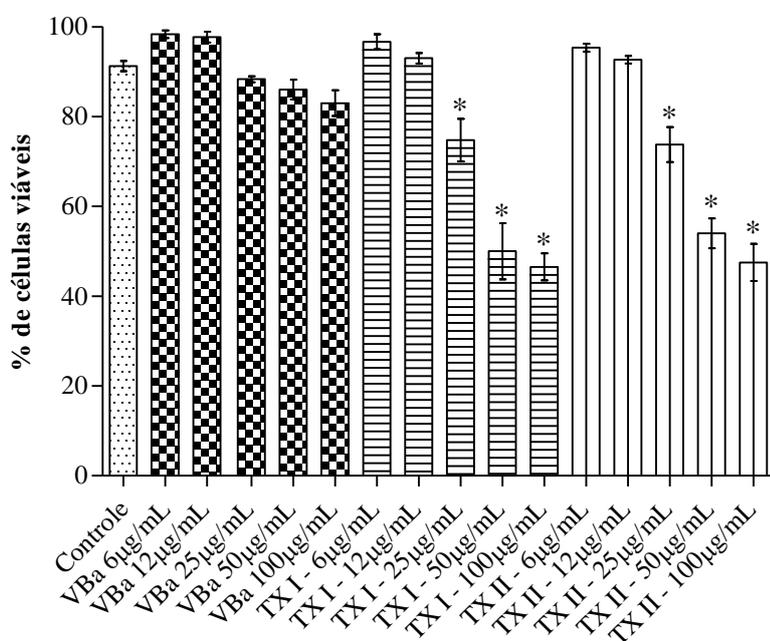


Fig. 3: Efeito do veneno bruto e das fosfolipases BaltTX-I (Lys-49) e BaltTX-II (Asp-49) de *Bothrops alternatus* sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais *in vitro*. Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos 96 horas após a injeção de tioglicolato. 2×10^5 células/mL foram incubadas por 1 hora com o veneno, nas concentrações descritas acima ou RPMI (controle). A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripán. Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.2- Efeito do veneno e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos.

Nas concentrações estudadas, o veneno e as toxinas, não interferiram na capacidade de adesão dos macrófagos (Figura 4A).

Ao mesmo tempo, para verificar se o veneno bruto ou as toxinas promoviam o descolamento, os macrófagos foram estimulados por 1 hora, com RPMI (controle), veneno bruto, BaltTX-I ou BaltTX-II nas concentrações de 6 e 3 $\mu\text{g/mL}$.

Não houve diferença estatisticamente significativa, na capacidade de adesão nem do descolamento, entre os macrófagos incubados com RPMI e os incubados tanto com o veneno bruto quanto com as toxinas (Figura 4B).

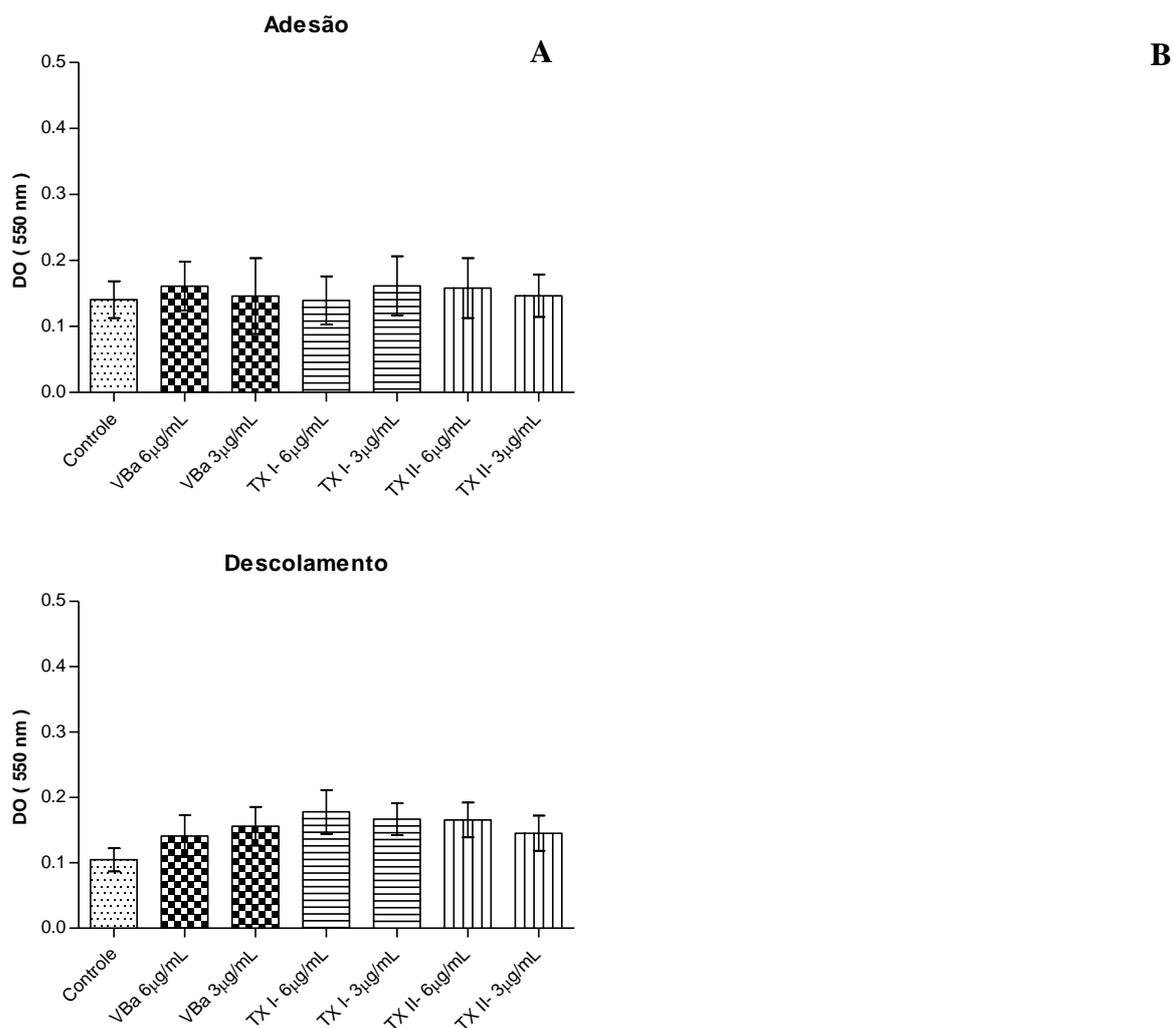


Fig. 4: Efeito do veneno e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos. Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos 96 horas após a injeção de tioglicolato. (A) Para o ensaio de adesão, 2×10^5 células foram incubadas por 1 hora com as toxinas nas concentrações de 6 e $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ou RPMI (controle). (B) Para o ensaio de descolamento, as células foram incubadas somente com meio de cultura, por 24 horas, após esse período as células foram incubadas por 1 hora com o veneno ou com as toxinas nas concentrações de 6 e $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ou RPMI (controle). A quantidade de células aderidas foi determinada por densidade ótica (550nm) sendo proporcional à quantidade de corante Giemsa incorporado. Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.3- Efeito da estaurosporina, inibidor de PKC, sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais.

Os macrófagos incubados com RPMI (controle) apresentaram 95% de viabilidade. Essa taxa não foi alterada quando as células foram incubadas com estaurosporina na concentração de 14 nM/mL (Figura 5).

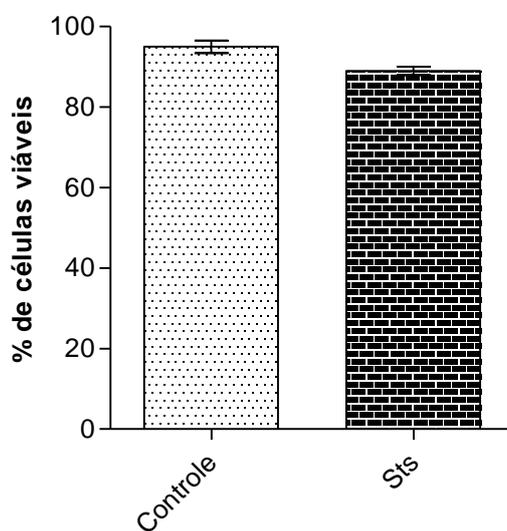


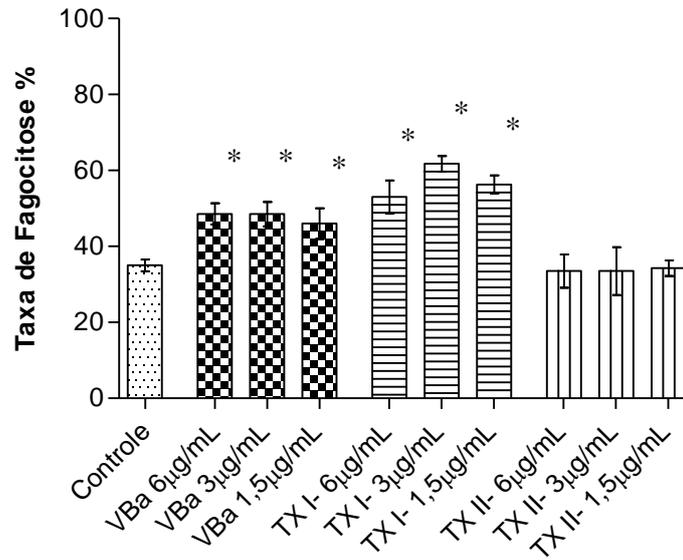
Fig. 5: Efeito da estaurosporina, inibidor de PKC sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos 96 horas após a injeção de tioglicolato. 2×10^5 células foram incubadas por 1 hora com estaurosporina (Sts) na concentração de 14nM/mL ou RPMI (controle). A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste de exclusão pelo azul de Tripán. Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.4 - Efeito do veneno bruto e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos, via receptor de complemento

Os macrófagos peritoneais incubados apenas com RPMI (controle) apresentaram taxa de fagocitose em torno de 35%, quando incubados com veneno bruto nas concentrações 6, 3 e 1,5 µg/mL apresentaram taxa de fagocitose respectivamente de 50.7, 48.5 e 46%, respectivamente. O veneno bruto, nas concentrações utilizadas, causou um aumento, estatisticamente significativo, da taxa de fagocitose dos macrófagos.

A toxina BaltTX-I nas concentrações de 6, 3 e 1,5µg/mL também aumentou a fagocitose de partículas de zimosan por essas células. As taxas de fagocitose da BaltTX-I foram 53, 59 e 51%, respectivamente. A toxina BaltTX-II não alterou taxa de fagocitose, em nenhuma das concentrações estudadas, em comparação ao controle (Figura 6A).

A



B

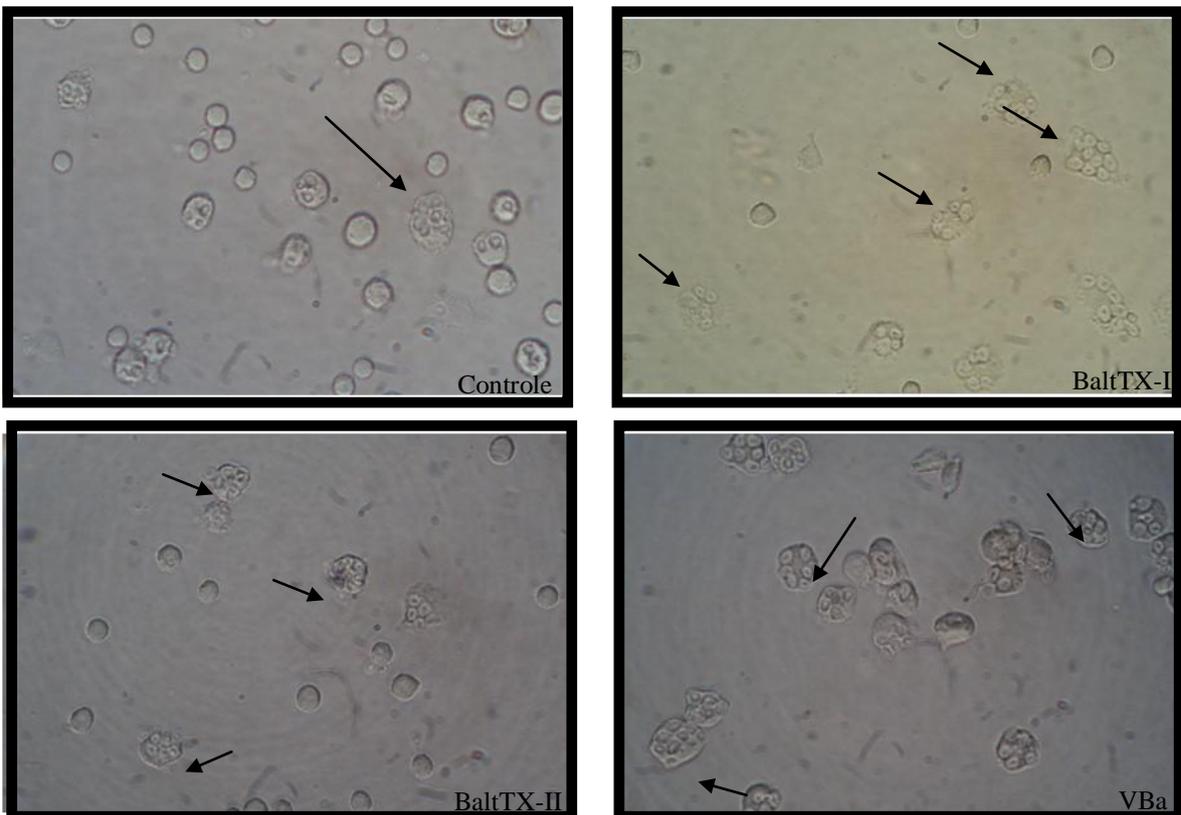


Fig. 6: Efeito do veneno bruto e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II da serpente *Bothrops alternatus* na capacidade fagocítica de macrófagos, via receptor de complemento. Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos 96 horas após a injeção de tioglicolato. 2×10^5 células aderidas em lamínulas, foram incubadas por 1 hora com RPMI (controle), veneno ou toxinas nas concentrações de 6, 3 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$. **A)** Número de células positivas para a fagocitose. **B)** Foto de macrófagos estimulados com RPMI, veneno ou toxinas

(aumento 100X). As setas indicam partículas de zimosan dentro dos macrófagos. Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.5- Efeito do inibidor PKC sobre a fagocitose

A avaliação do papel da PKC na fagocitose de partículas de zimosan, opsonizado, pelos macrófagos foi realizada através da incubação prévia dessas células por 15 minutos com staurosporina. Após a incubação com o inibidor, a taxa de fagocitose dos macrófagos foi avaliada após 1 hora de incubação com o veneno ou com a fosfolipase BaltTX-I (Lys-49) na concentração de $6\mu\text{g/mL}$. A taxa de fagocitose foi totalmente inibida nos macrófagos tratados previamente com os inibidores, mostrando que as vias de sinalização da PKC são essenciais para essa funcionalidade em macrófagos estimulados com o veneno ou com a fosfolipase BaltTX-I (Figura 7).

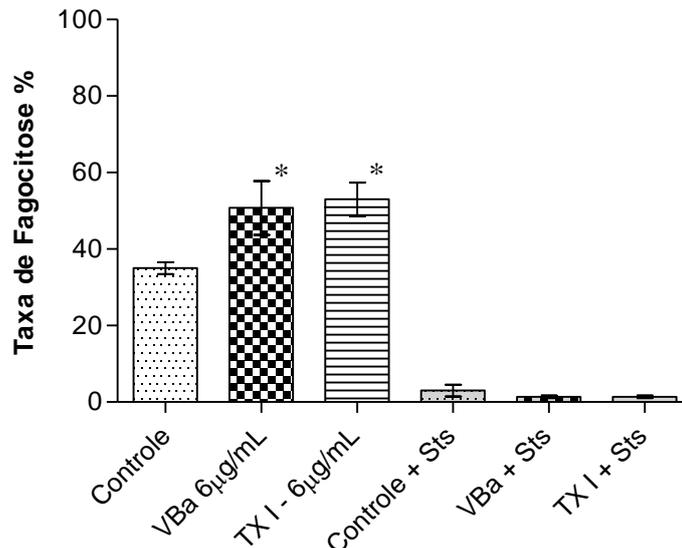


Fig. 7: Efeito do inibidor de PKC na capacidade fagocítica de macrófagos via receptor de complemento induzida pelo veneno bruto e pela toxina BaltTX-I. Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal dos camundongos 96 horas após a injeção de tioglicolato. 2×10^5 células foram incubadas com $40\mu\text{l}$ de staurosporina, 14nM/mL por 15 minutos, antes da adição do VBa ou da toxina ($6\mu\text{g/mL}$), seguido de 1h de incubação. Foi contado um total de 200 células,

em microscópio de contraste de fase. Os dados representam a média \pm EPM de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.6- Efeito do veneno bruto e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre a produção de superóxido por macrófagos

A incubação dos macrófagos com concentrações de 6 e 3 $\mu\text{g/mL}$ de veneno bruto, resultou no aumento significativo da produção superóxido por essas células em relação ao controle (RPMI), não havendo diferença em relação ao controle positivo (PMA). No entanto as fosfolipases BaltTX-I (Lys-49) e a BaltTX-II (Asp-49) aumentaram significativamente a produção de superóxido, somente na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle (RPMI). Não havendo diferença em relação ao controle positivo (PMA) nem ao veneno bruto. Não foi observado relação entre dose e efeito (Figura 8).

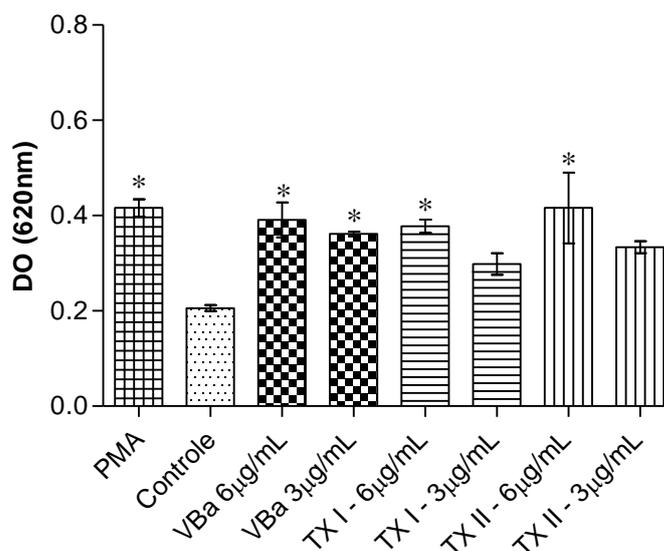


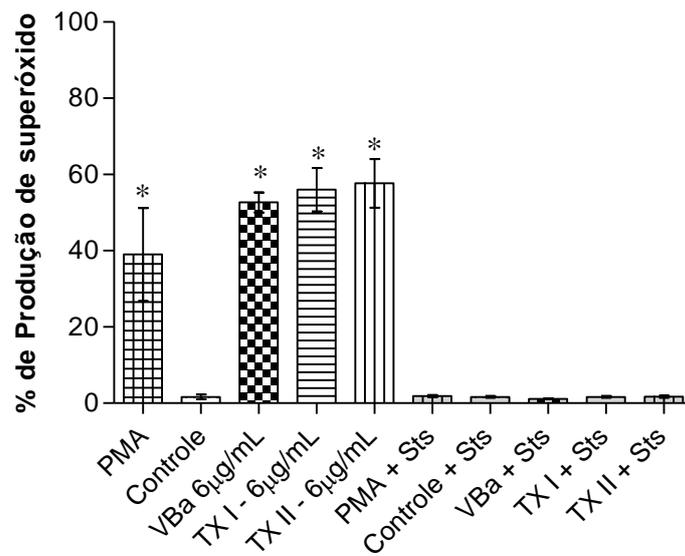
Fig. 8: Efeito do veneno e das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre a produção de superóxido *in vitro*. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ e foram incubados por 1 hora com meio de cultura RPMI, 0,1% de NBT, 10 μl de PMA (500ng/ml) (controle positivo), com o veneno ou com as toxinas nas concentrações de 6 e 3 $\mu\text{g/mL}$ à 37°C e 5% de CO_2 para a formação dos cristais formazan, resultantes da redução do NBT pelo superóxido. Os

cristais foram solubilizados e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 620nm em espectrofotômetro. Os dados foram expressos em D.O. e representam a média \pm EPM de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.7- Efeito do inibidor de PKC sobre a produção de ânion superóxido por macrófagos estimulados pelo veneno bruto e toxinas BaltTX-I e BaltTX-II

O tratamento dos macrófagos com estaurosporina, um inibidor de PKC, na concentração de 14 nm/mL, seguida de incubação por uma hora com o veneno ou com as toxinas, na concentração de 6 μ g/mL, resultou em uma inibição significativa da produção de ânion superóxido, em relação às células não tratadas com estaurosporina (Figura 9.A).

A



B

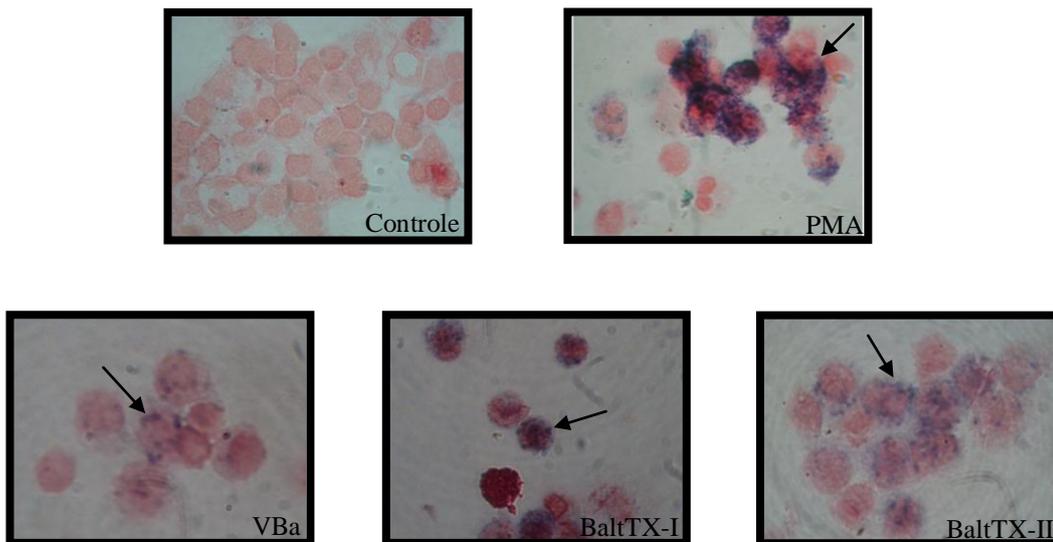


Fig.9: Efeito do inibidor de PKC na produção de superóxido por macrófagos estimulados pelo veneno ou toxinas BaltTX-I e BaltTX-II. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5 / 200 \mu\text{l}$ e foram incubados por 1 hora com meio de cultura RPMI contendo 0,1% de NBT (controle), 10µl de PMA (500ng/ml) (controle positivo), veneno ou com as toxinas

nas concentrações de 6µg/mL a 37°C e 5% CO₂. Após a centrifugação em citocentrífuga, as lâminas foram coradas com safranina. Foi contado um total de 200 células, em microscópio óptico e expressos em % de células positivas para o superóxido. **A)** Número de células positivas para superóxido. **B)** Foto de macrófagos estimulados com RPMI, PMA, veneno ou toxinas. As setas indicam células que produziram superóxido. Os dados representam a média ± EPM de 4 animais. *p < 0,05 em relação ao controle (ANOVA).

5- DISCUSSÃO

Considerado um fagócito profissional, o macrófago atua como sentinela do sistema imune, na captura e destruição de células senescentes, apoptóticas, defeituosas, partículas poluentes e principalmente sobre os organismos potencialmente patogênicos e inflamatórios (GORDON, 1998). Na reação inflamatória provocada pelos venenos botrópicos, os macrófagos possuem um papel importante, porém o estado de ativação dessas células na vigência de ação dos venenos e de suas toxinas é pouco conhecido. Os resultados iniciais deste estudo mostraram que o veneno nas concentrações estudadas não é tóxico para as células no tempo de 1 hora, sendo portanto utilizado para os experimentos propostos nesse estudo.

A literatura documenta através de ensaios de *screening* de toxicidade celular que o veneno da *Bothrops neuwiedii mattogrossensis* e *Bothrops leucurus* apresentam a maior citotoxicidade sobre células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde da África), enquanto o veneno de *B. atrox* e de *B. alternatus* são menos tóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Corroborando os dados acima, os resultados recentes utilizando veneno de *B. atrox* mostraram que esse veneno é pouco tóxico para macrófagos elicitados (dados não publicados). Ainda, Moreira *et al* (2009) verificaram que o veneno de *B. asper* afeta a viabilidade de macrófagos e neutrófilos apenas em concentrações acima de 8µg/mL. Considerando que as fosfolipases representam em torno de 30% do veneno bruto de serpentes (GUTIERREZ & LOMONTE, 1995) também avaliou-se o efeito das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre a viabilidade celular. Os dados obtidos no presente estudo mostraram que as toxinas afetam a viabilidade de macrófagos somente a partir da concentração de 25µg/mL, no tempo de uma hora. Não foi observado diferença na citotoxicidade entre as toxinas BaltTX-I (Lys-49) e BaltTX-II (Asp-49) nas concentrações estudadas. De acordo com a literatura, duas fosfolipases A₂ isoladas de *Bothrops asper* exercem efeitos tóxicos sobre diversos

tipos celulares apenas em altas concentrações (BULTRÓN *et al.*, 1993; LOMONTE *et al.* 1994a; 1999). Da mesma forma, Zuliani, *et al.* (2005) demonstraram que concentrações menores que 25µg/mL das toxinas de *Bothrops asper* incubadas com macrófagos peritoneais murinos elicitados por tioglicolato, por um período de uma hora, não afetaram a viabilidade dessas células. Esses autores relataram ainda que a toxina com atividade enzimática (Asp-49) é mais tóxica que a toxina enzimaticamente inativa (Lys-49). Embora a atividade da fosfolipase A₂ não seja requerida para a toxicidade, essas enzimas podem exercer um papel importante no efeito local do envenenamento por serpentes.

Uma das principais células de defesa do organismo com capacidade de migrar para focos de inflamação é o macrófago. Esta célula pode ser encontrada em diferentes tecidos e possui importante papel em processos inflamatórios, produzindo agentes microbicidas, secretando citocinas, processando e apresentando antígenos, e realizando sua principal função, a fagocitose (ADAMS & HAMILTON, 1984). Porém, para que o processo de fagocitose ocorra de forma eficaz, os macrófagos precisam aderir sobre um substrato para posteriormente modificar sua morfologia celular de uma forma redonda para uma forma achatada (TAYLOR, 1961). Nesse sentido, foram realizados experimentos para se verificar o efeito do veneno e das toxinas sobre a capacidade de adesão e descolamento das células. Os resultados obtidos mostraram que tanto o veneno quanto as toxinas não interferiram nem na adesão nem no descolamento das células. Não há dados na literatura mostrando o efeito do veneno de *Bothrops alternatus* nem das toxinas BaltTX-I e BaltTX-II sobre a capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos.

A partir desses dados foram conduzidos experimentos para verificar o efeito do VBa e das toxinas sobre a fagocitose, via receptor de complemento, utilizando partículas de zimosan opsonizadas. Os dados obtidos mostraram que o VBa é capaz de estimular a fagocitose de macrófagos peritoneais elicitados por tioglicolato. Zamunér *et al.*, (2001) observaram o aumento da capacidade fagocítica de leucócitos peritoneais induzida pelos venenos de *B. asper* e *B. jararaca*, 12 e 48 horas após a injeção intraperitoneal dos venenos, em camundongos. Cabe ressaltar que, nestes períodos, houve um maior acúmulo de

neutrófilos e macrófagos, no peritônio, respectivamente, e desta forma pode-se inferir que estas células sejam ativadas pelos venenos. No entanto, o mecanismo pelo qual o veneno de *B. alternatus* ativa o processo de fagocitose não foi estabelecido. De outra parte, o fato do veneno ativar o processo de fagocitose sugere que essa função leucocitária seja um evento importante para eliminação dos venenos em indivíduos mordidos. A literatura mostra que tanto macrófagos residentes quanto macrófagos recrutados para o músculo lesado, efetuam a fagocitose de fragmentos celulares e facilitam a regeneração de miofibrilas lesadas. Acredita-se que essas células, através da produção de diversas citocinas e fator de crescimento derivado de plaquetas, induzam a quimiotaxia de precursores de células musculares e outros leucócitos estimulando a proliferação de células endoteliais e musculares favorecendo a regeneração (ROBERTSON *et al.*, 1993).

Com relação às miotoxinas, os dados obtidos no presente estudo mostraram que apenas toxina BaltTX-I, uma Lys 49, aumentou significativamente a taxa fagocítica via receptor de complemento. Esses resultados corroboram os obtidos por Zuliani *et al.*, (2005a), que mostraram que a miotoxina MT-II, uma fosfolipase Lys 49, isolada do veneno de *Bothrops asper* da Costa Rica, também aumenta a fagocitose via receptor de complemento, enquanto a miotoxina MT-III, uma fosfolipase Asp 49, não afeta esse parâmetro via esse receptor em macrófagos elicitados. Esses resultados sugerem que a atividade catalítica não é essencial para o aumento da fagocitose via receptor de complemento, já que apenas a FLA₂ destituída de atividade enzimática aumentou a taxa de fagocitose. Vishwanath, *et al.*, (1987), foram os primeiros a sugerir a existência de sítios distintos em FLA₂, sendo um responsável pela atividade catalítica e outro pelas atividades farmacológicas, independentes de ação enzimática.

O mecanismo pelo qual as fosfolipases A₂ induzem o aumento da fagocitose não foi ainda elucidado, é possível que a BaltTX-II Lys-49 interaja com o receptor e seja internalizada ou que ela induza uma perturbação de membrana de modo a ativar vias de sinalização que vão culminar na ativação do receptor e ativar o processo de fagocitose. Estudos adicionais devem ser conduzidos com intuito de elucidar o mecanismo de ação dessas toxinas.

O receptor 3 do complemento (CR3) diferentemente do receptor para Fc, necessita de um sinal de ativação adicional para uma eficiente ligação da partícula e conseqüente internalização. Os sinais que podem desencadear a ativação do CR3 podem ser atribuídos a um número variado de estímulos, como, ésteres de forbol, lipopolissacarídeo (LPS), citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas. Esses estímulos ativam a proteína kinase C (PKC) e induzem a sinalização de dentro para fora culminando na internalização da partícula pelo mecanismo de invaginação (WRIGHT e SILVERSTEIN, 1982; GRIFFIN e MULLINAX, 1985; ROSS e VETVICKA, 1993; WILLIAMS e SOLOMKIN, 1999; SHMIDT et al., 2001; ADEREM e UNDEHILL, 1999).

Nesse sentido, experimentos foram delineados com o intuito de analisar a participação da PKC no processo de fagocitose de partículas de zimosan opsonizadas estimulada pelo VBa ou pelas duas miotoxinas. A PKC é essencial para a fagocitose induzida tanto pelo veneno quanto pelas toxinas, tendo em vista que a utilização da estaurosporina, um inibidor de PKC, aboliu a fagocitose via receptor de complemento pelos macrófagos elicitados.

As PKCs constituem uma grande família de proteína kinases com domínios serina/treonina consistindo de 10 isotipos codificados por 9 genes (OHNO e NISHIZUKA, 2002). Os isotipos de PKC exibem distintos padrões de expressão tecidual e localização intracelular. Desse modo, no presente estudo não foi determinado qual ou quais isoformas estão envolvidas na fagocitose induzida pelo VBa e pelas toxinas.

A literatura mostra que diferentes isoformas de PKC são translocadas para membrana durante a fagocitose, em resposta a diferentes estímulos (ALLEN e ADEREM, 1995; LARSEN *et al.*, 2000; YEDOVITZKY *et al.*, 1997) e que durante a estimulação de receptores da superfície celular, cada isotipo de PKC é translocada ou orientada para compartimentos intracelulares particulares, como membrana plasmática, complexo de Golgi, mitocôndria, núcleo celular e citoesqueleto. Ainda, o destino da enzima pode ser direcionado por mediadores lipídicos e talvez por fosforilação (NISHIZUKA, 1998). Estudos recentes têm demonstrado que lipídios produzidos na membrana, após estimulação de

receptores, podem participar da ativação da PKC. Esses lipídios incluem ácidos graxos livres, especialmente o ácido araquidônico, ácido fosfatídico, lisofosfolipídios, fosfatidilinositol e diacilglicerol (DAG) (NISHIZUKA, 1995). A translocação e consequente ligação à membrana é devido à presença de regiões específicas de ligação a lipídios, incluindo DAG, ácido araquidônico e ceramida (KASHIWAGI *et al.*, 2002). Em condições quiescentes, a PKC é citoplasmática e inativa. Quando estimulada, a quinase é translocada para a membrana, onde fosforila seu substrato em resíduos selecionados de serina ou treonina. As PKC estão divididas em quatro grupos: 1) clássicas (PKC- α e PKC- β) se ligam a fosfatidilserina, dependentes de cálcio e diacilglicerol; 2) novas ou n- PKC (δ , ϵ , η e θ), que se ligam à fosfatidilserina e ao diacilglicerol, mas são independentes de cálcio; 3) atípicas ou a-PKC (ζ , λ /i), que ligam-se à fosfatidilserina, mas são independentes de cálcio e diacilglicerol e 4) PKC μ ou PKD que ligam-se à fosfatidilserina e são independentes de cálcio (NEWTON, 2001; 2003).

É possível que as FLA₂s BaltTX-I por um mecanismo intrínseco, hidrolise fosfolipídeos de membrana e induza à liberação de mediadores lipídicos, culminando com a ativação da PKC ou que, por um mecanismo direto, ative as FLA₂s endógenas; ou ainda, que a toxina interaja com receptores de membrana e ative vias de sinalização que poderão culminar na ativação da PKC. Akiba *et al.*, (1999; 2002) demonstraram que a ativação da PKC, em células estimuladas com zimosan, acarreta um aumento da atividade de FLA₂s independentes de cálcio (Grupo VI) e das FLA₂s citosólicas (Grupo IV).

Junto ao processo de fagocitose há um aumento do metabolismo oxidativo de leucócitos. O alto consumo de O₂ associado à rápida ativação da NADPH-oxidase, desencadeia o “burst” respiratório, com a subsequente produção de íons superóxido e peróxido de hidrogênio (BABIOR, 1973). A enzima responsável pela produção de superóxido é a multicomponente NADPH oxidase ou “burst” respiratório oxidase (BABIOR, 1999; EL BENNA *et al.*, 2005). No fagócito, a NADPH e a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) desenvolvem um papel chave na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos, como ilustrado por uma desordem genética humana conhecida como doença granulomatosa crônica (CGD) caracterizada pela ausência de

produção de ROS devido uma deficiência em um dos componentes da NADPH oxidase (MEISCHL e ROOS, 1998; KANENGISSER *et al.*, 2008). O complexo enzimático NADPH consiste de várias proteínas separadas entre a membrana e o citosol (EL BENNA *et al.*, 2005). As proteínas citosólicas são p47phox, p67phox e p40phox que interagem umas com as outras para formar um complexo, e as pequenas proteínas G, Rac 1 (em monócitos) ou Rac 2 (em neutrófilos) (GROEMPING *et al.*, 2005). Os componentes da NADPH associados à membrana são a proteína glicosilada de 91 kDa (gp91phox ou NOX 2) e a subunidade (p22phox) que juntas formam o flavocitocromo b₅₅₈ (VIGNAIS, 2002). A separação espacial dos componentes da NADPH oxidase garante que a enzima estará dormente em células inativas. Contudo em resposta a estímulos, os componentes citosólicos migram quase instantaneamente para membrana onde se unem ao flavocitocromo b₅₅₈ para formar a enzima ativa, em um processo altamente regulado por interações proteína-proteína e por fosforilação da p47phox (EL BENNA *et al.*, 1994a ; FAUST *et al.*, 1995; QUINN e GAUSS, 2004; GROEMPING *et al.*, 2005). Está demonstrado que a fosforilação da p47phox é absolutamente necessária para ativação da NADPH oxidase em células da linhagem EBV (linfócitos B transformados) (FAUST *et al.*, 1995). Portanto a NADPH oxidase de macrófagos desenvolve um papel importante na defesa do hospedeiro contra patógenos microbianos pela geração de ânion superóxido e outras moléculas de ROS. A liberação excessiva de superóxido pode ser danosa para o tecido envolvido na reação inflamatória. Desse modo, avaliou-se a ação do VBa e das toxinas sobre a liberação de ânions superóxido por macrófagos elicitados.

Os resultados mostraram que o veneno e as toxinas induziram significativamente a liberação de ânion superóxido quando comparados ao controle negativo, entretanto não houve diferença quando comparado ao PMA, indicando que o VBa e as toxinas são capazes de condicionar os macrófagos para o “burst” respiratório. Nesse sentido, a literatura mostra que a injeção do veneno de *Bothrops asper* e *B. jararaca* na cavidade peritoneal de camundondos, ativou o “burst” respiratório em leucócitos (ZAMUNER *et al.*, 2001).

Os resultados desse estudo estão de acordo com os obtidos por Zuliani *et al.*, (2005b), que evidenciaram que as toxinas MT-II (fosfolipase Lys-49) e MT-III

(fosfolipase Asp-49) do veneno de *Bothrops asper* induzem a liberação de H_2O_2 , um outro reativo intermediário do oxigênio produzido a partir do ânion superóxido, por macrófagos, sendo que a ação da MT-III foi mais pronunciada. Pode-se propor que a produção de ânion superóxido não depende de atividade enzimática de FLA_2 , e que sítios diferentes do sítio catalítico podem ser importantes para a geração de ânion superóxido por macrófagos peritoneais.

O mecanismo pelo qual o veneno de *B. alternatus* e as toxinas isoladas deste veneno estimulam a geração de ânion superóxido não foi totalmente esclarecido. Portanto, é possível que tanto o veneno quanto as duas toxinas, as FLA_{2s} (BaltTX-I e BaltTX-II), ativem a NADPH oxidase por um mecanismo direto, ou indireto através da ativação de vias de sinalização, como o da PKC, e que culminam na ativação da NADPH oxidase. Os dados obtidos mostraram que tanto a ação estimulatória do veneno quanto das fosfolipases isoladas foi abolida após o tratamento das células com staurosporina, indicando que a PKC é uma via de sinalização importante para a produção de ânion superóxido em macrófagos. Por outro lado, espécies reativas de oxigênio também podem ser geradas por mecanismos independentes da NADPH oxidase, através da mitocôndria. A produção de superóxido e de peróxido de hidrogênio, na mitocôndria, pode ser estimulada por ativação de canais de potássio de pequena condutância ativados por cálcio (FAY *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que as toxinas podem atuar através de mecanismos distintos.

Tomados em conjunto, os dados deste estudo permitem concluir que tanto o veneno bruto quanto as FLA_{2s} (BaltTX-I e BaltTX-II), não interferem com a adesão e nem com o descolamento de macrófagos aderidos em suporte. O veneno e a BaltTX-I, mas não a BaltTX-II estimulam a fagocitose, de partículas de zimosam opsonizado, via receptor de complemento, através de mecanismos moleculares de sinalização que envolvem a PKC. Porém, o mecanismo pelo qual o veneno e as toxinas interagem com os macrófagos para desencadear essa via de sinalização não foi estabelecido. Ainda, o veneno bruto assim como as duas FLA_{2s} (BaltTX-I e BaltTX-II) induzem a produção de superóxido por uma via dependente da PKC. No entanto, a atividade de FLA_2 não é essencial para o desencadeamento desses efeitos. É possível que regiões particulares da

molécula dessas miotoxinas, além do sítio catalítico, possam interagir com as membranas celulares, conduzindo à ativação dos macrófagos.

Apesar dos dados desse estudo mostrarem que o mecanismo de ação das fosfolipases e do veneno, na fagocitose e produção de superóxido dos macrófagos, ocorre por uma via de sinalização dependente da PKC, são necessários estudos adicionais para a determinação de quais isoformas estão envolvidas nesses processos e de que forma ocorre a ativação dessa quinase.

Finalmente, esses estudos adicionaram conhecimento aos mecanismos de ação dos venenos e das fosfolipases isoladas da serpente *Bothrops alternatus*, contribuindo para uma melhor caracterização quanto à funcionalidade dos macrófagos. Além disso, pelo importante papel das fosfolipases na ativação de fagócitos, e por sua homologia com fosfolipases de mamíferos, essas toxinas poderão constituir ferramentas úteis para o estudo de funções celulares específicas, como a microbicida.

6- CONCLUSÕES

- O veneno bruto de *Bothrops alternatus* não afeta a viabilidade dos macrófagos nas concentrações de 6 a 100 µg/mL e as duas FLA₂s isoladas desse veneno (BaltTX-I e BaltTX-II), não afetam a viabilidade dos macrófagos nas concentrações abaixo de 25 µg/mL, no tempo de 1 hora.
- O veneno e as duas FLA₂s não interferem com a adesão nem com descolamento dos macrófagos.
- O veneno e a FLA₂ – Lys 49 (BaltTX-I), mas não a FLA₂ – Asp 49 (BaltTX-II) estimulam a fagocitose de partículas de zimosan via receptor de complemento.
- A participação da PKC é essencial na sinalização do processo de fagocitose de partículas de zimosan via receptor de complemento, estimulada pelo veneno e pela FLA₂ – Lys 49 (BaltTX-I).
- O veneno e as duas FLA₂s induzem a produção de superóxido na concentração de 6 µg/mL, via NADPH oxidase.
- A produção de superóxido, pelos macrófagos, induzida pelo veneno e toxinas (BaltTX-I e BaltTX-II), ocorre por um mecanismo dependente da PKC.

7- REFERÊNCIAS

ABE, A; SHAYMAN, J. A. Purification and Characterization of 1-O-acylceramide synthase a novel phospholipase A₂ with transacylase activity. **J Biol Chem.**, 273: 8467-74, 1998.

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T. A. Regulation of macrophage activation at the molecular level. **Ann. Inst. Pasteur/ Immunol.**, 37: 103-25, 1986.

ADAMS, D.O; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, 2: 283, 1984.

ADEREM, A.; UNDERHILL, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, 17: 593-623, 1999.

AIRD, S.D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon.**, 40, 335-393, 2002.

ALLEN, L. A.; ADEREM, A. - Mechanisms of phagocytosis. **Curr. Opin. Immunol.**, 8: 36-40, 1996.

ALLEN, L. H, ADEREM, A. A role for MARCKS, the alpha isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. **J Exp Med.**, 182(3):829-40, 1995.

AMORIM, M. F.; FRANCO DE MELLO, R.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. **Mem. Inst. Butantan.**, 23:108, 1951.

BABIOR, B. M. NADPH Oxidase: an update. **Blood.**, 93: 1464-76, 1999.

BABIOR, B.M. - The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, 73: 599-1, 1984.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURCNUITTE, J.T. - Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential agent. **J. Clin. Invest.**, 52: 741-4, 1973.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M.V.; DENNIS, E.A. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett.**, 531: 2-6, 2002.

BARBOSA, A.M.; DO AMARA, R.O.; TEIXEIRA, C.F; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon.**, 42:515–523, 2003.

BARRAVIEIRA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **Jornal Brasileiro de Medicina.**, 65: 209-250, 1993.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. **Arq Bras Med Hyg.**, 64: 14-20, 1990.

BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVOCH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Med. Inflamm.**, 7: 339-346, 1998.

BAUAB, F. A.; JUNQUEIRA, G. R.; CORRADINI, M. C.; SILVEIRA, P. V.; NISHIOKA, S. D. E. A. Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. **Trop Med Parasitol.**, 45(3):243-5,1994.

BECK, S.; LAMBEAU, G.; SCHOLZ-PEDRETTI, K.; GELB, M. H.; JANSSEN, M. J.; EDWARDS, S. H.; WILTON, D. C.; PFEILSCHIFTER, J.; KASZKIN, M. Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A2

(sPLA₂)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA₂ and peroxisome proliferators-activated receptor alpha activation. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.32, p. 29799-29812, 2003.

BERKEN, A.; BENACERREF, B. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. **J. Exp. Med.**, 123: 119-44, 1966.

BÉRNILS, R. S. (org.). 2009. *Brazilian reptiles – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acessado em 01 de Dezembro de 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**, 1998.

BRAZIL, V.; PESTANA, B. R. Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. **Ver. Med.**, São Paulo, 12: 415-25, 1909.

BROWN, W.J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. **Traffic.**, 4: 214-21, 2003.

BUCLEY, T.L.; BRAIN, S.D. Functional interactions between inflammatory mediators in the microcirculation and relevance of neurogenic components. In: Brain, S.D.; ed. **The Handbook of immunopharmacology, Immunopharmacology of the Microcirculation, San Diego, Academic Press.**, 63-76, 1994.

BURIGO, A.C.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, 48: 106-11, 1996.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Springer Science.**, 23:49-59, 2009.

BULTRÓN, E.; GUTIÉRREZ, J.M.; THELESTAM, M. Effects of *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin III, a basic phospholipase A₂, on liposomes and mouse gastrocnemius muscle. **Toxicon.**, 31:217-222, 1993.

CALDERON, L.; LOMONTE, B.; Immunochemical characterization and role in activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **Biochem. Biophys.**, 358:343-350, 1998.

CALDERON, L.; LOMONTE, B.; Inhibition of the myotoxic action of *Bothrops asper* myotoxin II in mice immunization with its synthetic peptide 115-129. **Toxicon.**, 37:683-687, 1999.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of Latin America. **Cornell Univ. Press, Ithaca.**, 425 pp, 1989.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WE, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica. **Sarvier Ed.** São Paulo, 2003.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WE, F.H.; MALAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos do Brasil.** Biologia, Clínica e Terapêutica. Sarvier ed, São Paulo, 2009.

CARON, E.; HALL, A. - Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science.**, **282**: 1717-21, 1998.

CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; ZINGALI, R. B. Bothroalternin, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon.**, 36(12):1903-12, 1998.

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

CHILTON, F.H.; AVERILL, F.J.; HUBBARD, W.C.; FONTEH, A.N.; TRIGGIANI, M.; LIU, M.C. Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. **Journal of Experimental Medicine.**, 183:2235-2245, 1996.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon.**, 29(11):1279-303, 1991.

CHIPPAUX, J.P. & GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon.**, 36: 823-846,1998.

COMINETTI, M.R.; RIBEIRO, J. U.; FOX, J. W.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin. **Arch Biochem Biophys.**, 15;416(2):171-9, 2003.

COX, D.; LEE, D.J.; DALE, B.M.; CALAFAT, J.; GREENBERG, S. A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA 97.**, 680-685, 2000.

CUPILLARD, L.; MULHERKAR, R.; GOMEZ, N.; KADAM, S.; VALENTIN, E.; LAZDUNSKI, M.; LAMBEAU, G. - Both group IB and group IIA secreted phospholipases A₂ are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. **J. Biol. Chem.**, 274: 7043-51, 1999.

DAVIES, J. D. Mammary ductal foam cells: macrophages immunophenotype for further cells?. **Hum. Pathol.**, 25(2):214-215, 1994.

DE ROODT, A. R.; DOLAB, J. A.; DOKMETJIAN, J. C.; LITWIN, S.; SEGRE, L.; VIDAL, J. C. A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon.**, 38(6):865-73, 2000.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, 269(18):13057-13060, 1994.

DIAZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GENÉ, J.A.; The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta.**,1070(2):455-460, 1991.

DOWNEN, M.; ZHAO, M.L.; LEE, P.; WEIDENHEIN, K.M.; DICKSON, D.W.; LEE, S.C. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 58: 12-21, 1999.

DUFTON, M.J.; EAKER, D.; HIDER, R.C. Conformational properties of phospholipases A2. Secondary-structure prediction, circular dichroism and relative interface hydrophobicity. **Eur. J. Biochem.**, 137:537-544, 1983.

EAST, L.; ISACKE, C.M. The manose receptor. **Biochem. Biophys. Acta.**, 1572: 364-386, 2002.

EI BENNA, J.; FAUST, L. P.; BABIOR, B. M. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47^{phox} during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline directed kinases. **J. Biol. Chem.**, 269(38):23431-6, 1994.

EL BENNA, J.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; ELBIN, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 53:199-206, 2005.

EZEKOWITZ, R.A.; STAHL, P.D. - The structure and function of vertebrate mannose lectin-like proteins. **J. Cell Sci.**, 9: 121-33, 1988.

FALCONI M, DESIDERI A, RUFINI S. Membrane-perturbing activity of Viperidae myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem. **J Mol Recognit.**, 3(1):14-9, 2000

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

FAY, A.J; OIAN, X.; JAN, Y.N.; JAN, L.Y. SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes. **PNAS.**, 103(46):17548-17553, 2006.

FAUST, L.P.; EL BENNA, J.; BABIOR, B.M.; CHANOCK, S.J.; The phosphorylation targets of p47^{phox}, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. **J Clin Invest.**, 96(3):1499-505, 1995.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. - Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venom. **Toxicol.**, 31: 1551-9, 1993.

FORSTERMANN, U.; GATH, I.; SCHWARZ, P.; CLOSS, E.I.; KLEINERT, H. - Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. **Biochem. Pharmacol.**, 50:1321-1332, 1995.

FURTADO, M. F.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicol.**, 29(2):219-26. 1991.

GANS, C. Physiology of the reptilian. Londres: **Academy Press.**, 12, 1978.

GARCIA-LEME, J. Hormones and inflammation. **Florida Boca, Raton.**, 238, 1989.

GAY, C. C.; LEIVA, L. C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA DE PÉREZ, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicol.**, 46(5):546-54, 2005.

GORDON, D.; PERRY, H.; RABINOWITZ, S.; LAPPING, C.; ROSEN, H. - Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **J. Cell. Sci.**, 9: 1-26, 1988.

GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Immunologic Research, Basel.**, 149: 7-8: 685-688, 1998.

GORDON, S.; FRASIER, I.; NATH, D.; CLARKE, S. Macrophages in tissues and in vitro. **Curr. Opin. Immunol.**, 4(1):25-32, 1992.

GRAF, B. A.; NAZARENKO, D. A.; BORRELO, M. A.; ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D.; PALIS, J.; PHIPPS, R. P. Biphenotypic B/ macrophage cells express COX-1 and up regulate COX-2 expression and prostaglandin E2 production in response to proinflammatory signal. **Eur. J. Immunol.**, 29(11): 3793-3803, 1999.

GRANATA, F.; PETRAROLI, A.; BOILARD, E.; BEZZINE, S.; BOLLINGER, J.; DEL VECCHIO, L.; GELB, M.H.; LAMBEAU, G.; MARONE, G.; TRIGGIANI, M. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor. **J. Immunol.**, 174:464-74, 2005.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation e inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **Journal of Leukocyte Biology.**, 55(5):662-75, 1994.

GREENBERG, S. Signal transduction of phagocytosis. **Trends Cell Biol.**, 5: 93-99, 1995.

GRIFFIN, F. M. JR.; MULLINAX, P.J. Effects of differentiation in vivo and of lymphokine treatment in vitro on the mobility of C3 receptors of human and mouse mononuclear phagocytes. **J Immunol.**, 135(5):3394-7, 1985.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH-oxidase: a structural perspective. **Biochem J.**, 386 (Pt 3): p. 401-16, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev Biol Trop.**, 34(2):209-19, 1986.

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

GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Memorias Instituto Butantan.**, 51: 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon.**, 33: 1404-1424, 1995.

GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev. Biol. Trop.**, 34: 209-19, 1986a.

HAAPAMAKI, M.M.; GRONROOS, J.M.; NURMI, H.; SODERLUND, K.; PEURAVUORI, H.; ALANEN, K.; NEVALAINEN, T.J. Elevated group II

phospholipase A₂ mass concentration in serum and colonic mucosa in Crohn's disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 36: 751-5, 1998.

HALL, A.B; GAKIDIS, M.A; GLOGAUER, M. Requirements for Vav guanine nucleotide exchange factors and Rho GTPases in Fcγ₃R- and complement-mediated phagocytosis. **Immunity**., 24:305-316, 2006.

HARRIS, J.B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. - In: HARVEY, A.L.; ed. **Snake Toxins**., New York, Pergamon Press., 91-129, 1991.

HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M.. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 30: 87-94, 1989.

HIRAOKA, M; ABE, A; SHAYMAN, J.A. Structure and function of lysosomal phospholipase A₂, 1-O-acylceramide synthase. **J Biol Chem.**, 277:10090-9, 2002.

HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGUE, S.A.R.W.L. Poisonous snakes of the world. Part I. Check list of the pit vipers Viperidea, Viperidae, Crotalinae. **Mem. Inst. Butantan.**, 42: 179 - 310, 1978.

HUBBARD, A.; ROTHLEIN, R. - Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic. Biol. Med.**, 28: 1379-1386, 2000.

ISCHIROPOULOS, H.; NELSON, J.; DURAN, D.; AL-MEHDI, A. - Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. **Free Radic. Biol. Med.**, 20: 373-381, 1996.

JOHNSTON, R. B. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. **N. Eng. J. Med.**, 318(12):747-752, 1988.

KAISER, I.I.; GUTIERREZ, J.M.; PLUMMER, D.; AIRD, S.D.; ODELL, G.D. - The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 278: 319-25, 1990.

KANNENGIESSER, C; GÉRARD, B; EL BENNA, J; HENRI, D; KROVIARSKI, Y; CHOLLET-MARTIN, S; GOUGEROT-POCIDALO, MA; ELBIM, C; GRANDCHAMP, B. Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations. **Hum Mutat.**, 29(9), 132-49, 2008.

KASHIWAGI, K; SHIRAI, Y; KURIYAMA, M; SAKAI N, S. N. Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of PKC. **J. Biol. Chem.**, 77:18037-18045, 2002.

KIKKAWA, U.; KISHIMOTO, A.; NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. **Annu Rev Biochem.**, 58:31-44, 1989.

KING, C.C.; JEFERSON, M.M.; THOMAS, E.L. Secretion in inactivation of mieloperoxidase by isolated neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, 61: 293 – 302,1997.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon.**, 27(6):613-635, 1989.

KINI, R.M. Phospholipase A₂ – A complex Multifunctional Protein Puzzle. In: **Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism.** R. Manjunatha Kini, ed., New York, John Wiley & Sons, p.1, 1997.

KRYZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodityn L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.**, 202(3):1165-1168, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.**, 227: 680, 1970.

LARSEN, E.C; DI GENNARO, J.A; SAITO, N; METHA, S; LOEGERING, D.J; MAZURKIEWICZ, J.M. Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. **J Immunol.**, 165(5):2809-17, 2000.

LAW, S.K.A. C3 receptors on macrophages. **J. Cell Sci.**, 9: 67-97, 1988.

LAY, W.H.; NUSSENZWEIG, V. - Receptors for complement on leucocytes. **J. Exp. Med.**, 128: 991-1009, 1968.

LEE, W.H.; GIOTTO, M.T.S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.; GARRAT, R.C. - Structural basis for catalytic activity in Lys49 phospholipase A₂ – a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid. **Biochemistry**, 40:28-36, 2001.

LENNARTZ, M.R. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 31: 415-430, 1999.

LIN, M.K.; FAREWELL, V.; VADAS, P.; BOOKMAN, A.A.; KEYSTONE, E.C.; PRUZANSKI, W. Secretory phospholipase A₂ as an index of disease activity in rheumatoid arthritis. Prospective double blind study of 212 patients. **J Rheumatol.**, 23(7):1162-6, 1996.

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

LOMONTE, B. ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, .; GIGLIO, J. R.; OHNO, M.; DANIELE, J. J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIÉRREZ, J. M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEND) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. **Toxicon**, 37: 145-58, 1999.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L.; Na overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, 42, 885-901.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. **Inflammation**, 17: 93-105, 1993.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, 5:323-350, 1997.

MADHAVI, N; DAS, V.N, 1994. Effects os n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vincristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Letters.**, 84, 31-41, 1994.

MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L.; TERRUGGI, C. H.; SELISTRE- DE-ARAÚJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M. S. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur J Biochem.**, 270(24):4799-808, 2003.

MARUNAK, S. L.; ACOSTA DE PÉREZ, O.; RUÍZ DE TORRENT, R. M.; TEIBLER, G. P.; KOSCINCZUK , P.; SÁNCHEZ- NEGRETTE, M. Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (Vibora de la Cruz). **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.**, 9;49(3):149-54, 1994.

MAUEL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y. Killing of Leishmania parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **J. Leukoc. Biol.**, 49: 73-82, 1991.

MEBS D, OWNBY CL. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol Ther.**, 48(2):223-36. Review, 1990.

MEBS, D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int. J. Biochem.**, 1: 335-342. doi: 10.1016/0020-711X (70) 90077-7, 1970.

MEISCHL, C.; ROOS, D. The molecular basis of chronic granulomatous disease. **Springer Semin Immunopathol.**, 19(4):417-34, 1998.

METCALF, D. Antigen-induced proliferation in vitro of bone marrow precursors of granulocytes and macrophages. **Immunology.**, 20(5):727-738, 1971.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **J. Biochem.**, 131: 285-92, 2002.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; INOUE, K.; KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A₂. **Crit. Rev. Immunol.**,17:225-283, 1997.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; HARA, N.; KUDO, I; INOUE, K. Role of phospholipase A₂ in mast cell activation and function. In: **Phospholipase A₂ in Clinical Inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology.**, 5:93-124, 1995.

NAPPER,C.E.; DYSON, M.H.; TAYLOR, M.E. An extended conformation of the macrophage mannose receptor. **J. Biol. Chem.**, 276: 14759-66, 2001.

NEWTON, A.C. Protein Kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. **Chem. Rev.**, 101:2353-64, 2001.

NEWTON, A.C.Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochem J.**, 370(2):361-71, 2003.

NICOLAS,J.P.; LAMBEAU,G.; LASDUNSKI, M. Identification of the binding domain for secretory phospholipases A₂ on their M-type 180-kDa membrane receptor. **J. Biol. Chem.**, 270:28873, 1995.

NISENBOM, H. E.; SEKI, C.; VIDAL, J. C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon.**, 24(3): 259-72, 1986.

NISHIZUKA Y. Intracellular signaling by hydrolysis of fosfolipids and activation of protein kinase C. **Science.**, 258: 607-614, 1992.

NISHIZUKA Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB J.**, 9:484-496, 1995.

OHNO, S; NISHIZUKA, Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. **J Biochem.**, 132(4):509-11, 2002.

OLIVEIRA, J.C; DE OCA, H.M; DUARTE, M.M; DINIZ, C.R; FORTES-DIAS CL. Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay. **Toxicon.**, 40(3):321-5, 2002.

OLIVO, R..do A.; TEIXEIRA, C. F. P.; SILVEIRA, P. F. Representative aminopeptidases and prolyl endopeptidase from murine macrophages: comparative activity levels in resedent and elicited cells. **Biochem. Pharmacol.**, 2005, 69: 1441-50.

OUYANG, C.; TENG, M.; HUANG, T.F. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 281: 151-163, 1990.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.**, 11-17: 524-526, 1987.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J.A.; GORVEL, J.P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur j biochem.**, 15;253(2):452-61, 1998.

PÓLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A2: purification, characterization and computer modeling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem J.**, 319(3):961-968, 1996.

POLIOUT, M.; GILBERT, C.; BORGEAT, P.; POUBLE, P. E.; BOURGOIN, S.; CREMION, C.; MACLOUF, J.; McCOLL, S. R.; NACCACHE, P. H. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. **FASEB J.**, 12(12):1109-1123, 1998.

QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; PRADO-FRANCESCHI, J.- Muscle necrosis regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon.**, 22: 339-46, 1984.

RABINOVITCH, M. Macrophage spreading *in vitro*. In: Van FURTH, R.; ed. **Mononuclear Phagocytes in Immunity Infection and Pathology**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, p. 369-85, 1975.

RAMONER, R.; PUTZ, T.; GANDER, H.; RAHM, A.; BARTSCH, G.; SCHABER, C.; THURNHER, M. Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A2. **Blood.**, 105: 3583-7, 2005.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; SIGLER, P.B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.**, 260(21):11627-11634, 1985.

RIZZO, M.T.; NGUYEN, E.; ALDO-BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration. **Blood.**, 96(12): 3809-3815, 2000.

ROBBINS, R.A.; GRISHAM, M.B. Molecules in focus. Nitric oxide. Int. **J. Biochem. Cell Biol.**, 29: 857 – 60, 1997.

ROBERTSON, T.A; MALEY, M.A; GROUNDS, M.D; PAPADIMITRIOU, J.M. The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. **Exp Cell Res.**, 207(2):321-3, 1993.

ROHN, T.T., NELSON, L.K.; SIPES, K.M.; SWAIN, S.D.; JUTILA, K.L.; QUINN, M.T. Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, 65: 59-70; 1999.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous Animals and Their Venoms.**, 2:345-403 (Burchel, W. & Buckley, E. E. ed) New York: Academic Press, 1971.

ROSS, G. D.; VĚTVICKA, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. **Clin Exp Immunol.** 92(2):181-4, 1993.

RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENSEK, F.;
GUTIÉRREZ, J.M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, JZ.;

Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**. 15;31(49):12424-30, 1992.

RUSSELL, F. E. Snake venom immunology: historical and practical considerations. **J. Toxicol. Toxin**. 7: 1-82, 1988.

SANCHES-MEJORADA, G.; ROSALES, C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. **J. Leukoc. Biol.**, 63: 521-533, 1998.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**., 30(1):95-103, 1992.

SARKAR, N.; DEVI, A.; Enzymes in snake venom. In: Bucherl, W., Buckley, E.; DEULOFEN, V. (Eds). **Venomous Animals and their venoms**., Vol. I. Academic Press, New York, 167-216, 1968.

SCHALWIJK, C.G.; PFEILSCHIFTER, J.; MARKI, F.; VAN DER BOSCH, H. – Interleukin – 1, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A2 in rat mesangial cells. **Biochem, Biophys. Res Commun**. 174: 268-75, 1991.

SCHMIDT, A; CARON, E; HALL, A. Lipopolysaccharide-induced activation of beta2-integrin function in macrophages requires Irak kinase activity, p38 mitogen-activated protein kinase, and the Rap1 GTPase. **Mol. Cell. Biol**. 21, 438-448, 2001

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; CREPIN, M.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz J Med Biol Res**., 38(10):1505-11, Epub, 2005.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, 18(3):385-405, 2004.

SILLIMAN,C.C.; MOORE, E.E.; ZALLENG,G.; GONZALES,R.; JOHNSON,J.L.; ELZI,D.J; MENG,X.; HANAZAKI,J.; ARITA,H.; AO,L.; ENGLAND,K.M.; BANERJE,A. Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, 283: C1102-13, 2002.

SIX, D. A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Elsevier Science.**, 2000.

SMOLKA, M. B; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon.**, 36(7): 1059-63, 1998.

SOARES, A.M; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; FRANÇA, S.C.; GIGLIO, J. R.; WARD, R.J.; ARANTES, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochem Biophys Res Commun.**, 302(2):193-200, 2003.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch Biochem Biophys.**,15:384(2): 341-50, 2000.

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S., CARLOS, G. B.; PEITRO, R. C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**,12:2881-2886. doi:10.1016/j.bmc. PMID: 15142548, 2004.

STADEL, J.M.; HOYLE, K.; NACLERIO, R.M.; ROSHAK, A.; CHILTON, F. H. Characterization of phospholipase A2 from human nasal lavage. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 11: 108-13, 1994.

STOY, N. Macrophage biology and pathobiology in the evolution of immune responses: a functional analysis. **Pathobiology.**, 69: 179-211, 2001.

TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). **Comp. Biochem. Physiol.**, B, 100: 361-365. PMID: 1799979, 1991.

TAYLOR, A.C. Attachment and spreading of cells in culture. **Exp Cell Res.**, 8:154-73, 1961.

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

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 391:37-62, 1996.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Biology Disease: Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. **Laboratory Investigation.**, 55: 391-404, 1986.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, 31: 59-70, 2000.

VALÉRIO, A. A.; CORRADINI, A. C.; PANUNTO, P. C.; MELLO, S. M.; HYSLOP, S. Purification and characterization of a phosphodiesterase from *Bothrops alternatus* snake venom. **J Protein Chem.**, 21(8):495-503, 2002.

VAN DEN BERG, B.; TESSARI, M.; BOELEN, R.; DIJKMAN, R.; DE HAAS, G. H.; KAPTEIN, R.; VERHEIJ, H. M. NMR structures of phospholipase A₂ reveal conformational changes during interfacial activation. **Nat. Struct. Biol.**, 2(5):402-406, 1995.

VERHEIJ, H. M.; EGMOND, M.R.; DE HAAS, G.H. Chemical modification of the alpha-amino group in snake venom phospholipases A₂. A comparison of the interaction of pancreatic and venom phospholipases with lipid—water interfaces. **Biochemistry.**, 20(1):94-99, 1981.

VIDARSSON, G.; VAN DE WINKEL, J. G. Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. **Curr Opin Infect Dis.**, 11(3):271-8, 1998.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from Habu venom and their interaction with the alkaloid aristocholic acid. **Toxicon.**, 25: 501-15, 1987.

VON ALLMEN, C. E.; SCHIMITZ, N. BAUER, M.; HINTON, H. J.; KURRER, M. O; BUSER, R. B.; GWERDER, M.; MUNTWILER, S. SPARWASSER, T. BEERLI, R. R.; BACHMANN, M. F. Secretory phospholipase A2-IIID is a effector molecule of CD4+ CD25+ regulatory T cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2009.

WILLIAMS, M. A.; SOLOMKIN, J. S. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. **J Leukoc Biol.**, 65(6):725-36. Erratum in: J Leukoc Biol. 66(1):194, 1999.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. **J Exp Med.**, 1;156(4):1149-64, 1982.

XAVIER, R. M. Influência de processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. **Rev. Bras. Reumatologia.**, 48:17-24, 2008.

YEDOVITZKY M, MOCHLY-ROSEN D, JOHNSON JA, GRAY MO, RON D, ABRAMOVITCHI E, CERASI E, NESHER R. Translocation inhibitors define specificity of PKC isoenzymes in pancreatic β cells. **J. Biol. Chem.**, 272:1417-1420, 1997.

YU, W.; BOZZA, P.T.; TZIZIK, D.M.; GRAY, J.P. CASSARA, J.; DVORAK, A.M.; WELLER, PF. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. **Am. J. Pathol.**, 152:759-69, 1998.

ZAMUNÉR, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MUSCARÁ, M.N; TEIXEIRA, S.A.; TEIXEIRA, C.F.P. - *Bothrops asper* e *Bothrops jaracaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon.**, 39:1505-1513, 2001.

ZAMUNÉR, S.R.; Mecanismos envolvidos no recrutamento e ativação leucocitários e o papel dos neutrófilos nos efeitos locais induzidos pelos venenos das serpentes *Bothrops asper* e *Bothrops jaracaca* e na regeneração após a injeção desses venenos. 109f. tese (Doutorado em Farmacologia) . Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ZHENG, L.; ZOMERDIJK, T.P.L.; VAN DER BARSELAAR, M.T.; GEERTSMA, M.F.; VAN FURTH, R.; NIBBERING, P.H. - Arachidonic acid, but not its metabolites, is essential for FcγR-stimulated intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by human monocyte. **Immunology.**, 96: 90-97, 1999.

ZHU, T.;GOH EL.; GRAICHEN, R.;LING, L.; LOBIE, P.E. Signal transduction via the growth hormone receptor. **Cell Signal.**, 13:599-616, 2001.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIERREZ,J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 secretory phospholipases A2: Role of catalytic activity. **Toxicon.**, 45: 335-346. 2005a.

ZULIANI, J.P.; GUTIERREZ,J.M.; CASAIS E SILVA, L.L; SAMPAIO, S.C.; TEIXEIRA, C.F.P. Activation of cellular functions in macrphages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 Phospholipases A2. **Toxicon.**, 46: 523-32. 2005b.

8. ANEXOS

8.1 - Soluções Utilizadas

Meio de cultura RPMI pH 7,2 (Solução Estoque)

RPMI-164010,4 g

Hepes 2,383 g (9,9 mM)
Água destilada1000 mL

Solução de RPMI pH 7,2 (Solução de Uso)

Meio RPMI.....90 mL
Soro Fetal Bovino.....10 mL
Gentamicina (100 µg/mL).....100 µL
L-glutamina.....1,0 mL

Solução de Glutamina (2mM) 100X

L-glutamina.....0,292 g (1,998mM)
PBS.....10 mL

Tampão Fosfato-salina (PBS, pH 7,2) 10X

NaH₂PO₄H₂O.....2,03 g (14,71mM)
Na₂HPO₄H₂O.....11,49 g (80,94mM)

NaCl..... 85 g (1,454M)
Água destilada.....1000 mL

Solução de Turk

Cristal violeta0,02 g
Ácido acético glacial.....2 mL
Água destilada.....100 mL

Solução de Tioglicolato (3%)

Tioglicolato.....30 g
Água destilada.....1000 mL

Solução de Azul de Tripán (0,1%) 10X

Azul de Tripán 0,1 g (0,104mM)
Água destilada.....100 mL

Solução de Safranina

Safranina 1%.....1g (2,850mM)

Ácido acético.....100mL

8. 2 - Drogas e reagentes

Acetato de forbol miristato - PMA (Sigma Chemical Company, EUA), Ácido acético glacial (Merck Germany), Azul de tripan (Biotec, Brasil), DMSO (Biotec, Brasil), Gentamicina (Hipolabor), Giensa (Newprov, Brasil), Glicerol (Merck, Germany), Hepes (Sigma Chemical Company, EUA), INF- γ (RD SYSTEMS), L-glutamina (Sigma Chemical Company, EUA), LPS (Sigma Chemical Company, EUA), Metanol (Sigma Chemical Company, EUA), NBT (Sigma Chemical Company, EUA), RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, EUA), Safranina (Sigma Chemical Company, EUA), Soro Fetal Bovino (Cultilab), Staurosporina (Sigma Chemical Company, EUA), Tioglicolato (Merck, Germany), Zymosan (Sigma Chemical Company, EUA).