MÁRCIO HIDEKI MATSUBARA

Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na produção de prostaciclina induzida pela fosfolipase A₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais: repercussão na atividade anti-inflamatória

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

São Paulo
2015

MÁRCIO HIDEKI MATSUBARA

Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na produção de prostaciclina induzida pela fosfolipase A₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais: repercussão na atividade anti-inflamatória

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Matsubara, Márcio Hideki.

Mecanismos moleculares envolvidos na produção de prostaciclina induzida pela fosfolipase A2 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais: repercussão na atividade anti-inflamatória / Márcio Hideki Matsubara. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Mecanismos de ação de venenos e toxinas animais.

Versão do título para o inglês: Molecular mechanisms involved in the prostacyclin release induced by *Crotalus durissus terrificus* phospholipase A2 in endothelial cells: role in anti-inflammatory activity.

1. Veneno de serpentes 2. *Crotalus durissus terrificus* 3. Fosfolipases A2 4. Células endoteliais 5. Prostaciclina 6. Inflamação I. Teixeira, Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB055/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Márcio Hideki Matsubara.

Título da Tese: Mecanismos moleculares envolvidos na produção de prostaciclina induzida pela fosfolipase A2 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais: repercussão na atividade anti-inflamatória.

Orientador(a): Profa. Dra. Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **95** nas fls. **91** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Catarina de Fátima Pereira Teixeira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na produção de prostaciclina induzida pela fosfolipase A2 do veneno de Crotalus durissus terrificus em células endoteliais: repercussão nas atividades antiinflamatórias** do qual participam o(s) alunos **Márcio Hideki Matsubara**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **10.08.2010**, com **validade de 3 anos**.

São Paulo, 10 de agosto de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

INSTITUTO BUTANTAN

PROTOCOLO (Prot.)
DIVISÃO BIOINDUSTRIAL
SERVIÇO DE CONTROLE DE QUALIDADE
SEÇÃO DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO

DESCRIÇÃO: ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL)	FOLHA 1 DE 1
TÍTULO: TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA – PIROGÊNIO “IN VITRO” (LAL)	IB/Prot./CI/M-007 VERSÃO Nº. 06
IB/POP/CI/M/P-015	

Data Entrada: 04 / 10 / 11

IB/Prot./CI/M-007/LAL 22453 / 11

Data Teste: 13 / 10 / 11

Nº. Registro (NR): 22.453/11

Kit LAL

Endotoxina *E. coli*

Marca: Lonza

Marca: Lonza

Lote nº.: 184467

Lote nº.: 184466

Sensibilidade: 0,125 U/ml

Concentração Utilizada: 2,5 U/ml

Data da reconstituição: 11 / 10 / 11

Data da reconstituição: 30 / 09 / 11

Validade: 31 / 08 / 2013

Validade: 10 / 07 / 2014

Lotes de despirogenização dos materiais utilizados: 28.97/11

Procedência: Laboratório de Farmacologia/Instituto Butantan - Lote: CB, 6,5 ug/ml		
Identificação da amostra	Diluição	Resultado Obtido
Amostra 3	Puro	+ endotoxina → ⊕
U.A.	1:10	+ endotoxina → ⊕
Controle H ₂ O apirrogênica: 1012921	U.A.	+ endotoxina → ⊕
Critérios de validação O teste é considerado válido quando: <ul style="list-style-type: none">- A temperatura do banho-maria manter-se constante a 37 °C ± 1 °C durante todo o ensaio;- O controle negativo (LAL + Água apirrogênica), não apresentar formação de gel;- Os controles positivos (LAL + Produto + endotoxina) e (LAL + Água apirrogênica + endotoxina), apresentarem formação de gel.		

Critérios de validação do ensaio: ☒ Conforme ☐ Não conforme

Observações: 13/10/11

Cálculos: 13/10/11

Resultado: 0,125 U/ml

Analista: Marcia

Data: 13 / 10 / 11

Chefe da Seção de Controle Microbiológico
Chefe de Seção de Controle Microbiológico

Documento válido quando visto e datado no canto direito inferior de cada página pelo responsável do Serviço. 19 / 11 / 11

CÓPIA AUTORIZADA

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta jornada reconheço que contei com a colaboração de muitas pessoas que, de forma direta ou indireta, ajudaram-me em vários momentos para a realização deste trabalho. Assim, quero agradecer de modo sincero as seguintes pessoas e instituições:

À Prof^a. Dr^a. **Catarina de Fátima Pereira Teixeira** do laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, pela orientação, disponibilidade, atenção e dedicação à minha pesquisa. Eu amadureci muito durante minha pós-graduação e devo tudo isso à você. Obrigado! Você sempre será uma referência para minha vida profissional.

À Dra. **Consuelo Latorre Fortes-Dias**, do Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática da Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte-MG) pela amizade, disponibilidade, atenção e pelo fornecimento da subunidade CB de *Crotalus durissus terrificus*. Esta toxina é uma das protagonistas deste trabalho, portanto, sua colaboração foi essencial para este trabalho!

À **Universidade de São Paulo**, ao **Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP)** e principalmente ao **Programa de Pós-graduação em Imunologia e seus docentes** pela minha formação, crescimento profissional e científico. Foi uma honra ter feito parte de um dos melhores programas de Pós-graduação do país.

À minha querida amiga **Maria Eni Sacramento Santos**, secretária da Pós-graduação em Imunologia, que sempre esteve presente e disponível para me ajudar em qualquer situação. Mas queria agradecer mesmo é pela sua amizade. Obrigado!

Ao **Instituto Butantan** e ao **Laboratório de Farmacologia** pela oportunidade de realizar este trabalho em suas dependências. Em especial, quero agradecer à **Unidade de Inflamação** chefiada pela Dra. Catarina Teixeira, pois foi neste laboratório que minha ciência de fato se desenvolveu.

Ao meu amigo **Elbio Leiguez Júnior** que está nessa jornada comigo desde os tempos da faculdade. Obrigado pelas discussões científicas (ou não), conselhos e amizade.

Aos amigos do laboratório de Inflamação: **Vanessa Moreira, Marlos Cortez, Karina Giannotti, Mariana Viana, Cristina Fernandes, Neide Galvão e Renata Hagi**, sempre dispostos a ajudar e melhorar nosso trabalho com muito bom-humor e profissionalismo.

Aos amigos do laboratório de farmacologia, em especial: **Rodrigo Frezzatti, Rafaela Vendrame, Ana Eduarda Zulim, Mariana Trivilin, Eduardo Frare, Renan Volner, Lucas Freitas e Thiago Guardia**.

Aos funcionários do laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan: **Maria Eliza Ferreira, Joana Darc Carvalho Vieira, Antônio de França Fontes, Andréia Souza, Jorge Fernandes** e todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para realização deste trabalho.

Ao **Eduardo Koji Tamura, Marina Marçola** e à **Dr. Regina Pekelmann Markus** que colaboraram muito com este trabalho. Agradeço o aprendizado de isolamento das células endoteliais, a cordialidade que me receberam no IB-USP e as discussões que forneceram ideias que ajudaram a melhorar este trabalho. Sou imensamente grato.

À minha querida mãe, **Aparecida Matsubara**, que sempre foi minha incentivadora incondicional. Se não fosse seu apoio, amor e amizade, não teria chegado até aqui. Obrigado por sempre ter acreditado nos meus sonhos. Dedico à você este trabalho. Te amo!

À minhas irmãs, **Patrícia Matsubara** e **Elaine Matsubara** que também torceram e me incentivaram sempre! Amo vocês!

À **Marcela Lins Ferri**, minha futura esposa (assim espero... haha!), pelo companheirismo, incentivo, paciência e amor! Ter você ao meu lado foi fundamental durante essa jornada. Te amo!

Às funcionárias da Biblioteca do ICB-USP, **Tereza Soutto Mayor, Renata Maria dos Santos e Rosa Miamoto Imura**, pelas correções da tese e pelo excelente atendimento.

Aos pesquisadores **Ana Paula Lepique, Niels Olsen Câmara** e **Heraldo Possolo de Souza** pela participação, críticas e sugestões na minha banca de qualificação do Doutorado. O conhecimento de vocês contribuiu para o enriquecimento deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela minha bolsa de Doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de Doutorado (processo nº 2010/08506-2) e pela reserva técnica, que auxiliou financeiramente o desenvolvimento deste trabalho.

Ao santo padroeiro da minha pesquisa, **Santo Expedito**, sempre intercedeu ao meu favor quando precisei. Sou muito grato.

“A dúvida é o princípio da sabedoria”.

(Aristóteles)

RESUMO

MATSUBARA, M. H. Mecanismos moleculares envolvidos na produção de prostaciclina induzida pela fosfolipase A₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais: repercussão na atividade anti-inflamatória. 2015. 154 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste estudo foram avaliados os efeitos da subunidade CB, uma fosfolipase A₂ (FLA₂) isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em células endoteliais de microcirculação de ratos, em cultura, quanto: 1) à biossíntese de prostaciclina e mecanismos envolvidos e 2) aos mecanismos inibitórios sobre moléculas de adesão. Quanto à biossíntese de prostaciclina, foram investigados: *i*) a participação das ciclooxigenases-1 e -2 (COX-1 e COX-2), da prostaciclina sintase (PGIS) e do fator de transcrição NF-κB e *ii*) a participação das proteínas quinases p38^{MAPK} MEK1/2, ERK1/2, JNK, das FLA₂ intracelulares citosólica (cFLA₂) e independente de cálcio (iFLA₂), do receptor IP da PGI₂, adenilato ciclase e PKA. Os resultados mostraram que a inibição farmacológica da COX-1 e PGIS, mas não de COX-2, ou do NF-κB, reduziu o efeito estimulatório da subunidade CB sobre a biossíntese de PGI₂. As proteínas MEK1/2 e ERK1/2, mas não p38^{MAPK} ou JNK, são relevantes para este efeito. Ainda, a cFLA₂, mas não a iFLA₂ é essencial para a produção de PGI₂. A inibição do receptor IP, da adenilato ciclase, ou da PKA, não modificaram a liberação de PGI₂ induzida pela CB. Ainda, a subunidade CB não alterou os níveis basais de COX-1 e não induziu a expressão de COX-2, porém, aumentou o teor proteico da PGIS. Quanto à ação inibitória da CB, em células endoteliais, foram avaliados: *i*) os efeitos na expressão proteica das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e PECAM-1 e expressão gênica de VCAM-1 e ICAM-1, induzidas por LPS; *ii*) a participação dos receptores PPAR (isoformas alfa, beta/delta e gama), do receptor IP, da adenilato ciclase, PKA e da prostaciclina no efeito inibitório da CB sobre a expressão das moléculas de adesão e *iii*) os efeitos na expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IL-6, induzida pelo LPS. Os resultados demonstraram que a CB inibiu a expressão proteica de ICAM-1 e VCAM-1, mas não de PECAM-1, induzida pelo LPS. A CB reduziu a transcrição gênica das ICAM-1 e VCAM-1, e este deve ser um dos mecanismos da inibição da expressão proteica destas moléculas. A inibição farmacológica do PPAR mostrou que as isoformas alfa e beta/delta, mas não gama, são relevantes para o efeito da CB na expressão de ICAM-1. Quanto à VCAM-1, nenhuma isoforma do PPAR está envolvida. Ainda, a via autócrina da prostaciclina (receptor IP, adenilato ciclase e PKA) está envolvida no efeito inibitório da CB, mas apenas para molécula ICAM-1. A inibição da PGIS reverteu o efeito

inibitório da CB sobre a expressão de ICAM-1, mas não VCAM-1, indicando a importância da PGI_2 para a atividade anti-inflamatória da CB no endotélio. Adicionalmente, a CB inibiu a transcrição gênica das citocinas inflamatórias TNF-alfa e IL-6, induzida pelo LPS. Este efeito deve contribuir para a atividade inibitória sobre a expressão de ICAM-1 e VCAM-1. Este estudo evidenciou a participação de importantes vias na ação inibitória da FLA_2 crotálica em um evento fundamental da resposta inflamatória e trouxe a melhor compreensão das atividades biológicas desencadeadas por este componente do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em células endoteliais.

Palavras-chave: Veneno de serpente. *Crotalus durissus terrificus*. Fosfolipase A_2 . Células endoteliais. Prostaciclina. Inflamação.

ABSTRACT

MATSUBARA, M. H. Molecular mechanisms involved in the prostacyclin release induced by *Crotalus durissus terrificus* phospholipase A₂ in endothelial cells: role in anti-inflammatory activity. 2015. 154 p. Ph. D. Thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In this study the effect of CB subunit, a phospholipase A₂ (PLA₂) isolated from *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) snake venom, in cultured endothelial cells was investigated, with focus on: i) biosynthesis of prostacyclin (PGI₂) and related mechanisms, and ii) inhibitory mechanisms on expression of ICAM-1, VCAM-1 and PECAM-1 adhesion molecules. Results showed that cyclooxygenase-1 (COX-1), PGI₂ synthase (PGIS), cytosolic PLA₂, ERK1/2 and MEK1/2, but not cyclooxygenase-2 (COX-2), NF-κB transcription factor, p38^{MAPK}, JNK, calcium-independent PLA₂, IP receptor, cyclase adenylate nor protein kinase A (PKA), are involved CB-induced PGI₂ biosynthesis. In addition, CB subunit up-regulated PGIS, but not COX-1 nor COX-2 protein levels. Moreover, CB subunit was able to inhibit LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1, but not PECAM-1 protein expression. PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) -α and -β/δ isoforms, IP receptor, cyclase adenylate, PKA and PGI₂, but not PPAR-γ isoform, are essential for CB-induced inhibition of LPS-induced ICAM-1 protein expression. Furthermore, CB inhibited LPS-induced gene expression of ICAM-1, VCAM-1, (tumor necrosis factor-α) TNF-α and interleukin-6 (IL-6). Inhibition of these cytokines by CB may be related to down regulation of both VCAM-1 and ICAM-1 seen in endothelial cells incubated with this venom PLA₂.

Keywords: Snake venom. *Crotalus durissus terrificus*. Phospholipase A₂. Endothelial cells. Prostacyclin. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Caracterização das células endoteliais de cultura primária de microcirculação de ratos.....	41
Figura 2 -	Efeito da subunidade CB em parâmetros de viabilidade celular.....	48
Figura 3 -	Decurso temporal do efeito da subunidade CB na atividade metabólica e na liberação de LDH em células endoteliais.....	49
Figura 4 -	Efeito da subunidade CB na liberação de prostaciclina por células endoteliais.....	51
Figura 5 -	Participação das COX-1, COX-2 e do fator de transcrição NF-kB na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	53
Figura 6 -	Participação da prostaciclina sintase na produção de prostaciclina em células endoteliais	55
Figura 7 -	Efeitos dos inibidores de proteínas quinases na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	57
Figura 8 -	Efeito dos inibidores de fosfolipases intracelulares na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	59
Figura 9 -	Efeitos do tratamento com inibidores da via do receptor IP na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	61
Figura 10 -	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de COX-1 e COX-2 em células endoteliais de cultura primária.....	63
Figura 11 -	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PGIS em células endoteliais	65
Figura 12 -	Efeito do lipopolissacarídeo (LPS) na expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 em células endoteliais	69
Figura 13 -	Efeito inibitório da subunidade CB na expressão proteica de VCAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	70
Figura 14 -	Efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão proteica de VCAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 8 horas.....	71
Figura 15 -	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 18 horas	74

Figura 16 -	Efeito inibitório da subunidade CB na expressão proteica de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 8 horas.....	75
Figura 17 -	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PECAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 18 horas.....	78
Figura 18 -	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PECAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 8 horas.....	79
Figura 19 -	Participação dos receptores PPAR no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	82
Figura 20 -	Participação dos receptores PPAR no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	86
Figura 21 -	Papel do receptor IP de prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	91
Figura 22 -	Papel da adenilato ciclase na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	92
Figura 23 -	Papel da proteína quinase A na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS.....	93
Figura 24 -	Papel do receptor IP de prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS.....	97
Figura 25 -	Papel da adenilato ciclase na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS.....	98
Figura 26 -	Papel da proteína quinase A na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	99
Figura 27 -	Efeito da subunidade CB na produção de AMP cíclico e de prostaciclina após 2 horas de incubação com as células endoteliais.....	101
Figura 28 -	Papel da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS.....	104
Figura 29 -	Papel da prostaciclina no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS.....	107
Figura 30 -	Eficácia do inibidor da prostaciclina sintase (tranilcipromina) sobre síntese de prostaciclina células endoteliais.....	108

Figura 31 -	Avaliação da transcrição gênica nos efeitos inibitórios da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 induzida pelo LPS.....	110
Figura 32 -	Efeito da subunidade CB na expressão gênica das citocinas inflamatórias TNF-alfa e IL-6 induzida pelo LPS.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais características das fosfolipases A₂ agrupadas de acordo com a classificação de SIX; DENNIS, 2000; ABE et al., 1998 e HIRAOKA et al., 2002.....	27
--	-----------

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGNIFICADOS

AA	ácido araquidônico
AC	adenilato ciclase
BEL	bromoeno lactona (inibidor da fosfolipase A ₂ independente de cálcio)
CA	componente ácido ou crotoxina ácida (crotapotina)
CB	componente básico ou crotoxina básica (fosfolipase A ₂)
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
CAY10441	antagonista do receptor IP
CE	célula endotelial
cFLA₂	fosfolipase A ₂ citosólica
COX	ciclooxigenase
CTX	crotoxina
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamina tetra-acético
EIA	ensaio imunoenzimático
E.P.M.	erro padrão médio
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i> (quinases reguladas por sinais extracelulares) (membro da família MAPK)
FLA₂	fosfolipase A ₂
GSK0660	inibidor da isoforma beta/delta do receptor PPAR
GW6471	inibidor da isoforma alfa do receptor PPAR
GW9662	inibidor da isoforma gama do receptor PPAR
H-89	inibidor da PKA
iFLA₂	fosfolipase A ₂ independente de cálcio
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-6	interleucina-6
IP	<i>prostaglandin I₂ receptor</i> (receptor de prostaglandina I ₂)
JNK	c-jun N-terminal kinases (membro da família MAPK)
LDH	lactato desidrogenase
LPS	lipopolissacarídeo
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i> (proteína quinase ativada por mitógenos)
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium

NF-kB	<i>nuclear fator kappa B</i> (fator nuclear kapa B)
NS-398	inibidor da COX-2
P38^{MAPK}	<i>P38 mitogen-activated protein kinases</i> (membro da família MAPK)
PD98059	inibidor da ERK1/2
PECAM-1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PGI₂	prostaciclina ou prostaglandina I ₂
PGIS	prostaciclina sintase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> (receptor ativado por proliferadores de peroxissomos)
PKA	<i>protein kinase A</i>
PYR-2	pirrolidina-2 (inibidor da fosfolipase A ₂ citosólica)
SB202190	inibidor da p38 ^{MAPK}
SFB	soro fetal bovino
sFLA₂	fosfolipase A ₂ secretada
SN50	inibidor do fator de transcrição NF-kB
SQ22536	inibidor da adenilato ciclase
TCP	tranilcipromina
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i> (fator de necrose tumoral)
TPCK	inibidor do fator de transcrição NF-kB
U0126	Inibidor da MEK1/2
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VCdt	veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
VSA	valeril salicilato
vWF	<i>von Willebrand fator</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Veneno e toxinas de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	21
1.2 Fosfolipases A ₂ (FLA ₂ s).....	25
1.2.1 Características Gerais.....	25
1.2.2 FLA ₂ s e Eicosanoides: Papel na Inflamação.....	28
1.3 Biossíntese de Prostaciclina (PGI ₂) - Ciclooxigenases, Prostaciclina Sintase e MAPKs.....	30
1.4 Células Endoteliais: Papel na Inflamação.....	33
2 OBJETIVOS.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Fosfolipase A ₂ isolada da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	39
3.2 Células endoteliais (CEs).....	39
3.2.1 Isolamento das células endoteliais.....	39
3.2.2 Caracterização das células endoteliais.....	39
3.2.2 Subcultivo das células endoteliais e preparação das amostras.....	40
3.3 Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal.....	42
3.4 Determinação do metabolismo celular como parâmetro de viabilidade celular: redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT).....	42
3.5 Ensaio para avaliação de alterações de membrana celular como parâmetro de viabilidade celular: análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH).....	42
3.6 Ensaio para análise da integridade das monocamadas de células endoteliais.....	42
3.7 Tratamento com inibidores ou antagonistas específicos.....	43
3.8 Determinação da concentração de PGI ₂ por ensaio imunoenzimático específico (EIA).....	44

3.9	Análise por <i>Western Blotting</i>.....	44
3.10	Análise da expressão proteica das moléculas de adesão endoteliais pela técnica de citometria de fluxo.....	44
3.11	Determinação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) via transcrição gênica em tempo real.....	45
3.12	Análise estatística.....	46
4	RESULTADOS.....	47
4.1	Efeitos da subunidade CB em parâmetros de viabilidade celular.....	47
4.2	Efeito da subunidade CB na liberação de prostaciclina por células endoteliais.....	50
4.3	Efeito do tratamento com inibidores de proteínas quinases na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	52
4.4	Efeito do tratamento com inibidores de fosfolipases intracelulares na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	54
4.5	Efeito do tratamento com inibidores de ciclooxigenases e do fator de transcrição NF-kB na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	56
4.6	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de ciclooxigenases em células endoteliais.....	58
4.7	Participação da prostaciclina sintase (PGIS) na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	60
4.8	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PGIS em células endoteliais.....	62
4.9	Efeito do tratamento com inibidores da via do receptor IP na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais.....	64
4.10	Efeito inibitório da subunidade CB na expressão proteica de VCAM-1 (CD106) estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	66
4.11	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de ICAM-1 (CD54) estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	72
4.12	Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PECAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais.....	76
4.13	Participação dos receptores PPAR na atividade inibitória da subunidade	80

CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS.....	
4.14 Participação dos receptores PPAR na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS.....	84
4.15 Participação da via de sinalização autócrina da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS.....	88
4.16 Participação da via de sinalização autócrina da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS.....	94
4.17 Efeito da subunidade CB na produção de AMP cíclico e de prostaciclina após 2 horas de incubação com as células endoteliais.....	100
4.18 Participação da prostaciclina sintase na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS.....	102
4.19 Participação da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS.....	105
4.20 Avaliação da transcrição gênica nos efeitos inibitórios da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 induzida pelo LPS.....	109
4.21 Efeito da subunidade CB sobre a expressão gênica de citocinas inflamatórias TNF-alfa e IL-6 induzida pelo LPS.....	111
5 DISCUSSÃO.....	113
6 CONCLUSÕES.....	129
BIBLIOGRAFIA.....	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 Veneno e toxinas de *Crotalus durissus terrificus*

A fauna ofídica, de interesse médico no Brasil, está representada por três famílias: família Viperidae, à qual pertencem os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, a família Elapidae, representada pelo gênero *Micrurus* e a família Colubridae, representada pelas serpentes do gênero *Philodryas* e *Clélia* (AZEVEVEDO-MARQUES, 2003; FUNASA, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). No país, existem aproximadamente 260 espécies de serpentes catalogadas, e destas, apenas 69 espécies são consideradas peçonhentas (FEITOSA et al., 1997; PINHO et al., 2000). Devido ao alto índice de acidentes ofídicos no Brasil, o envenenamento ofídico é considerado um problema de saúde pública.

De acordo com os dados acessados no endereço eletrônico do SINAN (Sistema de Informação de Agravo de Notificação), durante o período compreendido entre 2013-2015, ocorreram 53.486 acidentes ofídicos no Brasil. Apesar das serpentes do gênero *Bothrops* serem responsáveis por 38.084 desses acidentes (71,2% do total), o índice de letalidade dessas serpentes é de apenas 0,41%. O gênero *Crotalus*, nesse mesmo período, foi responsável por 3.715 acidentes ofídicos (6,94% do total), porém, com índice de letalidade significativamente maior (0,75%). Por outro lado, as médias históricas dos acidentes causados pelo gênero *Crotalus* apresentam índices ainda mais elevados no país. Os levantamentos do Ministério da Saúde (1999) e da Funasa (2001) demonstraram que as serpentes do gênero *Crotalus* são causadoras de aproximadamente 7,7% dos acidentes ofídicos no Brasil, destacando-se das demais, por causarem acidentes com o maior índice de letalidade (1,87%).

No Brasil, o gênero *Crotalus* inclui as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis e são representadas, predominantemente, pela serpente *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e algumas áreas de Mato Grosso, Rondônia e Pará. Os envenenamentos causados por estas serpentes são caracterizados por três atividades de importância clínica: neurotóxica, miotóxica e coagulante (AZEVEVEDO-MARQUES, 2003; ROSENFELD, 1971). O quadro clínico do acidente crotálico caracteriza-se por manifestações sistêmicas, visto que os sintomas locais são pouco expressivos, com pouca ou ausência de dor, edema discreto e, raramente, eritema (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

No que se refere às manifestações sistêmicas, o quadro neuromuscular aparece precocemente, caracterizando-se por ptose palpebral, diplopia, oftalmoplegia e flacidez da

musculatura da face - *facies neurotóxica* - (ROSENFELD, 1971). Ainda, ocorrem manifestações miotóxicas, evidenciadas por mialgia intensa e rabdomiólise generalizada, que levam ao aumento das enzimas musculares no soro e à mioglobinúria (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985, 1987, 2003; CUPO et al., 1990). Estes efeitos, associados a fatores como a desidratação e hipotensão arterial, contribuem para a instalação de insuficiência renal aguda (PINHO et al., 2000; ROSENFELD, 1971). Além disso, as alterações da coagulação sanguínea são relevantes e foram observadas em 50% dos pacientes atendidos no hospital Vital Brazil, no período de 1974 a 1990 (JORGE; RIBEIRO, 1992). Nestes, foram observados incoagulabilidade sanguínea ou aumento no tempo de coagulação, resultante do consumo de fibrinogênio, promovido por uma enzima trombina-símile, presente no veneno (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003).

A partir de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, foi demonstrado que o veneno crotálico inibe funções de macrófagos, a migração celular para o foco inflamatório, edema de pata em camundongos e síntese de imunoglobulina G (IgG), além de induzir efeitos microbicida e analgésico (BRIGATTE et al., 2001; CARDOSO; MOTA, 1997; GIORGI et al., 1993; NUNES et al., 2007; PICOLO et al., 2000; SAMPAIO et al., 2001; SOUSA-e-SILVA et al., 1996). De modo geral, as atividades biológicas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, observadas em modelos experimentais e no envenenamento, são de caráter sistêmico. Neste contexto, chama a atenção o fato de não existirem na literatura, estudos específicos sobre as atividades do VCdt e/ou de seus componentes isolados em células endoteliais. Este tipo celular constituiu a camada de revestimento interno dos vasos sanguíneos, conhecida também como endotélio. Estudos neste sentido são relevantes, uma vez que o endotélio é um tecido metabolicamente ativo, com função protetora do sistema cardiovascular, que possui papel fundamental na manutenção da função circulatória, através do controle de parâmetros fisiológicos, como a coagulação, a permeabilidade e o tônus vascular.

As ações biológicas causadas pelo veneno da cascavel sul-americana são atribuídas às ações de várias toxinas: crotamina, convulxina, giroxina e crotoxina, sendo que esta última representa cerca de 65% do veneno total. Além destes componentes, o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) contém peptídeos e enzimas, como a L-aminooxidase, enzima trombina-símile, fosfodiesterases, atividade de caliceína do tipo tissular e NAD-hidrolase, que desencadeiam importantes efeitos bioquímicos, farmacológicos, tóxicos e imunológicos (BERCOVICI, 1987).

A crotamina é um polipeptídeo básico, composto de 42 aminoácidos unidos por 3 pontes dissulfídicas e massa molecular de 4,8 kDa (MOURA-GONÇALVES; ARANTES, 1956). Esta toxina pertence à família das SBPM (*Small Basic Polypeptide Myotoxins*), as quais possuem a

capacidade de penetração intracelular, através de mecanismos independentes de gasto energético, por interação com proteoglicanos, como o sulfato de heparan (HAYASHI et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2007; OGUIURA et al., 2005). A injeção intraperitoneal desta toxina, em camundongos, causa paralisia e extensão das patas posteriores, podendo o animal se restabelecer desta incapacidade ou evoluir para a morte, devido à paralisia respiratória (MOUSSATCHÉ; DUARTE-VIEIRA, 1953). A crotamina é geralmente encontrada nos venenos de cascavéis do Brasil e da Argentina (MOURA-GONÇALVES; ARANTES, 1956). De outra parte, a convulxina é uma glicoproteína que representa cerca de 5% do peso do veneno, apresenta massa molecular em torno de 68 kDa, sendo constituída por estruturas heterodiméricas associadas por pontes dissulfídicas (BERCOVICI, 1987; MARLAS, 1985). Sua ação letal depende da via de inoculação, sendo extremamente tóxica quando injetada pela via intravenosa (PRADO-FRANCESCHI; VITAL-BRAZIL, 1981). Esta toxina é capaz de agregar e lisar plaquetas, ligando-se, com alta afinidade, a um pequeno número de sítios plaquetários, por mecanismo dependente de íons cálcio, fibrinogênio, adenosina difosfato, tirosina quinase e da fosfolipase C gama-2 (FRANCISCHETTI et al., 1997; SANO-MARTINS; DAIMON, 1992). A giroxina, isolada por Barrio (1961), é um componente tóxico, não-letal do veneno crotálico, que age sobre o sistema nervoso central, causando a síndrome da lesão labiríntica em camundongos e provocando movimentos circulatorios do corpo, ao longo do eixo longitudinal. Esta toxina apresenta massa molecular que varia entre 33 e 35 kDa, tem ação coagulante sobre o fibrinogênio em plasma de mamíferos e exerce atividade do tipo-trombina (SEKI et al., 1980).

A crotoxina (CTX) é o componente majoritário do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e constitui 65% do seu peso total. O seu isolamento foi descrito por Slotta e Fraenkel-Conrat, em 1938. A CTX é um heterodímero; uma de suas subunidades, de interesse neste estudo, é composta por uma fosfolipase A₂ alcalina, com atividade enzimática elevada porém, pouco tóxica, denominada crotoxina básica (ou subunidade CB) e a outra subunidade, por um polipeptídeo de caráter ácido, desprovido de atividade enzimática, conhecida como crotapotina ou crotoxina ácida (CA) (BON, 1988; BREITHAUPT, 1976; HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971; RÜBSAMEN et al., 1971).

A subunidade CA é composta por três cadeias peptídicas (A, B e C), unidas por sete pontes dissulfeto, constituídas de 40, 34 e 14 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Esta subunidade é gerada a partir do mesmo precursor fosfolipásico formador da subunidade CB, sendo denominada, neste estágio, de pro-CA. Acredita-se que o RNA mensageiro, codificante para cada uma das subunidades da CTX, seja resultante de um *splicing* alternativo, a partir de um único gene (BOUCHIER et al., 1991; BREITHAUPT et al., 1974). A subunidade CB, pertence

ao grupo das β -neurotoxinas e é responsável pela atividade enzimática da crotoxina (AIRD et al., 1986; RÜBSAMEN et al., 1971). Esta subunidade possui massa molecular de 14 kDa e consiste em uma cadeia polipeptídica, de 123 aminoácidos, que formam estruturas globulares, unidas por sete pontes dissulfeto (AIRD et al., 1986; FRAENKEL-CONRAT et al., 1980). A CB é classificada como uma miotoxina com propriedade neurotóxica e estrutura de fosfolipase A₂ (LOMONTE et al., 2003).

As subunidades CA e CB associam-se espontaneamente, de modo não covalente, na proporção 1:1, formando o complexo CTX em sua forma nativa, com elevado poder letal (BREITHAUPT, 1976). Várias isoformas das subunidades CA e CB foram descritas e atribuídas a modificações pós-traducionais ou à expressão de diferentes RNA mensageiros (FAURE et al., 1991, 1994; HERNANDEZ-OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2002; TOYAMA et al., 2003). Desse modo, acredita-se que associações aleatórias, de isoformas dessas subunidades, originem as diferentes isoformas descritas de CTX (FAURE et al., 1987, 1991, 1994). A literatura mostra, ainda, que os componentes formadores da CTX se dissociam logo após a sua interação com alguns tipos de membranas biológicas: a CB liga-se à membrana e desencadeia o efeito e a CA, desprovida de atividade farmacológica, é liberada do complexo (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978). A subunidade fosfolipásica (CB) pode ligar-se, de maneira inespecífica, a membranas de vários tipos de células, enquanto o componente não tóxico, CA, comporta-se como um direcionador (chaperona), que evita a ligação inespecífica do componente CB, conferindo-lhe habilidade para interagir com sítios específicos e exercer a sua ação farmacológica (BON et al., 1989; HABERMANN; BREITHAUPT, 1978). Quando a CB encontra-se associada à CA, a sua atividade hidrolítica é reduzida, porém, as atividades neurotóxica e miotóxica são potencializadas (BON, 1982, 1989; MARLAS; KOUYOUMDJIAN et al., 1986).

No que diz respeito à ação biológica, o complexo crotoxina é uma neurotoxina de ação pré-sináptica, que inibe a liberação de acetilcolina em junções neuro-musculares (BON et al., 1989). Apesar do efeito letal desta toxina ser atribuído ao bloqueio pré-sináptico, foi demonstrado que a mesma diminui a resposta à acetilcolina por inibir a despolarização causada por agonistas colinérgicos (VITAL BRAZIL, 1966). A subunidade CB, quando isolada, tem ação pré-sináptica na junção neuromuscular e provoca efeito semelhante ao da crotoxina, embora requeira uma maior concentração para produzir o mesmo efeito (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978). Além da ação neurotóxica, tanto a crotoxina, quanto a fração CB, são miotóxicas e acarretam aumento dos níveis de creatino quinase (CK) no soro (KOUYOUMDJIAN et al., 1986; SALVINI et al., 2001). Além destas atividades, a fração CB

exerce efeitos anticoagulante, bactericida e edematogênico (KOUYOUUMDJIAN et al., 1986; VERHEIJ et al., 1980). Algumas destas ações, como a miotoxicidade e a atividade anticoagulante, são dependentes da atividade enzimática da subunidade CB (SOARES et al., 2001). Por sua vez, o componente não-enzimático da crotoxina, a subunidade CA, quando isolada, é capaz de inibir a resposta edematogênica em ratos (LANDUCCI et al., 1995, 2000).

Em adição, foi demonstrado que a CTX, quando injetada pela via subcutânea, induz neutrofilia pronunciada, aumento do nível de corticosterona e da citocina IL-10, além da diminuição de linfócitos e monócitos circulantes (CARDOSO et al., 2001). No entanto, a real participação da subunidade CB nos efeitos inibitórios da CTX e os mecanismos de ação desta fosfolipase A₂ não foram investigados.

1.2 Fosfolipases A₂ (FLA₂s)

1.2.1 Características Gerais

As fosfolipases compreendem uma ampla família de enzimas (FLA₁, A₂, B, C e D) que catalisam a hidrólise de fosfolípidios em quatro posições diferentes e liberam ácidos graxos (BROWN et al., 2003; GUTIERREZ; LOMONTE, 1997; MURAKAMI et al., 2011). As fosfolipases A₂ catalisam a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de fosfolípidios. A reação de hidrólise é dependente de íons cálcio, sendo a unidade catalítica formada pelos aminoácidos His48, Asp99 e uma molécula de água (DENNIS, 1994; YU et al., 1990). Os produtos gerados da catálise por estas enzimas são ácidos graxos livres, como o ácido oleico e o ácido araquidônico (AA), precursor de um grupo importante de segundos mensageiros lipídicos, os eicosanoides, que incluem as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. Ainda, as FLA₂s geram o liso-PAF, precursor do fator ativador de plaquetas (PAF). Os derivados do ácido araquidônico e o PAF são mediadores de diversos fenômenos fisiológicos e patológicos (LENNARTZ, 1999; MURAKAMI et al., 1995; VISHWANATH et al., 1987). Dessa forma, foi atribuído um papel fisiológico relevante às FLA₂, na manutenção da homeostasia celular e remodelagem de membranas.

A superfamília das FLA₂s compreende as fosfolipases A₂ secretadas (presentes no veneno de abelhas, vespas e serpentes) e as fosfolipases A₂ intracelulares, que são subdivididas em 4 tipos, a saber: fosfolipase citosólica (cFLA₂), independente de Ca⁺² (iFLA₂), acetil-hidrolase do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e fosfolipase lisossômica (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Recentemente, as FLA₂s foram divididas em 15 grupos, com diversos

subgrupos, de acordo com cinco critérios físico-químicos: i) localização celular, ii) sequência de aminoácidos, iii) peso molecular, iv) presença de pontes dissulfeto intramoleculares e v) necessidade de cálcio para a atividade enzimática. As características das enzimas de cada grupo estão apresentadas, resumidamente, na **Tabela 1** (BROWN et al., 2003; DAVIDSON; DENNIS, 1990; HEINRIKSON et al., 1977; RIZZO et al., 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; SIX; DENNIS, 2000).

Os grupos mais estudados são: II, IV, VI, VII e VIII. O grupo II, de interesse neste estudo, será mais bem detalhado adiante, sendo que os demais grupos terão suas características gerais descritas a seguir: O grupo IV compreende as FLA₂s citosólicas, que são enzimas de alto peso molecular (61 a 114 kDa) e encontradas na fração citosólica de diversos tipos celulares. Estas FLA₂s apresentam resíduos de serina (Ser228 e Ser549) no sítio catalítico e expressam atividade enzimática na presença de concentrações mínimas de íons cálcio. Este íon é importante para a translocação da enzima para as membranas intracelulares (EVANS et al., 2001, 2004; HIRABAYASHI et al., 1999; PETERS-GOLDEN et al., 1996).

Dentre as FLA₂ citosólicas, são conhecidas seis isoenzimas: α , β , γ , δ , ϵ e ζ , sendo que a cFLA₂ α é a mais estudada e expressa constitutivamente em muitos tipos celulares e tecidos. (HERBERT et al., 2009; MURAKAMI et al., 2011; MURAKAMI; KUDO, 2000). As FLA₂ independentes de Ca²⁺ (iFLA₂) pertencem ao grupo VI e contêm cerca de 120 aminoácidos (84 a 90 kDa). As enzimas deste grupo estão localizadas intracelularmente e não dependem do cálcio para exercerem atividade catalítica. São conhecidas pelo menos seis isoenzimas da iFLA₂ (β , γ , δ , ϵ , ζ e η), além de algumas variantes originadas por *splicing* alternativo (JENKINS et al., 2004; MURAKAMI et al., 2011; SIX; DENNIS, 2000). As funções fisiológicas exercidas por estas enzimas estão relacionadas, principalmente, ao fornecimento de ácido araquidônico para a remodelagem e a manutenção de membranas celulares. Contudo, dados recentes indicam, ainda, a sua participação na síntese de eicosanoides, durante a apoptose e no *clearence* de células apoptóticas pelos macrófagos (ATSUMI et al., 2000; MURAKAMI et al., 2005; PÉREZ et al., 2004, 2006; RICKARD et al., 2005; WINSTEAD et al., 2000).

As FLA₂s dos Grupos VII e VIII compreendem enzimas com 26 a 45 kDa e são do tipo secretada e citosólica, respectivamente. Estas FLA₂ são denominadas de PAF acetil-hidrolases (PAF-AH) e catalisam a hidrólise na posição *sn*-2 do PAF e de outros fosfolipídios pró-inflamatórios. Quatro isoformas distintas desta enzima foram caracterizadas: isoformas Ia, Ib, II e eritrocitária. As PAF-AHs foram identificadas no plasma humano e no tecido cerebral bovino (CHAKRABORTI, 2003; MURAKAMI et al., 1997).

Tabela 1. Principais características das fosfolipases A₂ agrupadas de acordo com a classificação de ABE et al., 1998; HIRAOKA et al., 2002; SIX; DENNIS, 2000.

GRUPOS	Fontes	Nomes Alternativos	Tamanho (kDa)	Dependência de Cálcio
I	Serpentes da família Elapidae; Hidrophiidae (IA); pâncreas de mamíferos (IB)	sFLA ₂	13-15	dependente
II	Serpentes da família Viperidae (subfamílias Viperinae e Crotalidae); fluido sinovial e exsudato inflamatório de humanos; plaquetas e mastócitos	sFLA ₂	14-18	dependente
III	Águas-vivas; venenos de abelhas; escorpiões; lagartos do gênero <i>Eloderma</i> sp.	sFLA ₂	15-18	dependente
IV	Citosol de plaquetas e de monócitos; rim	cFLA ₂	61-114	concentrações mínimas
V	Macrófagos do coração e pulmão de mamíferos	sFLA ₂	14	dependente
VI	Linfócitos B humanos; músculo esquelético e coração humano	iFLA ₂	84-90	independente
VII/VIII	Circulação sanguínea de mamíferos e cérebro de bovinos	PAF acetil-hidrolase	26-45	independente
IX	Veneno de <i>Conus magus</i>	sFLA ₂ /conodipina M	14	dependente
X	Leucócitos, fígado, timo e células endoteliais alveolares de humanos	sFLA ₂	14	dependente
XI	Plantas	sFLA ₂	12,4-12,9	dependente
XIII e XIV	Alguns tipos de parvovírus e no fungo <i>Streptomyces</i> , respectivamente	sFLA ₂	12-19	dependente
XV	Células bovinas, murinas e humanas	LFLA ₂	45	independente

Finalmente, as fosfolipases do grupo II (subgrupos A, B e C), também conhecidas como secretadas (sFLA₂), compreendem o grupo de enzimas mais amplamente estudado. As fosfolipases secretadas possuem características relevantes, que estão conservadas neste grupo, tais como o baixo peso molecular (14 a 18 kDa), a termoestabilidade, a presença de uma alfa-hélice anfipática amino-terminal, uma alça de ligação ao cálcio, além de um grande número de pontes dissulfídicas intramoleculares (MUKHERJEE et al., 1994; RIZZO et al., 2000). As enzimas classificadas no subgrupo IIA são encontradas em abundância em venenos de serpentes da família Viperidae. Neste subgrupo também estão agrupadas as fosfolipases A₂ secretadas humanas, presentes no fluido sinovial e em exsudatos inflamatórios. Neste sentido, a literatura mostra que as FLA₂s de venenos apresentam homologia funcional e estrutural com as de mamíferos, do mesmo grupo (SCOTT et al., 1990; HEINRIKSON et al., 1977; LOMONTE et al., 2009). As FLA₂s do grupo IIA, V e X de mamíferos, estão implicadas em diversas patologias

de origem inflamatória, como a síndrome do desconforto respiratório no adulto, o choque séptico, a pancreatite aguda, doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, doença de Crohn e colite ulcerativa, além da asma brônquica, rinite alérgica e aterosclerose. O envolvimento das fosfolipases A_2 do Grupo IIA, no processo inflamatório da artrite reumatoide, asma e aterosclerose, está bem estabelecido (CHILTON et al., 1996; DIVCHEV; SCHIEFFER, 2008; HAAPAMÄKI et al., 1998, 1999; KIM et al., 1995; LIN et al., 1996; SCHRÖDER et al., 1980; STADEL, et al., 1994; VADAS, 1984; VADAS; PRUZANSKI, 1986; WEBB, 2005).

1.2.2 FLA_{2s} e Eicosanoides: Papel na Inflamação

É conhecido que o envolvimento das fosfolipases A_2 no processo inflamatório é devido, principalmente, à biossíntese de importantes mediadores lipídicos, denominados eicosanoides. A liberação de ácido araquidônico pelas FLA_{2s} é o passo inicial para a biossíntese de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas) (FITZPATRICK, 2001; SHIMIZU et al., 2009; SMYTH et al., 2009). Como mencionado anteriormente, estes derivados do ácido araquidônico medeiam uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, via receptores da superfície de células alvo e possuem uma meia vida biológica curta (BREYER et al., 1996; MEAD, 1984). Estes mediadores estão envolvidos em processos de homeostase, proteção gástrica, manutenção da filtração glomerular e balanço hídrico, ovulação, implantação e desenvolvimento embrionário e ativação do trabalho de parto. Também estão envolvidos em processos inflamatórios e modulação de respostas imunológicas (BOS, et al., 2004; HARRIS, et al., 2002; NARUMYIA; FITZGERALD, 2001).

Recentemente, foi demonstrado que os derivados do ácido araquidônico também são responsáveis pela resolução do processo inflamatório (NORRIS et al., 2014; SERHAN; SAVILL, 2005). O início e a fase resolutiva da inflamação são processos sinérgicos e altamente regulados (para revisão, FIERRO et al., 2010; SERHAN; SAVILL, 2005). Estudos recentes mostram que durante a fase inicial do processo inflamatório, as prostaglandinas da série E_2 e D_2 (PGE_2 e PGD_2 , respectivamente), são responsáveis pelas alterações do fluxo sanguíneo e do tônus vascular, que proporcionam a firme adesão e transmigração de leucócitos do sangue para o tecido injuriado. Em paralelo à estes eventos, vias de sinalização são ativadas para regular o processo através da produção de eicosanoides resolutivos. Desse modo, durante a fase resolutiva do processo inflamatório, diversas vias transcricionais são ativadas, no sentido de promover a biossíntese de lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas (para revisão, SERHAN; SAVILL, 2005). As lipoxinas atuam promovendo redução da permeabilidade vascular e diminuição da

entrada de leucócitos no tecido injuriado. Neste caso, em particular, chama atenção o fato de que, tanto os eicosanoides pró-inflamatórios quanto resolutivos, têm o ácido araquidônico (ácido graxo poli-insaturado ômega-6) como substrato comum. Portanto, ambas as fases do processo inflamatório dependem da participação de fosfolipases A₂. Ainda, o papel das FLA₂ se estende ao processo de liberação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ácidos docosahexaenoico e eicosapentaenoico), responsáveis pela biossíntese de resolvinas e protectinas. As resolvinas da série E1, D1 e a neuroprotectina D1 inibem as ações microbidas em leucócitos do exsudato inflamatório (para revisão, SERHAN, 2005, 2008; SERHAN; SAVILL, 2005). Em síntese, estas informações evidenciam que as fosfolipases A₂ representam um importante alvo para investigação, no que se refere ao desenvolvimento e resolução de eventos inflamatórios. Contudo, a participação desta classe de enzima, em eventos resolutivos da inflamação, não está estabelecida.

De outra parte, deve-se ressaltar que o conhecimento do papel resolutivo/anti-inflamatório dos eicosanoides não está restrito à descoberta de novos mediadores lipídicos, mas também ao melhor entendimento do mecanismo de ação de outros prostanoides já conhecidos, como por exemplo, a prostaciclina (PGI₂). Este importante mediador lipídico, produzido principalmente por células endoteliais, ganhou destaque no campo de estudo sobre eicosanoides com ação anti-inflamatória, devido ao detalhamento de sua ação sobre os receptores PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos), que são fatores de transcrição envolvidos na regulação negativa de genes pró-inflamatórios (MORAES et al., 2005). Com base neste conhecimento, é possível sugerir que os efeitos anti-inflamatórios do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, citados anteriormente, possam decorrer da atuação da sua toxina majoritária (subunidade CB -FLA₂) sobre a produção de prostaciclina endotelial. Neste sentido, Zambeli e colaboradores (2008) verificaram que o veneno da serpente sul-americana *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) induz aumento dos eventos de interação leucócito-endotélio, porém, sem promover a diapedese de leucócitos. Como citado anteriormente, grande parte das atividades do complexo CTX, incluindo as ações anti-inflamatórias são atribuídas à subunidade CB. Neste contexto, as evidências da literatura apontam que esta FLA₂ atua inibindo a migração de leucócitos para o foco inflamatório e funções de macrófagos (DONATO et al., 1996; MOUNIER et al., 1996; SAMPAIO et al., 2005, 2010; SOARES et al., 2001; ZAMBELLI et al., 2008). Considerando que não há estudos sobre as vias de sinalização envolvidas na produção de prostaciclina endotelial, induzida por FLA₂s secretadas, como a subunidade CB do veneno de *C. d. terrificus*, e que este veneno atua sistemicamente e deve interagir com o endotélio vascular, os estudos neste sentido são relevantes e poderão contribuir para a compreensão das ações

biológicas exercidas pelas fosfolipases do grupo IIA e para o detalhamento dos mecanismos que resultam na produção deste importante mediador em células endoteliais. Em última análise, este estudo poderá ampliar o conhecimento dos mecanismos relacionados à atividade anti-inflamatória do veneno de *C. d. terrificus* e da crotoxina.

1.3 Biossíntese de Prostaciclina (PGI_2) - Ciclooxigenases, Prostaciclina Sintase e MAPKs

O ácido araquidônico (AA) representa mais de 90% dos ácidos graxos insaturados, presentes em membranas celulares de mamíferos. Este ácido graxo essencial é liberado a partir de fosfolipídeos de membrana, a partir da ação de lipases, principalmente fosfolipases A_2 . Após sua liberação, o AA pode ser processado por vários complexos enzimáticos, que incluem as lipooxigenases (LOX) e as ciclooxigenases (COXs), além do citocromo P450, antes de ser finalmente convertido, por sintases e isomerases terminais, em produtos oxidados de vinte carbonos, coletivamente chamados de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas), que atuam como mediadores de numerosos processos fisiológicos e patológicos (BOGATCHEVA et al., 2005; MORITA et al., 2002; SIMMONS et al., 2004; SMITH; LANGENBACH, 2001).

A síntese de prostaglandina inicia-se pela metabolização do AA pelas COXs, que desempenham suas funções a partir de duas reações enzimáticas subsequentes: uma reação de oxidação que origina a prostaglandina G_2 (PGG_2), seguida de sua peroxidação, com a formação de PGH_2 . A PGH_2 é o substrato para sintases ou isomerases de prostanoides, como a prostaciclina sintase (PGIS), membro da superfamília P450, cuja atividade leva à formação da PGI_2 (MITCHELL et al., 2007; MIYATA et al., 1994). Quanto às ciclooxigenases, até o presente, foram descritas três isoformas, denominadas COX-1, -2 e -3. As duas primeiras isoformas são as mais amplamente estudadas, enquanto a terceira foi mais recentemente descoberta (WARNER; MITCHELL, 2004). Alguns trabalhos sugerem a participação da isoforma COX-3 em processos de dor e febre, porém, ainda não existem dados conclusivos sobre suas atividades e funções (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; KIS et al., 2006; PARK et al., 2006). Alguns autores sugerem, ainda, a existência de uma quarta isoforma (COX-4), que poderia ser induzida pelo diclofenaco, cuja função estaria relacionada à fase de resolução do processo inflamatório. No entanto, a existência da COX-4 ainda é alvo de especulações (BOTTING; AYOUB, 2005). Em relação às isoformas mais bem descritas, a COX-1 é expressa constitutivamente, enquanto a COX-2 é induzida em sítios inflamatórios. Todavia, a COX-2

também é expressa constitutivamente e, neste caso, exerce atividades regulatórias sobre a homeostasia vascular, juntamente com a isoforma COX-1 (WU et al., 2005).

A expressão da COX-2 está relacionada, principalmente, ao fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) (KIS et al., 2006; NARABA et al., 2002). Este fator de transcrição regula numerosos genes de proteínas que participam de processos inflamatórios, sendo considerado um possível alvo na terapêutica anti-inflamatória (BARNES; KARIN; 1997). O NF- κ B consiste de homo ou heterodímeros formados por subunidades polipeptídicas da família NF- κ B/Rel, como a p50, p65, c-Rel e RelB. Este fator de transcrição situa-se no citoplasma, sob a forma de complexo com proteínas inibitórias da família I κ B (LIN et al., 2005; POLIGONE; BALDWIN, 2001). Quando a célula é ativada por uma variedade de estímulos extracelulares, iniciam-se vias de sinalização, através de quinases específicas, que levam à fosforilação das moléculas de I κ B e sua dissociação com o NF- κ B (KARIN; BEN-NERIAH, 2000). Nesta condição, o NF- κ B migra para o núcleo e se liga a elementos responsáveis da região promotora do DNA, ativando a transcrição de diversos genes envolvidos na inflamação, como o da enzima COX-2 (BALDWIN, 2001; DUBOIS et al., 1998; VERMA, 2004; VIATOUR, 2005). As vias de sinalização responsáveis pela fosforilação e desligamento do I κ B, do complexo inativo NF- κ B, são representadas por enzimas da família de I κ B quinase quinase (IKK), que incluem as quinases indutoras de NF- κ B (NIK), quinases ativadoras do NF- κ B (NAK), a proteína C quinase (PKC), a Akt/proteína C quinase, as proteínas relacionadas ao IKK, receptor ativador de NF- κ B e seu ligante (RANK e RANKL), além das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), proteínas quinases ativadas por mitógenos/quinases e reguladas por sinais extracelulares (MEKKs) e fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K) (MARTIN; GILLESPIE, 2001; REDDY et al., 2000). Estas quinases constituem a interface entre o meio externo e a migração do NF- κ B para o compartimento nuclear (ZANDI et al., 1997). Diversas proteínas quinases também estão implicadas na via de transdução de sinal desencadeada pelas fosfolipases A₂. A favor desta informação, alguns autores mostraram que os mecanismos moleculares, responsáveis pela variedade de respostas celulares, ativadas pelas FLA₂ secretadas, envolvem a participação da ERK, PI3K, Akt, MAPK, além da PKC e JNK (*c-jun N-terminal kinase*) (BEK; KEMLER, 2002; CHOI et al., 2004; KINOSHITA et al., 1997; PERRIN-COCON et al., 2004). Neste contexto, também foi demonstrado que algumas FLA₂ secretadas são capazes de ativar vias de sinalização compostas por diferentes proteínas quinases, tais como: p38^{MAPK}, MEK, ERK e JNK para induzir a síntese de eicosanoides, como a prostaciclina (HOULISTON et al., 2001; HOULISTON; WHEELER-JONES, 2001).

Como já mencionado, todas as vias de sinalização celular que envolvem a biossíntese de eicosanoides, estão condicionadas à participação das enzimas terminais tecido-específicas, denominadas sintases. Dentre as sintases envolvidas na formação de prostanoídes, destaca-se a prostaciclina sintase (PGIS), responsável pela formação de prostaciclina (GILROY et al., 2003; LEVY et al., 2001). O fator condicionante que predispõe a atuação da PGI_2 como regulador fisiológico é a ativação de receptores específicos.

Neste contexto, é conhecido que a PGI_2 atua sobre dois tipos de receptores (IP e PPAR), envolvidos na transdução de sinal e no desencadeamento de seus efeitos. Os receptores IP estão acoplados à proteína G e são encontrados em diversos tecidos, incluindo o endotélio. A ativação dos receptores IP leva à ativação da adenilato ciclase, que resulta na formação de AMP cíclico, causando a diminuição do cálcio nas células-alvo, como as células da musculatura lisa de vasos sanguíneos, acarretando relaxamento muscular e consequente vasodilatação (BISHOP-BAILEY; HLA, 1999; FORMAN et al., 1996; KLIOWER et al., 1992). Por outro lado, o receptor PPAR (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos) é um fator de transcrição que pertence à superfamília de receptores nucleares e possui 3 isoformas descritas até o presente (α , β/δ e γ). Quando ativado, tem a capacidade de modular a expressão de genes, por meio da ligação a elementos responsáveis (PPRE), localizados na região promotora dos genes que estão sob o seu comando transcricional. Esta ligação depende da associação do PPAR a outro fator proteico, o ácido 9-*cis* retinoico (RXR) (KLIOWER et al., 1992). Estudos recentes indicam que os agonistas do PPAR estão envolvidos na resolução do processo inflamatório, via controle negativo do NF- κ B, o principal fator de transcrição relacionado à ativação de genes pró-inflamatórios. Até o presente, foi demonstrado que a isoforma α do PPAR antagoniza, principalmente, os fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e T-bet. A isoforma PPAR- γ atua sobre os fatores de transcrição STAT-1, NFAT, GATA-3, Erg-1 e Jun, enquanto o PPAR- β/δ atua somente sobre o fator NF- κ B (MORAES et al., 2006). Dentre os fatores pró-inflamatórios, regulados negativamente pelo PPAR, em células endoteliais, estão os genes que codificam as moléculas de adesão VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e E-selectina (*endothelial leukocyte adhesion molecule*), que são responsáveis pelo evento da transmigração celular, as quimiocinas MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), IP-10 (*interferon-inducible protein of 10 kDa*), MIG (*monokine induced by interferon- γ*) e I-TAC (*interferon-inducible T-cell α -chemoattractant*), as citocinas IL-1 β (interleucina-1 β) e TNF- α (fator de necrose tumoral- α), além das espécies reativas de oxigênio (ROS) e da enzima iNOS (*inducible nitric oxid sintase*), que atuam na resposta imune inata durante o processo inflamatório (DUAN et al., 2008;

FRUCHART et al., 1999; GEARING et al., 1993; ISSEMANN et al., 1990; KLIEWER et al., 1992; MORAES et al., 2006).

Nesse contexto, há uma discussão na literatura sobre o papel da prostaciclina no processo inflamatório. Para alguns autores, a ação inflamatória ou resolutive/anti-inflamatória da prostaciclina é determinada pelo tipo de receptor ativado, IP ou PPAR, e a via de sinalização envolvida (autócrina, parácrina ou intrácina, respectivamente). De fato, as enzimas COX-1 e PGIS estão localizadas tanto na membrana do retículo endoplasmático, quanto no envelope nuclear, o que sugere que as vias de sinalização autócrina/parácrina ou intrácina, possuem mecanismos distintos de ativação e de resposta nas células-alvo (FORMAN et al., 1997; LIM; DEY, 2002; LIOU et al., 2007; WISE, 2003). Em particular, a sinalização autócrina/parácrina envolve a ativação de receptores IP pela prostaciclina e está relacionada à vasodilatação e inibição da agregação plaquetária (WISE, 2003). Desse modo, a PGI₂ pode atuar tanto em células musculares lisas e plaquetas (efetor parácrino), quanto na própria célula endotelial (efetor autócrino). A via de sinalização, resultante da ativação do receptor IP, pela prostaciclina, é chamada de clássica, pois está envolvida na regulação homeostática do endotélio vascular, como citado anteriormente. A ativação autócrina dos receptores IP, pela prostaciclina, também é responsável por um mecanismo de *feedback* positivo na biossíntese deste mediador no endotélio. Na literatura, existem trabalhos que demonstram que as atividades inflamatórias da prostaciclina decorrem da sinalização autócrina via receptor IP. De outra parte, é conhecido que a PGI₂, atua de modo intrácino, ou seja, ativa receptores localizados intracelularmente no citosol ou no próprio núcleo. Neste sentido, foi demonstrado que a prostaciclina é capaz de ativar receptores localizados intracelularmente, como o PPAR, sem a necessidade de exteriorização do sinal (DUBOIS et al., 1998; HAO; BREYER, 2008; KHAN et al., 2008; SMYTH et al., 2009). A ação intrácina da prostaciclina, via receptores PPAR, foi relacionada aos seus efeitos resolutivos e anti-inflamatórios (BISCETTI; POLLA, 2008; CHEN et al., 2009; CHENG et al., 2012; HERNANZ et al., 2012; LIM; DEY, 2002; NASRALLAH et al., 2005; WISE, 2003).

Assim, com base nesses conhecimentos, levanta-se a hipótese de que os efeitos anti-inflamatórios do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e de seus componentes, sejam decorrentes, ao menos em parte, da ativação dos receptores nucleares PPAR pela prostaciclina. Até o presente, a capacidade deste veneno ou da subunidade CB ativarem receptores PPAR não foi investigada. Além disso, não é conhecida a participação da PGI₂ nos efeitos anti-inflamatórios desencadeados pela subunidade CB. Neste sentido, um estudo voltado para a ativação desses receptores pela fosfolipase crotálica e a subsequente repercussão deste evento na transcrição e expressão de fatores inflamatórios se faz necessário.

1.4 Células Endoteliais: Papel na Inflamação

O termo endotélio foi criado em 1865 pelo suíço Wilhelm His para diferenciar o epitélio dos vasos sanguíneos e linfáticos, da camada de células epiteliais das outras cavidades corporais (AIRD, 2007a). O epitélio vascular é constituído por uma monocamada de células endoteliais (CEs), que revestem o lúmen dos vasos e separam o sangue/linfa dos tecidos. Inicialmente, as células endoteliais foram caracterizadas pela presença de organelas específicas como cavéolas e corpúsculos de Weibel-Palade mas, atualmente, foi reconhecido que a composição estrutural do endotélio é heterogênea nos diversos leitos vasculares (WEIBEL; PALADE, 1964). Em alguns casos, as células endoteliais podem se apresentar justapostas e circundadas por uma membrana basal contínua (endotélio contínuo), ou podem apresentar membrana basal com fendas (endotélio fenestrado) ou, ainda, fendas com membrana basal escassa (endotélio descontínuo). A heterogeneidade endotelial também se estende ao formato das células (achatadas, arredondadas ou cuboides) e à espessura (0,1 μM em capilares até 1 μM na aorta) (GIRARD; SPRINGER, 1995; MIYASAKA; TANAKA, 2004). Em síntese, o endotélio representa a conexão entre células e moléculas presentes na circulação e os demais tecidos. Contudo, além desta função estrutural primária, como membrana semipermeável, o endotélio é considerado um dos tecidos mais ativos, do ponto de vista metabólico (SIMIONESCU; SIMIONESCU, 1988).

Devido à sua capacidade de sintetizar e responder às diversas moléculas sinalizadoras, o endotélio atua na regulação de diferentes processos fisiológicos, incluindo o controle do tônus vasomotor, balanço hemostático, permeabilidade, migração celular, proliferação, imunidade inata e adaptativa (AIRD, 2007a). De modo mais específico, é possível correlacionar as moléculas sintetizadas pelo endotélio com diversos processos de regulação homeostática, como por exemplo: a) hemostasia, por meio da produção de substâncias coagulantes (fator de Von Willebrand; inibidor de plasminogênio) e anticoagulantes, como a prostaciclina (PGI_2) e o ativador de plasminogênio, além de conter antitrombina-III e trombomodulina, na superfície de membrana e expressar receptores para trombina e fibrinogênio; b) modulação do tônus vascular, por sua capacidade de produzir e liberar fatores relaxantes da musculatura lisa dos vasos, como o óxido nítrico (NO), a PGI_2 e fatores de contração do músculo liso, como as endotelinas e angiotensina-II; c) metabolismo de substâncias vasoativas, por conter enzimas que transformam angiotensina-I em angiotensina-II e inativam noradrenalina, serotonina e bradicinina e d) produção de diversas substâncias endógenas com papel fisiológico relevante, como os antígenos dos grupos A e B, fibronectina, proteoglicanos, interleucinas, eicosanoides, colágenos do tipo

IV, V e VIII, nidogênio e laminina (CIRINO, 1998; LOESCH, 2005; MONCADA et al., 1988; YANAGISAWA et al., 1988; THUILLEZ; RICHARD, 2005). Com base nestas informações verifica-se que a integridade funcional e estrutural do endotélio é fundamental para a manutenção da homeostasia cardiovascular (NEREM, 1993; RAO et al., 2007).

As células endoteliais ainda desempenham papel central em processos fisiopatológicos, como por exemplo, no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e na inflamação. Neste sentido, sabe-se que o endotélio ativado afeta o crescimento do músculo liso, por sua capacidade de gerar diversos fatores de crescimento, que induzem espessamento da parede dos vasos e favorecem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (THUILLEZ; RICHARD, 2005). Por outro lado, os eventos vasculares responsáveis pela instalação da resposta inflamatória, como a interação leucócito-endotélio, ocorrem, predominantemente, na porção venular da rede microcirculatória em vênulas pós-capilares. A parede destes vasos é composta por uma monocamada de células endoteliais, membrana basal e pericitos, sem a presença de musculatura lisa. Neste segmento vascular, a célula endotelial está em contato direto com os componentes do sangue, da parede do vaso e do interstício, sendo assim, alvo de substâncias presentes no sangue ou secretadas por células competentes, do interstício, durante o processo inflamatório (COOK-MILLS; DEEM, 2005).

Em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios, como, por exemplo, o TNF- α , IL-1 β ou LPS, as células endoteliais expressam moléculas de adesão do grupo das selectinas e da superfamília das imunoglobulinas, favorecendo a migração de leucócitos para o espaço subendotelial (NEWMAN, 1996; ZIMMERMAN et al., 1992). A P-selectina (CD62P) encontra-se estocada nos corpúsculos de *Weibel-Palade* da célula endotelial e, após estimulação, é rapidamente mobilizada até a superfície celular (SPERANDIO, 2006). A E-selectina (CD62E) ou ELAM-1 (*Endothelial leukocyte adhesion molecule-1*) é expressa após estimulação e necessita de indução transcricional. (TAMARU; NARUMI, 1999). Outra importante família de moléculas de adesão, com papel relevante na interação dos leucócitos à parede vascular, é a das imunoglobulinas. Dentre as moléculas desta família, que se destacam durante o processo inflamatório e são expressas pelo endotélio, estão a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), ICAM-2 (*intercellular adhesion molecule-2*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule-1*) (YANG; SHIMAOKA, 2004).

A ICAM-1 é constitutivamente expressa na membrana da célula endotelial e sua expressão pode ser aumentada por estímulos inflamatórios, como a IL-1 β (YANG; SHIMAOKA, 2004). A ICAM-1 participa das interações leucócito-endotélio, como ligante das β 2 integrinas e determina um recrutamento seletivo de leucócitos, em diferentes situações patológicas

(DIAMOND et al., 1991; YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002). Além do seu papel na aderência de leucócitos, a ICAM-1 ativa uma série de sinais intracelulares na célula endotelial, desencadeando alterações do citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, na contratilidade celular (LORENZON et al., 1998). A ICAM-2 está presente na membrana de células endoteliais e sua expressão não é induzida por estímulos inflamatórios (YUSUF-MAKAGIANSAR et al., 2002). De outra parte, a VCAM-1 é expressa em baixos teores no endotélio em condições fisiológicas. Sua expressão na célula endotelial pode ser induzida por mediadores inflamatórios, via síntese proteica (POBER; COTRAN, 1991). As interações entre a VCAM-1 e a VLA-4 (*very late activation antigen-4*) ou $\alpha 4\beta 7$ integrina, expressa principalmente em linfócitos e monócitos, estão relacionadas ao processo de transmigração celular (BOCHNER et al., 1991; PETRUZZELLI et al., 1991). A PECAM-1 está distribuída nas bordas das células endoteliais não-ativadas e participa da formação das junções destas células por interações homotípicas. Esta molécula é um receptor de superfície celular mecanorresponsivo que apresenta um domínio intracelular e, por esta razão, regula diversos eventos dependentes de sinalização. Durante a interação leucócito-endotélio, a PECAM-1 ativa processos sinalizadores para aumentar a superfície de contato da célula endotelial, modificar a conformação do citoesqueleto ou para induzir a própria expressão gênica. Quando a PECAM-1 é ativada pelo *shear stress*, é fosforilada em diferentes resíduos de tirosina, induzindo uma cascata de sinalização intracelular (COOK-MILLS; DEEM, 2005). Deste modo, esta molécula medeia diferentes funções, incluindo o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação, fagocitose, vasculogênese, angiogênese e regulação da ativação de neutrófilos, monócitos e células T (DELISSER et al., 1997; ELIAS et al., 1998; PRIVRATSKY et al., 2010).

Adicionalmente, as células endoteliais produzem diversos mediadores que iniciam e/ou amplificam o processo inflamatório e, portanto, são consideradas elementos reguladores da resposta imune inata. A variedade de mediadores químicos do processo inflamatório é ampla e dentre estes, se destacam as citocinas. O TNF- α é uma citocina produzida por diversos tipos celulares, como a célula endotelial, mediante estimulação por produtos bacterianos (*e.g.* LPS), vírus, outras citocinas etc. Já está bem descrito o papel do TNF- α , como indutor da expressão de moléculas de adesão P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (KUNKEL et al., 1997; YU et al., 1997; WOO et al., 2005). A IL-1 β atua de modo sinérgico ao TNF- α , como mediador da resposta inflamatória, ativando fagócitos e células endoteliais (KULDO et al., 2005; WONG et al., 1989). Assim como o TNF- α , a IL-1 β é produzida por leucócitos e induz a expressão das moléculas de adesão P-selectina, ICAM-1 e VCAM-1, na célula endotelial, estimulando o recrutamento leucocitário para o foco inflamatório (DUSTIN et al., 1986; CHING et al., 2005; MEAGER et

al., 1989).

Em síntese, a presença de um endotélio funcional é crítica para a manutenção da homeostasia, pois este tecido atua tanto como barreira física no transporte de moléculas através de seus complexos juncionais, quanto na produção ativa de mediadores que regulam o tônus vascular, a coagulação, a proliferação e ativação de células circulantes e migração de leucócitos. Assim, em condições de disfunção ou lesão do endotélio, há repercussão sobre a estrutura vascular, tecido adjacente e, por fim, sobre todo o sistema cardiovascular e imune.

2 OBJETIVOS

Este estudo tem por objetivo avaliar o efeito subunidade CB (fosfolipase A₂ isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*) sobre a biossíntese de prostaciclina em células endoteliais. Também será dada ênfase à via de transdução de sinal envolvida neste efeito. Além disso, evidenciar o potencial anti-inflamatório desta fosfolipase A₂ quanto aos mecanismos moleculares envolvidos e ao papel da prostaciclina neste efeito.

A partir de estudos *in vitro*, serão avaliados os efeitos da subunidade CB em culturas primárias de células endoteliais de microcirculação de ratos, quanto à:

- a) participação das ciclooxygenases COX-1 e COX-2, do fator de transcrição NF- κ B e da PGIS, na produção de prostaciclina;
- b) participação proteínas quinases p38^{MAPK}, MEK1/2, ERK1/2 e JNK na produção de prostaciclina;
- c) participação das FLA₂ intracelulares (citossólica e independente de cálcio) na produção de prostaciclina;
- d) participação da via de sinalização autócrina da prostaciclina (receptor IP, AC e PKA) na biossíntese de prostaciclina;
- e) expressão proteica de COX-1, COX-2 e PGIS;
- f) expressão proteica das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1, induzida por estímulo inflamatório;
- g) participação da PGIS no efeito inibitório da subunidade CB, sobre a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, induzida por estímulo inflamatório;
- h) participação dos receptores PPAR (isoforma alfa, beta/delta e gama), no efeito inibitório da subunidade CB, sobre a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, induzida por estímulo inflamatório;
- i) participação da via de sinalização autócrina da prostaciclina (receptor IP, AC e PKA) no efeito inibitório da subunidade CB, sobre a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, induzida por estímulo inflamatório;
- j) à expressão gênica das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e das citocinas TNF-alfa e IL-6, induzida por estímulo inflamatório.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fosfolipase A₂ isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*: A fração fosfolipase A₂, denominada subunidade CB, foi isolada do veneno bruto, extraído de exemplares adultos de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e purificada de acordo com Slotta e Fraenkel-Conrat (1938) e Hendon e Fraenkel-Conrat (1971). A homogeneidade das frações foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970). A subunidade CB foi isolada e gentilmente fornecida pela Dra. Consuelo Latorre Dias-Fortes do laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática da Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais. A toxina foi liofilizada e mantida a -20 °C até o momento da sua utilização.

3.2 Células endoteliais (CEs): As células endoteliais da microcirculação foram obtidas da microcirculação sanguínea do músculo cremaster de ratos, de acordo com o método descrito originalmente por Chen et al. (1995) e modificado por Lotufo et al. (2006) e Tamura et al. (2009, 2010). Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo e as recomendações feitas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Butantan (CEUAIB) (Protocolo nº 764/10) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº 95/fls 91/livro 2), após a análise deste projeto.

3.2.1 Isolamento das células endoteliais: Ratos Wistar machos (± 250 g) foram mortos pela inalação de CO₂. Em seguida, cada animal foi banhado em álcool 70% e o tecido cremaster (músculo cremastérico do escroto) retirado, em ambiente estéril, sob fluxo laminar. Após o isolamento, o tecido foi lavado (3x) com solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem cálcio ou magnésio (pH 7,2) e cortado em fragmentos de aproximadamente 2x2 mm. Os segmentos de músculo cremaster foram colocados em microplacas de 24 poços (dois pedaços por poço), no qual foi adicionado meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino (SFB), a 20% e sulfato de gentamicina (40 µg/mL). As microplacas foram incubadas em estufa (37 °C) sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. Após este período, os tecidos foram removidos e o meio de cultura trocado a cada 48 horas.

3.2.2 Caracterização das células endoteliais: Como mencionado anteriormente, as células endoteliais são obtidas a partir da microcirculação sanguínea do músculo cremaster, responsável pelo recobrimento dos testículos. Segundo Chen e colaboradores (1995), somente células endoteliais migram do tecido cremaster para a microplaca de cultivo no período de 48 horas de incubação. Além disso, as células isoladas foram caracterizadas pela análise da presença do fator de von Willebrand (vWF), um reconhecido marcador de células endoteliais, pela técnica de imunocitoquímica e citometria de fluxo (RUGGERI; WARE, 1993; SADLER, 2009; para revisão VALENTIJN et al., 2011). A **Figura 1A** ilustra a marcação do fator de von Willebrand conjugado ao FITC (1 mg/mL; diluição 1:100) (Abcam), em células isoladas do músculo cremaster e cultivadas entre 7 e 10 dias (primeira passagem). As lamínulas foram analisadas sob objetiva de 40x e no mesmo plano. Como mostra a **Figura 1A**, as células apresentaram uma marcação positiva para o vWF em toda a sua extensão. A análise morfológica mostrou que as células exibiram forma poligonal ou oval, com citoplasma escuro ao redor do núcleo central; a região periférica do citoplasma apresentou-se mais clara e contorno das células bem definido. Em confluência, as células formaram uma monocamada endotelial característica (formato *cobblestone*) (dado não demonstrado). A **Figura 1B** mostra a população de células isoladas que foram submetidas à análise por citometria de fluxo. Os parâmetros de tamanho (*forward scatter*) e granulidade (*side scatter*) foram definidos a partir das referências obtidas pela análise por citometria de fluxo, da linhagem imortalizada de células endoteliais da microcirculação de

camundongos (tEnd). Nesta figura, também é possível observar a presença de apenas uma população homogênea de células (99,2%). A **Figura 1C** ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para o fator de von Willebrand (n=1 representativo) nas células isoladas. Nas células controles, incubadas com um anticorpo contra uma proteína não-relacionada ao endotélio (IgG1k, controle de isótipo), observa-se ausência ou porcentagem insignificante de células com fluorescência relativa ao controle de isótipo (aproximadamente 1,5%). Em contrapartida, a incubação das células isoladas com o anticorpo anti-fator de von Willebrand (1:100 a 4 °C por 20 minutos), resultou na marcação quase absoluta das células analisadas (98,4%), evidenciando a presença de uma população homogênea de células endoteliais nas culturas. Este protocolo foi repetido sistematicamente ao longo da padronização e obtenção das culturas celulares e os dados obtidos sempre demonstraram a presença inequívoca de células endoteliais.

3.2.3 Subcultivo de células endoteliais e preparação das amostras: A partir da obtenção de um número adequado de células endoteliais para o desenvolvimento dos ensaios, as células foram subcultivadas. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado e as células lavadas com 2 mL de PBS, sem cálcio ou magnésio (pH 7,2). Em seguida, 200 µL de uma solução de pancreatina (1:10) foram adicionados a cada poço da microplaca (24 poços) e incubados em estufa de cultura (5% de CO₂/37 °C), por um período de até 5 minutos. Decorrido este tempo, as células foram observadas ao microscópio de luz invertida para a verificação do destacamento das mesmas e, então, transferidas para um tubo cônico (50 mL), contendo DMEM com 20% SFB e centrifugadas a 200 x g por 10 minutos para a neutralização da pancreatina. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura DMEM com 20% SFB. Feito isso, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi diluída em 90 µL de azul de tripan (1:10), para a contagem do número total de células ao microscópio de luz e determinação da viabilidade celular (>95%), pela técnica de exclusão do corante. A seguir, foram feitas diluições apropriadas para a aplicação das CEs às microplacas (96 ou 6 poços). Após a formação de monocamada confluyente (aproximadamente 5 dias, com troca de meio a cada 48 horas), foi realizada a incubação com a subunidade CB (5 µg/mL) ou apenas com meio de cultura DMEM sem SFB (controle negativo), pelos períodos de tempo exigidos para cada protocolo experimental.

Observação: Durante a realização dos ensaios, empregou-se meio de cultura sem adição de soro fetal bovino, em todos os grupos experimentais deste trabalho. Antes da realização de cada protocolo experimental, foi realizada a privação de soro por 18 horas antes da adição da subunidade CB ou dos agentes em teste (LPS, inibidores ou antagonistas), com o intuito de evitar alterações suprafisiológicas no metabolismo das células endoteliais.

Figura 1 Caracterização das células endoteliais de cultura primária de microcirculação de ratos: (A) Reatividade de células endoteliais de microcirculação isoladas do tecido cremaster de ratos para o fator de von Willebrand (vWF). As células foram incubadas com anticorpo específico para o vWF conjugado ao FITC (1:100, 4 °C por 20 minutos) e a expressão do vWF foi avaliada por imunocitoquímica em microscópio de fluorescência (LSM 510, Carl Zeiss), de acordo com Material e Métodos. As imagens estão representadas pela fluorescência emitida apenas pelo fluorocromo (fundo escuro) ou com contraste de fase (fundo claro) de um mesmo campo. Barra de escala: 50 μm . (B e C) Citometria de fluxo das células isoladas do tecido cremaster de ratos. (B) Janela de aquisição (*gating*) das células isoladas do tecido cremaster, feita de acordo com parâmetros de tamanho e granulidade para células endoteliais; (C) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com anticorpo anti-vWF (vWF) conjugado ao FITC (1:100, 4 °C por 20 minutos) ou células incubadas com um anticorpo não relacionado (controle de isótipo) (CTRL).

3.3 Ensaio de imunocitoquímica por microscopia confocal: Para estes ensaios foram utilizadas células de primeira passagem após 48 horas de sua adição às microplacas. Para a análise da presença do marcador de célula endotelial, o fator de von Willebrand, as células foram incubadas com o anticorpo anti-vWF conjugado ao FITC (1:100 a 4 °C por 20 minutos, BD Pharmingen). Em seguida, as células foram fixadas com uma solução de acetona e metanol (1:1 a -20 °C por 15 minutos). As lâminas foram montadas com solução de glicerol diluída em PBS (1:1) e a análise foi feita por microscopia confocal (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany), empregando 488 nm (laser argônio) para excitação e 515-530 nm para emissão.

3.4 Determinação do metabolismo celular como parâmetro de viabilidade celular: redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT): A toxicidade dos inibidores, antagonistas e dos respectivos veículos, sobre as células endoteliais, foi avaliada pelo método da redução do sal de tetrazolium e formação do produto solúvel formazan (MOSMANN, 1983). Após cada período de incubação, descrito nos itens 3.2.3 e 3.7, as microplacas foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos e o sobrenadante de cada amostra descartado. A seguir, foram acrescentados a cada poço, 90 µL de meio de cultura DMEM e 10 µL de MTT (5 mg/mL) em PBS. Em seguida, as CEs foram incubadas a 37° C em estufa a 5% de CO₂ por 3 horas. Para dissolução dos cristais de formazan, oriundos da redução do sal de tetrazolium pelas células metabolicamente viáveis, foram adicionados 100 µL de dimetil sulfoxido (DMSO). Após 30 minutos de agitação das microplacas, foi efetuada a leitura a 540 nm em espectrofotômetro (Labssystem Multiscan®) para determinação da densidade óptica (DO). A toxicidade foi definida a partir da porcentagem de diminuição da DO, observada na monocamada submetida à ação dos agentes, em relação à monocamada controle (ausência de toxicidade >95%).

3.5 Ensaio para avaliação de alterações de membrana celular como parâmetro de viabilidade celular: análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH): A atividade enzimática da LDH, detectada no meio de cultura, foi definida como parâmetro da lesão necrótica em membranas celulares. Após cada período de incubação com a subunidade CB (2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas), as microplacas de cultivo foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. A seguir, 30 µL do sobrenadante foram adicionados à outra microplaca de 96 poços, acompanhados da adição de 170 µL do substrato (tampão fosfato contendo: NaCl 200 mM, NADH 0,2 mM e piruvato 1,6 mM/poço). De 0 a 10 minutos após esta reação, efetuou-se a leitura da DO a 340 nm, em espectrofotômetro (Labssystem Multiscan®). Os resultados foram extrapolados pelo decréscimo da DO, resultante da oxidação do NADH, na presença de piruvato, em relação ao tempo zero e expressos em mmoles de NADH/10 minutos.

3.6 Ensaio para análise da integridade das monocamadas de células endoteliais: A integridade das monocamadas celulares foi avaliada pela medida do descolamento das monocamadas do seu substrato de adesão (microplaca), pelo ensaio com o corante cristal violeta. Após cada período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as monocamadas celulares lavadas (2x) com PBS. Em seguida, foram adicionados 90 µL de meio de cultura DMEM sem SFB a cada poço da microplaca e, logo após, foram acrescentados 10 µL da solução de cristal violeta (0,5%) em ácido acético (30%). Decorridos 10 minutos, as microplacas foram lavadas com PBS (2x) e colocadas para secar. A seguir, 100 µL de metanol absoluto (P.A.) foram adicionados aos poços e após 10 minutos de homogeneização (agitador orbital), efetuou-se a leitura da DO (620 nm) em espectrofotômetro (Labssystem Multiscan®). O decréscimo na integridade das monocamadas foi definido como a diminuição da DO observada na monocamada submetida à ação do agente em teste (subunidade CB), em relação à monocamada incubada

apenas com meio de cultura DMEM sem SFB (controle negativo, considerado como 100% de células aderidas).

3.7 Tratamento com inibidores ou antagonistas específicos: Para a avaliação da participação das vias de sinalização do receptor IP, proteínas quinases, fosfolipases intracelulares, ciclooxygenases, prostaciclina sintase ou do fator de transcrição NF- κ B, foram empregadas intervenções farmacológicas específicas, utilizando-se antagonistas ou inibidores de atividade enzimática, previamente à adição da subunidade CB ou meio de cultura apenas (controle negativo) às culturas de células endoteliais em confluência. As concentrações dos inibidores e dos antagonistas, empregados neste estudo, foram baseadas em dados de eficácia, descritos anteriormente na literatura. Ainda, nos diferentes protocolos experimentais, as células foram incubadas com a mesma concentração do veículo utilizado para a diluição dos compostos. Abaixo estão indicados os compostos e as concentrações utilizadas, bem como os tempos de tratamento das células, antes da adição da subunidade CB:

- **SB203580** (inibidor de p38^{MAPK}): 10 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,1%) (SYEDA et al., 2006);
- **U0126** (inibidor da MEK1/2): 20 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,1%) (LIM et al., 2009);
- **PD98059** (inibidor da ERK1/2): 20 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,1%) (GUDMUNSDÓTTIR et al., 2001);
- **JNK Inhibitor II** (inibidor da JNK): 10 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,04%) (ZHANG et al., 2009);
- **VSA** (inibidor da COX-1): 10 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,2%) (BHATTACHARYYA et al., 1995);
- **NS-398** (inibidor da COX-2): 1 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,03%) (SYEDA et al., 2006);
- **SN50** (inibidor do NF- κ B): 5 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,5%) (JEONG et al., 2004; YU et al., 2008);
- **TPCK** (inibidor da translocação do NF- κ B): 10 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,5%) (DRAGOMIR et al., 2006);
- **BEL** (inibidor da fosfolipase A₂ independente de cálcio): 2 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,1%) (RASTOGI; McHOWAT, 2009);
- **TCP** (inibidor da prostaciclina sintase): 2 mM/1 hora e 1 mM/12 horas, dissolvido em água ultrapura (ZHANG et al., 2007);
- **CAY10441** (antagonista do receptor IP de prostaciclina): 1 μ M/1 hora ou 1 μ M/3 horas, dissolvido em DMSO (0,1%) (BARBIERI et al., 2011);
- **H-89** (inibidor da PKA): 10 μ M/1 hora ou 1 μ M/3 horas, dissolvido em DMSO (0,1%) (LIOU et al., 2007; KIM et al., 2010);
- **SQ22536** (inibidor da adenilato ciclase): 10 μ M/1 hora ou 50 μ M/3 horas, dissolvido em DMSO (0,04%) (DOHGU et al., 2010);
- **PYRROLIDINA** (inibidor de fosfolipase A₂ citosólica): 2 μ M/1 hora, dissolvido em DMSO (0,1%) (RIEDERER et al., 2010);
- **GW6471** (antagonista da isoforma alfa do PPAR): 20 μ M/3 horas, dissolvido em DMSO (0,1%);
- **GSK0660** (antagonista da isoforma beta/delta do PPAR): 20 μ M/3 horas, dissolvido em DMSO (0,1%);
- **GW9662** (antagonista da isoforma gama do PPAR): 20 μ M/3 horas, dissolvido em DMSO (0,1%).

3.8 Determinação da concentração de PGI₂ por ensaio imunoenzimático (EIA): A produção de PGI₂ foi determinada através da medida do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina F_{1α}, por ensaio imunoenzimático (EIA) utilizando um kit comercial (Cayman Chemicals). Após a incubação das células com a fosfolipase A₂, em concentração não-citotóxica (5 µg/mL) ou meio de cultura DMEM apenas (controle negativo), as microplacas foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos e os sobrenadantes coletados. Alíquotas, contendo 50 µL de cada amostra foram adicionadas a microplacas de 96 poços e incubadas com igual volume do prostanoide conjugado à acetilcolinesterase e antisoro específico de coelho. Após a adição do substrato, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Labsystem Multiscan®) a 405 nm e as concentrações estimadas a partir da curva padrão específica, em concentrações representadas em pg/mL.

3.9 Análise por western blotting: A expressão proteica da PGIS, COX-1 e COX-2 foi feita pela técnica de *western blotting*. As células endoteliais foram incubadas, ou não, com a subunidade CB (5 µg/mL) por diferentes períodos de tempo. Após centrifugação a 200 x g por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e às células remanescentes foram adicionados 50 µL de tampão de amostra (SDS 20%; glicerina 20%; β-mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6,8; azul de bromofenol 0,1%) (LAEMMLI, 1970), seguido de aquecimento a 100 °C por 10 minutos. A seguir, o volume de 20 µL de cada amostra, foi aplicado ao gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE), para a separação das proteínas por eletroforese. Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 100 V. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, através da aplicação de voltagem (100 V) durante aproximadamente 90 minutos, em sistema tamponado a 4 °C. Os sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foram bloqueados com uma solução contendo leite desnatado a 5%, em tampão de lavagem (Tween-20 10% pH 7,4) durante 2 horas. A seguir, as membranas foram incubadas com os anticorpos para a detecção da PGIS (policlonal anti-PGIS 1:1000 v/v) (Cayman Chemicals), COX-1 (policlonal anti-COX-1 1:1000 v/v) ou COX-2 (policlonal anti-COX-2 1:1000 v/v) (Santa Cruz Biotechnology). Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, para a detecção dos anticorpos primários, correspondentes a cada uma das proteínas descritas acima. Para o controle do *western blotting*, as membranas também foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-β-actina (diluição de 1:3000 v/v) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na diluição de 1:7000 v/v. As bandas imunorreativas para cada proteína deste estudo foram reveladas por quimioluminescência, com solução de luminol e, em seguida, reveladas em filme fotográfico em câmara escura. As densidades das bandas foram determinadas pelo densitômetro GS-800 (Bio Rad Laboratories), utilizando o programa de análise *Quantity One®* (Bio Rad Laboratories) e normalizadas a partir das densidades das bandas do controle β-actina.

3.10 Análise da expressão proteica das moléculas de adesão endotelial pela técnica de citometria de fluxo: A expressão proteica das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1 e PECAM-1, pelas células endoteliais, foi determinada por citometria de fluxo. As células endoteliais (4x10⁵ células/poço) foram pré-incubadas, ou não, com a subunidade CB (5 µg/mL) em microplacas de 6 poços por 2 horas em estufa (5% de CO₂/37 °C). Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril (2x) e estimulado com 50 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8, Sigma Aldrich), por 8 ou 18 horas de incubação, nas mesmas condições anteriores. Após o término das incubações, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 500 µL de PBS e, em seguida, uma solução de pancreatina (500 µL) foi adicionada a cada poço da microplaca, que foi incubada em estufa de cultivo (5% de CO₂/37 °C) por um período de até 5 minutos. Decorrido este tempo, as células foram transferidas para tubos cônicos, contendo DMEM com 10% SFB (15 mL) e centrifugadas a 250 x g, por 5 minutos, para a neutralização da

pancreatina. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 5 mL de PBS e centrifugadas novamente, sob mesmas condições, para eliminação de vestígios de meio de cultura ou SFB. Após a centrifugação, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD106 (VCAM-1), anti-CD54 (ICAM-1) ou anti-CD31 (PECAM-1), diluídos em PBS (200 μ L de volume final) por 20 minutos a 4 °C. Abaixo estão indicadas as características dos anticorpos utilizados, assim como as concentrações e o nome do fabricante.

- **Anticorpo Anti-CD106 de rato:** conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE), 0,2 mg/mL (diluição 1:200) (BD Pharmingen);
- **Anticorpo Anti-CD54 de rato:** conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), 0,5 mg/mL (diluição 1:300) (BD Pharmingen);
- **Anticorpo Anti-CD31 de rato:** conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE), 0,2 mg/mL (diluição 1:200) (BD Pharmingen).

Após o término da incubação com os anticorpos, as células foram centrifugadas novamente (250 x g por 5 minutos) e incubadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído (200 μ L de volume final) por 20 minutos a 4 °C para fixação das células em solução. Em seguida, as células foram centrifugadas sob mesmas condições e ressuspensas em 500 μ L de PBS, para leitura em citômetro de fluxo FACSDiva versão 6.1.3 (BD Pharmingen). Os dados obtidos se referem a 10.000 eventos e somente células endoteliais morfologicamente viáveis foram consideradas para análise, de acordo com o estabelecimento de uma janela de aquisição (*gate*), com base em parâmetros adequados de tamanho (*forward-scatter*) versus granulosidade (*side-scatter*). Os dados foram obtidos pelo programa FlowJo® e representados como porcentagem da intensidade de fluorescência, de acordo com uma janela de aquisição estabelecida em relação às células do grupo controle (meio de cultura apenas). Os dados quantitativos da intensidade de fluorescência obtidos pelo programa FlowJo® foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5 e representam a média da intensidade de fluorescência de cada grupo experimental (n=3-4 para cada grupo).

3.11 Determinação da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR) via transcrição reversa em tempo real:

A detecção do RNAm das proteínas de interesse foram realizadas por meio da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (qPCR).

Extração de RNA: As células endoteliais (4×10^5 células/poço) foram pré-incubadas ou não com a subunidade CB (5 μ g/mL) por 2 horas (5% de CO₂/37 °C) em microplacas de 6 poços. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril (2x) e estimulado com 50 ng/mL de LPS (*Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8, Sigma Aldrich) por 8 horas de incubação nas mesmas condições anteriores. Após o término das incubações, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 μ L de PBS. Em seguida, foi adicionado Trizol e as células foram homogeneizadas e coletadas à temperatura ambiente. Após, as amostras foram precipitadas com 100 μ L de clorofórmio e centrifugadas por 15 minutos (12.000 x g/4 °C), para a separação do RNA total e das proteínas. A fase aquosa, contendo o RNA, foi removida e precipitada com 250 μ L de álcool isopropílico, durante 15 minutos (4 °C). As amostras foram centrifugadas por 15 min (12.000 x g/4 °C) e os precipitados foram lavados com etanol 75%. Após nova centrifugação (8000 x g/5 minutos/4 °C), o álcool foi removido e os precipitados secos à temperatura ambiente. As amostras foram solubilizadas em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e a concentração e pureza do RNA total calculadas por espectrofotometria, a 260 nm e por meio da relação A260/A280, respectivamente.

Ensaio de qPCR: Para a geração do cDNA, por transcrição reversa, 1 μ g de RNA total foi incubado com 1 μ L de Oligo dTs (0,05 μ g/ μ L), 1 μ L de SuperScript™ II Reverse Transcriptase

e completado para 20 µL com água DEPC e as amostras colocadas no termociclador por 10 min a 70 °C/50 min a 42 °C/15 min a 70 °C/20 min a 37 °C. Para o PCR quantitativo, 20 ng dos cDNAs, 10 µL de SYBR Green (concentrado 2X) e 450 nM das oligossondas de interesse, mencionadas na tabela abaixo, foram amplificados utilizando-se 1 µL da enzima Taq DNA polimerase 2,5 U, MgCl a 1,25 mM, dNTPs Mix, a 0,2 mM, em volume final de 20 µL por poço. Todas as reações de amplificação, utilizando o SYBR Green qPCR supermix, foram realizadas em termociclador (Applied Biosystems - Onestep plus) e compostas de controles negativos.

Análise da amplificação gênica: A análise da PCR em tempo real foi realizada pelo método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A partir dos valores de CT encontrados, foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene alvo}}}{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene controle}}}$$

onde E = eficiência da reação de PCR;

ΔCt do gene alvo = diferença entre o valor de CT da amostra desconhecida e da amostra controle para este gene;

ΔCt do gene controle = diferença entre o valor de CT da amostra desconhecida e da amostra controle para este gene.

Primers específicos para cada gene (Ratos):

VCAM-1 (CD106): 5'-TTGGGAGCCTCAACGGTACT-3 (sense) e 5'-GCAATCGTTTTGTATTTCAGGGGA-3 (antisense);

ICAM-1 (CD54): 5'-GTGATGCTCAGGTATCCATCCA-3 (sense) e 5'-CACAGTTCTCAAAGCACAGCG-3 (antisense);

TNF-alfa: 5'-TTCCTACCTGCAAGTTCTACACC-3' (sense) e 5'-CCGAGCTTTGTAAGAGCGGT-3' (antisense);

IL-6: 5'-AACGAGCAAAGTTTGAAGTGAAGG-3' (sense) e 5'-TCGAAGAGCACCGAATATACTGA-3' (antisense).

Observação: Todas as amplificações foram realizadas com a curva de dissociação (melting), para verificar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de oligossondas ou qualquer outro produto inespecífico.

3.12 Análise estatística: Os dados estão apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). A comparação entre dois grupos experimentais foi feita pelo teste t-Student. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância (one-way ou two-way ANOVA), com elementos repetidos, seguida do teste de Tukey nas comparações múltiplas. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas pelo software GraphPad Prism® versão 5.0 (GraphPad Software©).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da subunidade CB na viabilidade celular

As células endoteliais em confluência foram incubadas com concentrações crescentes de CB (1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$), ou meio de cultura apenas (controle negativo), pelo período de 24 horas. A seguir, foram avaliadas a atividade metabólica e as alterações na membrana celular, bem como a integridade das monocamadas.

A **Figura 2A** mostra que as monocamadas controles, incubadas apenas com o meio de cultura, apresentaram-se metabolicamente ativas, após 24 horas de incubação, com o valor médio de densidade óptica (DO) de $1,242 \pm 0,036$. Em contrapartida, a incubação da subunidade CB causou uma diminuição significativa do metabolismo celular em relação ao controle, apenas na maior concentração (50 $\mu\text{g/mL}$), cujo valor médio de DO foi de $0,9133 \pm 0,080$. A **Figura 2B** mostra que a subunidade CB não alterou, de modo significativo, a integridade das monocamadas endoteliais, em relação ao controle, em nenhuma das concentrações estudadas. De modo semelhante, a **Figura 2C** mostra que não houve aumento significativo na liberação de LDH, na vigência da ação da subunidade CB, em células endoteliais, no período de tempo avaliado. O valor médio do controle foi de $0,0227 \pm 0,003$. Curiosamente, a subunidade CB nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ induziu uma diminuição significativa na liberação basal de lactato desidrogenase (**Figura 2C**), com valores médios de absorbância de $0,0148 \pm 0,001$ e $0,0145 \pm 0,002$, respectivamente.

A seguir, avaliou-se o decurso temporal do efeito da subunidade CB, na concentração não-citotóxica de 5 $\mu\text{g/mL}$, nos mesmos parâmetros verificados acima. A **Figura 3A** mostra que as células endoteliais controles, incubadas apenas com o meio de cultura, apresentaram-se metabolicamente ativas ao longo das 24 horas de incubação, com valor médio de DO de $1,186 \pm 0,098$ (540 nm), que foi tomado como 100% de atividade metabólica. A adição da subunidade CB às células endoteliais não alterou a atividade metabólica endotelial, de modo significativo, em relação ao controle no decorrer de 24 horas de incubação. A subunidade CB apresentou valor médio de absorbância de $1,098 \pm 0,096$ (redução de 7,4% em relação ao controle). Do mesmo modo, a **Figura 3B** mostra que a subunidade CB não causou aumento significativo da liberação de LDH ao longo das 24 horas de incubação, com valores médios de absorbância de $0,0090 \pm 0,002$ para o controle e de $0,0087 \pm 0,002$ para a subunidade CB. Curiosamente, a subunidade CB causou diminuição da liberação basal de LDH, que foi significativa em relação ao controle, apenas na 4ª hora de incubação.

Figura 2 Efeito da subunidade CB em parâmetros de viabilidade celular: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 24 horas em estufa de CO₂ (5% e 37 °C). **(A)** Análise do metabolismo oxidativo mitocondrial efetuada pelo ensaio de MTT. **(B)** Integridade das monocamadas celulares avaliada pelo ensaio do cristal violeta. **(C)** Alterações das membranas celulares avaliadas pelo ensaio do LDH. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p < 0,05 em relação ao controle negativo (one-way ANOVA).

Figura 3 Decurso temporal do efeito da subunidade CB na atividade metabólica e liberação de LDH em células endoteliais: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). **(A)** Análise do metabolismo oxidativo mitocondrial efetuada pelo ensaio de MTT. **(B)** Alterações das membranas celulares avaliada pelo ensaio do LDH. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p < 0,05 em relação ao controle negativo (one-way ANOVA).

4.2 Efeito da subunidade CB na liberação de prostaciclina por células endoteliais

Para avaliar o efeito da subunidade CB na produção de PGI_2 , as células endoteliais em confluência foram incubadas com concentrações crescentes de CB (1, 5, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura apenas (controle negativo) pelo período de 24 horas. A liberação de prostaciclina foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável, a 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ por ensaio imunoenzimático (EIA).

A **Figura 4A** mostra que as células controles apresentaram uma liberação basal de 549,1 $\pm$ 63,38 pg/mL de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ após 24 horas de incubação. A adição da subunidade CB às células endoteliais, a partir da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, induziu aumento significativo da liberação de PGI_2 , se comparado ao controle (906,1 $\pm$ 50,13 pg/mL ou 65% de aumento). A liberação deste mediador foi máxima na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ da subunidade CB (1194 $\pm$ 95,67 pg/mL ou 117% de aumento em relação ao controle). Apesar da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ induzir efeito máximo na liberação de PGI_2 , a análise estatística revelou que não há diferença significativa entre as concentrações de PGI_2 detectadas após estímulo pela CB, nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$. A partir destes resultados, foi escolhida a concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ para o desenvolvimento dos estudos posteriores.

A seguir, foi analisado o perfil temporal da produção de PGI_2 induzida pela subunidade CB (concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$) em células endoteliais. Para tanto, as células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB ou meio de cultura apenas como controle negativo por 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas. A **Figura 4B** mostra que a subunidade CB induziu aumento significativo da liberação de PGI_2 , a partir da 6^a até a 24^a hora de incubação com as células endoteliais. Na sexta hora de incubação, a subunidade CB foi capaz de induzir um aumento marcante de 221,3% na liberação de PGI_2 , significativa em relação ao controle deste período (controle: 226,6 $\pm$ 26,04 pg/mL e subunidade CB: 728,2 $\pm$ 54,89 pg/mL). Desse modo, o período de tempo de incubação de 6 horas das células endoteliais com a subunidade CB (5 $\mu\text{g/mL}$) foi tomada como padrão para os estudos subsequentes.

Figura 4 Efeito da subunidade CB na liberação de prostaciclina por células endoteliais: **(A)** Efeito de diferentes concentrações da subunidade CB na liberação de PGI₂. As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (1, 5, 10, 25 ou 50 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 24 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). **(B)** Decurso temporal da liberação de PGI₂ induzida pela subunidade CB. As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (5 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo. *** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (A: one-way ANOVA e B: two-way ANOVA).

4.3 Efeito do tratamento com inibidores de ciclooxigenases e do fator de transcrição NF- κ B na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais

Para determinar o envolvimento das COX-1, COX-2 e do fator de transcrição NF- κ B na produção de PGI₂ estimulada pela subunidade CB, foram efetuados pré-tratamentos das células endoteliais com os seguintes compostos: VSA (inibidor seletivo da COX-1), NS-398 (inibidor seletivo da COX-2), SN50 (inibidor da translocação do NF- κ B), TPCK (inibidor do NF- κ B) ou seus respectivos veículos (DMSO) por 1 hora. Após este período, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas e incubada por 6 horas, seguido da determinação dos níveis de prostaciclina nos sobrenadantes das culturas. Para este estudo, foram realizados ensaios prévios para a avaliação do efeito citotóxico dos compostos VSA (10 μ M), NS-398 (2 μ M), SN50 (5 μ M), TPCK (10 μ M) e do veículo dos mesmos (DMSO, nas respectivas concentrações demonstradas no item **3.7 de Material e Métodos**) sobre as células endoteliais pelo teste de redução do MTT. Nas concentrações estudadas, esses agentes não causaram alterações significativas da viabilidade celular (> 95% células viáveis) (dados não demonstrados).

A **Figura 5** mostra que o controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultura na presença do veículo DMSO) apresentou uma liberação basal média de 6-ceto PGF_{1 α} de 284,7 $\pm$ 27,05 pg/mL após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com a subunidade CB (controle positivo), com valor médio de 566,5 $\pm$ 62,18 pg/mL (98,9% de aumento). A pré-incubação das células com o composto VSA, reduziu significativamente a liberação de PGI₂, se comparado ao controle estimulado (valor médio de 326,1 $\pm$ 28,86 pg/mL ou 46,1% de inibição). De modo distinto, a pré-incubação com os compostos NS-398, SN50 ou TPCK não alterou a produção de PGI₂, se comparado ao controle positivo (subunidade CB apenas).

Figura 5 Participação das COX-1, COX-2 e do fator de transcrição NF-kB na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais: As células endoteliais foram incubadas com os compostos VSA (10 μM) ou NS-398 (1 μM) ou SN50 (5 μM) ou TPCK (10 μM) ou meio de cultura na presença dos respectivos veículos (CTRL: controle negativo) por 1 hora antes da adição de 5 μg/mL da subunidade CB (controle positivo) por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p< 0,05 em relação ao controle negativo. **p< 0,01 em relação ao controle negativo. ***p< 0,001 em relação ao controle negativo. ++p< 0,01 em relação ao controle positivo (CB) (one-way ANOVA).

4.4 Participação da prostaciclina sintase (PGIS) na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais

Para determinar o envolvimento da prostaciclina sintase (PGIS) na produção de PGI_2 estimulada pela subunidade CB, foram efetuados pré-tratamentos das células endoteliais com o composto tranilcipromina (TCP) (inibidor da prostaciclina sintase) ou seu veículo (água ultrapura) por 1 hora. Após este período, a subunidade CB ($5 \mu\text{g/mL}$) foi adicionada às culturas e incubada por 6 horas, seguido da determinação dos níveis de prostaciclina nos sobrenadantes das culturas. Para este estudo, foram realizados ensaios prévios para a avaliação do efeito citotóxico do composto TCP (2 mM) e do seu veículo (água ultrapura, como descrito no item 3.7 de **Material e Métodos**) sobre as células endoteliais pelo teste de redução do MTT. Na concentração estudada, esse agente não causou alteração significativa da viabilidade celular ($> 95\%$ células viáveis) (dados não demonstrados).

A **Figura 6** mostra que o controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultura na presença do veículo) apresentou uma liberação basal média de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ de $205,9 \pm 20,71 \text{ pg/mL}$, após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com a subunidade CB (controle positivo), com valor médio de $526,2 \pm 101,9 \text{ pg/mL}$ (155% de aumento). A pré-incubação das células com o composto TCP, reduziu significativamente a liberação de PGI_2 , se comparado ao controle positivo (valor médio de $272,9 \pm 67,32 \text{ pg/mL}$ ou 48,1% de redução).

Figura 6 Participação da prostaciclina sintase na produção de prostaciclina em células endoteliais. As células endoteliais foram incubadas com o composto TCP (2 mM) ou meio de cultura na presença do respectivo veículo (CTRL: controle negativo) por 1 hora antes da adição de 5 µg/mL da subunidade CB (controle positivo) por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p< 0,05 em relação ao controle negativo. +p< 0,05 em relação ao controle positivo (CB) (one-way ANOVA).

4.5 Efeito do tratamento com inibidores de proteínas quinases na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais

Para determinar o envolvimento das proteínas quinases $p38^{\text{MAPK}}$, MEK1/2, ERK1/2 e JNK na produção de PGI_2 estimulada pela subunidade CB, foram efetuados pré-tratamentos das células endoteliais com os seguintes compostos: U0126 (inibidor seletivo da MEK1/2); PD98059 (inibidor seletivo da ERK1/2); SB202190 (inibidor seletivo da $p38^{\text{MAPK}}$); JNK inhibitor II (inibidor seletivo da JNK) ou seus respectivos veículos (DMSO) por 1 hora. Após este período, a subunidade CB (5 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionada às culturas e incubada por 6 horas, seguida da determinação dos níveis de prostaciclina nos sobrenadantes das culturas. O período de incubação de 6 horas com a subunidade CB foi definido a partir dos dados anteriores, que demonstraram que a liberação de prostaciclina foi significativamente aumentada, a partir deste período de tempo (**Figura 4B**).

Para este estudo, foram realizados ensaios prévios para a avaliação do efeito citotóxico dos compostos U0126 (20 μM), PD98059 (20 μM), SB202190 (10 μM) e JNK inhibitor II (10 μM) e do veículo dos mesmos (DMSO, nas respectivas concentrações descritas no item **3.7 de Material e Métodos**), sobre as células endoteliais pelo teste de redução do MTT. Nas concentrações estudadas, esses agentes não causaram alterações significativas da viabilidade celular ($> 95\%$ células viáveis) (dados não demonstrados).

A **Figura 7** mostra que o controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultura na presença do veículo DMSO) apresentou uma liberação basal de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ de $270,7 \pm 30,08$ pg/mL (valor da média) após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com a subunidade CB (controle positivo), com valor médio de $550,6 \pm 26,56$ pg/mL (103,4% de aumento). Contudo, a pré-incubação das células com o composto U0126, reduziu significativamente a liberação de PGI_2 induzida pela subunidade CB, em relação ao controle positivo (valor médio de $372,9 \pm 15,68$ pg/mL ou 32% de redução). De modo semelhante, a pré-incubação das células com o composto PD98059, causou redução significativa da produção de PGI_2 , se comparado ao controle positivo (valor médio de $165,1 \pm 4,790$ pg/mL ou 67,7% de redução). Por outro lado, a pré-incubação com os compostos SB202190 ou JNK inhibitor II, não alterou a liberação de PGI_2 estimulada pela subunidade CB nas mesmas condições ($531,82 \pm 8,61$ pg/mL e $560 \pm 45,2$ pg/mL , respectivamente).

Figura 7 Efeitos dos inibidores de proteínas quinases na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais: As células endoteliais foram incubadas com os compostos SB202190 (10 μM) ou JNK inibitor II (10 μM) ou U0126 (20 μM) ou PD98059 (20 μM) ou meio de cultura na presença dos respectivos veículos (CTRL: controle negativo) por 1 hora antes da adição de 5 μg/mL da subunidade CB (controle positivo) por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p < 0,05 em relação ao controle negativo. **p < 0,01 em relação ao controle negativo. ***p < 0,001 em relação ao controle negativo. ++p < 0,01 em relação ao controle positivo (CB). +++p < 0,001 em relação ao controle positivo (CB) (one-way ANOVA).

4.6 Efeito do tratamento com inibidores de fosfolipases intracelulares na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais

Para avaliar a participação das fosfolipases intracelulares citosólica (cFLA₂) e independente de cálcio (iFLA₂), na produção de PGI₂ estimulada pela subunidade CB, foram efetuados pré-tratamentos das células endoteliais com os compostos PYR-2 (inibidor seletivo da isoforma alfa da FLA₂ citosólica) ou BEL (inibidor irreversível da FLA₂ independente de cálcio) ou seus respectivos veículos (DMSO) por 1 hora. Após este período, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas e incubada por 6 horas, seguido da determinação dos níveis de prostaciclina nos sobrenadantes das culturas. Para este estudo, foram realizados ensaios prévios para a avaliação do efeito citotóxico dos compostos PYR-2 (2 µM), BEL (2 µM) e do veículo dos mesmos (DMSO, nas respectivas concentrações descritas no item 3.7 de **Material e Métodos**) sobre as células endoteliais pelo teste de redução do MTT. Nas concentrações estudadas, esses agentes não causaram alterações significativas da viabilidade celular (> 95% células viáveis) (dados não demonstrados).

A **Figura 8A** mostra que o controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultura na presença do veículo DMSO) apresentou uma liberação basal média de 6-ceto PGF_{1α} de 141,4 ±20,83 pg/mL após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com a subunidade CB (controle positivo), com valor médio de 416,4 ±9,96 pg/mL (194,4% de aumento). A pré-incubação das células, com o composto PYR-2 reduziu significativamente a liberação de PGI₂ induzida pela subunidade CB, em relação ao controle positivo (valor médio de 305,4 ±30,43 pg/mL). Por outro lado, a **Figura 8B** mostra que a pré-incubação com o composto BEL, não alterou a produção de PGI₂ estimulada pela subunidade CB, nas mesmas condições.

Figura 8 Efeito dos inibidores de fosfolipases intracelulares na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais: As células endoteliais foram incubadas com os compostos PYR-2 (2 μM) ou BEL (2 μM) ou meio de cultura na presença dos respectivos veículos (CTRL: controle negativo) por 1 hora antes da adição de 5 μg/mL da subunidade CB (controle positivo) por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p < 0,05 em relação ao controle negativo. ***p < 0,001 em relação ao controle negativo. +p < 0,05 em relação ao controle positivo (CB) (one-way ANOVA).

4.7 Efeito do tratamento com inibidores da via do receptor IP na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais

Para avaliar o possível envolvimento da via de sinalização autócrina, de *feedback* positivo, ativada pela prostaciclina na vigência de ação da subunidade CB, foram efetuados pré-tratamentos das células endoteliais com os compostos CAY10441 (antagonista do receptor IP), SQ22536 (inibidor seletivo da adenilato ciclase) e H-89 (inibidor da PKA), ou seus respectivos veículos (DMSO), por 1 hora antes da adição da subunidade CB (5 µg/mL). Decorridas 6 horas deste estímulo, os níveis de prostaciclina foram determinados nos sobrenadantes das culturas. Para este estudo, foram realizados ensaios prévios para a avaliação do efeito citotóxico dos compostos CAY10441 (1 µM), SQ22536 (10 µM), H-89 (10 µM) e do veículo dos mesmos (DMSO, nas respectivas concentrações descritas no item 3.7 de **Material e Métodos**) sobre as células endoteliais pelo teste de redução do MTT. Nas concentrações estudadas, esses agentes, não causaram alterações significativas da viabilidade celular (> 95% células viáveis) (dados não demonstrados).

A **Figura 9** mostra que controle negativo (células incubadas apenas com meio de cultura na presença do veículo DMSO) apresentou uma liberação basal média de 6-ceto PGF_{1α} de 113,3 ±12,92 pg/mL após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com a subunidade CB (controle positivo), com valor médio de 372,9 ±49,30 pg/mL (229% de aumento). O pré-tratamento das células com os compostos CAY10441, SQ22536 ou H-89 não alterou a liberação de PGI₂ estimulada pela subunidade CB, em relação ao controle positivo.

Figura 9 Efeitos do tratamento com inibidores da via do receptor IP na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais. As células endoteliais foram incubadas com os compostos CAY10441 (1 μM), ou H-89 (10 μM), ou SQ22536 (10 μM), ou meio de cultura na presença dos respectivos veículos (CTRL: controle negativo) por 1 hora antes da adição de 5 μg/mL da subunidade CB (controle positivo) por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p<0,05 em relação ao controle negativo. **p<0,01 em relação ao controle negativo. ***p<0,001 em relação ao controle negativo (one-way ANOVA).

4.8 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de ciclooxigenases em células endoteliais

A expressão proteica das enzimas COX-1 e COX-2 foi analisada após 6 horas da incubação com a subunidade CB (5 µg/mL) ou LPS (1 µg/mL) como controle positivo ou meio de cultura apenas (controle negativo).

A **Figura 10A** mostra as bandas imunorreativas para a COX-1, obtidas a partir do precipitado celular, após incubação com a subunidade CB ou não. As bandas proteicas correspondentes à COX-1 foram detectadas em todos os precipitados celulares analisados. A análise densitométrica demonstrou que a incubação da subunidade CB com as células endoteliais, não modificou a intensidade das bandas de COX-1 (**Figura 10B**) de modo significativo, em relação ao controle negativo. Entretanto, na **Figura 10C** pode-se observar que não foi detectada a presença de bandas imunorreativas para a isoforma COX-2, tanto no controle negativo quanto em células incubadas com a subunidade CB. Para comprovação da eficácia do anticorpo para a COX-2, na presente condição experimental, foi utilizado o LPS (lipopolissacarídeo) como controle positivo. Neste caso, a análise das bandas imunorreativas para a COX-2 (**Figura 10C**) e a análise densitométrica (**Figura 10D**), revelaram a presença da proteína COX-2, cujo aumento foi significativo em relação ao controle negativo e em relação às células incubadas com a subunidade CB.

Figura 10 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de COX-1 e COX-2 em células endoteliais de cultura primária. As células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL), ou LPS (1 µg/mL), ou meio de cultura apenas por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). As células foram lisadas e analisadas por *Western blotting*, como descrito em Material e Métodos. (A) *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:3000). (B) Quantificação por densitometria das bandas de COX-1, normalizadas a partir das bandas de β-actina. (C): *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:3000). (D): Quantificação por densitometria das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β-actina. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *p < 0,05 em relação ao controle negativo (one-way ANOVA).

4.9 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PGIS em células endoteliais

A expressão proteica da prostaciclina sintase (PGIS) foi analisada nos períodos de 2, 4, 6, 8, 12 ou 24 horas de incubação das células endoteliais com a subunidade CB (5 µg/mL), ou meio de cultura apenas (controle negativo).

A **Figura 11A** mostra as bandas imunorreativas para a PGIS, que foram detectadas em todos os precipitados celulares e em todos os períodos de tempo analisados. Porém, a análise densitométrica (**Figura 11B**) demonstrou que apenas no período de 8 horas de incubação, com a subunidade CB, houve alteração na intensidade das bandas proteicas referentes à PGIS. A análise densitométrica destas bandas mostrou que neste período de incubação, a subunidade CB induziu um aumento significativo do teor proteico de PGIS ($2,021 \pm 0,58$ U.A.), se comparado ao controle negativo ($1,165 \pm 0,33$ U.A.), com percentual de aumento de 73,4%.

Figura 11 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PGIS em células endoteliais. As células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) ou meio de cultura apenas (CTRL: controle negativo) por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). As células foram lisadas e analisadas por *Western blotting*, como descrito em Material e Métodos. (A): *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-PGIS (1:1000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:3000). (B): Quantificação por densitometria das bandas de PGIS, normalizadas a partir das bandas de β-actina. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. **p < 0,01 em relação ao controle negativo (two-way ANOVA).

4.10 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de VCAM-1 (CD106) estimulada pelo LPS em células endoteliais

Para investigação dos possíveis efeitos inibitórios da subunidade CB, na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, utilizou-se o LPS como agente inflamatório e indutor da expressão de moléculas de adesão. Inicialmente, com o intuito de estabelecer as condições ideais para este estudo, as células endoteliais foram incubadas com concentrações crescentes de LPS (5, 10, 25, 50 e 100 ng/mL), ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 18 horas. Em seguida, o perfil de expressão proteica da molécula VCAM-1, encontrada em baixos níveis em condições basais, foi determinado por citometria de fluxo.

As **Figuras 12A, B, C, D, e E** ilustram as porcentagens da intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Nesta figura, observa-se que após a incubação das células com o meio de cultura apenas (controle negativo), um baixo percentual de células (1,2%) apresentou intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1. Em todas as concentrações estudadas, a adição de LPS induziu aumento do percentual de células, com intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1. De modo qualitativo, é possível notar que o LPS na concentração de 50 ng/mL induziu a mudança mais marcante no perfil de expressão da molécula VCAM-1, pois 67% da população celular apresentou intensidade de fluorescência aumentada. Na concentração de 10 ng/mL, o LPS induziu um aumento da intensidade de fluorescência para VCAM-1, da ordem de 43%. A **Figura 12F** apresenta a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais estimuladas pelo LPS. Esta figura mostra que as células controles apresentaram baixa expressão da molécula de adesão VCAM-1, com valor médio de $89,6 \pm 5,54$ UA. Entretanto, nas concentrações de 50 e 100 ng/mL, o LPS induziu aumento significativo na expressão de VCAM-1 ($591,3 \pm 95,67$ UA e $214,3 \pm 20,3$ UA, respectivamente), se comparado ao controle. De acordo com estes dados, a concentração de 50 ng/mL de LPS foi tomada como padrão para os estudos subsequentes.

A seguir, para avaliar o efeito da subunidade CB na expressão da VCAM-1, as células endoteliais foram pré-incubadas com diferentes concentrações da subunidade CB (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 μ g/mL) por 2 horas. Após este período, os poços foram lavados para retirada da subunidade CB e o LPS (50 ng/mL; controle positivo), ou meio de cultura apenas (controle negativo), foram adicionados às culturas por 18 horas e o perfil de expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

A **Figura 13A** ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Nesta figura, observa-se que após a incubação das células com o meio de cultura apenas

(controle negativo), um baixo percentual de células ($\cong 3\%$) apresentou intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1. De modo semelhante, a incubação das culturas com a subunidade CB (2 horas) resultou em baixo percentual de células com intensidade de fluorescência para VCAM-1 (aproximadamente 4%). Como demonstrado anteriormente, a adição de LPS (50 ng/mL) induziu aumento do percentual de células com intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 (aproximadamente 66%). Entretanto, a pré-incubação com a subunidade CB nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, reduziu o efeito do LPS, com queda do percentual de células com intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1, após estímulo pelo LPS (41,6% e 46%, respectivamente). A **Figura 13B** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais. Nesta figura, pode-se observar que as células controles apresentaram baixa expressão da molécula de adesão VCAM-1, com valor médio de $74,3 \pm 9,24$ UA. Contudo, houve aumento significativo da expressão de VCAM-1 em células estimuladas com o LPS (50 ng/mL) por 18 horas ($429 \pm 75,34$ UA), se comparado ao controle negativo. A pré-incubação das células com a subunidade CB, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, causou diminuição significativa da expressão proteica de VCAM-1 ($171 \pm 29,02$ UA e $163,7 \pm 28,00$ UA, respectivamente) induzida pelo LPS, na ordem de 60% e 62%, respectivamente, em comparação ao controle positivo (LPS apenas). De acordo com estes dados, a pré-incubação das células com a subunidade CB (2 horas), na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$, foi tomada como referência para os estudos subsequentes.

Todavia, uma vez que em modelos experimentais *in vitro*, não há um sistema de depuração fisiológica, o efeito do LPS por 18 horas poderia ser cumulativo e, assim, suprimir a magnitude do efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão da VCAM-1. Considerando esta hipótese, avaliou-se o efeito da subunidade CB na expressão da molécula de adesão VCAM-1, estimulada pelo LPS em um período de tempo menor (8 horas). As células endoteliais foram pré-incubadas com a subunidade CB (5 $\mu\text{g/mL}$) por 2 horas e, após lavagem, o LPS (50 ng/mL) ou meio de cultura apenas (controle negativo), foram adicionados às culturas e mantidos por 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

A **Figura 14A** ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Nesta figura, observa-se em células do controle negativo, um baixo percentual de células (2,7%) com intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1. De modo semelhante, a incubação das culturas com a subunidade CB (2 horas) resultou em baixo percentual de células com intensidade de fluorescência para VCAM-1 (aproximadamente 2%). Após 8 horas de incubação, o LPS (50 ng/mL) induziu aumento do percentual de células com intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 (48,4%), se comparado ao controle negativo. Apesar do menor

tempo de incubação do LPS com as células endoteliais, não houve diferença na magnitude do aumento da intensidade de fluorescência para VCAM-1, em relação à observada após 18 horas de incubação. A pré-incubação das células com a subunidade CB (5 µg/mL) causou queda no aumento percentual de intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1, estimulada pelo LPS (26,7%). A **Figura 14B** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais. Pode-se observar que as células do controle negativo apresentam baixa expressão da molécula de adesão VCAM-1, com valor médio de $78,6 \pm 7,12$ UA. A pré-incubação das células com a subunidade CB não alterou significativamente o perfil de expressão da VCAM-1, se comparado ao controle negativo ($73 \pm 6,02$ UA). Contudo, houve aumento significativo na expressão de VCAM-1 nas células estimuladas com o LPS (50 ng/mL) por 8 horas ($506,7 \pm 37,26$ UA), se comparado ao controle negativo. A pré-incubação das células endoteliais com a subunidade CB (5 µg/mL) causou diminuição significativa da expressão proteica de VCAM-1 ($234,3 \pm 74,77$ UA) induzida pelo LPS, se comparado ao controle positivo (LPS apenas).

Figura 12 Efeito do lipopolissacarídeo (LPS) na expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 em células endoteliais: As células endoteliais foram incubadas com LPS (5, 10, 25, 50 ou 100 ng/mL) por 18 horas (5% CO₂/37 °C) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A-E) Porcentagem da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais estimuladas com LPS (n=1 representativo de um total de 3 animais). (F) Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais estimuladas com LPS. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3 animais. *p< 0,05 em relação ao controle negativo. ***p< 0,001 em relação ao controle negativo (one-way ANOVA).

Figura 13 Efeito inibitório da subunidade CB na expressão proteica de VCAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 ou 10 µg/mL) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 18 horas (5% CO₂/37 °C) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Porcentagem da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais (n=1 representativo de um total de 4 animais). **(B)** Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. ***p < 0,001 em relação ao controle negativo. +p < 0,05 em relação ao controle positivo (LPS) (one-way ANOVA).

A: VCAM-1 [8 horas]

Figura 14 Efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão proteica de VCAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 8 horas: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas (5% CO₂/37 °C) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Porcentagem da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais (n=1 representativo de um total de 4 animais). **(B)** Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. ***p< 0,001 em relação ao controle negativo. ++p< 0,01 em relação ao controle positivo (LPS) (one-way ANOVA).

4.11 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de ICAM-1 (CD54) estimulada pelo LPS em células endoteliais

Neste estudo, investigou-se inicialmente o efeito inibitório da subunidade CB em células estimuladas pelo LPS por 18 horas. Para tanto, as células endoteliais foram pré-incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL, controle positivo) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 18 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão ICAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

A **Figura 15A** ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para a molécula ICAM-1. Nesta figura, observa-se que após a incubação das células com o meio de cultura apenas (controle negativo), um baixo percentual de células (10,4%) apresentou intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1. De modo semelhante, a incubação das culturas com a subunidade CB (2 horas) resultou em baixo percentual de células com intensidade de fluorescência para ICAM-1 (aproximadamente 8%). Após 18 horas de incubação com o LPS (50 ng/mL), ocorreu aumento do percentual de células com intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 (45,6%), em comparação ao controle negativo. Porém, a pré-incubação das células com a subunidade CB (5 µg/mL) não afetou o aumento percentual da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1, induzida pelo LPS (41,1%). A **Figura 15B** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de ICAM-1 em células endoteliais. Desse modo, observa-se que as células controles apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $214,5 \pm 7,12$ UA. A pré-incubação das células com a subunidade CB não alterou significativamente o perfil de expressão da ICAM-1, se comparado ao controle negativo ($212 \pm 14,00$ UA). Contudo, houve aumento significativo na expressão de ICAM-1 nas células estimuladas com o LPS (50 ng/mL) por 18 horas ($502,5 \pm 37,50$ UA), em relação ao controle negativo. A pré-incubação das células com a subunidade CB (5 µg/mL), não afetou a expressão proteica de ICAM-1 ($455 \pm 30,00$ UA), se comparado ao controle positivo (LPS).

Com o intuito de avaliar o possível efeito inibitório da subunidade CB na expressão da molécula de adesão ICAM-1, em período menor de estimulação com o LPS, as células endoteliais foram pré-incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas e, a seguir, o LPS (50 ng/mL; controle positivo) ou meio de cultura apenas (controle negativo), foram adicionados às culturas e mantidos por apenas 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão ICAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

A **Figura 16A** ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para a molécula ICAM-1. Nesta figura, observa-se que após a incubação das células com o meio de cultura apenas (controle negativo), um baixo percentual de células (14,8%) apresentou intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1. De modo semelhante, a incubação das culturas com a subunidade CB (2 horas) resultou em baixo percentual de células com intensidade de fluorescência para ICAM-1 (aproximadamente 13%). Após 8 horas de incubação com o LPS (50 ng/mL), ocorreu aumento do percentual de células com intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 (58,4%), em relação ao controle negativo. Nestas condições, a pré-incubação das células com a subunidade CB (5 µg/mL) causou queda (28,6%) do aumento percentual de intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1, induzida pelo LPS. A **Figura 16B** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de ICAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células do controle negativo apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $485,7 \pm 81,61$ UA. A pré-incubação das células com a subunidade CB não alterou significativamente o perfil de expressão da ICAM-1, se comparado ao controle negativo ($504,3 \pm 80,07$ UA). O LPS (50 ng/mL) induziu aumento significativo na expressão de ICAM-1 após 8 horas de incubação ($1070 \pm 136,8$ UA), se comparado ao controle negativo. Nestas condições, a pré-incubação das células com a subunidade CB (5 µg/mL) diminuiu significativamente a expressão proteica de ICAM-1 ($807,3 \pm 135,50$ UA) induzida pelo LPS, se comparado ao controle positivo (LPS apenas).

A: ICAM-1 [18 horas]

Figura 15 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 18 horas: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (5 $\mu\text{g/mL}$) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 18 horas (5% $\text{CO}_2/37^\circ\text{C}$) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Porcentagem da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais ($n=1$ representativo de um total de 4 animais). **(B)** Média da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo. + $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS) (one-way ANOVA).

A: ICAM-1 [8 horas]

Figura 16 Efeito inibitório da subunidade CB na expressão proteica de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 8 horas: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas (5% CO₂/37 °C) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Porcentagem da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais (n=1 representativo de um total de 4 animais). **(B)** Média da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. **p < 0,01 em relação ao controle negativo. +p < 0,05 em relação ao controle positivo (LPS) (one-way ANOVA).

4.12 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PECAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais

Para avaliar o possível efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão da molécula de adesão PECAM-1, sob estímulo inflamatório do LPS, as células endoteliais foram pré-incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL, controle positivo) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 18 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão PECAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

A **Figura 17A** ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para a molécula PECAM-1. Nesta figura, observa-se que após a incubação das células com o meio de cultura apenas (controle negativo), um baixo percentual de células (3%) apresentou intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1. De modo semelhante, a incubação das culturas com a subunidade CB (2 horas) resultou em baixo percentual de células com intensidade de fluorescência para PECAM-1 (2,36%). Após 18 horas de incubação com o LPS (50 ng/mL), não houve alteração no percentual de intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 (4,08%), se comparado ao controle negativo. De modo semelhante, a pré-incubação com a subunidade CB (5 µg/mL), seguida da estimulação pelo LPS, não causou alteração na intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 (2,61%). A **Figura 17B** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de PECAM-1 em células endoteliais. Nesta figura, pode-se observar que as células do controle negativo apresentam expressão da molécula de adesão PECAM-1, com valor médio de $33,5 \pm 3,50$ UA. A pré-incubação das células com a subunidade CB não alterou significativamente o perfil de expressão da PECAM-1, se comparado ao controle negativo ($28,5 \pm 0,50$ UA). De modo similar, não houve aumento significativo na expressão de PECAM-1 nas células estimuladas com o LPS (50 ng/mL) por 18 horas ($30,5 \pm 0,67$ UA), se comparado ao controle negativo. A pré-incubação com a subunidade CB (5 µg/mL) não afetou, de modo significativo, a expressão proteica de PECAM-1 ($28,5 \pm 0,63$ UA) induzida pelo LPS, em comparação ao controle positivo ou ainda, ao controle negativo.

A seguir, foram realizados ensaios em que as células endoteliais foram pré-incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas e, na sequência, o LPS (50 ng/mL; controle positivo) ou meio de cultura apenas (controle negativo), foram adicionados às culturas por apenas 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão PECAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

A **Figura 18A** ilustra as porcentagens da intensidade de fluorescência para a molécula PECAM-1. Nesta figura, observa-se que após a incubação das células com o meio de cultura apenas (controle negativo), um baixo percentual de células (1,46%) apresentou intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1. De modo semelhante, a incubação das culturas com a subunidade CB (2 horas) resultou em baixo percentual de células com intensidade de fluorescência para PECAM-1 (1,65%). Após 8 horas de incubação com o LPS (50 ng/mL), não houve alteração no percentual de células com intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 (7,37%), em relação ao controle negativo. A pré-incubação das células com a subunidade CB (5 µg/mL) não causou alteração do percentual de intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 (2,25%), induzida pelo LPS. A **Figura 18B** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de PECAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles apresentaram expressão da molécula de adesão PECAM-1 com valor médio de $68,0 \pm 3,05$ UA. A pré-incubação das células com a subunidade CB não alterou significativamente o perfil de expressão da PECAM-1, em relação ao controle negativo ($65,3 \pm 2,40$ UA). Em células estimuladas com o LPS (50 ng/mL) por 8 horas ($68,0 \pm 4,58$ UA), não houve aumento significativo na expressão de PECAM-1, se comparado ao controle negativo. Curiosamente, não houve aumento nas células estimuladas com o LPS ($68,0 \pm 4,58$ UA). A pré-incubação com a subunidade CB (5 µg/mL) não afetou significativamente a expressão proteica de PECAM-1 ($61,3 \pm 1,85$ UA) induzida pelo LPS, se comparada ao controle positivo ou ainda, ao controle negativo.

A: PECAM-1 [18 horas]

Figura 17 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PECAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 18 horas: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 18 horas (5% CO₂/37 °C) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A) Porcentagem da intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 em células endoteliais (n=1 representativo de um total de 4 animais). (B) Média da intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais (one-way ANOVA).

A: PECAM-1 [8 horas]

Figura 18 Efeito da subunidade CB na expressão proteica de PECAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais no período de 8 horas: As células endoteliais em confluência foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas (5% CO₂/37 °C) e analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Porcentagem da intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 em células endoteliais (n=1 representativo de um total de 4 animais). **(B)** Média da intensidade de fluorescência relativa à PECAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais (one-way ANOVA).

4.13 Participação dos receptores PPAR na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS

É conhecido que os receptores nucleares PPAR são reguladores negativos do processo inflamatório que atuam por mecanismos transcricionais. Um dos ligantes para as 3 isoformas conhecidas destes receptores (alfa, beta/delta e gama) é a prostaciclina. Uma vez que a subunidade CB é capaz de aumentar, de modo marcante, a produção de prostaciclina em células endoteliais, foi de interesse determinar a participação dos receptores PPARs no efeito inibitório exercido por essa FLA₂. Para tanto, as células endoteliais foram pré-incubadas com os respectivos inibidores específicos de cada isoforma: PPAR-alfa (GW6471, 20 μ M), PPAR beta/delta (GSK0660, 20 μ M) ou PPAR gama (GW9662, 20 μ M) ou com seus respectivos veículos (dados não demonstrados) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas celulares e mantida por 2 horas na presença dos inibidores. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL; controle positivo) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão ICAM-1 (CD54) foi determinado por citometria de fluxo.

As **Figuras 19A, 19B, 19C, 19D, 19E e 19F** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula ICAM-1. A **Figura 19A** mostra que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 19B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência das células endoteliais, se comparadas ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de ICAM-1 (**Figura 19C**). O tratamento das células com o inibidor da isoforma alfa do PPAR (GW6471), previamente à incubação das mesmas com a subunidade CB, aboliu o efeito inibitório desta FLA₂ sobre a expressão de ICAM-1, estimulada pelo LPS (**Figura 19D**). De mesmo modo, o tratamento das células com o composto GSK0660 (inibidor da isoforma beta/delta), aboliu a atividade inibitória da subunidade CB, sobre a expressão de ICAM-1 induzida pelo LPS (**Figura 19E**). Por outro lado, a **Figura 19F** mostra que o tratamento das células endoteliais com o inibidor da isoforma gama do PPAR (GW9662), não alterou o perfil inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 induzida pelo LPS.

A **Figura 19G** apresenta a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de ICAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $419,8 \pm 79,62$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou

significativamente a expressão de ICAM-1 após 8 horas de incubação ($569,8 \pm 91,54$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB ($5 \mu\text{g/mL}$), causou diminuição significativa da expressão proteica de ICAM-1 ($428,8 \pm 55,77$ UA), quando comparado ao controle positivo (LPS). Em relação aos tratamentos com os inibidores dos receptores PPAR, é possível observar que tanto o inibidor da isoforma alfa quanto o da isoforma beta/delta do PPAR, aboliram o efeito inibitório da subunidade CB ($649,3 \pm 115,10$ UA; $687 \pm 135,6$ UA, respectivamente). É possível observar que estes níveis de expressão da molécula ICAM-1, foram muito similares àqueles verificados com as células estimuladas apenas com LPS apenas (controle positivo). Por outro lado, o pré-tratamento das células com o inibidor da isoforma gama do PPAR, não modificou a atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1, apresentando neste caso, valor muito próximo àquele verificado com as células pré-incubadas com a subunidade CB, antes da adição de LPS ($446 \pm 80,7$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com os compostos GW6471 ou GSK0660 ou GW9662, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação da subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de ICAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Figura 19. Participação dos receptores PPAR no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais: As células endoteliais em confluência foram pré-incubadas com os inibidores dos receptores PPAR alfa, beta/delta e gama (GW6471, 20 µM; GSK0660, 20 µM e GW9662, 20 µM, respectivamente) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL), incubado por 8 horas e a expressão de ICAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas (controle negativo) *versus* subunidade CB; (B) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); (C) Histograma representativo da

média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; **(D)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* inibidor PPAR alfa + CB/LPS; **(E)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* inibidor PPAR beta/delta + CB/LPS; **(F)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* inibidor PPAR gama + CB/LPS; **(G)** Média da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo. ++ $P < 0,01$ em relação às células com CB/LPS. +++ $P < 0,001$ em relação às células inibidas com CB/LPS (one-way ANOVA).

4.14 Participação dos receptores PPAR na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS

O próximo passo foi avaliar se os receptores PPAR participariam do efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 (CD106) induzida pelo LPS. Para tanto, as células endoteliais foram pré-incubadas com os inibidores específicos de cada isoforma: PPAR-alfa (GW6471, 20 μ M), PPAR beta/delta (GSK0660, 20 μ M) e PPAR gama (GW9662, 20 μ M) ou com seus respectivos veículos (dados não demonstrados) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas celulares e mantida por 2 horas na presença dos inibidores. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL, controle positivo) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

As **Figuras 20A, 20B, 20C, 20D, 20E e 20F** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Em relação à **Figura 20A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 20B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência das células endoteliais, se comparadas ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de VCAM-1 (**Figura 20C**). O tratamento das células com os inibidores das isoformas alfa (**Figura 20D**) ou beta/delta (**Figura 20E**) ou gama (**Figura 20F**) do PPAR, previamente à incubação das mesmas com a subunidade CB, não alterou o perfil inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 induzida pelo LPS.

Para melhor visualização destes dados, a **Figura 20G** apresenta a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles apresentam expressão da molécula de adesão VCAM-1, com valor médio de $68,2 \pm 8,4$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de VCAM-1 após 8 horas de incubação ($187,8 \pm 33,47$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB (5 μ g/mL), causou diminuição significativa da expressão proteica de VCAM-1 ($84,25 \pm 13,66$ UA), quando comparado ao controle positivo. Em relação aos tratamentos com os inibidores dos receptores PPAR, é possível observar que os inibidores das isoformas alfa ou beta/delta ou gama do PPAR, não foram capazes de abolir o efeito inibitório da subunidade CB (alfa: $108 \pm 27,44$ UA; beta/delta: $122,8 \pm 30,92$ UA; gama: $83,25 \pm 11,06$ UA,

respectivamente). Nestes casos, é possível observar que os níveis de expressão da molécula VCAM-1, são muito similares àqueles verificados com as células pré-incubadas com a subunidade CB, antes da adição de LPS (CB/LPS). Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com os compostos GW6471 ou GSK0660 ou GW9662, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação da subunidade CB), não acarretou diferenças no perfil de expressão de VCAM-1, em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Figura 20 Participação dos receptores PPAR no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais: As células endoteliais em confluência foram pré-incubadas com os inibidores dos receptores PPAR alfa, beta/delta e gama (GW6471, 20 μ M; GSK0660, 20 μ M e GW9662, 20 μ M, respectivamente) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL), incubado por 8 horas e a expressão de VCAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas (controle negativo) *versus* subunidade CB; (B) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); (C) Histograma representativo da

média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; **(D)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* inibidor PPAR alfa + CB/LPS; **(E)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* inibidor PPAR beta/delta + CB/LPS; **(F)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* inibidor PPAR gama + CB/LPS; **(G)** Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. *** $p < 0,001$ em relação ao controle negativo. ## $P < 0,01$ em relação ao controle positivo (LPS apenas) (one-way ANOVA).

4.15 Participação da via de sinalização autócrina da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS

Para avaliar o envolvimento da via de sinalização autócrina da prostaciclina (via do receptor IP, adenilato ciclase e PKA), na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1, foram efetuados pré-tratamentos das células endoteliais com os compostos CAY10441 (antagonista do receptor IP), SQ22536 (inibidor seletivo da adenilato ciclase) ou H-89 (inibidor da PKA) ou com os seus respectivos veículos (dados não demonstrados) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas celulares, por 2 horas, na presença dos compostos CAY10441 ou SQ22536 ou H-89. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão ICAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

Primeiramente, foi avaliado o efeito do composto CAY10441 na atividade inibitória da subunidade CB, sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1. As **Figuras 21A, 21B, 21C e 21D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula ICAM-1. Em relação à **Figura 21A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 21B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, em comparação ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de ICAM-1 (**Figura 21C**). Porém, a pré-incubação das células com o composto CAY10441, previamente à incubação das células com a subunidade CB, diminuiu o efeito inibitório desta FLA₂ sobre a expressão de ICAM-1, após estimulação com o LPS (**Figura 21D**).

A **Figura 21E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de ICAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células do controle negativo apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $480,8 \pm 158,5$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de ICAM-1 após 8 horas de incubação ($724,3 \pm 186,7$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB (5 µg/mL), causou diminuição significativa da expressão proteica de ICAM-1 ($537,5 \pm 156,9$ UA), quando comparado ao controle positivo (LPS). Porém, a pré-incubação com o composto CAY10441 aboliu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS ($702,8 \pm 172,7$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das células

endoteliais com o composto CAY10441, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação com a subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de ICAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Em seguida, foi avaliado o efeito do composto SQ22536 na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1. As **Figuras 22A, 22B, 22C e 22D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula ICAM-1. Em relação à **Figura 22A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 22B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, em comparação ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de ICAM-1 (**Figura 22C**). Porém, a pré-incubação das células com o composto SQ22536, previamente à incubação das células com a subunidade CB, aboliu o efeito inibitório desta FLA₂ sobre a expressão de ICAM-1, após estimulação com o LPS (**Figura 22D**).

A **Figura 22E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de ICAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $258 \pm 17,24$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de ICAM-1 após 8 horas de incubação ($476,8 \pm 40,53$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB ($5 \mu\text{g/mL}$), causou diminuição significativa da expressão proteica de ICAM-1 ($375,5 \pm 38,31$ UA), quando comparado ao controle positivo (LPS). Porém, a pré-incubação com o composto SQ22536 aboliu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS ($490,5 \pm 47,42$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com o composto SQ22536, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação com a subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de ICAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

O próximo passo foi avaliar o efeito do composto H-89 na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1. As **Figuras 23A, 23B, 23C e 23D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula ICAM-1. Em relação à **Figura 23A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Na **Figura 23B** observa-se que o LPS estimulou um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, se comparadas ao controle negativo. Como esperado, a subunidade CB

diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de ICAM-1 (**Figura 23C**). Todavia, a pré-incubação das células com o inibidor H-89, aboliu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS (**Figura 23D**).

A **Figura 23E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de ICAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $258 \pm 17,24$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de ICAM-1 após 8 horas de incubação ($476,8 \pm 40,53$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB ($5 \mu\text{g/mL}$) causou diminuição significativa da expressão proteica de ICAM-1 ($375,5 \pm 38,31$ UA), quando comparado ao controle positivo. Contudo, a pré-incubação com o composto H-89 aboliu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS ($492,5 \pm 49,04$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com o composto H-89, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação da subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de ICAM-1, em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Figura 21 Efeito do antagonista do receptor IP na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais foram pré-incubadas com o antagonista do receptor IP CAY10441 (1 μ M) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de ICAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* subunidade CB; **(B)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); **(C)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; **(D)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* CAY10441 [1 μ M] + CB/LPS; **(E)** Média da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas). + $p < 0,05$ em relação às células inibidas com CB/LPS (one-way ANOVA).

Figura 22 Efeito do inibidor da adenilato ciclase na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais foram pré-incubadas com o inibidor da adenilato ciclase SQ22536 (50 µM) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de ICAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* subunidade CB; (B) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); (C) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; (D) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* SQ22536 [50 µM] + CB/LPS; (E) Média da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas). ++ $p < 0,01$ em relação às células inibidas com CB/LPS (one-way ANOVA).

Figura 23 Efeito do inibidor da proteína quinase A na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais foram pré-incubadas com o inibidor da proteína quinase A H-89 (1 μ M) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de ICAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas (controle negativo) *versus* subunidade CB; **(B)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); **(C)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; **(D)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* H-89 [50 μ M] + CB/LPS; **(E)** Média da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas). + $p < 0,05$ em relação às células inibidas com CB/LPS (one-way ANOVA).

4.16 Participação da via de sinalização autócrina da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS

O envolvimento da via de sinalização autócrina da prostaciclina (via do receptor IP, adenilato ciclase e PKA) no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 endotelial induzida pelo LPS foi avaliado. Para tanto, foram efetuados pré-tratamentos das células endoteliais com os compostos CAY10441 (antagonista do receptor IP) ou SQ22536 (inibidor seletivo da adenilato ciclase) ou H-89 (inibidor da PKA) ou com os seus respectivos veículos (dados não demonstrados) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas celulares por 2 horas na presença dos compostos CAY10441 ou SQ22536 ou H-89. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

Primeiramente, foi avaliado o efeito do composto CAY10441 na atividade inibitória da subunidade CB, sobre a expressão da molécula de adesão VCAM-1. As **Figuras 24A, 24B, 24C e 24D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Em relação à **Figura 24A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 24B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, em comparação ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de VCAM-1 (**Figura 24C**). A pré-incubação das células com o composto CAY10441, previamente à incubação das células com a subunidade CB, não aboliu o efeito inibitório desta FLA₂ sobre a expressão de VCAM-1, após estimulação com o LPS (**Figura 24D**).

A **Figura 24E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células do controle negativo apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $99,25 \pm 10,59$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de VCAM-1 após 8 horas de incubação ($496,5 \pm 139,2$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB (5 µg/mL) causou diminuição significativa da expressão proteica de VCAM-1 ($245,8 \pm 71,69$ UA), quando comparado ao controle positivo (LPS). A pré-incubação com o composto CAY10441 não modificou o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS ($279,5 \pm 66,86$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das

células endoteliais com o composto CAY10441, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação com a subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de VCAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Em seguida, foi avaliado o efeito do composto SQ22536 na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão da molécula de adesão VCAM-1. As **Figuras 25A, 25B, 25C e 25D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Em relação à **Figura 24A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 25B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, em comparação ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de VCAM-1 (**Figura 25C**). A pré-incubação das células com o composto SQ22536, previamente à incubação das células com a subunidade CB, não afetou a ação inibitória desta FLA₂ sobre a expressão de VCAM-1, após estimulação com o LPS (**Figura 25D**).

A **Figura 25E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles (negativo) apresentam expressão da molécula de adesão VCAM-1, com valor médio de $99,2 \pm 7,86$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de VCAM-1 após 8 horas de incubação ($496,5 \pm 105,8$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB ($5 \mu\text{g/mL}$), causou diminuição significativa da expressão proteica de VCAM-1 ($245,8 \pm 57,87$ UA), quando comparado ao controle positivo (LPS). A pré-incubação com o composto SQ22536 não modificou o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS ($316,5 \pm 72,50$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com o composto SQ22536, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação com a subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de VCAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

O próximo passo foi avaliar o efeito do composto H-89 na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1. As **Figuras 26A, 26B, 26C e 26D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Em relação à **Figura 26A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação ao controle negativo. Na **Figura 26B** observa-se que o LPS induziu um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, se comparadas ao controle negativo. Como esperado, a subunidade CB

diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de VCAM-1 (**Figura 26C**). A pré-incubação das células com o inibidor H-89, não aboliu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS (**Figura 26D**).

A **Figura 26E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células do controle negativo apresentam expressão da molécula de adesão VCAM-1, com valor médio de $99,2 \pm 7,86$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de VCAM-1 após 8 horas de incubação ($496,5 \pm 105,8$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB ($5 \mu\text{g/mL}$), causou diminuição significativa da expressão proteica de VCAM-1 ($245,8 \pm 57,87$ UA), quando comparada ao controle positivo (LPS).

A pré-incubação com o composto H-89 não aboliu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS ($273,5 \pm 67,16$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com o composto H-89, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação da subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de VCAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Figura 24 Efeito do antagonista do receptor IP na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais foram pré-incubadas com o antagonista do receptor IP CAY10441 (1 µM) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de VCAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* subunidade CB; (B) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); (C) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; (D) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* CAY10441 [1 µM] + CB/LPS; (E) Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas) (one-way ANOVA).

Figura 25 Efeito do inibidor da adenilato ciclase na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais foram pré-incubadas com o inibidor da adenilato ciclase SQ22536 (50 µM) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de VCAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* subunidade CB; (B) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); (C) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; (D) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* SQ22536 [50 µM] + CB/LPS; (E) Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas) (one-way ANOVA).

Figura 26 Efeito do inibidor da proteína quinase A na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais foram pré-incubadas com o inibidor da proteína quinase A H-89 (1 µM) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 3 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de VCAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas (controle negativo) *versus* subunidade CB; **(B)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); **(C)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; **(D)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* H-89 [50 µM] + CB/LPS; **(E)** Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas) (one-way ANOVA).

4.17 Efeito da subunidade CB na produção de AMP cíclico após 2 horas de incubação com as células endoteliais

Para confirmar os resultados anteriores, que demonstraram a participação do receptor IP, adenilato ciclase e da PKA no efeito inibitório da subunidade CB, sobre a expressão da molécula ICAM-1, avaliou-se a biodisponibilidade de AMP cíclico nos sobrenadantes celulares. Adicionalmente, foi feita a dosagem de PGI₂ com o mesmo sobrenadante utilizado para dosagem do AMP cíclico, como parâmetro de referência da atividade da subunidade CB. Desse modo, após o término da incubação das células endoteliais com subunidade CB (5 µg/mL por 2 horas), o sobrenadante foi coletado e, em seguida, os níveis de prostaciclina e de AMP cíclico foram determinados por ensaio imunoenzimático. A **Figura 27A** mostra que as células controles (meio de cultura apenas) apresentaram uma liberação basal média de AMP cíclico de $0,3750 \pm 0,07$ pg/mL, após 2 horas de incubação. Não houve alteração significativa na concentração de AMP cíclico nas células estimuladas com a subunidade CB (valor médio de $0,4773 \pm 0,02$ pg/mL). Em relação à dosagem de prostaciclina, a **Figura 27B** mostra que as células controles (meio de cultura apenas) apresentaram uma liberação basal média de 6-ceto PGF_{1α} de $283,4 \pm 39,93$ pg/mL, após 2 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada em células estimuladas com a subunidade CB, com valor médio de $662,2 \pm 42,06$ pg/mL (133% de aumento).

Figura 27 Efeito da subunidade CB na produção de AMP cíclico e de prostaciclina após 2 horas de incubação com as células endoteliais: As células endoteliais foram incubadas (2 horas) com a subunidade CB (5 µg/mL) ou meio de cultura apenas (37 °C em estufa de CO₂ a 5%). A concentração de AMP cíclico e 6-ceto prostaglandina F_{1α} foram determinadas por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. *** p< 0,001 em relação ao controle (one-way ANOVA).

4.18 Participação da prostaciclina sintase na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS

Para avaliar o papel da prostaciclina no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão da molécula de adesão ICAM-1 estimulada pelo LPS, as células endoteliais foram pré-incubadas com o inibidor da prostaciclina sintase TCP (1 mM) ou com seu respectivo veículo (dados não demonstrados) por 12 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas celulares por 2 horas na presença do inibidor TCP. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão ICAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

As **Figuras 28A, 28B, 28C e 28D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula ICAM-1. Em relação à **Figura 28A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 28B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, se comparadas ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de ICAM-1 (**Figura 28C**). Todavia, a pré-incubação das células com o inibidor TCP, previamente à incubação das células com a subunidade CB, aboliu o efeito inibitório desta FLA₂ sobre a expressão de ICAM-1, após estimulação com o LPS (**Figura 28D**).

A **Figura 28E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de ICAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles apresentam expressão da molécula de adesão ICAM-1, com valor médio de $680,3 \pm 173,9$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS aumentou significativamente a expressão de ICAM-1 após 8 horas de incubação ($1051,0 \pm 249,5$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB (5 µg/mL), causou diminuição significativa da expressão proteica de ICAM-1 ($740,3 \pm 182,7$ UA), quando comparado ao controle positivo (LPS). A pré-incubação das células com o inibidor TCP aboliu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS, sendo que o valor médio de expressão ($1142,2 \pm 254,9$ UA) não diferiu, de modo significativo, do observado em células estimuladas apenas pelo LPS. Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com o composto TCP seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação da subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de ICAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Adicionalmente, foi feita a dosagem de prostaciclina com o sobrenadante das mesmas células submetidas à análise por citometria de fluxo, para comprovação da eficácia do inibidor TCP sobre a prostaciclina sintase. A **Figura 30** mostra que as células controles (não estimuladas) apresentaram uma liberação basal de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ de $283,4 \pm 39,93$ pg/mL (valor da média) após 2 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada em células estimuladas com a subunidade CB, com valor médio de $662,2 \pm 42,06$ pg/mL (133% de aumento). Porém, o pré-tratamento das células endoteliais com o inibidor TCP, diminuiu significativamente a biossíntese de prostaciclina ($228,4 \pm 28,32$ pg/mL ou 65% de diminuição), se comparado às células incubadas com a subunidade CB apenas.

Figura 28 Participação da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais em confluência foram pré-incubadas com o inibidor da prostaciclina sintase TCP (1 mM) por 12 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de ICAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas (controle negativo) *versus* subunidade CB; **(B)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); **(C)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; **(D)** Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* TCP [1 mM] + CB/LPS; **(E)** Média da intensidade de fluorescência relativa à ICAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas). ++ $p < 0,01$ em relação às células inibidas com CB/LPS (one-way ANOVA).

4.19 Participação da prostaciclina na atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS

A participação da prostaciclina no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 induzida pelo LPS também foi investigada. Para tanto, as células endoteliais foram pré-incubadas com o inibidor TCP (1 mM) ou com seu respectivo veículo (dados não demonstrados) por 12 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 µg/mL) foi adicionada às culturas celulares por 2 horas na presença do inibidor TCP. Após este período, os poços foram lavados com PBS estéril e as células estimuladas com LPS (50 ng/mL) ou meio de cultura apenas (controle negativo) por 8 horas. O perfil de expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 foi determinado por citometria de fluxo.

As **Figuras 29A, 29B, 29C e 29D** ilustram as médias de intensidade de fluorescência para a molécula VCAM-1. Em relação à **Figura 29A**, é possível verificar que as células incubadas com a subunidade CB apenas, não apresentaram diferenças na intensidade de fluorescência, em comparação com o controle negativo. Contudo, observa-se na **Figura 29B** que o LPS causou um aumento na intensidade de fluorescência nas células endoteliais, se comparadas ao controle negativo. Como demonstrado anteriormente, a subunidade CB diminuiu o efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de VCAM-1 (**Figura 29C**). A pré-incubação das células com o inibidor TCP, previamente à incubação das células com a subunidade CB, não alterou o efeito inibitório desta FLA₂ sobre a expressão de VCAM-1, após estimulação com o LPS (**Figura 29D**).

A **Figura 29E** mostra a média das intensidades de fluorescência e fornece dados quantitativos sobre a expressão proteica de VCAM-1 em células endoteliais. Desse modo, pode-se observar que as células controles (negativo) apresentam expressão da molécula de adesão VCAM-1, com valor médio de $87,75 \pm 15,8$ UA. A estimulação das células endoteliais com o LPS é capaz de aumentar significativamente a expressão de VCAM-1 após 8 horas de incubação ($447,8 \pm 131,8$ UA), se comparado ao controle negativo. A incubação prévia das células endoteliais com a subunidade CB (5 µg/mL), causou diminuição significativa da expressão proteica de VCAM-1 ($245,3 \pm 57,9$ UA), quando comparado ao controle positivo (LPS). A pré-incubação com o inibidor TCP não alterou o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS ($154,5 \pm 36,34$ UA). Vale mencionar que o pré-tratamento das células endoteliais com o composto TCP, seguido apenas da estimulação com o LPS (sem incubação da subunidade CB), não apresentou diferenças no perfil de expressão de VCAM-1 em relação às células estimuladas apenas com LPS (dados não demonstrados).

Para comprovar a eficácia do inibidor TCP sobre a PGIS, efetuou-se a dosagem de prostaciclina com o sobrenadante das mesmas células submetidas à análise por citometria de fluxo. A **Figura 30** mostra que as células controles (não estimuladas) apresentaram uma liberação basal de 6-ceto $\text{PGF}_{1\alpha}$ de $283,4 \pm 39,93$ pg/mL (valor da média) após 2 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada em células estimuladas com a subunidade CB, com valor médio de $662,2 \pm 42,06$ pg/mL (133% de aumento). Porém, o pré-tratamento das células endoteliais com o inibidor TCP, diminuiu significativamente a biossíntese de prostaciclina ($228,4 \pm 28,32$ pg/mL ou 65% de diminuição), se comparado às células incubadas com a subunidade CB apenas.

Figura 29 Participação da prostaciclina no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 estimulada pelo LPS: As células endoteliais em confluência foram pré-incubadas com o inibidor da prostaciclina sintase TCP (1 μ M) por 12 horas. Em seguida, a subunidade CB (5 μ g/mL) foi adicionada às culturas por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 8 horas e a expressão de VCAM-1 foi analisada por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. (A) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas (controle negativo) *versus* subunidade CB; (B) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com meio de cultura apenas *versus* LPS (controle positivo); (C) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS; (D) Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência em células incubadas com LPS *versus* CB/LPS *versus* TCP [1 mM] + CB/LPS; (E) Média da intensidade de fluorescência relativa à VCAM-1 em células endoteliais. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais diferentes. ** $p < 0,01$ em relação ao controle negativo. # $p < 0,05$ em relação ao controle positivo (LPS apenas) (one-way ANOVA).

Figura 30 Efeito da tranilcipromina (TCP) na liberação de prostaciclina estimulada pela subunidade CB em células endoteliais: As células endoteliais foram incubadas com o composto TCP (1 mM) ou meio de cultura na presença do respectivo veículo (CTRL: controle negativo) por 1 hora antes da adição de 5 µg/mL da subunidade CB (controle positivo) por 6 horas a 37 °C em estufa de CO₂ (5%). A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 3-4 animais. ***p < 0,001 em relação ao controle. +++p < 0,001 em relação à subunidade CB (controle positivo) (one-way ANOVA).

4.20 Efeito da subunidade CB na expressão gênica das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 induzida pelo LPS

Para determinar se o efeito inibitório da subunidade CB, sobre a expressão proteica de ICAM-1 e VCAM-1 (induzidas pelo LPS), envolveria alterações na transcrição gênica dessas moléculas, as células endoteliais foram pré-incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas. Após este período, o LPS (50 ng/mL; controle positivo) ou meio de cultura apenas (controle negativo) foram adicionados às culturas por 4 horas. Após esse período, as células foram processadas para quantificação do teor de RNA mensageiro das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, pela técnica de qPCR em tempo real.

As **Figuras 31A e 31B** mostram que as células incubadas apenas com a subunidade CB não induziram alterações significativas, no conteúdo de RNAs mensageiros que codificam as moléculas ICAM-1 ou VCAM-1, se comparados às células incubadas com meio de cultura apenas (controle basal). Por outro lado, quando as células foram estimuladas pelo LPS (controle positivo), houve um aumento significativo no teor de RNA mensageiro tanto de ICAM-1 quanto de VCAM-1 (7 vezes e 29 vezes, respectivamente), se comparado ao controle basal. Quando as células foram incubadas com a subunidade CB, antes da adição do LPS, houve uma diminuição significativa no teor de RNA mensageiro de ICAM-1 e VCAM-1 (3 vezes e 13 vezes, respectivamente), em relação tanto ao controle basal quanto ao controle positivo (LPS apenas).

Figura 31 Efeito da subunidade CB na expressão gênica das moléculas ICAM-1 e VCAM-1 induzida pelo LPS: As células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 4 horas (5% CO₂/37 °C). A seguir, as células foram processadas e o teor de RNA mensageiro foi determinado pela técnica de rt-PCR em tempo real, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Quantidade relativa de RNA mensageiro que codifica a proteína ICAM-1. **(B)** Quantidade relativa de RNA mensageiro que codifica a proteína VCAM-1. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. ***p<0,001 em relação ao controle negativo (meio de cultura apenas). ++p<0,01 em relação ao controle positivo (LPS). +++p<0,001 em relação ao controle positivo (LPS) (one-way ANOVA).

4.21 Efeito da subunidade CB sobre a expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IL-6 induzida pelo LPS

Para determinar se o efeito da subunidade CB, sobre a expressão gênica das citocinas inflamatórias TNF-alfa e IL-6 induzida pelo LPS, as células endoteliais foram pré-incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas. Após este período, o LPS (50 ng/mL; controle positivo), ou meio de cultura apenas (controle basal) foram adicionados às culturas por 4 horas. Após esse período, as células foram processadas para quantificação do teor de RNA mensageiro das citocinas TNF-alfa e IL-6 pela técnica de qPCR em tempo real.

As **Figuras 32A e 32B** mostram que as células incubadas apenas com a subunidade CB não induziram alterações significativas, no conteúdo de RNAs mensageiros que codificam as citocinas TNF-alfa ou IL-6, se comparado às células incubadas com meio de cultura apenas. Por outro lado, quando as células foram estimuladas pelo LPS, houve um aumento significativo no teor de RNA mensageiro, tanto de TNF-alfa quanto de IL-6 (11 vezes e 15 vezes, respectivamente), se comparado ao controle basal. Quando as células foram incubadas com a subunidade CB, antes da adição do LPS, ocorreu uma diminuição significativa do teor de RNA mensageiro de TNF-alfa e IL-6 (6 vezes de aumento para ambos), em relação ao controle basal.

Figura 32 Efeito da subunidade CB na expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IL-6 induzida pelo LPS. As células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB (5 µg/mL) por 2 horas antes da adição do LPS (50 ng/mL) por 4 horas (5% CO₂/37 °C). Após, as células foram processadas e o teor de RNA mensageiro foi determinado pela técnica de rt-PCR em tempo real, como descrito em Material e Métodos. **(A)** Quantidade relativa de RNA mensageiro que codifica a citocina TNF-alfa. **(B)** Quantidade relativa de RNA mensageiro que codifica a citocina IL-6. Cada valor representa a média ± E.P.M. de culturas de células provenientes de 4 animais. **p<0,01 em relação ao controle negativo. ***p<0,001 em relação ao controle negativo (meio de cultura apenas). +p<0,05 em relação ao controle positivo (LPS) (one-way ANOVA).

5 DISCUSSÃO

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* é conhecido pelas suas propriedades inibitórias sobre a resposta imune inata e adaptativa, em diversos parâmetros experimentais, como edema, dor, migração leucocitária, função microbicida de macrófagos e produção de anticorpos. A responsabilidade destes efeitos é atribuída ao componente majoritário do veneno crotálico, à crotoxina e à sua subunidade CB, uma fosfolipase A₂. (BOLANO; CERDAS, 1978; BORDON et al., 2012; CARDOSO et al., 2001; CARDOSO; MOTA, 1997; FAVORETTO et al., 2011; MULLER et al., 2012; NUNES et al., 2007, 2010; RANGEL-SANTOS et al., 2004; SAMPAIO et al., 2003, 2005, 2006, 2010; SCHAEFFER et al., 1988; SOUSA-E-SILVA et al., 1996; ZHANG et al., 2006). Embora existam estudos que demonstrem as ações modulatórias da FLA₂ crotálica em eventos inflamatórios, pouco se conhece sobre os mecanismos de ação envolvidos. Em função do papel central das células endoteliais, que revestem internamente os vasos do sistema cardiovascular, no controle da inflamação, no presente estudo, foram investigadas as ações da subunidade CB nestas células, em particular nos mecanismos de síntese de prostaciclina e sua participação nos efeitos inibitórios desta FLA₂. Neste sentido, o presente estudo evidenciou uma importante relação entre a prostaciclina, o principal mediador lipídico produzido pelas células endoteliais, e os efeitos inibitórios induzidos pela FLA₂ de *C. d. terrificus* sobre a inflamação.

Para estes estudos, as células endoteliais primárias de microcirculação representaram o modelo mais adequado. É conhecido que o processo inflamatório se desenvolve, fundamentalmente, na rede microcirculatória, especialmente no segmento de vênulas pós-capilares (KIRKPATRICK et al., 1997). Além disso, as células de cultura primária apresentam maior estabilidade genética, em relação à linhagens imortalizadas e, por possuírem um ciclo de replicação finito, exigem novos isolamentos, proporcionando uma amostragem populacional mais ampla.

A presença das células endoteliais nas culturas celulares foi confirmada pela imunodeteção do fator de von Willebrand (vWF). Este fator é uma glicoproteína multimérica envolvida no processo de coagulação e conhecido marcador de células endoteliais (RUGGERI; WARE, 1993; SADLER et al., 2009; VALENTIJN et al., 2011). O vWF é expresso apenas em células endoteliais e plaquetas e atua como estabilizador do fator VIII da coagulação e como cofator para adesão de plaquetas à matriz extracelular, após injúria dos vasos sanguíneos (SUMPIO et al., 2002). A célula endotelial produz duas formas de vWF: uma forma dimérica,

que é secretada no plasma e na matriz subendotelial e outra forma, multimérica, encontrada tanto na membrana perinuclear (forma imatura), quanto associada ao citoesqueleto de actina e aos microtúbulos (após maturação). Em geral, o fator de von Willebrand é encontrado no interior dos corpúsculos de Weibel-Palade, os quais podem se fundir com a membrana extracelular para a sua exocitose (JAFÉ et al., 1973; SUMPIO et al., 2002; VALENTIJN et al., 2011; WEIBEL; PALADE, 1964).

Os dados iniciais, obtidos neste estudo, evidenciaram uma baixa citotoxicidade da subunidade CB, visto que, apenas na concentração de 50 µg/mL, esta FLA₂ causou redução do metabolismo celular e somente após 24 horas de incubação. Outros parâmetros de viabilidade celular não foram afetados pela CB, em nenhuma das concentrações utilizadas (integridade das monocamadas celulares e lesão necrótica). Estes dados corroboram a literatura acerca da baixa toxicidade desta FLA₂, em outros tipos celulares, inclusive células endoteliais (COLLARES-BUZATO et al., 2002; TANJONI et al., 2005). Lomonte e colaboradores (1999) sugeriram que a FLA₂-subunidade CB é menos tóxica, se comparada àquelas isoladas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Curiosamente, a subunidade CB, nas concentrações de 1 e 5 µg/mL, causou diminuição da liberação basal da lactato desidrogenase, uma enzima liberada como subproduto do catabolismo celular, ou em decorrência de lesões necróticas em membranas celulares (KARAHASHI et al., 2009; STODDART, 2011). Estes dados são intrigantes e podem sugerir um papel citoprotetor da subunidade CB, porém, para comprovação desta hipótese, são necessários estudos adicionais.

A seguir, foi avaliado o efeito da subunidade CB na produção de prostaciclina. Como mencionado na Introdução, o endotélio é um tecido metabolicamente ativo, envolvido na síntese de diversos mediadores com função regulatória (VANE et al., 1990; VANE; BOTTING, 1995; POBER; SESSA, 2007; SIMMONS et al., 2004). Dentre estas substâncias, o principal produto do metabolismo do ácido araquidônico, na célula endotelial, é a prostaciclina. Este mediador é membro da família das prostaglandinas e exerce importante papel fisiológico, atuando no controle da homeostasia vascular e da coagulação (KELTON et al., 1980; MITCHELL et al., 2007; VANE; CORIN, 2003). Os resultados do presente estudo demonstraram que a subunidade CB foi capaz de aumentar, de modo marcante, a produção de prostaciclina pelas células endoteliais. Estes dados corroboram estudos anteriores, iniciados no mestrado, que mostraram que a CB induziu aumento dos níveis de PGI₂, em células endoteliais imortalizadas e apontam a capacidade da subunidade CB estimular, de modo direto, as células endoteliais da microcirculação. Deve-se ressaltar que esta é a primeira demonstração do efeito indutor da CB

em células endoteliais primárias de microcirculação, para a produção de prostaciclina. A seguir, foram avaliados os mecanismos intracelulares envolvidos nesse efeito.

Em condições fisiológicas, a via biossintética da prostaciclina no endotélio envolve a participação de três enzimas-chaves: a ciclooxygenase-1 (COX-1), a prostaciclina sintase (PGIS) e as fosfolipases A₂ intracelulares (VANE; CORIN, 2003, MITCHELL et al., 2007). Nesse sentido, avaliou-se a participação das ciclooxygenases nos efeitos da subunidade CB, ora evidenciados. Como mencionado na Introdução, o ácido araquidônico, gerado a partir da hidrólise de fosfolipídeos de membrana celular, pelas fosfolipases A₂, é prontamente metabolizado por diferentes complexos enzimáticos, em particular as COX-1 e COX-2 (BAKHLE, 1999; SMITH et al., 2000). A metabolização do AA, por este sistema, leva à produção das prostaglandinas via ação de enzimas sintases terminais tecido-específicas. Os dados obtidos neste estudo, a partir de intervenções farmacológicas, indicaram que a isoforma COX-1, mas não a COX-2, está envolvida na biossíntese de PGI₂ induzida pela CB no endotélio. Os resultados referentes ao estudo de expressão proteica das isoformas de COXs, que demonstraram que a subunidade CB não induziu a expressão de COX-2 e não alterou a expressão constitutiva de COX-1, corroboram os dados acima e indicam que as ações estimulatórias da CB, para a produção de PGI₂ endotelial, dependem exclusivamente da atividade enzimática da COX-1. Ainda neste contexto, vale ressaltar que a incubação das células endoteliais com o LPS, conhecido estimulador inflamatório, induziu aumento marcante da expressão proteica da isoforma COX-2, demonstrando que o modelo experimental empregado responde a estímulos específicos, com a expressão de COX-2.

A literatura mostra que a ativação catalítica das COX-1 e COX-2 está relacionada ao nível de ácido araquidônico liberado no citoplasma celular (MURAKAMI et al., 2000). Assim sendo, estímulos que ocasionam um grande aumento no teor de ácido araquidônico, ativam imediatamente a COX-1 (MORITA et al., 1995; REDDY et al., 1997; REDDY; HERSCHMAN, 1997). Há evidências de que, durante um processo inflamatório, as COX-1 e -2 regulam diferentes fases da biossíntese de prostanoídes e não exercem funções sobrepostas (NARABA, et al., 1998). O fato de a subunidade CB possuir potente atividade catalítica e ter causado um aumento marcante na liberação de ácido araquidônico em neutrófilos, como demonstrado por Moreira et al., (2008), pode explicar os resultados obtidos no presente estudo, indicando a importância da COX-1 para a síntese da PGI₂ endotelial. Adicionalmente, considerando que os componentes do veneno crotálico não estão associados a efeitos inflamatórios (DONATO et al., 1996; MOUNIER et al., 1996; SAMPAIO et al., 2005; SOARES et al., 2001; ZAMBELLI et al., 2008), a ausência de participação da isoforma COX-2, que normalmente é superexpressa em

condições inflamatórias, era esperada. A expressão de COX-2 está intimamente associada à ativação do fator de transcrição inflamatório NF- κ B (WU et al., 2003). Desse modo, os dados do presente estudo, demonstrando que a ativação do NF- κ B não está envolvida no efeito indutor da subunidade CB, para produção de PGI₂, concordam com a ausência da participação da COX-2 neste efeito.

Como supracitado, a etapa final da síntese de prostaglandinas envolve a ação de sintases e isomerases específicas (VANE; BOTTING, 1995). Na célula endotelial, a principal sintase é a prostaciclina sintase (PGIS) (WU; LIOU, 2005). A PGIS é uma isomerase que pertence a família do citocromo P450 e está localizada na membrana do retículo endoplasmático e na membrana perinuclear (DENG et al., 2002; SPISNI et al., 2001; WU; LIOU, 2005). Na célula endotelial, a PGIS é constitutiva, mas pode ser induzida sob ação de citocinas, fatores de crescimento ou hormônios reprodutivos (WU; LIOU, 2005). Com base nestas informações, avaliou-se o papel da PGIS na produção de prostaciclina induzida pela CB. Como esperado, a inibição da PGIS pela tranilcipromina reduziu os níveis de prostaciclina liberada pelas células endoteliais, na vigência de ação da CB. Estes dados confirmam que esta sintase é requerida para a síntese de PGI₂, na presente condição experimental. O fato de termos observado uma redução de 48% na produção de PGI₂ pode ser explicado pela baixa concentração do inibidor tranilcipromina, utilizada neste estudo.

Para melhor compreender os resultados obtidos, avaliou-se a expressão proteica da PGIS pelas células endoteliais, sob estímulo da subunidade CB. Em concordância com os dados anteriores e com a literatura (WU; LIOU, 2005), a PGIS foi detectada em todos os períodos de incubação avaliados, tanto no controle quanto nas células incubadas com a CB. Entretanto, no período de incubação de 8 horas, a subunidade CB induziu um aumento significativo da expressão proteica da PGIS. Com base neste dado, é plausível sugerir que o aumento dos níveis proteicos da PGIS, contribua para a manutenção dos níveis elevados de PGI₂, verificado até a 24^a hora de estimulação pela CB. Este dado é interessante e tem relevância frente ao número crescente de trabalhos da literatura, que evidenciam os efeitos benéficos da PGIS na diminuição da resposta inflamatória. Por exemplo, Bachschmid e colegas (2003) demonstraram que a adesão de leucócitos à parede endotelial, induzida por LPS, é maior quando os níveis de PGIS estão reduzidos. Ainda, outros autores sugerem a prevenção da ativação da PGIS, como estratégia terapêutica para o tratamento de doenças cardiovasculares (CAMACHO et al., 2008; DORRIS; PEEBLES, 2012; NAKAYAMA, 2006; ZOU et al., 1998; ZOU; ULRICH, 1996). De outra parte, Liou e colaboradores (2000) demonstraram, por estudos de imunofluorescência, que a PGIS está colocalizada com a COX-1, tanto no retículo endoplasmático, quanto na membrana

perinuclear. No entanto, Shyue e colaboradores (2001) sugerem que os níveis de PGIS *per se*, não determinam aumento da produção de prostaciclina no endotélio. Estes autores mostraram que a superexpressão de PGIS em HUVECs, não resultou em aumento dos níveis de prostaciclina liberada; esta condição ocorreu somente quando foi feita a coexpressão de PGIS e COX-1. Assim, de acordo com estes autores, a existência de uma razão apropriada entre as enzimas COX-1 e PGIS é fundamental para indução da biossíntese de prostaciclina pelo endotélio. Embora não tenha sido investigada neste estudo, a razão ideal de COX-1:PGIS, deve ter sido alcançada na oitava hora de estímulo com a subunidade CB.

A seguir, investigou-se a participação das fosfolipases A_2 intracelulares no efeito da subunidade CB, uma vez que estas enzimas regulam positivamente a biodisponibilidade do ácido araquidônico para as ciclooxigenases e favorecem a síntese de eicosanoides, como a prostaciclina. Além disso, a interação funcional entre as fosfolipases A_2 secretadas e intracelulares, para formação de prostanoides é bem conhecida (ANTHONSEN et al., 2001; BALSINDE et al., 1998; CHAKRABORTI, 2003; THOMMENSEN et al., 1998). Os dados obtidos mostraram que o tratamento com o inibidor da FLA_2 citosólica (c FLA_2) aboliu a produção de PGI_2 estimulada pela subunidade CB. Este resultado sugere que a FLA_2 citosólica é relevante para a produção da prostaciclina, induzida pela subunidade CB em células endoteliais. Os dados indicam, ainda, a capacidade de uma FLA_2 secretada de veneno de serpente em ativar uma FLA_2 citosólica de mamífero. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que demonstra que as c FLA_2 s, especialmente a c $FLA_2\alpha$, do grupo IV e as s FLA_2 dos grupos IIA, IID, V e X, são as principais isoformas envolvidas na liberação de AA e formação de prostaglandinas, em resposta a estímulos exógenos (MURAKAMI et al., 1998; 2000; SHINOHARA et al., 1999). Em concordância com nossos dados, Houliston e Wheeler-Jones (2001) verificaram que uma FLA_2 secretada de veneno da serpente *Crotalus atrox* é capaz induzir a fosforilação de FLA_2 citosólicas, para aumento da síntese de prostaciclina em células endoteliais. Os resultados do presente estudo mostraram também que, o tratamento com o inibidor da FLA_2 independente de cálcio (i FLA_2), não alterou a liberação de PGI_2 induzida pela CB no endotélio. Diferentemente dos nossos dados, Rastogi e McHowat (2009) verificaram que a produção de PGI_2 , induzida pela trombina em células endoteliais, foi dependente da i FLA_2 . Contudo, a atividade da i FLA_2 tem sido relacionada, principalmente, ao fornecimento de ácido araquidônico para a remodelagem e manutenção de membranas celulares (BALSINDE et al., 1995; MURAKAMI et al., 1998, 2000;).

Na literatura, é conhecido que a fosfolipase A_2 citosólica pode ser ativada pelas proteínas quinases da família MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) e, deste modo, aumentar

a biodisponibilidade de AA para síntese de prostaglandinas (HOULISTON; WHEELER-JONES, 2001). As proteínas quinases da família MAPK são importantes mediadores das vias de transdução de sinal e podem ser ativadas por diferentes estímulos extracelulares, que atuam sobre a membrana celular (*e.g.* mitógenos, stress, FLA₂), ou sobre receptores ligados à proteína G. Com base em diferenças estruturais, a família MAPK foi dividida em 3 subfamílias: ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular); JNK/SAPK (quinase C-jun N-terminal) e p38^{MAPK} (LIM et al., 2009; WADA; PENNINGER, 2004). As principais representantes da família MAPK, envolvidos na ativação da FLA₂ citosólica, são a p38^{MAPK}, MEK1/2 e ERK1/2 e a JNK. Com base nestas informações, investigou-se a participação das proteínas quinases da família MAPK no efeito indutor da subunidade CB sobre a biossíntese prostaciclina.

A partir de intervenções farmacológicas, os dados obtidos neste estudo revelaram que a inibição dos representantes da subfamília ERK1/2 e MEK1/2 reduziram a produção de PGI₂, induzida pela subunidade CB. Estes dados indicam que estas proteínas quinases estão implicadas na cadeia de sinalização desencadeada pela subunidade CB, que culmina na produção de PGI₂ pelo endotélio. Por outro lado, a inibição das proteínas sinalizadoras JNK e p38^{MAPK} não modificou o efeito da subunidade CB, indicando que estas quinases não participam do mecanismo de ação da CB para a produção de prostaciclina. A ativação das proteínas da subfamília ERK1/2 está associada a estímulos extracelulares, cuja resposta celular está relacionada à regulação de processos de crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (ALESSI et al., 1994; CREWS et al., 1992; LIM et al., 2009; ROSEN et al., 1994). Nesse sentido, os dados da literatura demonstram que diversas biomoléculas, com ação citoprotetora, atuam por meio da via de sinalização das ERK quinases (BAINES et al., 2005; COBB, 1999; LIM et al., 2009; YU et al., 2009; ZHANG et al., 2009). De modo distinto, as vias de sinalização da p38^{MAPK} e da JNK estão associadas a respostas de *stress* celular, cuja ativação está frequentemente associada à indução de apoptose (ARMSTRONG, 2004; BAINES et al., 2005; He et al., 1999; ROOVERS; ASSOIAN, 2000; XIE et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Nesse sentido, vários autores sugerem a inibição da JNK quinase como estratégia para a obtenção de cardioproteção após injúria isquêmica (FERRANDI et al., 2004; HRENIUK et al., 2001; MILANO et al., 2007). Liu e colaboradores (2011) demonstraram que proteínas quinases da família das MAPK, participam dos efeitos vasoprotetores da prostaciclina, em resposta ao HDL (*high-density lipoprotein*) em células endoteliais. Assim, diversos estímulos extracelulares e segundos mensageiros estão envolvidos na síntese de prostaciclina endotelial. Portanto, os efeitos da PGI₂ e sua repercussão na célula endotelial variam de acordo com a natureza do estímulo e podem contribuir tanto para a inflamação, quanto para sua resolução (STITHAM et

al., 2011; WISE, 2003). Estas informações, em conjunto aos dados obtidos, sugerem um papel citoprotetor da subunidade CB, que deve ser mediado, ao menos em parte, pela prostaciclina. Adicionalmente, estes resultados sugerem uma correlação da proteína quinase da subfamília ERK1/2 e da FLA₂ citosólica, no efeito da subunidade CB sobre a biossíntese de prostaciclina endotelial.

Outro aspecto relevante para o entendimento da via biossintética de PGI₂, induzida pela subunidade CB, envolve o efeito autócrino desta prostaglandina sobre o seu receptor IP. O receptor de superfície IP está envolvido na sinalização clássica da prostaciclina em células endoteliais, sendo responsável pelos seus efeitos parácrinos, em plaquetas e células musculares lisas, e autócrinos, na célula endotelial (SCHWARZ et al., 2001). A ativação parácrina/autócrina do receptor IP induz aumento dos níveis de AMP cíclico, pela ativação da adenilato ciclase, com subsequente fosforilação da proteína quinase A (PKA) e aumento da biossíntese de prostaciclina (*feedback* positivo) via COX-2 (FETALVERO et al., 2008; KASZA et al., 2009; LIU et al., 2011; MICHAELIS; FLEMING, 2006; NORATA et al., 2004). Desse modo, avaliou-se o envolvimento de um possível mecanismo de retroalimentação positiva, via sinalização autócrina do receptor IP de prostaciclina. Os dados obtidos evidenciaram que o receptor IP, a adenilato ciclase e a PKA não contribuem para o aumento da produção de PGI₂, induzida pela subunidade CB no endotélio. Todavia, não pode ser descartada a hipótese de que a ativação deste receptor esteja envolvida em outro tipo de resposta das células endoteliais frente à subunidade CB. Diferentemente dos nossos resultados, Kasza e colaboradores (2009) mostraram que o efeito vasoprotetor da prostaciclina endotelial na aterosclerose, depende do aumento de COX-2 via sinalização AMPc/PKA. Neste contexto, diversos autores mostraram que o aumento dos níveis de AMP cíclico, em células endoteliais, está relacionado à inibição da produção de espécies reativas de oxigênio e inflamação (CHEN et al., 2008; DORRIS; PEEBLES, 2012; FUJITA et al., 2006; KIM et al., 2002; OUCHI et al., 2000; OUEDRAOGO et al., 2006; RAYNAUD et al., 1997).

Em síntese, os resultados obtidos, até esta etapa do estudo, demonstraram que a fosfolipase A₂ de *Crotalus durissus terrificus*, induziu a liberação de prostaciclina, por ação direta em células endoteliais primárias de microcirculação de ratos. Este efeito foi dependente das proteínas quinases da subfamília MEK1/2 e ERK1/2, mas não da p38^{MAPK}, nem da JNK. Ainda, a COX-1 e a PGIS, são essenciais para este efeito da CB. Em adição, a subunidade CB induziu a expressão de PGIS, sugerindo que este seja um mecanismo relevante para a biossíntese de prostaciclina endotelial em períodos tardios. Por outro lado, as fosfolipases A₂ intracelulares, assim como as vias do NF-κB e da COX-2 não estão envolvidos no efeito da CB.

Adicionalmente, foi demonstrado que a via biossintética de prostaciclina induzida pela FLA₂ do veneno de *C. d. terrificus*, em células endoteliais, não é dependente da sinalização autócrina via receptor IP.

Como mencionado na **Introdução**, o veneno de Cdt e seus componentes são conhecidos por exercerem atividades inibitórias sobre a resposta imune humoral e celular, infecções virais e bacterianas, tumores, dor e inflamação em diversos modelos experimentais (BOLANO; CERDAS, 1978; BORDON et al., 2012; CARDOSO et al., 2001; CARDOSO; MOTA, 1997; FAVORETTO et al., 2011; MULLER et al., 2012; NUNES et al., 2007, 2010; RANGEL-SANTOS et al., 2004; SAMPAIO et al., 2003, 2005, 2006, 2010; SCHAEFFER et al., 1988; SOUSA-E-SILVA et al., 1996). Em muitos destes trabalhos, a responsabilidade dos efeitos inibitórios desencadeados pelo VCdt, é atribuída ao complexo heterodimérico crotoxina ou, ainda, ao seu componente fosfolipásico, a subunidade CB. Recentemente, a proteômica do VCdt mostrou que este veneno é composto, essencialmente, por sete famílias proteicas: fosfolipases A₂, serinoproteinases, ecto-5'-nucleotidases, metaloproteinases, fatores de crescimento, fosfodiesterases e glutaminil ciclases (GEORGIEVA et al., 2010). A família das fosfolipases A₂ se destaca por constituir 45,8% da composição proteica total do veneno de *C. d. terrificus*. De modo geral, as FLA₂ secretadas estão implicadas em diversas patologias de origem inflamatória, devido ao seu papel estimulatório sobre a produção de citocinas e mediadores lipídicos inflamatórios em diversos contextos biológicos (PRUZANSKI; VADAS, 1991; VADAS; PRUZANSKI, 1990; VANE, 1976; WEISS; WRIGHT, 1990). Por outro lado, a subunidade CB isolada do veneno de *C. d. terrificus* é descrita na literatura como anti-inflamatória (SAMPALIO et al., 2005).

É conhecido que durante os estágios iniciais do processo inflamatório, a expressão de moléculas de adesão no endotélio é etapa determinante na transmigração de leucócitos para o foco inflamatório (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Desse modo, investigou-se o efeito da subunidade CB, na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, sob estímulo inflamatório.

Durante o processo inflamatório, a expressão de moléculas de adesão pela parede dos vasos sanguíneos é reconhecida como etapa determinante do processo de extravasamento de leucócitos para o foco inflamatório (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Como já mencionado, diversos estímulos inflamatórios são capazes de induzir a expressão das moléculas de adesão na superfície de células endoteliais. Dentre estes estímulos, se destacam as citocinas TNF-alfa, IL-1 beta e IFN-gama e os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como LPS (MAKÓ et al., 2010; MEAGER et al., 2009). O LPS é uma molécula de lipopolissacarídeo

presente na membrana externa de bactérias gram-negativas. Esta endotoxina induz respostas imunológicas a partir da ativação do receptor *Toll-like-4*, gerando sinalização intracelular de ativação do fator de transcrição NF- κ B, que, por sua vez, promove indução transcricional de genes de diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias e de moléculas de adesão em células endoteliais. O efeito estimulatório do LPS sobre a expressão de moléculas de adesão no endotélio, em condições experimentais, está bem descrito na literatura (MAKÓ et al., 2010; MORICONI et al., 2012; POBER et al., 1991; VIEIRA et al., 2007; WANG et al., 2006).

A partir das informações acima, foram realizados diversos ensaios preliminares de padronização do uso do LPS, para indução da expressão das moléculas de adesão. A primeira molécula de adesão a ser estudada foi a VCAM-1. A VCAM-1 é expressa em baixos teores no endotélio em condições fisiológicas. Sua expressão na célula endotelial pode ser induzida por mediadores inflamatórios, como por exemplo, o LPS (POBER; COTRAN, 1991). As interações entre a VCAM-1 e a VLA-4 ($\alpha 4\beta 7$ integrina), expressa principalmente em linfócitos e monócitos, estão relacionadas ao processo de transmigração celular do sangue para o tecido injuriado e, conseqüentemente, ao início do processo inflamatório (BOCHNER et al., 1991; PETRUZZELLI et al., 1991). Os resultados obtidos mostraram que a exposição das células endoteliais ao LPS induziu aumento da expressão proteica da molécula de adesão VCAM-1 (CD106), após 18 horas, com uma concentração relativamente baixa e não-citotóxica de LPS (50 ng/mL). Os resultados seguintes, do presente estudo, demonstraram que a subunidade CB possui capacidade de diminuir, de modo marcante, a expressão de VCAM-1 induzida pelo LPS. Este efeito foi observado apenas com as duas maiores concentrações testadas (5 e 10 μ g/mL), sendo que não houve uma relação concentração-efeito para a inibição observada. Por outro lado, considerando que no presente protocolo experimental *in vitro* não há um sistema de depuração fisiológica e, portanto, que o LPS pode manter sua concentração e efeitos relativamente estáveis, durante as 18 horas de incubação, foi de interesse verificar se a magnitude do efeito inibitório da subunidade CB seria maior em períodos mais curtos de estimulação com o LPS. Nesse sentido, após o tratamento com a subunidade CB, as células foram estimuladas com o LPS por apenas 8 horas. Os dados obtidos indicaram que não houve diferença na magnitude do efeito inibitório da subunidade CB, sobre a expressão de VCAM-1, entre os dois períodos de estimulação analisados. Até o presente, esta é a primeira demonstração do efeito inibitório de uma fosfolipase A_2 secretada sobre a expressão de moléculas de adesão. Diferentemente dos nossos dados, inúmeros autores descreveram o papel estimulatório de FLA $_2$ s secretadas do Grupo IIA, V ou citosólica, para o aumento da expressão de moléculas de adesão pelo endotélio (BARNETT et

al., 2001; HADAD et al., 2011; LAPOINTE et al., 2010; SADARIA et al., 2011; THOMMESEN et al., 1998; YOKOTE et al., 1993).

Outra molécula de adesão importante para o processo inflamatório é a imunoglobulina ICAM-1 (CD54), cuja expressão constitutiva pode ser aumentada frente a estímulos como o LPS (MEAGER et al., 1999; MORICONI et al., 2012). Durante o processo inflamatório, a molécula CD54 endotelial está envolvida nos eventos de firme adesão de leucócitos à parede dos vasos sanguíneos, via interação com os contra-receptores de integrina (MAC-1 e LFA-1) presentes em leucócitos (MEAGER et al., 1999). Os dados obtidos no presente estudo corroboram a literatura, uma vez que foram detectados níveis constitutivos da molécula ICAM-1 nas células controles. Em contrapartida, a estimulação das células endoteliais com o LPS, por 8 ou 18 horas, induziu um aumento expressivo no percentual proteico da molécula CD54. O pré-tratamento das células com a subunidade CB, diminuiu a expressão proteica da molécula ICAM-1, porém, este efeito foi observado apenas 8 horas após o estímulo com o LPS. Este resultado pode ser decorrente da falta de um sistema de depuração fisiológica do modelo *in vitro* de nossos ensaios. Como mencionado anteriormente, o estímulo contínuo do LPS nas células endoteliais (18 horas), pode ter sobrepujado a atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1, nesse longo período de tempo. Em concordância com os nossos dados, Stach e colaboradores (2012) evidenciaram o papel inibitório de estatinas (simvastatina e atorvastatina) na expressão de ICAM-1 estimulada pelo LPS em células endoteliais. Por outro lado, fica evidente que a inibição observada no presente estudo se contrapõe aos relatos da literatura, que indicam o papel indutor das FLA₂ secretadas, na expressão de ICAM-1 em células endoteliais (SADARIA et al., 2011; YOKOTE et al., 1993).

A molécula de adesão PECAM-1 (CD31) é encontrada na região apical da membrana de células endoteliais e a sua função, no processo inflamatório, é mediar as interações leucócito-endotélio na adesão heterotípica (via CD31-CD177) ou homotípica (via CD31-CD31), durante o processo de extravasamento leucocitário para o foco inflamatório (DeLISSER et al., 1997; MULLER et al., 1993, 1995). Estudos sobre a biologia da molécula PECAM-1, mostraram que após estimulação com LPS ou TNF-alfa, ocorre um fenômeno de redistribuição das moléculas de CD31, na membrana das células endoteliais, que são agrupadas no sentido de promover aumento na mobilidade de leucócitos através das junções aderentes nas regiões interendoteliais (MEAGER, 1999; MULLER et al., 1995; ROMER et al., 1995). Desse modo, não há necessidade de indução transcricional para que a molécula CD31 exerça suas atividades inflamatórias. Nesse sentido, Moriconi e colaboradores (2012) observaram que o TNF-alfa e o IFN-gama diminuíram a expressão gênica da molécula PECAM-1 no endotélio e sugeriram que

este efeito contribui para passagem de leucócitos entre as junções interendoteliais. Por outro lado, foi demonstrado que a citocina IL-1 beta e o LPS são capazes de aumentar a expressão proteica da PECAM-1 em modelos experimentais (TAMURA et al., 2010; THOMPSON et al., 2001; WOODFIN et al., 2009). Neste contexto, os dados do presente estudo mostraram que a incubação das células endoteliais com o LPS não alterou a expressão constitutiva de PECAM-1, após 8 ou 18 horas. Além disso, verificou-se que a subunidade CB não foi capaz de alterar o padrão constitutivo de expressão de PECAM-1, tanto em células controles, quanto naquelas tratadas com a subunidade CB e pós-estimuladas com o LPS. Diferentemente dos nossos dados, Tamura e colaboradores (2010) demonstraram o efeito inibitório da melatonina sobre a expressão de CD31, em células endoteliais, isoladas a partir de animais injetados com LPS. Porém, estes autores avaliaram a expressão da molécula PECAM-1 em células aderidas e semi-confluentes pela a técnica de imunocitoquímica. De modo semelhante aos dados apresentados neste trabalho, Romer e colaboradores (1995) avaliaram a expressão de PECAM-1 endotelial por citometria de fluxo. Neste trabalho, foi verificado que a análise celular, de modo individual, desfavorece a observação da expressão da molécula PECAM-1, uma vez que esta pode ser mais bem caracterizada em células endoteliais aderidas ou em monocamadas confluentes.

A migração de leucócitos do sangue para os locais de injúria é mediada por uma sequência de interações adesivas entre os leucócitos e o endotélio. Este processo possui uma etapa inicial de rolamento dos leucócitos sobre o endotélio (adesão transiente), seguida de uma firme adesão e transmigração (PIQUERAS et al., 2009). As moléculas ICAM-1 e VCAM-1 estão envolvidas na última etapa deste processo, a transmigração. Portanto, o fato de a subunidade CB inibir a expressão de ICAM-1 e VCAM-1, mas não PECAM-1, indica que esta FLA₂ interfere no processo de migração de leucócitos para o foco inflamatório, por mecanismos que afetam a firme adesão e a subsequente transmigração de células inflamatórias. Em suma, os dados obtidos nesta etapa do estudo reforçam os dados da literatura que apontam que FLA₂ em estudo possui características anti-inflamatórias, que são opostas àquelas descritas para outras FLA₂ secretadas do mesmo grupo (IIA).

Está bem estabelecido que os genes das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 estão sob o controle transcricional do NF- κ B, AP-1 e T-bet, cuja ativação é altamente regulada pelos receptores/fatores de transcrição PPAR (MORAES et al., 2006). Atualmente, são conhecidas três isoformas do PPAR (alfa, beta/delta e gama) e todas possuem a capacidade de regular negativamente o NF- κ B, o que resulta em diminuição ou inibição da transcrição de genes que codificam citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (CHINETTI et al., 2001; STRAUS; GLASS, 2007; THAM et al., 2003). Com base nesse conhecimento, foi avaliada a possibilidade

de participação destes receptores no efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de VCAM-1 e ICAM-1 induzida pelo LPS.

Em relação à molécula de adesão ICAM-1, os dados obtidos mostraram que as isoformas alfa e beta/delta do PPAR são relevantes para os efeitos inibitórios da subunidade CB em células endoteliais ativadas. O pré-tratamento das células com antagonistas seletivos para as isoformas alfa e beta/delta, impediu o efeito inibitório anteriormente demonstrado. Por outro lado, a antagonização da isoforma gama do PPAR não influenciou a atividade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM, demonstrando que esta isoforma não contribui para este efeito. No caso da molécula VCAM-1, a antagonização as três isoformas do PPAR, não repercutiu no efeito inibitório da subunidade CB, demonstrando que a regulação negativa desta FLA₂ sobre a expressão de CAMs, deve estar relacionada à outras vias regulatórias.

De modo congruente aos nossos dados, está descrito na literatura que a ativação da isoforma alfa do PPAR, inibiu a transcrição de ICAM-1, o que acarretou efeitos benéficos dos agonistas em doenças coronarianas, atividade anti-inflamatória em modelos de aterosclerose e inibição da produção de citocinas como TNF-alfa, IL-6 e IL-8 (CHEN et al., 2011; GOUNI-BERTHOLD; KRONE, 2005; HAN et al., 2005; ISRAELIAN-KONARAKI; REAVEN, 2005; MORAES et al., 2006; PIQUERAS et al., 2009; ZAPOLSKA-DOWNAR, 2012; ZHOU et al., 2011). Todavia, agonistas farmacológicos do PPAR-alfa também possuem efeito inibitório sobre a transcrição de VCAM-1, fato que não ocorreu em nosso modelo experimental. Mais uma vez, fica evidente que a regulação da expressão dessas moléculas de adesão, pela subunidade CB, ocorre por mecanismos distintos. Em relação à isoforma beta/delta do PPAR, foi demonstrado que sua ativação também promove a regulação negativa de processos inflamatórios, como a aterosclerose, pela diminuição da transcrição de ICAM-1 no endotélio (FAN et al., 2008; LIOU et al., 2006; MORAES et al., 2006). Por outro lado, embora a isoforma gama do PPAR não tenha se mostrado relevante para o mecanismo anti-inflamatório da subunidade CB, tanto no caso da molécula ICAM-1, quanto VCAM-1, há diversos relatos na literatura sobre as propriedades inibitórias desta isoforma sobre moléculas de adesão no endotélio (CHACKÓ et al., 2005, 2011; DOLEZALOVÁ et al., 2007; DUÁN et al., 2008; RIUS et al., 2010; WANG et al., 2002). Entretanto, em apoio aos nossos dados, Orasanu e colaboradores (2008), mostraram o efeito inibitório da pioglitazona (fármaco usado na terapêutica da diabetes do tipo 2), na expressão de moléculas de adesão endoteliais, ocorre por uma ação específica sobre o PPAR-alfa, mas não sobre a isoforma gama.

Os receptores PPAR são conhecidos por serem promíscuos em relação aos seus ligantes, sendo que diversos ácidos graxos e prostaglandinas, como a PGI₂, são capazes de ativar uma

mesma isoforma destes receptores. Embora as isoformas do PPAR estejam relacionadas a muitos processos, de modo simultâneo, podem desencadear efeitos distintos frente à diferentes agonistas (KATUSIC et al., 2012). Neste contexto, é conhecido que a prostaciclina ativa as isoformas alfa e beta/delta do PPARs em células endoteliais. Porém, ainda não há informações sobre a capacidade da PGI₂, liberada pela ação da subunidade CB, em ativar os receptores PPAR.

A etapa seguinte do presente estudo foi realizada com base em informações da literatura que descrevem o potencial efeito anti-inflamatório da via de sinalização autócrina da prostaciclina em células endoteliais. Como demonstrado na literatura, o receptor IP pode ser ativado autocrinamente em células endoteliais e desencadear efeitos regulatórios sobre a expressão de CAMs, decorrente da ativação da adenilato ciclase (AC), AMP cíclico e PKA (PARNELL et al., 2012). Apesar deste processo ser primariamente envolvido na manutenção homeostática do sistema cardiovascular, há um número crescente de trabalhos que evidenciam o papel regulador do AMP cíclico sobre a inflamação. A via do receptor IP resulta em atividades anti-inflamatórias por interferir na resposta celular à algumas citocinas. Este efeito envolve a diminuição da sinalização intracelular dos receptores de citocinas, o que repercute diretamente na expressão de moléculas de adesão pelo endotélio (SHIH et al., 2013). A partir da ativação do receptor IP, tanto o AMP cíclico, quanto a PKA (ativada pelo AMPc), podem induzir a transcrição do fator SOCS-3 (*suppressor of cytokine signaling-3*), que atua inibindo a sinalização JAK/STAT-1, associada à cauda citoplasmática dos receptores de citocinas inflamatórias, como a IL-6 e o IFN-gama. Desse modo, a inibição da via sinalizadora da IL-6 e do IFN-gama contribui para diminuição da expressão de moléculas de adesão induzida por estímulos inflamatórios, como por exemplo, o LPS (LORENOWICS et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o receptor IP, a adenilato ciclase e a PKA são moléculas importantes para o efeito inibitório da CB sobre a inflamação, uma vez que a inibição farmacológica destas moléculas impediu a subunidade CB de exercer suas atividades inibitórias sobre a expressão de ICAM-1. Mais uma vez, no caso da molécula VCAM-1, o mecanismo desencadeado pela subunidade CB foi distinto, pois nenhuma molécula da via autócrina da prostaciclina se mostrou relevante para seus efeitos inibitórios. No que se refere à adenilato ciclase, em apoio aos dados obtidos, Braun e colaboradores (1997) mostraram que um ativador da adenilato ciclase (cicaprost, análogo estável da PGI₂) foi capaz de diminuir a expressão de ICAM-1 induzida pelo TNF-alfa em células endoteliais. Contudo, há controvérsia na literatura a este respeito, pois outros autores evidenciaram que ativadores da adenilato ciclase não modificaram a expressão da molécula ICAM-1, mas apenas da molécula VCAM-1 (BLEASE et al., 1998; POBER et al., 1993). No que se refere à participação da PKA, os dados

obtidos são similares aos publicados por SHIH e colaboradores (2013), que demonstraram o envolvimento da PKA no efeito inibitório de um peptídeo anti-inflamatório, isolado de algas verdes, sobre a expressão de ICAM-1. Ainda, em trabalho de revisão, Katusic e colegas (2012) forneceram indícios de uma correlação entre PKA e PPAR em modelos de anti-inflamação. Esta revisão bibliográfica descreve que tanto a síntese de AMP cíclico, quanto a ativação da PKA, estão relacionadas ao aumento da atividade da isoforma beta/delta do PPAR, em modelos que envolvem células vasculares, prostaciclina e regulação da inflamação (BLANQUART et al., 2003; HANSEN et al., 2001; KROGSDAM et al., 2002; LAZENNEC et al., 2000). Com base nestas informações, é possível sugerir que a PKA e o PPAR, envolvidos no efeito inibitório da subunidade CB, possam estar relacionados. No entanto, para uma análise definitiva, estudos mais detalhados são necessários.

Para detalhar melhor os dados acima discutidos, foram avaliados os níveis AMP cíclico na vigência de ação da subunidade CB, antes da estimulação das células endoteliais com o LPS. Os dados obtidos mostraram que não houve alteração dos níveis de AMP cíclico após incubação das células endoteliais com a subunidade CB. Portanto, é possível sugerir que o AMP cíclico não esteja envolvido com a ativação do PPAR-beta/delta, porém, outras vias relacionadas à PKA podem estar relacionadas. Como mencionado anteriormente, é conhecido que a PKA pode induzir a ativação de SOCS-3, de modo independente do cAMP (KATUSIC et al., 2012). Adicionalmente, a PKA é capaz de inibir o NF-kB e a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, envolvidas na expressão de moléculas de adesão (CAMPO et al., 2012).

A seguir, foi investigada a participação da prostaciclina no efeito inibitório da subunidade CB, para a expressão de CAMs. Os resultados obtidos mostraram que a inibição da enzima PGIS, pela tranilcipromina, preveniu o efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1, mas não sobre a expressão de VCAM-1. Este dado evidencia a prostaciclina como segundo mensageiro da propriedade inibitória da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1 endotelial. Apesar da prostaciclina estar envolvida nos efeitos anti-inflamatórios da subunidade CB, não pode ser descartado o envolvimento de outros prostanoides ou ácidos graxos, uma vez que as FLA₂s são conhecidas por induzirem a liberação desses mediadores, que também podem ativar os receptores PPAR alfa e beta/delta (MORAES et al., 2005).

Os dados obtidos nesta fase do estudo evidenciaram que as 2 isoformas dos receptores PPAR, alfa e beta/delta, a via autócrina da prostaciclina (receptor IP, adenilato ciclase e proteína quinase A) e a própria prostaciclina, estão envolvidos nos efeitos inibitórios da subunidade CB sobre a expressão da molécula ICAM-1, mas não da VCAM-1. Neste contexto, vale ressaltar a evidência de que a prostaciclina, liberada pela ação da subunidade CB, é

relevante para o efeito inibitório desta FLA₂ sobre um dos principais determinantes moleculares que iniciam o processo inflamatório, as moléculas de adesão endoteliais.

Está bem estabelecido que diversas citocinas são determinantes moleculares na ativação endotelial e inflamação. As citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-6 têm o seu efeito relacionado diretamente com a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio. O LPS é conhecido por induzir a transcrição gênica dessas citocinas, assim como de moléculas de adesão em células endoteliais. Nesse sentido, a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, no presente modelo experimental, poderia ser resultante da liberação de TNF-alfa e IL-6, ambas induzíveis pelo LPS. Para testar a hipótese da subunidade CB diminuir a expressão das moléculas de adesão, por regular negativamente a produção de citocinas, avaliou-se a expressão gênica das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 e também das citocinas TNF-alfa e IL-6 no mesmo protocolo experimental de anti-inflamação. Os dados obtidos evidenciaram que a subunidade CB foi capaz de diminuir a expressão gênica das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e das citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-6, estimulada pelo LPS. Esta informação sugere que subunidade CB atue em nível transcricional, para exercer suas atividades anti-inflamatórias sobre as moléculas de adesão. Ainda, é possível sugerir que os receptores PPAR alfa e beta/delta podem estar envolvidos neste efeito, especialmente no caso da ICAM-1, TNF-alfa e IL-6, já que o PPAR ativado compete com o NF-κB, pela região promotora dos genes relacionados à inflamação, como no caso das moléculas de adesão e das citocinas pró-inflamatórias (MORAES et al., 2006). Porém, em relação à molécula VCAM-1, outro mecanismo transcricional deve estar envolvido, visto que o efeito inibitório sobre esta molécula de adesão, não é dependente de nenhuma das 3 isoformas do PPAR.

Em síntese, o conjunto de dados obtidos neste estudo, evidenciou importantes vias de sinalização envolvidas na biossíntese de prostaciclina, induzida pela subunidade CB, em células endoteliais. Assim sendo, verificou-se que a COX-1 e a PGIS, mas não a COX-2 ou o NF-κB, são essenciais para o efeito estimulatório da subunidade CB sobre a biossíntese de PGI₂. As proteínas MEK1/2 e ERK1/2, mas não p38 ou JNK, também são relevantes para este efeito. Ainda, a cFLA₂, mas não a iFLA₂, é importante para a produção de PGI₂. A inibição do receptor IP, da adenilato ciclase, ou da PKA, não modificou a liberação de PGI₂ induzida pela CB. Em adição, a subunidade CB não alterou os níveis basais de COX-1 e não induziu a expressão de COX-2, porém, aumentou o teor proteico da PGIS. Este feito deve contribuir para a manutenção da produção de PGI₂, em períodos tardios da ação da subunidade CB.

Além disso, este estudo correlacionou a produção de prostaciclina e outros requerimentos moleculares no efeito inibitório da subunidade CB na inflamação. O veneno da serpente *Crotalus*

durissus terrificus é amplamente conhecido por exercer atividades anti-inflamatórias, todavia, não haviam estudos que detalhassem os mecanismos envolvidos nesse efeito. Nesse sentido, os resultados obtidos mostraram que a CB inibiu a expressão proteica de ICAM-1 e VCAM-1, mas não de PECAM-1, induzida pelo LPS. A CB reduziu a transcrição gênica das ICAM-1 e VCAM-1 e este deve ser um dos mecanismos da inibição da expressão proteica destas moléculas. A inibição farmacológica do PPAR mostrou que as isoformas alfa e beta/delta, mas não gama, são relevantes para o efeito da CB na expressão de ICAM-1. Quanto à VCAM-1, nenhuma isoforma do PPAR está envolvida. Ainda, a via autócrina da prostaciclina (receptor IP, adenilato ciclase e PKA) está envolvida no efeito inibitório da CB, apenas para molécula ICAM-1. A inibição da PGIS reverteu o efeito inibitório da CB sobre a expressão de ICAM-1, mas não VCAM-1, indicando a importância da PGI₂ para o efeito inibitório da CB no endotélio. Adicionalmente, a CB inibiu a transcrição gênica das citocinas inflamatórias TNF-alfa e IL-6, induzida pelo LPS. Este efeito deve contribuir para a atividade inibitória sobre a expressão de ICAM-1 e VCAM-1.

Finalmente, considerando o exposto acima, o presente estudo forneceu informações inéditas e relevantes para a compreensão das atividades anti-inflamatórias de uma fosfolipase A₂ do grupo IIA, isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* e, em última análise, da fisiopatologia do veneno bruto desta serpente, que apresenta teores elevados de fosfolipases A₂ em sua composição.

6 CONCLUSÕES

- 1** A subunidade CB não induz alterações de membrana ou afeta a integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura, em nenhuma concentração ou tempo estudados, mas altera o metabolismo oxidativo mitocondrial, na maior concentração e no maior tempo estudado;
- 2** A subunidade CB induz aumento da produção de prostaciclina pelas células endoteliais, de modo concentração-dependente e tempo-dependente;
- 3** A via enzimática da COX-1, mas não da COX-2, contribui para biossíntese de prostaciclina, induzida pela subunidade CB em células endoteliais;
- 4** O fator de transcrição NF-kB não é relevante para biossíntese de prostaciclina, induzida pela subunidade CB em células endoteliais;
- 5** A prostaciclina sintase é essencial para biossíntese de prostaciclina, induzida pela subunidade CB em células endoteliais;
- 6** As proteínas quinases MEK1/2 e ERK1/2, mas não p38^{MAPK} ou JNK, contribuem para biossíntese de prostaciclina, induzida pela subunidade CB em células endoteliais;
- 7** A FLA₂ intracelular citosólica, mas não a independente de cálcio, contribui para biossíntese de prostaciclina, induzida pela subunidade CB em células endoteliais;
- 8** A via autócrina da prostaciclina (receptor IP, adenilato ciclase e PKA) não é relevante para a biossíntese de prostaciclina, induzida pela subunidade CB em células endoteliais;
- 9** A subunidade CB induz a expressão proteica de PGIS, mas não de COX-1 ou COX-2, em células endoteliais;
- 10** A subunidade CB diminui a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, mas não de PECAM-1, induzida pelo LPS em células endoteliais;
- 11** O efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1, mas não de VCAM-1, induzida pelo LPS, depende da prostaciclina;

- 12** O efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1, mas não de VCAM-1, induzida pelo LPS, depende da isoforma alfa e beta/delta do PPAR;
- 13** O efeito inibitório da subunidade CB sobre a expressão de ICAM-1, mas não de VCAM-1, induzida pelo LPS, depende da via autócrina da prostaciclina (receptor IP, adenilato ciclase e PKA);
- 14** A subunidade CB diminui a expressão gênica das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1, induzida pelo LPS em células endoteliais;
- 15** A subunidade CB diminui a expressão gênica das citocinas TNF-alfa e IL-6, induzida pelo LPS em células endoteliais.

REFERÊNCIAS*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H., 2005. **Imunologia Celular e Molecular**, 5th Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, p. 125-172.
- AIRD, S. D.; KAISER, II; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 249, n. 2, p. 296-300, 1986.
- AIRD, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. **Circ. Res.**, v. 100, n. 2, p. 158-173, 2007.
- AIRD, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. **Circ. Res.**, v. 100, n. 2, p. 174-190, 2007.
- ALESSI, D. R.; SAITO, Y.; CAMPBELL, D. G.; COHEN, P.; SITHANANDAM, G.; RAPP, U.; ASHWORTH, A.; MARSHALL, C. J.; COWLEY, S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. **EMBO J.**, v. 13, n. 7, p. 1610-1619, 1994.
- ANTHONSEN, M. W.; SOLHAUG, A.; JOHANSEN, B. Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A (2) modulates tumor necrosis factor-alpha-and interleukin-1 beta-induced NF-kappa B activation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 32, p. 30527-30536, 2001.
- ARMSTRONG, S. C. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.**, v. 61, n. 3, p. 427-436, 2004.
- ATSUMI, G.; MURAKAMI, M.; KOJIMA, K.; HADANO, A.; TAJIMA, M.; KUDO, I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A₂s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A₂alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂ augments spontaneous fatty acid release. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 24, p. 18248-18258, 2000.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 633-636, 1985.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, H.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1163-1168, 1987.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE C. M. S.; HADDA JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier/Fapesp, 2003. p. 91-107.
- BACHSCHMID, M.; THURAU, S.; ZOU, M. H.; ULLRICH, V. Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. **FASEB J.**, v. 17, n. 8, p. 914-916, 2003.
- BAINES, C. P.; MOLKENTIN, J. D. J. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. **Mol. Cell. Cardiol.**, v. 38, n. 1, p. 47-62, 2005.

* De acordo com:ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BAINES, C. P.; MOLKENTIN, J. D. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 38, n. 1, p. 47–62, 2005.
- BAKHLE, Y. S. Structure of COX-1 and COX-2 enzymes and their interaction with inhibitors. **Drugs Today**, v. 35, n. 4-5, p. 237-250, 1999.
- BALDWIN, A. S. J. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *Clin. Invest.*, v. 107, n. 1, p. 3-6, 2001.
- BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; DENNIS, E. A. Functional coupling between secretory phospholipase A(2) and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A(2). **Proc. Natl. Acad. U. S. A.**, v. 95, n.14, p. 7951-7956, 1998.
- BALSINDE, J.; BIANCO, I. D.; ACKERMANN, E. J.; CONDE-FRIEBOES, K.; DENNIS, E. A. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, p. 8527-8531, 1995.
- BARBIERI, S. S.; AMADIO, P.; GIANELLINI, S.; ZACCHI, E.; WEKSLER, B. B.; TREMOLI, E. Tobacco smoke regulates the expression and activity of microsomal prostaglandin E synthase-1: role of prostacyclin and NADPH-oxidase. **FASEB J.**, v. 25, n. 10, p. 3731-3740, 2011.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. N. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *Engl. J. Med.*, v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.
- BARNETT, C. C. JR.; MOORE, E. E.; SILLIMAN, C. C.; ABDALLA, E. K.; PARTRICK, D. A.; CURLEY, S. A. J. Cytosolic phospholipase A(2)-mediated ICAM-1 expression is calcium dependent. **Surg. Res.**, v. 99, p. 307-310, 2001.
- BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta. Physiol. Lat. Am.**, v. 11, p. 224-230, 1961.
- BEK, S.; KEMLER, R. J. Protein kinase CKII regulates the interaction of beta-catenin with alpha-catenin and its protein stability. **Cell Sci.**, v. 115, pt. 24, p. 4743-4753, 2002.
- BERCOVICI, D. A. Systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, n. 3, p. 69-78, 1987.
- BHATTACHARYYA, D. K.; LECOMTE, M.; DUNN, J.; MORGANS, D. J.; SMITH, W. L. Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 317, n. 1, p. 19-24, 1995.
- BISCETTI, F.; POLA, R. Endothelial progenitor cells and angiogenesis join the PPARty. **Circ. Res.**, v. 103, n. 1, p. 7-9, 2008.
- BISHOP-BAILEY, D.; HLA, T. J. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J₂. **Biol. Chem.**, v. 274, n. 24, p. 17042-17048. 1999.
- BISHOP-BAILEY, D.; HLA, T. J. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J₂. **Biol. Chem.**, v. 274, n. 24, p. 17042-17048. 1999.

BLANQUART, C.; BARBIER, O.; FRUCHART, J. C.; STAEELS, B.; GLINEUR, C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v. 85, n. 2-5, p. 267-273, 2003.

BLEASE, K.; BURKE-GAFFNEY, A.; HELLEWELL, P. G. Modulation of cell adhesion molecule expression and function on human lung microvascular endothelial cells by inhibition of phosphodiesterases 3 and 4. **Br. J. Pharmacol.**, v. 124, n. 1, p. 229-237, 1998.

BOCHNER, B. S.; LUSCINSKAS, F. W.; GIMBRONE, M. A.; JR NEWMAN, W.; STERBINSKY, S. A.; DERSE-ANTHONY, C. P.; KLUNK, D.; SCHLEIMER, R. P. J. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. **Exp. Med.**, v. 173, n. 6, p. 1553-1557, 1991.

BOGATCHEVA, N. V.; SERGEEVA, M. G.; DUDEK, S. M.; VERIN, A. D. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. **Microvasc. Res.**, v. 69, n. 3, p. 107-127, 2005.

BOLAÑOS, R.; CERDAS, L. The production and control of anti--venous sera. **Dev. Biol. Stand.**, v. 41, p. 109-116, 1978.

BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. **Acta. Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1989.

BON, C.; CHOUNER, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZAR, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Biochemical analysis of the mechanism of action of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from snake venom. In: DOLLY, O. J. (Ed.). **Neurotoxins in Neurochemistry**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. p. 52-63.

BORDON, K. C.; PERINO, M. G.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie.**, v. 94, n. 12, p. 2740-2748, 2012.

BOS, C. L.; RICHEL, D. J.; RITSEMA, T.; PEPPELENBOSCH, M. P.; VERSTEEG, H. H. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 36, n. 7, p. 1187-1205, 2004. Review.

BOTTING, R.; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 72, n. 2, p. 85-87, 2005.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J. C.; BON, C.; MÉNEZ, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A₂-like precursor. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1008, n. 3, p. 401-408, 1991.

BRAUN, M.; PIETSCH, P.; ZEPP, A.; SCHRÖR, K.; BAUMANN, G.; FELIX, S. B. Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 11, p. 2568-2575, 1997.

BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and crotoxin complex. **Toxicon**, v. 14, p. 221-233, 1976.

BREITHAUPT, H.; RÜBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotoxin and the basic *Crotalus* phospholipase. **Eur. J. Biochem.**, v. 49, n. 2, p. 333-345, 1974.

- BREYER, M. D.; JACOBSON, H. R.; BREYER, R. M.; Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 7, n. 1, p. 8-17, 1996.
- BRIGATTE, P.; HOFFMANN, F. A.; BERNARDI, M. M.; GIORGI, R.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H. A.; BARROS, S. B.; ALMEIDA, M. G.; CURY, Y. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. *Toxicon*, v. 39, n. 9, p. 1399-1410, 2001.
- BROWN, W. J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic*, v. 4, n.4, p. 214-221, 2003.
- CAMACHO, M.; RODRÍGUEZ, C.; SALAZAR, J.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; RIBALTA, J.; ESCUDERO, J. R.; MASANA, L.; VILA, L. Retinoic acid induces PGI synthase expression in human endothelial cells. *J. Lipid. Res.*, v. 49, n. 8, p. 1707-1714, 2008.
- CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; D'ASCOLA, A.; PRESTIPINO, V.; SCURUCHI, M.; NASTASI, G.; CALATRONI, A.; CAMPO, S. Protein kinase a mediated anti-inflammatory effects exerted by adenosine treatment in mouse chondrocytes stimulated with IL-1 β . *Biofactors*, v. 38, n. 6, p. 429-439, 2012.
- CARDOSO, D. F.; LOPES-FERREIRA, M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S.; FARSKY, S. H. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators Inflamm.*, v. 10, n. 3, p. 125-133, 2001.
- CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, v. 35, n. 4, p. 607-612, 1997.
- CHACKO, B. K.; CHANDLER, R. T.; MUNDHEKAR, A.; KHOO, N.; PRUITT, H. M.; KUCIK, D. F.; PARKS, D. A.; KEVIL, C. G.; BARNES, S.; PATEL, R. P. Revealing anti-inflammatory mechanisms of soy isoflavones by flow: modulation of leukocyte-endothelial cell interactions. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 289, n. 2, p. 908-915, 2005.
- CHACKO, B. K.; SCOTT, D. W.; CHANDLER, R. T.; PATEL, R. P. Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. *J. Biol. Chem.*, v. 286, n. 44, p. 38738-38747, 2011.
- CHAKRABORTI, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspectiva. *Cell Signal.*, v. 15, p. 637- 665, 2003. Review.
- CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON N. K.; TOMSIK J.; ELTON T. S.; SIMMONS D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.
- CHEN, H. H.; CHEN, T. W.; LIN, H. Am. J. Prostacyclin-induced peroxisome proliferator-activated receptor-alpha translocation attenuates NF-kappaB and TNF-alpha activation after renal ischemia-reperfusion injury. *Am. Physiol. Renal. Physiol.*, v. 297, n. 4, p. 1109-1118, 2009.
- CHEN, M.; BOILARD, E.; NIGROVIC, P. A.; CLARK, P.; XU, D.; FITZGERALD, G. A. AUDOLY, L. P.; LEE, D. M. Predominance of cyclooxygenase 1 over cyclooxygenase 2 in the generation of proinflammatory prostaglandins in autoantibody-driven K/BxN serum-transfer arthritis. *Arthritis Rheum.*, v. 58, n. 5, p. 1354-1365, 2008.
- CHEN, Q.; APPENHEIMER, M. M.; MUHITCH, J. B.; FISHER, D. T.; CLANCY, K. A.; MIECZNIKOWSKI, J. C.; WANG, W. C.; EVANS, S. S. Thermal facilitation of lymphocyte trafficking involves temporal induction of intravascular ICAM-1. *Microcirculation*, v. 16, n. 2, p. 143-158, 2009.

- CHEN, S. F.; FEI, X.; LI, S. H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. **Microvasc. Res.**, v. 50, n. 1, p. 119-128, 1995.
- CHEN, Y. W.; PAT, B.; GLADDEN, J. D.; ZHENG, J.; POWELL, P.; WEI, C. C.; CUI, X.; HUSAIN, A.; DELL'ITALIA, L. J. Dynamic molecular and histopathological changes in the extracellular matrix and inflammation in the transition to heart failure in isolated volume overload. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 300, n. 6, p. 2251-2260, 2011.
- CHENG, C. F.; LIAN, W. S.; CHEN, S. H.; LAI, P. F.; LI, H. F.; LAN, Y. F.; CHENG, W. T.; LIN, H. J. Protective effects of adiponectin against renal ischemia-reperfusion injury via prostacyclin-PPAR α -heme oxygenase-1 signaling pathway. **Cell Physiol.**, v. 227, n. 1, p. 239-249, 2012.
- CHILTON, F. H.; FONTEH, A. N.; SURETTE, M. E.; TRIGGIANI, M.; WINKLER, J. D. Control of arachidonate levels within inflammatory cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1299, n. 1, p. 1-15, 1996.
- CHINETTI, G.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors with functions in the vascular wall. **Z. Kardiol.**, v. 90, n. 3, p. 125-132, 2001.
- CHING, S.; HE, L.; LAI, W.; QUAN, N. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. **Brain Behav. Immun.**, v. 19, n. 2, p. 127-137, 2005.
- CHOI, Y. A.; LIM, H. K.; KIM, Y. J.; KANG, S. S.; BAEK, S. H. J. Group IB secretory phospholipase A₂ promotes matrix metalloproteinase-2-mediated cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway. **Biol. Chem.**, v. 279, n. 35, p. 36579-36585, 2004.
- CIRINO, G. Multiple controls in inflammation: Extracellular and intracellular phospholipase A₂, inducible and constitutive cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, n. 2, p. 105-111, 1998.
- COBB, M. H. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys.* **Mol. Biol.**, v. 71, pt. 3-4, p. 479-500, 1999.
- COLLARES-BUZATO, C. B.; DE PAULA, L. E.; SUEUR, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 181, n. 2, p. 124-132, 2002.
- COOK-MILLS, J. M.; DEEM, T. L. J. Active participation of endothelial cells in inflammation. **Leukoc. Biol.**, v. 77, n. 4, p. 487-495, 2005.
- CREWS, C. M.; ALESSANDRINI, A.; ERIKSON, R. L. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. **Science**, v. 258, n. 5081, p. 478-480, 1992.
- CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 3, p. 447-451, 1990.
- DELISSER, H. M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R. M.; BURDICK, M. D.; ROBINSON, C. S.; WEXLER, R. S.; KERR, J. S.; GARLANDA, C.; MER, W. I. N.; JR MADRI, J. A.; ALBELDA, S. M. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 151, n. 3, p. 671-677, 1997.
- DENG, H.; HUANG, A.; SO, S. P.; LIN, Y. Z.; RUAN, K. H. Substrate access channel topology in membrane-bound prostacyclin synthase. **Biochem. J.**, v. 362, pt. 3, p. 545-551, 2002.

- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994. Review.
- DIAMOND, M. S.; STAUNTON, D. E.; MARLIN, S. D.; SPRINGER, T. A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. **Cell**, v. 65, n. 6, p. 961-971, 1991.
- DIVCHEV, D.; SCHIEFFER, B. The secretory phospholipase A₂ group IIA: a missing link between inflammation, activated renin-angiotensin system, and atherogenesis? **Vasc. Health Risk Manag.**, v. 4, n. 3, p. 597-604, 2008.
- DOHGU, S.; SUMI, N.; NISHIOKU, T.; TAKATA, F.; WATANABE, T.; NAITO, M.; SHUTO, H.; YAMAUCHI, A.; KATAOKA, Y. Cyclosporin A induces hyperpermeability of the blood-brain barrier by inhibiting autocrine adrenomedullin-mediated up-regulation of endothelial barrier function. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 644, n. 1-3, p. 5-9, 2010.
- DOLEZALOVÁ, R.; HALUZÍK, M. M.; BOSANSKÁ, L.; LACINOVÁ, Z.; KASALOVÁ, Z.; STULC, T.; HALUZÍK, M. Effect of PPAR-gamma agonist treatment on markers of endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. **Physiol. Res.**, v. 56, n. 6, p. 741-748, 2007.
- DONATO, N. J.; MARTIN, C. A.; PEREZ, M.; NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A₂ toxin. A novel growth inhibitory mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, n. 11, p. 1535-1543, 1996.
- DORRIS, S. L.; PEEBLES, R. S. JR, PGI₂ as a regulator of inflammatory diseases. **Mediators Inflamm.**, v. 2012, p. 926968, 2012.
- DRAGOMIR, E.; TIRCOL, M.; MANDUTEANU, I.; VOINEA, M.; SIMIONESCU, M. Aspirin and PPAR-alpha activators inhibit monocyte chemoattractant protein-1 expression induced by high glucose concentration in human endothelial cells. **Vascul. Pharmacol.**, v. 44, n. 6, p. 440-449, 2006.
- DUAN, S. Z.; USHER, M. G.; MORTENSEN, R. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effects in the vasculature. **Circ. Res.**, v. 102, n. 3, p. 283-294, 2008.
- DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN, D. E.; PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.
- DUSTIN, M. L.; ROTHLEIN, R.; BHAN, A. K.; DINARELLO, C. A.; SPRINGER, T. A. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J. Immunol.**, v. 137, n. 1, p. 245-254, 1986.
- ELIAS, C. G.; SPELLBERG, J. P.; KARAN-TAMIR, B.; LIN, C. H.; WANG, Y. J.; MCKENNA, P. J.; MULLER, W. A.; ZUKOWSKI, M. M.; ANDREW, D. P. Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 6, p. 1948-1958, 1998.
- FAN, Y.; WANG, Y.; TANG, Z.; ZHANG, H.; QIN, X.; ZHU, Y.; GUAN, Y.; WANG, X.; STAELS, B.; CHIEN, S.; WANG, N. Suppression of pro-inflammatory adhesion molecules by PPAR-delta in human vascular endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 28, n. 2, p. 315-321, 2008.
- FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, p. 229-234, 1987.

- FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 223, p. 161-164, 1994.
- FAURE, G.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus urissus terrificus* venom, results from postranslational modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074-8083, 1991.
- FAVORETTO, B. C.; RICARDI, R.; SILVA, S. R.; JACYSYN, J. F.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H. A.; FAQUIM-MAURO, E. L. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunised with human serum albumin. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 600-607, 2011.
- FEITOSA, R. F.; MELO, I. M.; MONTEIRO, H. S. The epidemiology of accidental bites by venomous snakes in the state of Ceará, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 4, p. 295-301, 1997.
- FERRANDI, C.; BALLERIO, R.; GAILLARD, P.; GIACHETTI, C.; CARBONI, S.; VITTE, P. A.; GOTTELAND, J. P.; CIRILLO, R. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 6, p. 953-960, 2004.
- FETALVERO, K. M.; ZHANG, P.; SHYU, M.; YOUNG, B. T.; HWA, J.; YOUNG, R. C.; MARTIN, K. A. Prostacyclin primes pregnant human myometrium for an enhanced contractile response in parturition. **FASEB**, v. 22, n. 12, p. 719-715, 2008.
- FIERRO, I. M.; SERHAN, C. N. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 5, p. 555-566, 2001.
- FITZPATRICK, F. A.; SOBERMAN, R. Regulated formation of eicosanoids. *J. Clin. Invest.*, v. 107, n. 11, p. 1347-1351, 2001.
- FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, n. 9, p. 4312-4317, 1997.
- FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 804, p. 266-275, 1996.
- FORMAN, B. M.; CHEN, J.; EVANS, R. M. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 804, p. 266-275, 1996.
- FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T. W.; HSIANG, M. Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In: EAKER, D.; WADSTROM. (Ed.). **Natural Toxins**. Oxford: Pergamon, 1980. p. 561-567.
- FRANCISCHETTI, I. M.; SALIOU, B.; LEDUC, M.; CARLINI, C. R.; HATMI, M.; RANDON, J.; FAILI, A.; BON, C. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom specifically binds to platelets. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1217-1228, 1997.
- FRUCHART, J. C.; DURIEZ, P.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 10, n. 3, p. 245-257, 1999.
- FUJITA, H.; OGINO, T.; KOBUCHI, H.; FUJIWARA, T.; YANO, H.; AKIYAMA, J.; UTSUMI, K.; SASAKI, J. Cell-permeable cAMP analog suppresses 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through the activation of the Akt pathway. **Brain Res.**, v. 1113, n. 1, p. 10-23, 2006.

FUNASA. Fundação Nacional De Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2^a Ed, Brasília, D.F.: p. 120, Ministério da Saúde, 2001.

GEARING, K. L.; GÖTTLICHER, M.; TEBOUL, M.; WIDMARK, E.; GUSTAFSSON, J. A. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 4, p. 1440-1444, 1993.

GEORGIEVA, D.; OHLER, M.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, R. K.; GENOV, N.; BETZEL, C. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus* - correlation with pharmacological activities. **J. Proteome Res.**, v. 9, n. 5, p. 2302-2316, 2010.

GILROY, D. W.; COLVILLE-NASH, P. R.; MCMASTER, S.; SAWATZKY, D. A. WILLOUGHBY, D. A.; LAWRENCE, T. Inducible cyclooxygenase-derived 15-deoxy(Delta)12-14PGJ2 brings about acute inflammatory resolution in rat pleurisy by inducing neutrophil and macrophage apoptosis. **FASEB J.**, v. 17, n. 15, p. 2269-2271, 2003.

GIORGI, R.; BERNARDI, M. M.; CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 31, n. 10, p. 1257-1265, 1993.

GIRARD, J. P.; SPRINGER, T. A. High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. **Immunol. Today**, v. 16, n. 9, p. 449-457, 1995.

GOUNI-BERTHOLD, I.; KRONE, W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and athero-sclerosis. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.*, v. 5, n. 6, p. 513-523, 2005.

GUDMUNDSÓTTIR, I. J.; HALLDÓRSSON, H.; MAGNÚSDÓTTIR, K.; THORGEIRSSON, G. Involvement of MAP kinases in the control of cPLA(2) and arachidonic acid release in endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 156, n. 1, p. 81-90. 2001.

HAAPAMÄKI, M. M.; GRÖNROOS, J. M.; NURMI, H.; IRJALA, K.; ALANEN, K. A.; NEVALAINEN, T. J. Phospholipase A₂ in serum and colonic mucosa in ulcerative colitis. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 59, n. 4, p. 279-287, 1999.

HAAPAMÄKI, M. M.; GRÖNROOS, J. M.; NURMI, H.; SÖDERLUND, 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.**, v. 36, n. 10, p. 751-755, 1998.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-review the crotoxin complex - an exemple of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HADAD, N.; TUVAL, L.; ELGAZAR-CARMOM, V.; LEVY, R.; LEVY, R. Endothelial ICAM-1 protein induction is regulated by cytosolic phospholipase A₂α via both NF-κB and CREB transcription factors. **J. Immunol.**, v. 186, n. 3, p. 1816-1827, 2011.

HAN, S. H.; QUON, M. J.; KOH, K. K. Beneficial vascular and metabolic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *Hypertension*, v. 46, n. 5, p. 1086-1092, 2005.

HANSEN, J. B.; ZHANG, H.; RASMUSSEN, T. H.; PETERSEN, R. K.; FLINDT, E. N.; KRISTIANSEN, K. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 5, p. 3175-3182, 2001.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.**, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002. Review.

- HAYASHI, M. A.; NASCIMENTO, F. D.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. Cytotoxic effects of crotamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 508-517, 2008.
- HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 68, p. 1560-1563, 1971.
- HERBERT, S. P.; ODELL, A. F.; PONNAMBALAM, S.; WALKER, J. H. Activation of cytosolic phospholipase A₂-{alpha} as a novel mechanism regulating endothelial cell cycle progression and angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 9, p. 5784-5796, 2009.
- HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. **Protein J.**, v. 24, n. 4, p. 233-242, 2005.
- HERNANZ, R.; MARTÍN, Á.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; PALACIOS, R.; BRIONES, A. M.; MIGUEL, M.; SALAICES, M.; ALONSO, M. J. Pioglitazone treatment increases COX-2-derived prostacyclin production and reduces oxidative stress in hypertensive rats: role in vascular function. **Br. J. Pharmacol.**, v. 166, n. 4, p. 1303-1319, 2012.
- HOULISTON, R. A.; PEARSON, J. D.; WHEELER-JONES, C. P. Agonist-specific cross talk between ERKs and p38(mapk) regulates PGI(2) synthesis in endothelium. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 281, n. 4, p. 1266-1276, 2001.
- HOULISTON, R. A.; WHEELER-JONES, C. P. sPLA(2) cooperates with cPLA(2)alpha to regulate prostacyclin synthesis in human endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 287, n. 4, p. 881-887, 2001.
- HRENIUK, D.; GARAY, M.; GAARDE, W.; MONIA, B. P.; MCKAY, R. A.; CIOFFI, C. L. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 1, but not c-Jun N-terminal kinase 2, suppresses apoptosis induced by ischemia/reoxygenation in rat cardiac myocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 59, n. 4, p. 867-874, 2001.
- ISRAELIAN-KONARAKI, Z.; REAVEN, P. D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. **Cardiol. Rev.**, v. 13, n. 5, p. 240-246, 2005.
- ISSEMAN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645-50, 1990.
- JAFFE, E. A.; HOYER, L. W.; NACHMAN, R. L. Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 71, n. 5, p. 1906-1909, 1974.
- JEONG, E. M.; MOON, C. H.; KIM, C. S.; LEE, S. H.; BAIK, E. J.; MOON, C. K.; JUNG, Y. S. Cadmium stimulates the expression of ICAM-1 via NF-kappaB activation in cerebrovascular endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 320, n. 3, p. 887-892, 2004.
- JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 347-354, 1992.
- KARAHASHI, H.; MICHELSEN, K. S.; ARDITI, M. J. Lipopolysaccharide-induced apoptosis in transformed bovine brain endothelial cells and human dermal microvessel endothelial cells: the role of JNK. **Immunol.**, v. 182, n. 11, p. 7280-7286, 2009.

- KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev. Immunol.*, v. 18, p. 621-663, 2000.
- KASZA, Z.; FETALVERO, K. M.; DING, M.; WAGNER, R. J.; ACS, K.; GUZMAN, A. K.; DOUVILLE, K. L.; POWELL, R. J.; HWA, J.; MARTIN, K. A. Novel signaling pathways promote a paracrine wave of prostacyclin-induced vascular smooth muscle differentiation **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 46, n. 5, p. 682-694, 2009.
- KATUSIC, Z. S.; SANTHANAM, A. V.; HE, T. Vascular effects of prostacyclin: does activation of PPAR δ play a role? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 33, n. 10, p. 559-564, 2012.
- KELTON, J. G.; BLAJCHMAN, M. A. Prostaglandin I₂ (prostacyclin). **Can. Med. Assoc. J.**, v. 122, n. 2, p. 175-179, 1980.
- KHAN, A. H.; CARSON, R. J.; NELSON, S. M. Prostaglandins in labor--a translational approach. **Front. Biosci.**, v. 13, p. 5794-5809, 2008.
- KIM, D. K.; FUKUDA, T.; THOMPSON, B. T.; COCKRILL, B.; HALES, C.; BONVENTRE, J. V. Bronchoalveolar lavage fluid phospholipase A₂ activities are increased in human adult respiratory distress syndrome. **Am. J. Physiol.**, v. 269, n. 1, pt 1, p. 109-118, 1995.
- KIM, J. E.; SONG, S. E.; KIM, Y. W.; KIM, J. Y.; PARK, S. C.; PARK, Y. K.; BAEK, S. H.; LEE, I. K.; PARK, S. Y. Adiponectin inhibits palmitate-induced apoptosis through suppression of reactive oxygen species in endothelial cells: involvement of cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase. **J. Endocrinol.**, v. 207, n. 1, p. 35-44, 2010.
- KIM, S.; BAKRE, M.; YIN, H.; VARNER, J. A. Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. **J. Clin. Invest.**, v. 110, n. 7, p. 933-941, 2002.
- KINOSHITA, E.; HANDA, N.; KAJIYAMA, G.; SUGIYAMA, M. Activation of MAP kinase cascade induced by human pancreatic phospholipase A₂ in a human pancreatic cancer cell line. **FEBS Lett.**, v. 407, n. 3, p. 343-346, 1997.
- KIRKPATRICK, C. J.; WAGNER, M.; HERMANN, I.; KLEIN, C. L.; KÖHLER, H.; OTTO, M.; VAN KOOTEN, T. G.; BITTINGER, F. Physiology and cell biology of the endothelium: a dynamic interface for cell communication. **Int. J. Microcirc. Clin. Exp.**, v. 17, n. 5, p. 231-240, 1997.
- KIS, B.; SNIPES, J.; LENZSER, G.; TULBERT, C.; BUSIJA, D. W. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. **Inflamm. Res.**, v. 55, n. 7, p. 274-278, 2006.
- KLIEWER, S. A.; UMESONO, K.; NOONAN, D. J.; HEYMAN, R. A.; EVANS, R. M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 771-774, 1992.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, n. 6, p. 576-561, 1986.
- KROGSDAM, A. M.; NIELSEN, C. A.; NEVE, S.; HOLST, D.; HELLEDIE, T.; THOMSEN, B.; BENDIXEN, C.; MANDRUP, S.; KRISTIANSEN, K. Nuclear receptor corepressor-dependent repression of peroxisome-proliferator-activated receptor delta-mediated transactivation. **Biochem. J.**, v. 363, pt. 1, p. 157-165, 2002.

- KULDO, J. M.; WESTRA, J.; ASGEIRSDÓTTIR, S. A.; KOK, R. J.; OOSTERHUIS, K.; ROTS, M. G.; SCHOUTEN, J. P.; LIMBURG, P. C.; MOLEMA, G. Differential effects of NF- κ B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF- α - and IL-1 β -induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 289, n. 5, p. 1229-1239, 2005.
- KUNKEL, E. J.; JUNG, U.; LEY, K. TNF- α induces selectin-mediated leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 3, pt. 2, p. H1391-400, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.
- LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 199-208, 2000.
- LAPOINTE, S.; BRKOVIC, A.; CLOUTIER, I.; TANGUAY, J. F.; ARM, J. P.; SIROIS, M. G. Group V secreted phospholipase A₂ contributes to LPS-induced leukocyte recruitment. **J. Cell. Physiol.**, v. 224, n. 1, p. 127-134, 2010.
- LAZENNEC, G.; CANAPLE, L.; SAUGY, D.; WAHLI, W. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. **Mol. Endocrinol.**, v. 14, n. 12, p. 1962-1975, 2000.
- LENNARTZ, M. R. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 31, n. 3-4, p. 415-430, 1999.
- LEVY, B. D.; CLISH, C.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 612-619, 2001.
- LEVY, B. D.; CLISH, C.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 612-619, 2001.
- LIM, E.; LEE, S.; LI, E.; KIM, Y.; PARK, S. Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate-induced excitotoxicity via ERK1/2 and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathways. **Exp Neurol.**, v. 230, n. 1, p. 114-122, 2011.
- LIM, H.; DEY, S. K. A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3207-3210, 2002.
- LIM, J. H.; WOO, J. S.; SHIN, Y. W. Cilostazol protects endothelial cells against lipopolysaccharide-induced apoptosis through ERK1/2- and P38 MAPK-dependent pathways. **Korean J. Intern. Med.**, v. 24, n. 2, p. 113-122, 2009.
- LIM, J. H.; WOO, J. S.; SHIN, Y. W. Cilostazol protects endothelial cells against lipopolysaccharide-induced apoptosis through ERK1/2- and P38 MAPK-dependent pathways. **Korean J. Intern. Med.**, v. 24, n. 2, p. 113-122, 2009.
- 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.**, v. 23, n. 7, p. 1162-1166, 1996.

- LIN, Y.; YAO, S.; VEACH, R. A.; TORGENSON, T. R.; HAWIGER, J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF- κ B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J. Biol. Chem.*, v. 24, p. 14255-14258, 1995.
- LIU, J. Y.; LEE, S.; GHELANI, D.; MATIJEVIC-ALEKSIC, N.; WU, K. K. Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 26, n. 7, p. 1481-1487, 2006.
- LIU, J. Y.; MATIJEVIC-ALEKSIC, N.; LEE, S.; WU, K. K. J. Prostacyclin inhibits endothelial cell XIAP ubiquitination and degradation. *Cell. Physiol.*, v. 212, n. 3, p. 840-848, 2007.
- LIU, J. Y.; SHYUE, S. K.; TSAI, M. J.; CHUNG, C. L.; CHU, K. Y.; WU, K. K. Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 20, p. 15314-15320, 2000.
- LIU, J. Y.; MATIJEVIC-ALEKSIC, N.; LEE, S.; WU, K. K. Prostacyclin inhibits endothelial cell XIAP ubiquitination and degradation. *J. Cell. Physiol.*, v. 212, n. 3, p. 840-848, 2007.
- LIU, F.; HUANG, J.; SADLER, J. E. Shiga toxin (Stx)1B and Stx2B induce von Willebrand factor secretion from human umbilical vein endothelial cells through different signaling pathways. *Blood*, v. 118, n. 12, p. 3392-3398, 2011.
- LOESCH, A. Localisation of endothelin-1 and its receptors in vascular tissue as seen at the electron microscopic level. *Curr. Vasc. Pharmacol.*, v. 3, n. 4, p. 381-392, 2005.
- LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J. R.; OHNO, M.; DANIELE, J. J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIERREZ, 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: 145-158, 1999.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; 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*, v. 37, n. 1, p. 145-158, 1999.
- LORENOWICZ, M. J.; FERNANDEZ-BORJA, M.; KOOISTRA, M. R.; BOS, J. L.; HORDIJK, P. L. PKA and Epac1 regulate endothelial integrity and migration through parallel and independent pathways. *Eur. J. Cell. Biol.*, v. 87, n. 10, p. 779-792, 2008.
- LORENZON, P.; VECILE, E.; NARDON, E.; FERRERO, E.; HARLAN, J. M.; TEDESCO, F.; DOBRINA, A. J. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *Cell Biol.*, v. 142, n. 5, p. 1381-1391, 1998.
- MAKÓ, V.; CZÚCZ, J.; WEISZHÁR, Z.; HERCZENIK, E.; MATKÓ, J.; PROHÁSZKA, Z.; CERVENAK, L. Proinflammatory activation pattern of human umbilical vein endothelial cells induced by IL-1 β , TNF- α , and LPS. *Cytometry A*, v. 77, n. 10, p. 962-970, 2010.
- MARLAS, G. Isolation and characterization of the alpha and beta subunits of the platelet-activation glycoprotein from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. *Biochimie*, v. 67, n. 12, p. 1231-1239, 1985.

- MARLAS, G.; BON, C. Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 125, n. 1, p. 157-165, 1982.
- MARTIN, T. J.; GILLESPIE, M. T. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL): another link between breast and bone. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 12, n. 1, p. 2-4, 2001.
- MEAD, J. F. The non-eicosanoid functions of the essential fatty acids. **J. Lipid Res.**, v. 25, n. 13, p. 1517-1521, 1984.
- MEAGER, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 10, n. 1, p. 27-39, 1999.
- MEAGER, A.; LEUNG, H.; WOOLLEY, J. J. Assays for tumour necrosis factor and related cytokines. **Immunol. Methods**, v. 116, n. 1, p. 1-17, 1989.
- MICHAELIS, UR.; FLEMING, I. From endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) to angiogenesis: Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and cell signaling. **Pharmacol. Ther.**, v. 111, n. 3, p. 584-595, 2011.
- MILANO, G.; MOREL, S.; BONNY, C.; SAMAJA, M.; VON SEGESSER, L. K.; NICOD, P.; VASSALLI, G. A peptide inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and infarct size in vivo. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 292, n. 4, p. H1828-H1835, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional De Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, D.F.: Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1999.
- MITCHELL, J. A.; ALI, F.; BAILEY, L.; MORENO, L.; HARRINGTON, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Exp. Physiol.**, v. 93, n. 1, p. 141-147, 2007.
- MIYASAKA, M.; TANAKA, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 5, p. 360-370, 2004.
- MIYATA, A.; HARA, S.; YOKOYAMA, C.; INOUE, H.; ULLRICH, V.; TANABE, T. Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 200, n. 3, p. 1728-1734, 1994.
- MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, n. 13, p. 2495-2501, 1988.
- MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v. 110, n. 3, p. 371-385, 2006.
- MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v. 110, n. 3, p. 371-385, 2005.
- MORICONI, F.; MALIK, I. A.; AMANZADA, A.; BLASCHKE, M.; RADDATZ, D.; KHAN, S.; RAMADORI, G. The anti-TNF- α antibody infliximab indirectly regulates PECAM-1 gene expression in two models of in vitro blood cell activation. **Lab. Invest.**, v. 92, n. 2, p. 166-177, 2012.
- MORITA, I. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 68-69, p. 165-75, 2002.

- MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REIGER, M. K.; OTTO, J. C.; HORI, T.; DeWITT, D. L.; SMITH, W. L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase- 1 and -2. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 10902-10908, 1995.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOUNIER, C.; FRANKEN, P. A.; VERHEIJ, H. M.; BON, C. The anticoagulant effect of the human secretory phospholipase A₂ on blood plasma and on a cell-free system is due to a phospholipid-independent mechanism of action involving the inhibition of factor Va. **Eur. J. Biochem.**, v. 237, n. 3, p. 778-785, 1996.
- MOURA-GONÇALVES, J.; ARANTES, E. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. Determinação quantitativa da crotamina no veneno de cascavel brasileira. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 28, p. 369-372, 1956.
- MOUSSATCHÉ, H.; DUARTE-VIEIRA, G. Mecanismo da contratura produzido pelo veneno de cascavel (*Crotalus terrificus terrificus*). **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 25, p. 249-254, 1953.
- MUKHERJEE, A. B.; MIELE, L.; PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 1-10, 1994.
- MULLER, V. D.; RUSSO, R. R.; CINTRA, A. C.; SARTIM, M. A.; ALVES-PAIVA, R. D. M.; FIGUEIREDO, L. T.; SAMPAIO, S. V.; AQUINO, V. H. Crotoxin and phospholipases A₂ from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507-515, 2012.
- MULLER, W. A. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. **J. Leukoc. Biol.**, v. 57, n. 4, p. 523-528, 1995.
- MULLER, W. A.; WEIGL, S. A.; DENG, X.; PHILLIPS, D. M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 449-460, 1993.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **J. Biochem.**, v. 131, n. 3, p. 285-292, 2002.
- MURAKAMI, M.; MASUDA, S.; SHIMBARA, S.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Cellular distribution, post-translational modification, and tumorigenic potential of human group III secreted phospholipase A(2). **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 26, p. 24987-24998, 2005.
- MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; INOUE, K.; KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A₂. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 225-283, 1997. Review.
- MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; KUWATA, H.; KUDO, I. Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A₂s. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 159-166, 2000.
- MURAKAMI, M.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; KUWATA, H.; WINSTEAD, M. V.; TISCHFIELD, J. A.; KUDO, I. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. Type IIA and type V secretory phospholipase A₂ are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 23, p. 14411-14423, 1998.
- MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; SATO, H.; YAMAMOTO, K. Secreted phospholipase A₂ revisited. **J. Biochem.**, v. 150, n. 3, p. 233-255, 2011.

- NAKAYAMA, T. Prostacyclin analogues: prevention of cardiovascular diseases. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.**, v. 4, n. 4, p. 351-359, 2006.
- NARABA, H.; MURAKAMI, M.; MATSUMOTO, H.; SHIMBARA, S.; UENO, A.; KUDO, I.; OH-ISHI, S. Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 160, n. 6, p. 2974-2982, 1998.
- NARABA, H.; YOKOYAMA, C.; TAGO, N.; MURAKAMI, M.; KUDO, I.; FUEKI, M.; OH-ISHI, S.; TANABE, T. J. Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E₂ synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. **Biol. Chem.**, 277, n. 32, p. 28601-28608, 2002.
- NARUMIYA, S.; FITZGERALD, G. A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 1, p. 25-30, 2001. Review.
- NASCIMENTO, F. D.; HAYASHI, M. A.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; TERSARIOL, I. L.; KERKIS, I. Crotonamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 29, p. 21349-21360, 2007.
- NASRALLAH, R.; HÉBERT, R. L. Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, n. 2, p. 235-246, 2005.
- NEREM, R. M.; HARRISON, D. G.; TAYLOR, W. R.; ALEXANDER, R. W. Hemodynamics and vascular endothelial biology. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 21, n. 1, p. S6-10, 1993.
- NEWMAN, P. J. Perspectives Series: Cell adhesion in vascular biology. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 3-8, 1996.
- NORATA, G. D.; CALLEGARI, E.; INOUE, H.; CATAPANO, A. L. HDL3 induces cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin release in human endothelial cells via a p38 MAPK/CRE-dependent pathway: effects on COX-2/PGI-synthase coupling. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 24, n. 5, p. 871-877, 2004.
- NUNES, F. P.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1090-1098, 2007.
- NUNES, F. P.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R.; CIRILLO, M. C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100-1106, 2010.
- OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotonamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363-370, 2005.
- OLIVEIRA, D. G.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; BERIAM, L. O.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Protein. Chem.**, v. 21, n. 3, p. 161-168, 2002.
- ORASANU, G.; ZIOUZENKOVA, O.; DEVCHAND, P. R.; NEHRA, V.; HAMDY, O.; HORTON, E. S.; PLUTZKY, J. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 52, n. 10, p. 869-881, 2008.

- OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y.; OKAMOTO, Y.; MAEDA, K.; KURIYAMA, H.; HOTTA, K.; NISHIDA, M.; TAKAHASHI, M.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1296-1301, 2000.
- OUEDRAOGO, R.; WU, X.; XU, S. Q.; FUCHSEL, L.; MOTOSHIMA, H.; MAHADEV, K.; HOUGH, K.; SCALIA, R.; GOLDSTEIN, B. J. Adiponectin suppression of high-glucose-induced reactive oxygen species in vascular endothelial cells: evidence for involvement of a cAMP signaling pathway. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1840-1846, 2006.
- PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. **Clin. Immunol.**, v. 119, n. 3, p. 229-240, 2006.
- PARNELL, E.; SMITH, B. O.; PALMER, T. M.; TERRIN, A.; ZACCOLO, M.; YARWOOD, S. J. Regulation of the inflammatory response of vascular endothelial cells by EPAC1. **Br. J. Pharmacol.**, v. 166, n. 2, p. 434-446, 2012.
- PÉREZ, R.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Involvement of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in macrophage engulfment of hydrogen peroxide-treated U937 cells. **J. Immunol.**, v. 176, n. 4, p. 2555-2561, 2006.
- PÉREZ, R.; MELERO, R.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Role of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 39, p. 40385-40391, 2004.
- PERRIN-COCON, L.; AGAUGUE, S.; COUTANT, F.; MASUREL, A.; BEZZINE, S.; LAMBEAU, G.; ANDRE, P.; LOTTEAU, V. Secretory phospholipase A₂ induces dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n. 8, p. 2293-2302, 2004.
- PETERS-GOLDEN, M.; SONG, K.; MARSHALL, T.; BROCK, T. Translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. **Biochem. J.**, v. 318, pt 3, p. 797-803, 1996.
- PETRUZZELLI, L.; TAKAMI, M.; HUMES, H. D. Structure and function of cell adhesion molecules. **Am. J. Med.**, v. 106, n. 4, p. 467-476, 1999.
- PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, n. 1-2, p. 55-62, 2000.
- PINHO, F. M.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, p. 162-168, 2000.
- PIQUERAS, L.; SANZ, M. J.; PERRETTI, M.; MORCILLO, E.; NORLING, L.; MITCHELL, J. A.; LI, Y. BISHOP-BAILEY, D. Activation of PPARbeta/delta inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, n. 1, p. 115-122, 2009.
- POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007.
- POBER, J. S.; SLOWIK, M. R.; DE LUCA, L. G.; RITCHIE, A. J. Elevated cyclic AMP inhibits endothelial cell synthesis and expression of TNF-induced endothelial leukocyte adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1, but not intercellular adhesion molecule-1. **J. Immunol.**, v. 150, n. 11, p. 5114-5123, 1993.

- POBER, J.; COTRAN, R. S. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? **Lab. Invest.**, v. 64, n. 3, p. 301-305, 1991.
- POLIGONE, B.; BALDWIN, A. S. Positive and negative regulation of NF-kappa B by COX-2: roles of different prostaglandins. **J. Biol. Chem.**, v. 19, p. 38658-38664, 2001.
- PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, p. 875-887, 1981.
- PRIVRATSKY, J. R.; NEWMAN, D. K.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. **Life Sci.**, v. 87, n. 3-4, p. 69-82, 2010.
- PRUZANSKI, W.; VADAS, P. Phospholipase A₂ - a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. **Immunol. Today**, v. 12, n. 5, p. 143-146, 1991.
- RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FEREIRA, M.; CARDOSO, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 609-616, 2004.
- RAO, R. M.; YANG, L.; GARCIA-CARDENA, G.; LUSCINSKAS, F. W. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. **Circ. Res.**, v. 101, n. 3, p. 234-247, 2007.
- RASTOGI, P.; MCHOWAT, J. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents inflammatory mediator production in pulmonary microvascular endothelium. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 165, n. 2-3, p. 167-174, 2009.
- RAYNAUD, F.; EVAÏN-BRION, D.; GERBAUD, P.; MARCIANO, D.; GORIN, I.; LIAPI, C.; ANDERSON, W. B. Oxidative modulation of cyclic AMP-dependent protein kinase in human fibroblasts: possible role in psoriasis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, n. 4, p. 623-632, 1997.
- REDDY, S. A.; HUANG, J. H.; LIAO, W. S. Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. **J. Immunol.**, v. 164, n. 3, p. 1355-1363, 2000.
- REDDY, S. T.; HERSCHAMAN, H. R. Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D₂ in activated mast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 6, p. 3231-3237, 1997.
- REDDY, S. T.; WINSTEAD, M. V.; TISCHFIELD, J. A.; HERSCHMAN, H. R. J. Analysis of the secretory phospholipase A₂ that mediates prostaglandin production in mast cells. **Biol. Chem.**, v. 27, n. 21, p. 13591-13596, 1997.
- RICKARD, A.; PORTELL, C.; KELL, P. J.; VINSON, S. M.; MCHOWAT, J. Protease-activated receptor stimulation activates a Ca²⁺-independent phospholipase A₂ in bladder microvascular endothelial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 288, n. 4, p. 714-721, 2005.
- RIEDERER, M.; OJALA, P. J.; HRZENJAK, A.; GRAIER, W. F.; MALLI, R.; TRITSCHER, M.; HERMANSSON, M.; WATZER, B.; SCHWEER, H.; DESOYE, G.; HEINEMANN, A.; FRANK, S. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelial prostacyclin production. **J. Lipid Res.**, v. 51, n. 10, p. 2957-2966, 2010.
- RIUS, C.; ABU-TAHA, M.; HERMENEGILDO, C.; PIQUERAS, L.; CERDA-NICOLAS, J. M.; ISSEKUTZ, A. C.; ESTAÑ, L.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E. J.; ORALLO, F.; SANZ, M. J. Trans- but not cis-resveratrol impairs angiotensin-II-mediated vascular inflammation through inhibition of NF-κB

activation and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulation. **J. Immunol.**, v. 185, n. 6, p. 3718-3727, 2010.

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

ROMER, L. H.; MCLEAN, N. V.; YAN, H. C.; DAISE, M.; SUN, J.; DELISSER, H. M. IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. **J. Immunol.**, v. 154, n. 12, p. 6582-6592, 1995.

ROOVERS, K.; ASSOIAN, R. K., Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. **Bioessays**, v. 22, n. 9, p. 818-826, 2000.

ROSEN, L. B.; GINTY, D. D.; WEBER, M. J.; GREENBERG, M. E. Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. **Neuron.**, v. 12, n. 6, p. 1207-1221, 1994.

RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 270, n. 3, p. 274-288, 1971.

RUGGERI, Z. M.; WARE, J. von Willebrand factor. **FASEB J.**, v. 7, n. 2, p. 308-316, 1993.

SADARIA, M. R.; MENG, X.; FULLERTON, D. A.; REECE, T. B.; SHAH, R. R.; GROVER, F. L.; WEYANT, M. J. Secretory phospholipase A₂ inhibition attenuates intercellular adhesion molecule-1 expression in human esophageal adenocarcinoma cells. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 91, p. 1539-1545, 2011.

SADLER, J. E. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 106-112. , 2009.

SALVINI, T. F.; AMARAL, A. C.; MIYABARA, E. H.; TURRI, J. A.; DANELLA, P. M.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. **Toxicon**, v. 39, n. 8, p. 1141-1149, 2001.

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; DOS SANTOS, E. C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, n 3, p. 313-321, 2006.

SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; SANTOS, E. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 899-907, 2003.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.

SAMPAIO, S. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; PERES, C. M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A(2) isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 671-676, 2005.

SANO-MARTINS, I. S.; DAIMON, T. Electron microscopic sytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 30, n. 2, p. 141-150, 1992.

- SCHAEFFER, R. C. J. R.; RANDALL, H.; RESK, J.; CARLSON, R. W. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) of size-selected crotalid venom antigens by Wyeth's polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 26, n. 1, p. 67-76, 1988.
- SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.
- SCHRÖDER, T.; KIVILAAKSO, E.; KINNUNEN, P. K.; LEMPINEN, M. Serum phospholipase A₂ in human acute pancreatitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 15, n. 5, p. 633-636, 1980.
- SCHWARZ, U. R.; WALTER, U.; EIGENTHALER, M. Taming platelets with cyclic nucleotides. **Biochem Pharmacol.**, v. 62, n. 9, p. 1153-1161, 2001.
- SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541-1546, 1990.
- SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 235-247, 1980.
- SERHAN, C. N. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 8, n. 2, p. 115-121, 2005.
- SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.
- SHIH, M. F.; CHEN, L. C.; CHERNG, J. Y. Chlorella 11-peptide inhibits the production of macrophage-induced adhesion molecules and reduces endothelin-1 expression and endothelial permeability. **Mar. Drugs**, v. 11, n. 10, p. 3861-3874, 2013.
- SHIMIZU, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 49, p. 123-150, 2009.
- SHINOHARA, H.; BALBOA, M. A.; JOHNSON, C. A.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A₂s. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 12263- 12268, 1999.
- SHYUE, S. K.; TSAI, M. J.; LIOU, J. Y.; WILLERSON, J. T.; WU, K. K. Selective augmentation of prostacyclin production by combined prostacyclin synthase and cyclooxygenase-1 gene transfer. **Circulation**, v. 103, n. 16, p. 2090-2095, 2001.
- SIMIONESCU, M.; SIMIONESCU, N. Endothelial transport macromolecules: transcytosis and endocytosis. **Cell. Biol. Rev.**, v. 25, n. 1, p. 1-78, 1991.
- SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. The cardiovascular system., In: WEISS, L. (Ed.). **Cell and Tissue Biology**. Germany: Urban and Schwarzenberg, 1988. p. 353-400.
- SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.
- SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.
- SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000. Review.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v. 12, p. 505-512, 1938.

SMITH, W. L.; LANGENBACH, R. J. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **Clin. Invest.**, v. 107, p. 1491-1495, 2001.

SMITH, W. S.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 145-182, 2000. Review.

SMITH, W. S.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 145-182, 2000. Review.

SMYTH, E. M.; GROSSER, T.; WANG, M.; YU, Y.; FITZGERALD, G. A. Prostanoids in health and disease. **J. Lipid. Res.**, v. 50, p. 423-428, 2009.

SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANCA, S. C.; GUTIERREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.; Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 33, n. 9, p. 877-888, 2001.

SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. **Mediators Inflamm.**, v. 5, n. 1, p. 18-23, 1996.

SPERANDIO, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. **FEBS J.**, v. 273, n. 19, p. 4377-4389, 2006.

SPISNI, E.; GRIFFONI, C.; SANTI, S.; RICCIO, M.; MARULLI, R.; BARTOLINI, G.; TONI, M.; ULLRICH, V.; TOMASI, V. Colocalization prostacyclin (PGI₂) synthase--caveolin-1 in endothelial cells and new roles for PGI₂ in angiogenesis. **Exp. Cell. Res.**, v. 266, n. 1, p. 31-43, 2001.

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.**, v. 11, n. 1, p. 108-113, 1994.

STITHAM, J.; MIDGETT, C.; MARTIN, K. A.; HWA, J. Prostacyclin: an inflammatory paradox. **Front. Pharmacol.**, v. 2, p. 24, 2011.

STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. **Methods Mol. Biol.**, v. 740, p. 1-6, 2011.

STRAUS, D. S.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. **Trends Immunol.**, v. 28, n. 12, p. 551-558, 2007.

SUMPIO, B. E.; RILEY, J. T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 34, n. 12, p. 1508-1512, 2002.

SYEDA, F.; GROSJEAN, J.; HOULISTON, R. A.; KEOGH, R. J.; CARTER, T. D.; PALEOLOG, E.; WHEELER-JONES, C. P. Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 17, p. 11792-11804, 2006.

TAMARU, M.; NARUMI, S. J. E-selectin gene expression is induced synergistically with the coexistence of activated classic protein kinase C and signals elicited by interleukin-1beta but not tumor necrosis factor-alpha. **Biol. Chem.**, v. 274, n. 6, p. 3753-3763, 1999.

TAMURA, E. K.; CECON, E.; MONTEIRO, A. W.; SILVA, C. L.; MARKUS, R. P. J. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. **Pineal Res.**, v. 46, n. 3, p. 268-274, 2009.

TAMURA, E. K.; FERNANDES, P. A.; MARÇOLA, M.; DA SILVEIRA CRUZ-MACHADO, S.; MARKUS, R. Long-lasting priming of endothelial cells by plasma melatonin levels. **PLoS One**, v. 5, n. 11, p. e13958, 2010.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

THAM, D. M.; WANG, Y. X.; RUTLEDGE, J. C. Modulation of vascular inflammation by PPARs. **Drug News Perspect.**, v. 16, n. 2, p. 109-116, 2003.

THOMMESEN, L.; SJURSEN, W.; GASVIK, K.; HANSEN, W.; BREKKE, O. L.; SKATTEBOL, L.; HOLMEIDE, A. K.; ESPEVIK, T.; JOHANSEN, B.; LAEGREID, A. Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A₂ block TNF-induced activation of transcription factor NF-κB and expression of ICAM-1. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3421-3430, 1998.

THOMMESEN, L.; SJURSEN, W.; GÅSVIK, K.; HANSEN, W.; BREKKE, O. L.; SKATTEBØL, L.; HOLMEIDE, A. K.; ESPEVIK, T.; JOHANSEN, B.; LAEGREID, A. Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. **J. Immunol.**, v. 161, n. 7, p. 3421-3430, 1998.

THOMPSON, R. D.; NOBLE, K. E.; LARBI, K. Y.; DEWAR, A.; DUNCAN, G. S.; MAK, T. W.; NOURSHARGH, S. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane. **Blood**, v. 97, n. 6, p. 1854-1860, 2001.

THUILLEZ, C.; RICHARD, V. Targeting endothelial dysfunction in hypertensive subjects. **J. Hum. Hypertens.**, v. 19, n. 1, p. 21-25, 2005.

TOYAMA, M. H.; DE OLIVEIRA, D. G.; BERIAM, L. O.; NOVELLO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p.1033-1038, 2003.

VADAS, P. Elevated plasma phospholipase A₂ levels: correlation with the hemodynamic and pulmonary changes in gram-negative septic shock. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 104, n. 6, p. 873-881, 1984.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Phospholipase A₂ activation is the pivotal step in the effector pathway of inflammation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 275, p. 83-101, 1990.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. **Lab. Invest.**, v. 55, n. 4, p. 391-404, 1986.

VALENTIJN, K. M.; SADLER, J. E.; VALENTIJN, J. A.; VOORBERG, J.; EIKENBOOM, J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5033-5043, 2011.

VANE, J. R. Prostaglandins as mediators of inflammation. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.**, v. 2, p. 791-801, 1976.

VANE, J. R.; ANGGÅRD, E. E.; BOTTING, R. M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, n. 1, p. 27-36, 1990.

- VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. **Am. J. Cardiol.**, v. 75, n. 3, p. 3A-10A, 1995.
- VANE, J.; CORIN, R. E. Prostacyclin: a vascular mediator. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 26, n. 6, p. 571-578, 2003.
- VERHEIJ, H. M.; BOFFA, M. C.; ROTHEN, C.; BRYCKAERT, M. C.; VERGER, R.; DE HAAS, G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **Eur. J. Biochem.**, v. 112, n. 1, p. 25-32, 1980.
- VERMA, I. M. Nuclear factor (NF)-kappaB proteins: therapeutic targets. *Ann. Rheum. Dis.*, v. 63, n. 2, p. 57-61, 2004.
- VIATOUR, P.; MERVILLE, M. P.; BOURS, V.; CHARIOT, A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem. Sci.*, v. 30, n. 1, p. 43-52, 2005.
- VIEIRA, M. L.; D'ATRI, L. P.; SCHATTNER, M.; HABARTA, A. M.; BARBOSA, A. S.; DE MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ABREU, P. A.; GÓMEZ, R. M.; NASCIMENTO, A. L. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 276, n. 2, p. 172-180, 2007.
- WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2838-2849, 2004.
- WANG, N.; VERNA, L.; CHEN, N. G.; CHEN, J.; LI, H.; FORMAN, B. M.; STEMERMAN, M. B. Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 37, p. 34176-34181, 2002.
- WANG, S. X.; SUN, X. Y.; ZHANG, X. H.; CHEN, S. X.; LIU, Y. H.; LIU, L. Y. Cariporide inhibits high glucose-mediated adhesion of monocyte-endothelial cell and expression of intercellular adhesion molecule-1. **Life Sci.**, v. 79, n. 14, p. 1399-1404, 2006.
- WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **FASEB J.**, v. 18, n. 7, p. 790-704, 2004.
- WEBB, N. R.; Secretory phospholipase A₂ enzymes in atherogenesis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 16, n. 3, p. 341-344, 2005.
- WEIBEL, E. R.; PALADE, G. E. New cytoplasmic components in arterial endothelia. **J. Cell. Biol.**, v. 23, p. 101-112, 1964.
- WEISS, J.; WRIGHT, G. Mobilization and function of extracellular phospholipase A₂ in inflammation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 275, p. 103-113, 1990.
- WINSTEAD, M. V.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. **Biochim Biophys. Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 28-39, 2000.
- WISE, H. Multiple signalling options for prostacyclin. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 24, n. 7, p. 625-630, 2003.

WONG, G. H.; ELWELL, J. H.; OBERLEY, L. W.; GOEDDEL, D. V. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. **Cell**, v. 58, n. 5, p. 923-931, 1989.

WOO, C. H.; LIM, J. H.; KIM, J. H. VCAM-1 upregulation via PKCdelta-p38 kinase-linked cascade mediates the TNF-alpha-induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 288, n. 2, p. 307-316, 2005.

WOODFIN, A.; VOISIN, M. B.; IMHOF, B. A.; DEJANA, E.; ENGELHARDT, B.; NOURSHARGH, S. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*, v. 113, n. 24, p. 6246-6257, 2009.

WU, D.; MARKO, M.; CLAYCOMBE, K.; PAULSON, K. E.; MEYDANI, S. N. J. Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. **Biol. Chem.**, v. 278, n. 13, p. 10983-10992, 2003.

WU, K. K. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. **Prostaglandins, Leukotrienes Essen. Fatty Acids**, v. 72, p. 89-93, 2005.

WU, K. K.; LIOU, J. Y. Cellular and molecular biology of prostacyclin synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, n. 1, p. 45-52, 2005.

XIE, P.; GUO, S.; FAN, Y.; ZHANG, H.; GU, D.; LI, H. Atrogin-1/MAFbx enhances simulated ischemia/reperfusion-induced apoptosis in cardiomyocytes through degradation of MAPK phosphatase-1 and sustained JNK activation. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 5488-5496, 2009.

YANAGISAWA, M.; KUHIIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.; MITSILL, Y.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produces by vascular endothelial cell. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411-415, 1988.

YANG, W.; SHIMAOKA, M. Activation of integrin beta-subunit I-like domains by one-turn C-terminal alpha-helix deletions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 8, n. 8, p. 2333-2338, 2004.

YOKOTE, K.; MORISAKI, N.; ZENIBAYASHI, M.; UEDA, S.; KANZAKI, T.; SAITO, Y.; YOSHIDA, S. The phospholipase-A₂ reaction leads to increased monocyte adhesion of endothelial cells via the expression of adhesion molecules. **Eur. J. Biochem.**, 217: 723-729. 1993.

YU, J.; ETO, M.; AKISHITA, M.; OKABE, T.; OUCHI, Y. A selective estrogen receptor modulator inhibits TNF-alpha-induced apoptosis by activating ERK1/2 signaling pathway in vascular endothelial cells. **Vascul. Pharmacol.**, 51: 21-28, 2009.

YU, L.; DEEMS, R. A.; HAJDU, J.; DENNIS, E. A. The interaction of phospholipase A₂ with phospholipid analogues and inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 5, p. 2657-2664, 1990.

YU, M. L.; LIMPER, A. H. Pneumocystis carinii induces ICAM-1 expression in lung epithelial cells through a TNF-alpha-mediated mechanism. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 6, pt. 1, p. 1103-1111, 1997.

YU, M.; HAN, J.; CUI, P.; DAI, M.; LI, H.; ZHANG, J.; XIU, R. Cisplatin up-regulates ICAM-1 expression in endothelial cell via a NF-kappaB dependent pathway. **Cancer Sci.**, v. 99 n. 2, p. 391-397, 2008.

YUSUF-MAKAGIANSAR, H.; ANDERSON, M. E.; YAKOVLEVA, T. V.; MURRAY, J. S.; SIAHAAN, T. J. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Med. Res. Rev.**, v. 2, n. 2, p. 146-167, 2002.

- ZAMBELLI, V. O.; SAMPAIO, S. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; GRECO, K.; BRITTO, L. R.; ALVES, A. S.; ZYCHAR, B. C.; GONÇALVES, L. R.; SPADACCI-MORENA, D. D.; OTTON, R.; DELLA-CASA, M. S.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-1367, 2008.
- ZANDI, E.; ROTHWARF, D. M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 243-252, 1997.
- ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; BRYK, D.; MAŁECKI, M.; HAJDUKIEWICZ, K.; SITKIEWICZ, D. Aronia melanocarpa fruit extract exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Eur. J. Nutr.**, v. 51, n. 5, p. 563-572, 2012.
- ZHANG, H. L.; HAN, R.; CHEN, Z. X.; CHEN, B. W.; GU, Z. L.; REID, P. F.; RAYMOND, L. N.; QIN, Z. H. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 48, p. 2, 175-182, 2006.
- ZHANG, T.; YANG, D.; FAN, Y.; XIE, P.; LI, H. Epigallocatechin-3-gallate enhances ischemia/reperfusion-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via AKT and MAPK pathways. **Apoptosis**, v. 14, n. 10, p. 1245-1254, 2009.
- ZHANG, X.; CHEN, S.; WANG, Y. Honokiol up-regulates prostacyclin synthase protein expression and inhibits endothelial cell apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 554, n. 1, p. 1-7, 2007.
- ZHOU, J.; WANG, K. C.; WU, W.; SUBRAMANIAM, S.; SHYY, J. Y.; CHIU, J. J.; LI, J. Y.; CHIEN, S. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor-alpha in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 108, n. 25, p. 10355-10360, 2011.
- ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, M. S.; MCINTYRE, M. T. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, v. 13, 3, p. 93-100, 1992.
- ZOU, M. H.; KLEIN, T.; PASQUET, J. P.; ULLRICH, V. Interleukin 1beta decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. **Biochem. J.**, v. 336, pt. 2, p. 507-512, 1998.
- ZOU, M. H.; ULLRICH, V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. **FEBS Lett.**, v. 382, v. 1-2, p. 101-114, 1996.