**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

PRISCILA ANDRADE RANÉIA E SILVA

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO DE INFLAMASSOMA POR
TOXINAS ISOLADAS DE VENENOS BOTRÓPICOS
E MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

SÃO PAULO

2018

RESUMO

RANÉIA, P.A.S. **Estudo da ativação de inflamassoma por toxinas isoladas de venenos botrópicos e modulação da resposta imune.** 2018. 151 f. Tese (Doutorado em Imunologia) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A lesão tecidual é um dos efeitos locais descritos nos envenenamentos botrópicos. Toxinas isoladas, como: a jararagina (JAR) e bothropstoxina-I (BthTX-I), obtidas dos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*, respectivamente, induzem intensa resposta inflamatória e lesão tecidual, porém apresentam diferentes mecanismos de ação. Como descrito, a resolução da lesão tecidual envolve a interação entre mecanismos de reparo do tecido e o sistema imune. Neste contexto, a resposta inflamatória é iniciada por meio da detecção de sinais de dano tecidual agudo devido a distúrbios da homeostasia resultantes ou não de agentes microbianos (DAMPs) e/ou por reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Uma vez induzida, a resposta inflamatória está envolvida tanto no processo de lesão visando a eliminação do agente indutor, assim como no reparo tecidual. Diversos receptores estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs e DAMPs como os transmembrânicos representados pelos do tipo *Toll*, e os citosólicos que compreendem complexos proteicos que formam os inflamassomas. Estes complexos multiproteicos citosólicos podem participar da indução da resposta imune inata por ativação de caspase-1 com consequente liberação de IL-1 β , que pode resultar em morte celular. Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a participação de inflamassoma na resposta inflamatória no tecido muscular de injeção das toxinas, a capacidade da BthTX-I e JAR de induzir a ativação de inflamassoma em macrófagos e os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. O estudo da migração de neutrófilos e macrófagos para o músculo gastrocnêmio de animais C57BL/6 ou deficientes em caspase 1/11 (Caspase 1/11^{-/-}) ou NLRP3 (NLRP3^{-/-}) injetados com JAR e BthTX-I permitiu verificar que o inflamassoma NLRP3 participa da migração destas células inflamatórias para local de injeção das toxinas. A análise da produção de IL-1 β nas culturas de macrófagos peritoneais incubados com JAR e BthTX-I (6 e 24h) mostrou que somente a BthTX-I foi capaz de induzir a secreção desta citocina por um mecanismo dependente de caspase 1/11, ASC e NLRP3 e independente de IPAF. A incubação de macrófagos humanos com as toxinas permitiu verificar que ambas as toxinas induziram a secreção de IL-1 β dependente de caspase 1, porém esta produção foi significativamente maior em resposta à BthTX-I. Nos macrófagos peritoneais de camundongos observamos a relação entre a secreção de IL-1 β e morte celular em ensaio de incorporação do brometo de etídio nas culturas incubadas com BthTX-I por 24h e não com a JAR. Visto que ambas as toxinas injetadas via intramuscular induzem resposta inflamatória intensa, foi analisado o efeito delas sobre a viabilidade e secreção de IL-6 e MCP-1 em miotubos C2C12. Os resultados mostraram que somente a BthTX-I induz efeito miotóxico sobre esta linhagem celular. Além disso, pudemos verificar que BthTX-I induz altos níveis de IL-6 e MCP-1 quando comparados aos obtidos com a JAR.

Visto que a BthTX-I induziu alta secreção de MCP-1 pelos miotubos C2C12, em experimento *in vivo* realizado em camundongos C57BL/6 ou deficientes em CCR2 (CCR2^{-/-}) pode ser observada a dependência da interação entre MCP-1 e o CCR2 para a migração dos macrófagos em resposta a injeção de BthTX-I. Em culturas de miotubos incubados com as toxinas pôde ser observada alta liberação de ATP induzida pela BthTX-I *in vitro*. Em outros experimentos foi estudada a capacidade do sobrenadante de miotubos incubados com BthTX-I de induzir a secreção de IL-1 β pelos macrófagos *in vitro*. Os resultados mostraram a produção de IL-1 β nessas culturas de macrófagos, assim como a produção desta citocina em macrófagos incubados com BthTX-I juntamente com ATP. A hidrólise do ATP no sobrenadante da cultura de C2C12 estimulada com BthTX-I aboliu a secreção de IL-1 β pelos macrófagos *in vitro*. Além disso, foi observada a inibição da produção de IL-1 β nas culturas de macrófagos primados com LPS e incubados com a BthTX-I em condições de altas concentrações de KCl sugerindo papel relevante do efluxo de K⁺ na produção de IL-1 β induzida pela BthTX-I. Em conjunto, os resultados acrescentam novas informações sobre o potencial inflamatório da JAR e BthTX-I, quanto à ação destas toxinas em macrófagos, ativação de inflamassoma e células musculares.

Palavras-chave: envenenamento botrópico; jararagina; bothropstoxina-I; IL-1 β ; MCP-1; inflamassoma; resposta inflamatória; célula muscular.

ABSTRACT

RANÉIA, P.A.S. **Evaluation of the inflammasome activation by toxins isolated from bothropic venoms and modulation of the immune response.** 2018. 151 f. Ph. D. These (Immunology) -Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Tissue damage is one of the local effects described in bothropic envenomations. Isolated toxins, such as jararhagin (JAR) and bothropstoxin-I (BthTX-I), obtained from *B. jararaca* and *B. jararacussu* venoms, respectively, induce intense inflammatory response and tissue injury, however mediated by distinct mechanisms. As described, resolution of tissue injury involves the interaction between mechanisms of tissue repair and the immune system. In this context, the inflammatory response is initiated by detecting of signs of acute tissue damage due to disorders of homeostasis resulting from distinct agents (DAMPs) and / or recognition of pathogens associated molecular patterns (PAMPs). Once induced, the inflammatory response is involved both in the injury process for the elimination of the pathogenic agent, as well as in the tissue repair. Several receptors are involved in the recognition of PAMPs and DAMPs as the transmembrane receptors such as the Toll-like, and the cytosolic ones that comprise protein complexes - inflammasomes. These cytosolic multiprotein complexes may participate in the induction of the innate immune response by activation of caspase-1 with consequent release of IL-1 β , which may result in cell death. Thus, we aimed to study the role of inflammasome on the inflammatory response in muscular tissue of JAR and BthTX-I injection, the ability of BthTX-I and JAR to induce the activation of inflammasome in macrophages and the molecular mechanisms involved in this process. The analyses of the neutrophils and macrophages migration in gastrocnemius muscle of C57BL/6 or Caspase 1/11 (Caspase 1/11^{-/-}) or NLRP3 (NLRP3^{-/-}) deficient mice injected with JAR e BthTX-I allow us to verify that NLRP3 inflammasome participates in these cells migration for the local of the toxins injection. The detection of IL-1 β on supernatants from macrophage cultures incubated with JAR or BthTX-I (6 e 24h) showed that only BthTX-I was able to induce this cytokine secretion by a mechanism dependent of caspase 1/11, ASC and NLRP3 and independent of IPAF. The incubation of human macrophages with the toxins demonstrated that both toxins induced IL-1 β secretion, however this production was significantly higher in response to BthTX-I. On murine macrophage cultures it was verified the correlation between the IL-1 β secretion and the cell death in the incorporation of ethidium bromide assay of cultures incubated with BthTX-I during 24h and not with JAR. Since that both toxins injected in the muscle induced intense inflammation, it was analyzed the effect of both toxins on the viability and the secretions of IL-6 and MCP-1 by C2C12 myotubes. The results showed that only BthTX-I induces a myotoxic effect on this cell line. Furthermore, it was verified that BthTX-I induces high secretion of IL-6 and MCP-1 when compared with those induced by JAR. Considering that BthTX-I induces high levels of MCP-1, in in vivo experiment using C57BL/6 and CCR2 deficient (CCR2^{-/-}) mice it was observed that the interaction of MCP-1 and CCR2 is essential for the macrophage recruitment for the toxin injection. High release of ATP was detected in C2C12 myotube cultures incubated with BthTX-I but not with JAR. In another experiments it was studied the ability of the supernatants of C2C12 myotubes incubated with BthTX-I to induce the IL-1 β secretion by peritoneal macrophages *in vitro*.

The results showed the IL-1 β secretion in the macrophage cultures as well as the cytokine secretion in macrophages incubated with BthTX-I and ATP independent of the priming with LPS. The hydrolysis of the ATP on the supernatants of C2C12 incubated with the BthTX-I abolished the IL-1 β production by macrophages *in vitro*. In addition, it was not observed IL-1 β production by macrophages primed with LPS and incubated with BthTX-I in the presence of high concentration of KCl suggesting a relevant role of K⁺ efflux for this cytokine secretion in response to BthTX-I. Taken together, the results show new findings about the inflammatory effect of JAR and BthTX-I, concerning about the action of these toxins on macrophages, inflammasome activation and muscle cell.

Keywords: Bothrops envenomation; jararhagin; bothropstoxin-I; IL-1 β ; MCP-1; inflammasome; muscle cell; inflammatory reaction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envenenamento Botrópico

Acidentes causados por animais peçonhentos afetam um grande número de indivíduos, principalmente em países tropicais, e pode levar a lesões permanentes ou morte (Monteiro-Machado *et al.*, 2015). Sua incidência e mortalidade são mais altas que outras doenças negligenciadas, como febre hemorrágica induzida por dengue, cólera, doença de Chagas, leishmaniose, febre amarela e esquistossomose (Williams *et al.*, 2010).

As serpentes peçonhentas de importância médica da América Latina pertencem aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. Dentre eles, o gênero *Bothrops* é responsável pela maioria dos acidentes. A Organização Mundial da Saúde estima que globalmente ocorram 2.500.000 acidentes por picadas de serpentes e 125.000 mortes por ano (World Health Organization).

No Brasil, o gênero *Bothrops* é o principal responsável pelos relatos, causando aproximadamente 80% dos acidentes ofídicos (Ministério da Saúde, 2016).

O envenenamento por picada de serpente é caracterizado, com algumas exceções, por dano tecidual proeminente associado a uma série de alterações patológicas agudas na área de injeção do veneno (Gutiérrez e Ownby, 2003). Tais alterações ocorrem rapidamente após a picada, e dependem da quantidade de veneno injetado e tempo de espera para o tratamento com o soro antiofídico (Otero *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2006).

O envenenamento botrópico é caracterizado tanto por ações locais como sistêmicas. Os efeitos locais incluem mionecrose, hemorragia, edema e inflamação, enquanto que sistemicamente observa-se coagulopatia, alteração cardiovascular e insuficiência renal (Otero *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2009).

Muitas dessas patologias como hemorragia e necrose, têm sido associadas com a ação das metaloproteinases (*Snake venom metalloproteinases*- SVMPs) ou fosfolipases A₂ (PLA₂) presentes nos venenos, as quais provocam esses efeitos por mecanismos que podem ser diretos ou indiretos (Rucavado *et al.*, 2016). Como já descrito na literatura, a ação direta das SVMPs é a hemorragia, resultado da degradação proteolítica das principais proteínas da matriz extracelular, enquanto que as PLA₂s são responsáveis diretamente pela miotoxicidade. Estas toxinas também estão diretamente envolvidas na intensa resposta inflamatória observada no envenenamento (Gallagher *et al.*, 2005).

Modelos animais de injeção de veneno total ou toxinas de venenos têm sido utilizados para avaliar o dano local, exsudato inflamatório, capacidade neutralizante de antivenenos e ainda, os mecanismos envolvidos na patologia resultante do envenenamento (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Fox e Serrano, 2005; Gutiérrez, Rucavado, *et al.*, 2010). Neste contexto, a análise proteômica do exsudato resultante da injeção do veneno tem permitido identificar vários mediadores inflamatórios e de moléculas de padrão molecular associadas a danos (ou associadas a perigo-DAMPs) que induzem e medeiam a resposta inflamatória local (Rucavado *et al.*, 2016). Alguns DAMPs identificados são derivados da proteólise de proteínas pela ação das SVMs e proteinases endógenas ativadas e outros são resultantes da lise celular e do escape de proteínas no exsudato, devido à ação de PLA₂ citotóxicas presentes no veneno (Escalante *et al.*, 2009). Citocinas e quimiocinas liberadas no exsudato também exercem papel relevante na resposta inflamatória no local do envenenamento (Mahdavian Delavary *et al.*, 2011).

Apesar do baixo índice de letalidade, os acidentes botrópicos têm grande importância médica, uma vez que podem resultar em sequelas permanentes, como perda da função ou amputação do membro afetado (Cardoso *et al.*, 1993). O soro antiofídico é utilizado como única terapia específica e eficiente contra vítimas desses envenenamentos. Ele é capaz de neutralizar com grande êxito os efeitos sistêmicos, porém é pouco eficiente sobre os efeitos locais decorrentes da hemorragia, necrose e intensa inflamação (Cardoso *et al.*, 1993; Gutiérrez *et al.*, 2009).

Os venenos botrópicos são ricos em diferentes classes de toxinas como metaloproteinases, serinoproteinases, PLA₂, peptídeos potencializadores de bradicinina, disintegrinas, L-amino oxidases e lectinas tipo C dentre outras, cujas ações determinam o quadro clínico observado nos acidentes (Bjarnason e Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 1996).

Figura 1- Resumo hipotético dos eventos propostos que ocorrem no tecido injetado com veneno de *B. asper*.

As toxinas de veneno, particularmente SVMPs, PLA₂s e hialuronidases, induzem danos diretos ao tecido, especialmente necrose aguda da fibra muscular e degradação de componentes da matriz extracelular, como os da membrana basal de vasos capilares e outras moléculas da matriz, incluindo ácido hialurônico. Ocorre a inflamação aguda, com a produção de mediadores que promovem o aumento na permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias e dor. Esse dano tecidual agudo também está associado à liberação de DAMPs, tanto intracelulares quanto extracelulares (Rucavado *et al.*, 2016)

1.2. Metaloproteinases de venenos de serpentes

As metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs) compreendem uma série de enzimas dependentes de zinco, que são encontradas em grande quantidade nos venenos botrópicos (Junqueira-De-Azevedo e Ho, 2002). As SVMPs são proteínas estruturalmente relacionadas à metaloproteinases de mamíferos como as ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinases*) e MMPs (*matrix metalloproteinases*) (Fox e Serrano, 2008).

As SVMPs organizam-se em multidomínios, o que permite sua classificação em 3 classes principais: as P-I que contêm somente o domínio metaloproteinase; P-II são sintetizadas com os domínios metaloproteinase e tipo disintegrina, mas

frequentemente são encontradas no veneno na forma processada contendo somente o domínio disintegrina; e P-III compostas pelos domínios metaloproteinase, disintegrina e rico em cisteína e, em raros casos, com a inclusão de um domínio lectina tipo-C (Fox e Serrano, 2008). Dentre as classes de SVMPs, P-I e P-III são as mais abundantes na maioria dos venenos de serpentes (Moura-Da-Silva e Baldo, 2012).

As SVMPs são sintetizadas no citoplasma das células secretórias, transferidas para o retículo endoplasmático, em seguida para o complexo de Golgi e transportadas para o lúmen da glândula de peçonha por meio de vesículas secretórias (Fox e Serrano, 2008). Durante o transporte pelo retículo endoplasmático ocorre a remoção do peptídeo sinal e no complexo de Golgi ocorrem as modificações pós-traducionais como ativação enzimática devido à remoção do segmento pró-proteína (Pro), e clivagem entre os domínios metaloprotease e disintegrina, o que permite a geração das diferentes subclasses (PIa, PIa, PIIb, PIIf, PIId, PIle, PIIIa, PIIIb, PIIIc e PIIId) de SVMPs (Fox e Serrano, 2008).

Figura 2- Esquema representativo das classes de SVMPs.

P: peptídeo sinalizador; Pro: segmento da pró-proteína, removido durante sua ativação; S: espaçador; Proteinase: sequência HEBXHXBGXBH; Dis: domínio disintegrina; Dis-like: domínio semelhante à disintegrina; Cys-rich: domínio rico em cisteína; Lec: lectina tipo-C; (?): produto processado, mas não identificado na peçonha. (adaptado de Fox e Serrano, 2008).

As SVMPs são responsáveis por grande parte dos efeitos observados nos envenenamentos botrópicos como: incoagulabilidade sanguínea, hemorragia, edema, hipotensão, inflamação e mionecrose (Rucavado *et al.*, 2002). Estas proteínas são também responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular, resultando na ruptura da integridade das células endoteliais nas paredes dos vasos sanguíneos e subsequente hemorragia, que é agravada por distúrbios na função plaquetária (Bjarnason e Fox, 1994; Kamiguti *et al.*, 2003). Os efeitos das SVMPs ainda comprometem a hemostasia, com a degradação de proteínas de coagulação, como fibrinogênio (Kamiguti *et al.*, 1994; Markland, 1998) e inibição da agregação plaquetária (Kamiguti *et al.*, 1996).

A jararagina (JAR) é a uma metaloproteinase hemorrágica abundante no veneno de *Bothrops jararaca* (Paine *et al.*, 1992). Desde seu isolamento, esta proteína tem sido utilizada em vários estudos voltados para o entendimento da ação desta toxina nos envenenamentos por *B. jararaca* (Kamiguti *et al.*, 1991; Paine *et al.*, 1992; Moura-Da-Silva *et al.*, 1996; Moura-Da-Silva *et al.*, 2008). A JAR é uma proteína de cadeia única, de 52 KDa, composta pelos domínios: metaloproteinase, tipo-disintegrina e rico em cisteínas, o que a classifica como uma SVMP de classe PIII (Paine *et al.*, 1992).

Dentre as principais atividades biológicas da JAR, destaca-se sua intensa atividade hemorrágica (Paine *et al.*, 1992) correlacionada com a degradação de componentes plasmáticos (Kamiguti *et al.*, 1994) e inibição da agregação plaquetária (Kamiguti *et al.*, 1996). A atividade hemorrágica da JAR também está relacionada com a sua capacidade de ligação ao colágeno I e IV via domínio tipo-disintegrina (Moura-Da-Silva *et al.*, 2008).

1.3. Fosfolipases de venenos de serpentes

Outro exemplo de envenenamento botrópico é o causado pela serpente *B. jararacussu*, que tem sido estudado desde os anos 1900 devido à sua potente ação miotóxica (Brazil, 1909).

A composição do veneno de *B. jararacussu* se assemelha à encontrada em outros venenos botrópicos, com exceção da maior proporção de PLA₂s em relação

às metaloproteinases. Essas PLA₂s desempenham papel relevante na indução da mionecrose observada (Gutiérrez & Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003).

As fosfolipases são classificadas em muitos grupos e subgrupos com base em suas estruturas (Schaloske e Dennis, 2006). PLA₂s de venenos de serpentes da família dos Elapídeos são agrupadas no grupo I, enquanto PLA₂s de serpente da família dos Viperídeos pertencem ao grupo II, juntamente com as provenientes de exsudatos de mamíferos. As PLA₂s de ambos os grupos têm, em geral, as mesmas características, mas diferem em seu padrão de ligações dissulfeto e a presença de uma extensão C-terminal nas PLA₂s do grupo II (Gutiérrez et al., 2013).

As PLA₂ exibem várias atividades biológicas, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, inibição da agregação plaquetária além das atividades inflamatória e anticoagulante (Gutiérrez e Ownby, 2003). Essa diversidade de atividades das PLA₂s é resultante do processo de evolução dos genes que codificam essas moléculas associado à uma alta taxa de mutação (Chuman et al., 2000), particularmente em regiões que codificam resíduos expostos na superfície.

As PLA₂s do grupo II (venenos de viperídeos) podem ser subdivididas em 2 classes: as PLA₂s Asp49, assim denominadas por possuírem um resíduo de aspartato na posição 49, resíduo este essencial para catálise; e as PLA₂s Lys49, cujo resíduo de aspartato é substituído por um resíduo de lisina na mesma posição, e por isso são desprovidas de atividade fosfolipásica (Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003). Ambos os grupos de PLA₂s são capazes de induzir mionecrose, edema, dor, inflamação, citotoxicidade, neurotoxicidade e efeito anticoagulante (Gutiérrez e Ownby, 2003; Lomonte et al., 2003). Exemplos de PLA₂s miotóxicas incluem as cardiotoxinas presentes em alguns venenos de *Elapídeos* (Duchen et al., 1974), a melitina do veneno de abelha dentre outras (Ownby et al., 1997).

Apesar do amplo conhecimento sobre as PLA₂ miotóxicas, muitas questões relativas ao seu mecanismo de ação não são totalmente compreendidas. Há evidência de que as PLA₂ miotóxicas de ambos os grupos I e II se ligam a uma proteína ainda não identificada na membrana plasmática de células musculares (Dixon e Harris, 1996). Após a ligação, as PLA₂s desestabilizam a bicamada, causando hidrólise enzimática de fosfolípidos de membrana, induzindo mudanças drásticas na sua permeabilidade aos íons, promovendo eventos intracelulares que

culminam em lesão celular irreversível (Gutiérrez *et al.*, 1984b; Gutiérrez e Ownby, 2003).

A Lemnitoxina é uma PLA₂ isolada do veneno de *Micrurus lemniscatus*, miotóxica e pró-inflamatória do grupo I (Casais-E-Silva *et al.*, 2016), enquanto a bothropstoxina-I (BthTX-I) isolada do veneno de *B.jararacussu* é uma PLA₂ pertencente ao grupo II. Apesar de pertencerem à classes distintas, ambas as toxinas causam os mesmos efeitos, como a degeneração muscular quando injetadas por via intramuscular e, como são miotoxinas sistêmicas, também atuam em locais distantes induzindo rabdomiólise, mioglobinúria e lesão renal aguda (Gutiérrez *et al.*, 2009).

Como mencionado, a Bothropstoxina-I (BthTX-I), é uma PLA₂ Lys49 isolada do veneno de *B. jararacussu* com massa molecular em torno de 13,7KDa constituída por uma única cadeia polipeptídica contendo 121 aminoácidos e 14 pontes dissulfeto (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Cintra *et al.*, 1993). Esta miotoxina reproduz os efeitos neurotóxico e miotóxico do veneno (Rodrigues-Simioni *et al.*, 1983; Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988). Ambas as ações são provavelmente responsáveis pelos graves efeitos observados nos acidentes por esta serpente (Milani Júnior *et al.*, 1997; Ribeiro e Jorge, 1997). Assim sendo, apesar de baixa atividade catalítica, a BthTX-I induz necrose de fibras musculares, liberação de creatina quinase (*Creatine kinase*-CK) (Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988) e bloqueio da contração muscular em tecido nervoso e muscular (Heluany *et al.*, 1992; Rodrigues-Simioni *et al.*, 1995).

QUEIROZ e colaboradores (Queiroz *et al.*, 1984) mostraram progressiva área de necrose e fagocitose de células necróticas dependente da concentração de BthTX-I injetada no músculo tibial anterior. Além disso, observaram reparo tecidual total das fibras musculares após duas semanas da injeção de baixas concentrações da toxina e acentuada fibrose no tecido injetado com altas doses da toxina.

LANDUCCI e colaboradores (Landucci *et al.*, 1998) demonstraram que a BthTX-I, assim como outra PLA₂ isolada do veneno de *B. jararacussu* (BthTX-II), induz edema quando injetadas pela via subcutânea na pele ou na pata de ratos, além de promover a desgranulação de mastócitos *in vivo* e *in vitro*. Os autores descreveram ainda, que esse efeito edematogênico é parcialmente inibido em ratos tratados com antagonista do receptor de histamina.

Em outro trabalho, DE CASTRO e colaboradores (De Castro *et al.*, 2000) demonstraram que, assim como outras PLA_{2s} de venenos botrópicos, a BthTX-I

induz a migração de leucócitos mononucleares e em menor proporção de neutrófilos e eosinófilos, além da desgranulação de mastócitos na cavidade pleural de ratos. O potencial de diferentes PLA₂s de venenos assim como da BthTX-I em induzir o recrutamento de neutrófilos, liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e fator ativador de plaquetas (PAF) foram independentes da ação fosfolipásica destas toxinas, no entanto esse efeito parece ser mediado pela ligação com sítios de interação heparina/heparana (Gambero *et al.*, 2002).

Assim como o observado para BthTX-I, atividade miotóxica também foi descrita para outras PLA₂s de venenos de *Bothrops*, *Agkistrodon*, *Trimeresurus* e *Crotalus* em modelo *in vitro* de miotubos, com estrutura semelhante ao músculo esquelético, diferenciados a partir de mioblastos C2C12 (Lomonte *et al.*, 1998). Esta linhagem celular C2C12 (células satélites de camundongo) quando cultivadas *in vitro* apresentam características de mioblastos, que em determinadas condições de cultivo fundem-se e diferenciam-se em miotubos multinucleados semelhantes ao tecido muscular *in vivo* (Hansen *et al.*, 2007);(Nishimura *et al.*, 2008).

1.4. Processo inflamatório e reparo tecidual

A regeneração do músculo esquelético é um processo que envolve a interação de células miogênicas (satélites), residentes, inflamatórias, vasos sanguíneos, nervos e matriz extracelular. Ela começa após a lesão de fibras musculares, com a ativação das células satélites localizadas na periferia das fibras musculares entre o sarcolema e membrana basal (Grounds, 1991; Hawke e Garry, 2001; Ciciliot e Schiaffino, 2010). Uma vez que as células miogênicas são ativadas, estas se diferenciam em mioblastos que, após vários ciclos de replicação, se fundem formando os miotubos multinucleados que, quando amadurecem tornam-se miofibras (Schiaffino *et al.*, 2008; Saclier *et al.*, 2013).

O processo de ativação e proliferação das células satélites em resposta a uma injúria é semelhante ao que ocorre no desenvolvimento do músculo fetal (Jung *et al.*, 2000; Geissmann *et al.*, 2003; Yona e Jung, 2010). Além disso, a capacidade proliferativa destas células é dependente da inervação do músculo, como evidenciado por Biswas e Mantovani (Biswas e Mantovani, 2010). Neste trabalho, os autores mostraram que a denervação de ratos recém-nascidos com 6 dias de idade reduz drasticamente a capacidade proliferativa das células satélites.

Durante o processo de regeneração e formação muscular, um grupo de fatores transcricionais pertencentes à família MyoD tem um papel central na diferenciação das células e formação do tecido. Estes fatores coletivamente chamados *Myogenic Regulatory Factors* (MRFs) incluem: MyoD, Myf-5, miogenina e MRF4 (Sassoon *et al.*, 1989). Esses fatores são expressos de forma temporal e controlam a expressão dos genes relacionados com o crescimento muscular (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004). As células embrionárias com potencial para diferenciação em células musculares (células precursoras miogênicas) expressam MyoD e Myf-5 e são denominadas de mioblastos (Choi *et al.*, 1990). Essas células proliferam, saem do ciclo celular, expressam miogenina e MRF4, que regulam a fusão e a diferenciação da fibra muscular (Megeney e Rudnicki, 1995). Uma população de mioblastos que se diferenciam mais tardiamente, as células miossatélites, é responsável pelo crescimento muscular, que pode ocorrer por hiperplasia e hipertrofia das fibras (Crescenzi *et al.*, 1990). As células satélites quiescentes não expressam os MRFs, porém, sob a ação de estímulos como fatores de crescimento ou citocinas, são ativadas e passam a expressar os MRFs de maneira similar ao que ocorre com as células precursoras miogênicas durante a miogênese.

Neste processo de regeneração muscular, trabalhos têm ressaltado a participação ativa dos neutrófilos e macrófagos (Arnold *et al.*, 2007). Essas células estão envolvidas tanto da fase inflamatória da lesão atuando na remoção de células apoptóticas e/ou necróticas como na fase de restabelecimento tecidual via secreção de citocinas e fatores de crescimento promovendo a resposta regenerativa local e sobrevivência de mioblastos (Martinez-Pomares *et al.*, 2003).

Macrófagos no local do reparo do tecido lesionado consistem em duas populações, ambas têm sua origem na medula óssea (Mahdavian Delavary *et al.*, 2011). A primeira é o macrófago de tecido "residente" que está presente nos tecidos em todos os momentos e, sob estímulos adequados, é capaz de entrar no ciclo mitótico. A outra grande população é recém-recrutada e consiste de células precursoras hematogênicas, chamadas de monócitos que circulam na corrente sanguínea ou são armazenados no baço, prontos para serem recrutados para o tecido lesionado (Jia e Pamer, 2009). Uma vez que os monócitos recém-recrutados migram através da parede do vaso, eles liberam enzimas que fragmentam as proteínas da matriz extracelular, criando espaço para outros monócitos migrarem

para o local da lesão. Posteriormente, em reação ao microambiente, os monócitos diferenciam-se em macrófagos (Martin e Leibovich, 2005).

Os macrófagos podem ser classificados em duas subpopulações de acordo com seu fenótipo e as funções efetoras que desempenham no contexto da resposta imune (Mantovani *et al.*, 2002). A população de macrófagos tipo 1, chamada M1 (clássicos), apresenta um perfil pró-inflamatório, ou seja, com acentuada atividade microbicida, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e secreção de TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6 além de IFN- γ . Estas células apresentam alta expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), estão principalmente presentes na fase inflamatória da reação e envolvidas na eliminação dos agentes patogênicos ou células tumorais (Gordon e Taylor, 2005). Por outro lado, a população de macrófagos tipo 2, ou seja os M2 (alternativos), apresentam alta expressão da enzima arginase, assumem um papel regulador na resposta imune secretando predominantemente IL-4, IL-10 e TGF- β . Estas células M2 atuam no controle da resposta inflamatória, promovem a angiogênese, remodelamento e reparo tecidual (Mantovani *et al.*, 2004).

Os fenótipos dos macrófagos mencionados irão influenciar o reparo tecidual de diferentes maneiras, dependendo do micro-ambiente em que eles exercem sua função. Como ambos os fenótipos de macrófagos são fundamentais para o desenvolvimento e reparo do dano, o equilíbrio entre os dois fenótipos torna-se importante nas diferentes fases do reparo tecidual. Na fase pró-inflamatória do processo de cicatrização, mais macrófagos M1 são necessários para limpar os detritos e eliminar possíveis patógenos invasores. Por outro lado, numa fase posterior em que ocorre nova formação de tecido, o macrófago M2 pode ter um papel mais importante (Mahdavian Delavary *et al.*, 2011).

Figura 3- Mudanças nas populações de células mieloides, expressão de fatores de transcrição específicos do músculo e enzimas e proteínas estruturais no músculo seguindo o dano tecidual muscular.

PMN: polimorfonucleado (neutrófilos); M1: macrófagos M1; M2: macrófagos M2 (Adaptado de (Tidball e Villalta, 2010).

Em vista do exposto, fica clara a relevância de estudos que visam elucidar os mecanismos envolvidos no desencadeamento da reação inflamatória em tecido muscular lesionado e posterior regeneração tecidual. Em se tratando de envenenamentos, as informações acima citadas ressaltam a importante participação das metaloproteinases e PLA₂s para o estabelecimento do quadro clínico observado no local da picada (Kanashiro *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2004; Doin-Silva *et al.*, 2009).

Neste contexto, nós estudamos o processo de lesão e reparo muscular induzidos por JAR e BthTX-I em modelo murino, correlacionando o perfil de migração de neutrófilos e macrófagos M1 e M2. As análises histológicas dos tecidos musculares permitiram verificar intensa hemorragia, desorganização dos feixes musculares com a presença neutrófilos nas primeiras horas da injeção da JAR. Em seguida, observamos o infiltrado de neutrófilos, seguida de macrófagos com a formação de pequenos granulomas e o início do reparo tecidual. Nos períodos mais tardios da

injeção da JAR, verificamos reparo muscular com pouca área de fibrose. No entanto, verificamos que a injeção da BthTX-I resultou em degeneração dos feixes musculares, presença de edema e infiltrado mais tardio de neutrófilos seguido de macrófagos. Após 28 dias da injeção da BthTX-I verificamos a presença de granulomas e fibrose no tecido analisado. Os resultados de citometria de fluxo confirmaram a presença de macrófagos M1 (CD11b⁺/CD68⁺, CD11b⁺/IL-12⁺ e alta expressão da iNOS) mais precoce em resposta à JAR em relação à BthTX-I. O pico de macrófagos M2 (CD11b⁺/CD206⁺ e CD11b⁺/IL-10⁺) e a expressão de arginase foram também mais precoces em JAR (24-48hs) que BthTX-I. Maior expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi induzida nos tempos iniciais pós-injeção da JAR em relação à BthTX-I. Aumento progressivo de *tgf- β* foi verificado após a injeção de JAR seguida de declínio, enquanto que no grupo BthTX-I houve pico de expressão de *tgf- β* mais tardio. Com relação aos fatores de transcrição envolvidos no reparo tecidual, verificamos altos níveis de Pax-7 logo após a injeção da JAR e BthTX-I mais tardio. A expressão de MyOD foi verificada tanto no grupo JAR como BthTX-I nos períodos iniciais analisados e precedeu à expressão de miogenina que também foi mais tardia em resposta à BthTX-I (Ranéia *et al.*, 2018 – em preparação).

Esses resultados em conjunto sugerem, portanto que JAR e BthTX-I induzem cinéticas distintas de influxo celular, sendo que no grupo BthTX-I o processo inflamatório e de reparo muscular ocorrem mais tardiamente em relação ao observado com a JAR. As análises das populações de macrófagos M1 e M2 indicam que estas células exercem papel ativo nesse processo regulando tanto a inflamação como o reparo tecidual.

1.5. Ativação da Imunidade Inata

A inflamação é uma resposta aguda a diferentes agentes potencialmente patogênicos ou dano tecidual. As células da imunidade inata reconhecem vários componentes microbianos evolutivamente conservados chamados de padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen associated molecular pattern*-PAMPs), tais como lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, peptidoglicanos, flagelina, dentre outros. Este reconhecimento ocorre por meio da interação com receptores de reconhecimento de padrões moleculares (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs) como, por exemplo, os do tipo *Toll* (*Toll Like Receptors* - TLRs)

que podem estar expressos na superfície celular ou no interior de endossomos (Medzhitov, 2001; Strowig *et al.*, 2012)

Além disso, outros receptores reconhecem sinais derivados do hospedeiro, chamados de padrões moleculares associados ao dano (*Damage associated molecular pattern* - DAMPs), os quais são resultantes de perturbações da homeostasia do tecido causada pela presença no local de produtos patogênicos ou não (Akira *et al.*, 2006).

Tendo em conta a variedade de componentes liberados no local da picada pela serpente, assim como os danos causados pode-se sugerir que ocorra a ativação de das células do sistema imune pela presença de PAMPs ou DAMPs resultando na resposta inflamatória local. Corroborando com essa hipótese, Zoccal e colaboradores (Zoccal *et al.*, 2016) propuseram o termo “Padrões Moleculares Associados a Venenos” (*Venom Associated Molecular Patterns*- VAMPs), referindo-se assim, a proteínas presentes no veneno que, quando introduzidos no hospedeiro, são reconhecidos por PRRs resultando em inflamação.

Com relação à ativação da imunidade inata por venenos animais, a literatura descreve a capacidade de venenos que apresentam composições distintas de induzir tanto a resposta inata com inflamação aguda como a imunidade adaptativa (Müller, 2010; León *et al.*, 2011). No entanto, os mecanismos moleculares pelo qual o sistema imune inato detecta os componentes dos venenos e inicia a resposta inflamatória permanecem em estudo.

PALM e colaboradores (2013) mostraram que a melitina, um peptídeo catiônico isolado do veneno de abelha *Apis mellifera*, é capaz de ativar o inflamassoma *in vivo* e *in vitro*. Além disso, mostraram que a caspase-1 é dispensável para a resposta alérgica ao veneno de abelha, no entanto é essencial para o recrutamento dos neutrófilos para o local do envenenamento. Os estudos *in vivo* permitiram verificar que a resposta inflamatória dependente de caspase-1 é capaz de proteger os camundongos contra os efeitos patológicos do envenenamento (Palm e Medzhitov, 2013).

Recentemente, Zoccal e colaboradores (2016) demonstraram que a inoculação intraperitoneal do veneno de escorpião *T. serrulatus* (Tsv) em camundongos induz a ativação do inflamassoma NLRP3, resultando na produção de IL-1 β , LTB₄ e PGE₂, edema pulmonar, recrutamento de neutrófilos. Além disso, evidenciaram que a ativação do NLRP3 influencia a mortalidade dos animais. Os resultados mostraram

ainda, que um mecanismo mediado por cAMP é responsável pelo edema pulmonar e a mortalidade dos animais tem relação com a IL-1 β e eicosanoides. Neste mecanismo de ação de eicosanoides, os autores verificaram que o balanço entre a ativação das vias das lipoxigenase 5 e cicloxigenase 1 e 2 parece determinar a gravidade do envenenamento (Zoccal *et al.*, 2016). Assim sendo, fica evidente que venenos de animais peçonhentos induzem potente atividade inflamatória, cuja indução pode ser mediada pela ativação de inflamassoma nas células imunes locais.

Em vista destes estudos e nossos resultados mostrando cinéticas de migração celular e padrão de regeneração muscular distintos em resposta à JAR e BthTX-I, podemos sugerir que estas observações possam ser resultantes do tipo de reconhecimento/interação dessas toxinas pelas células inatas.

1.6. Ativação do Inflamassoma

Em 2002, Tschopp e colaboradores atribuíram o termo inflamassoma para descrever um complexo de alto peso molecular presente no citosol de células imunes estimuladas que, quando acionados resultam na ativação de caspases inflamatórias (Martinon *et al.*, 2002). Trabalhos subsequentes foram essenciais para mostrar a complexidade desta plataforma e, assim identificar diferentes inflamassomas, tendo como principal diferencial o domínio de reconhecimento de padrão (*Pattern Recognition Receptor*- PRR) de patógenos (PAMPs) ou sinais endógenos de perigo no citosol da célula (DAMPs) (Akira *et al.*, 2006; Meylan *et al.*, 2006; Ting *et al.*, 2008).

Os complexos inflamassomas são predominantemente formados por 3 componentes, o primeiro é uma proteína iniciadora que pode ser pertencente à família de PRRs, como por exemplo um sensor citosólico da família NOD-LRR (*Nucleotide binding oligomerization domain- Leucin rich repeats* – NLRs), ou à família de sensores do tipo PYHIN (*pyrin e HIN domain containing protein*); o segundo componente pertencente ao inflamassoma é a molécula adaptadora ASC que consiste de dois domínios de morte: pirina (*Pyrin Domain*-PYD) e recrutador de caspase (*Caspase Activating and Recruitment Domain*-CARD) e o terceiro componente são as moléculas efetoras pró-caspase 1 ou pró-caspase-11 (Bortoluci e Medzhitov, 2010).

A maioria dos NLRs contém 3 domínios: C-terminal contendo uma sequência rica em leucinas (LRR), responsável pelo reconhecimento dos ligantes; domínio central do tipo NOD ou NBD crucial para a oligomerização da proteína e uma porção N-terminal que é responsável pela especificidade das suas interações moleculares e pelas funções efetoras. Este último domínio pode ser variável, o que classifica essas moléculas em NLRA (NLRs *containing the acidic transactivation domain* CIITA), NLRBs (NLRs *containing the baculovirus inhibitory BIR domain*), NLRCs (NLRs *containing the CARD domain*) e NLRPs (NLRs *containing the pyrin PYD domain*) (Bortoluci e Medzhitov, 2010).

Três membros da família NLR têm sido bem caracterizados/descritos e podem formar inflamassomas: NLRP1 (também chamado NALP1), capaz de reconhecer a toxina letal anthrax, NLRP3 (também conhecido como NALP3) que reconhece vários peptídeos de origem microbiana, RNA bacteriano, RNA dupla fita presente em vírus, ácido úrico e efluxo celular de potássio, PAMPs e DAMPs; e NLRC4 (ou IPAF) que responde à flagelina de bactérias como *S. typhimurium* e *L.pneumophila* (Bortoluci e Medzhitov, 2010).

O AIM2 (*Absent in Melanoma 2*) é um inflamassoma da família PYHIN que responde a presença citosólica de DNA do próprio hospedeiro ou exógeno durante infecções bacterianas ou virais (Broz e Dixit, 2016). Essas proteínas permanecem em estado quiescente em condições fisiológicas, devido ao arranjo conformacional do domínio LRR. Após ativação, os receptores recrutam a proteína adaptadora ASC através de interações homotípicas PYD-PYD (NLRP3) ou CARD-CARD (NLRP1B e NLRC4). O domínio CARD da molécula ASC é necessário para recrutar pró-caspase 1 para o complexo, embora os receptores NLRP1B e NLRC4 possam também recrutar diretamente a pró-caspase 1. Após a sua ativação, a caspase 1 processa a pró-IL- β e pró-IL-18 às suas formas maduras e cliva a gasdermina D. Há evidências que o fragmento N-terminal da gasdermina D está envolvida na indução da piroptose, assim como a liberação de IL-1 β e IL-18 maduras pela célula (Kayagaki *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2015); (Broz e Dixit, 2016). A piroptose é um tipo de morte celular que é iniciada pelas caspases 1 e 11 (em camundongos) que progride para a formação de poros na membrana plasmática resultando em morte celular (Broz e Dixit, 2016). Diferentemente da apoptose, a piroptose é caracterizada pelo inchaço celular, lise e liberação do conteúdo citoplasmático, presumivelmente como resultado da formação de poros na membrana (Fink e Cookson, 2005). Há

evidências de que seja nesse processo de liberação do conteúdo citoplasmático que citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-18, IL-33 sejam também liberadas e possam atuar na resposta inflamatória (Keller *et al.*, 2008).

A produção de IL-1 β e indução de piroptose mediadas pela ativação de caspase-1, conforme acima citado, é chamada de via canônica de ativação de inflamassoma. No entanto, está descrita a via não canônica do inflamassoma, que é iniciada pela ativação da caspase 11 ou 8 (4 ou 5 no humano) que promove a piroptose como observado com a caspase-1. No entanto, estas caspases não estão envolvidas na clivagem da pró-IL-1 β ou pró-IL-18. O inflamassoma não-canônico é estimulado em infecções por bactérias Gram-negativas, mas não Gram-positivas, e sinalização via IFN do tipo I (revisado por Broz & Dixit, 2016).

Figura 4- Principais tipos de inflamassoma.

(A) NLRP1B, responde a *Bacillus anthracis* e infecção por *Toxoplasma gondii*. **(B)** NLRP 3, mostrando que o efluxo de potássio é um evento comum que está associado a uma diversidade de estímulos. **(C)** NLRC4 funcionam como receptores diretos para a flagelina bacteriana e as subunidades de agulha e haste do sistema de secreção tipo 3 (T3SS). **(D)** AIM2 detecta DNA de fita dupla do hospedeiro ou microbiano no citosol (adaptado de Broz e Dixit, 2016).

Como mencionado, a ativação e a formação do inflamassoma pode ser mediada por inúmeros ligantes endógenos e exógenos induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Davis *et al.*, 2011; Strowig *et al.*, 2012). Estas citocinas atuam no recrutamento de populações celulares para o sítio da infecção/inflamação, controle de infecção e reparo tecidual (Martinon e Tschopp, 2007; Franchi, Eigenbrod, *et al.*, 2009).

Neste contexto, experimentos realizados com camundongos deficientes em determinados genes que codificam moléculas associadas a esses complexos têm sido essenciais para determinar o papel deles na defesa do hospedeiro à diferentes patógenos e controle da resposta inflamatória. Assim sendo, esses estudos têm destacado a participação dos mecanismos efetores do inflamassoma, como a piroptose e a liberação de IL-1 β e IL-18 nestes processos. No entanto, também há evidências de uma correlação entre a ativação desregulada do inflamassoma e o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias, metabólicas e neurodegenerativas (Broz e Dixit, 2016). Esse conjunto de informações evidencia portanto, a complexidade destas plataformas protéicas, assim como sua possível participação nas respostas do sistema imune que são elicitadas.

1.7. Inflamassoma NLRP3 e seus mecanismos efetores

Dentre os inflamassomas descritos, o complexo NLRP3 é o melhor caracterizado. A ativação deste NLR, que leva ao recrutamento dos componentes ASC e caspase-1 (Martinon e Tschopp, 2007), pode ser resultante de estímulos diversos, como por exemplo: ATP extracelular, toxinas formadoras de poros (Mariathasan *et al.*, 2006), cristais de urato (Martinon *et al.*, 2006), amianto e sílica (Dostert *et al.*, 2008) e LPS (Mariathasan *et al.*, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007). No entanto, o mecanismo pelo qual NLRP3 detecta esta diversidade de sinais é desconhecido, uma vez que não estão estruturalmente relacionados (Franchi, Warner, *et al.*, 2009).

Muitos trabalhos demonstraram a correlação direta entre a ativação do NLRP3 com a indução de piroptose (Carson e Ribeiro, 1993; Baron *et al.*, 2015). No entanto, pouco se sabe sobre as características e mecanismos que regulam este tipo de morte celular e seu envolvimento na patogênese de doenças inflamatórias (Sato *et al.*, 2013).

A formação do inflamassoma NLRP3 requer dois sinais. O primeiro sinal irá ativar alguma via transcricional, como por exemplo, a do fator de transcrição *NF-κB* (*Nuclear Factor Kappa B*), o qual pode ser oriundo de moléculas microbianas e é necessária para a regulação positiva do próprio NLRP3 e a produção de citocinas alvo pelo inflamassoma, como a pró-IL-1β. O segundo sinal irá ativar a oligomerização direta pela ativação de pró-caspase 1, que pode ser fornecido pelos vários estímulos acima citados incluindo o ATP (Eltzschig *et al.*, 2012).

A ATP desempenha um papel amplamente reconhecido na defesa do hospedeiro, atuando como um DAMP, assim como diferentes moléculas que são normalmente sequestradas intracelularmente e liberadas após dano celular. Uma vez no espaço extracelular, DAMPs ativam o sistema imunológico por interação com receptores específicos. O P2X7R é unanimemente reconhecido como o principal sensor para o ATP durante a inflamação e um gatilho principal das fases iniciais da resposta imune, mediando a maturação e secreção de IL-1β (Ferrari *et al.*, 2006). Assim sendo, a ligação de ATP nos receptores P2X7 provoca a abertura de canais, depleção intracelular de potássio e oligomerização de NLRP3, seguida por oligomerização de ASC e finalmente a formação do inflamassoma NLRP3. Então, o inflamassoma induz auto-clivagem da pró-caspase-1 em sua forma ativa, que cliva a pró-IL-1 β em sua forma biologicamente ativa (IL-1β madura) (Tschopp e Schroder, 2010).

O ATP intracelular é liberado após o estresse celular e/ou ativação e sinalização purinérgica e tem sido demonstrada a sua capacidade de modular a inflamação e imunidade (Antonioli *et al.*, 2013); (Eltzschig *et al.*, 2012). No espaço extracelular, sob a ação de ectoenzimas o ATP é hidrolisado de um modo gradual para fosfato de adenosina (ADP), monofosfato de adenosina (AMP) e adenosina (Eltzschig *et al.*, 2012). Há relatos que essa adenosina derivada de ATP e sua subsequente sinalização através dos receptores P1 apresenta papel benéfico em algumas doenças. No entanto, tem sido observado que durante a lesão tecidual níveis elevados de adenosina promovem a cicatrização com fibrose em diferentes órgãos como; pulmões, fígado, pele e rim (Karmouty-Quintana *et al.*, 2013).

O receptor P2X7 (P2X7R) é expresso em todas as células imunes e inflamatórias e é regulada positivamente durante a inflamação. Células do eixo monócito / macrófago, incluindo células dendríticas, microglia e osteoclastos, são as linhagens de células imunes onde a atividade de P2X7 tem sido melhor

caracterizado, no entanto este receptor também é expresso por T e linfócitos B, mastócitos e células natural killer (Adinolfi *et al.*, 2018) .

No final dos anos 90, a clivagem de caspase -1 e maturação de IL-1 β foram primeiramente associadas ao efluxo de K⁺ dependente de ATP (Perregaux e Gabel, 1994; Ferrari *et al.*, 1997). Nas décadas seguintes, vários trabalhos demonstraram agregação do inflamassoma dependente de P2X7R quase em todos tipos de células do sistema imune (Englezou *et al.*, 2015). As citocinas pró-inflamatórias secretadas após a ativação de P2X7 incluem não apenas IL-1 β e IL-18, mas também IL-6 e IL-1 α , embora através de uma via independente de inflamassoma (Englezou *et al.*, 2015)

Baron e colaboradores (Baron *et al.*, 2015) mostraram, pela primeira vez, que a adenosina extracelular é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 de duas maneiras: interagindo com receptores de adenosina, quando em concentrações nano/micromolares ou através da captação celular por transportadores de nucleosídeos em situações de concentrações milimolares. Portanto, estas observações fornecem bases moleculares sobre os mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3 e perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para controlar a inflamação.

As citocinas da família IL-1 β , IL-18 e IL-33 desempenham importante papel na modulação da resposta imune adaptativa (Yoshimoto *et al.*, 2000; Dunne e O'Neill, 2003), IL-1 β e IL-18 são importantes citocinas que promovem a inflamação e coordenam a resposta imune inata e adaptativa (Dinarello, 2009). Ambas são liberadas de forma independente do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi, no entanto, ainda não é compreendido como a IL-1 β é liberada pela célula. Microvesículas, exossomos, autofagia e lisossomos têm sido propostos para explicar esse mecanismo de secreção da IL-1 β . Assim, a IL-1 β e IL-18 podem ser alarminas exclusivas que requerem a clivagem mediada por caspase-1 para se tornar biologicamente ativas. O processamento da IL-1 β pode ser dependente da caspase-1 via ativação do inflamassoma, como já mencionado (Martinon *et al.*, 2009) e independente desta protease, via serino-proteases derivadas de neutrófilos ou proteases libertadas pelos microrganismos invasores (Dinarello *et al.*, 1982). Portanto, a secreção de IL-1 β pelos neutrófilos, por exemplo é independente de piroptose (Chen *et al.*, 2014). A IL-1 β induz a expressão das enzimas COX-1 e iNOS

com a produção de mediadores lipídicos e NO causando vasodilatação e ativação de linfócitos T e macrófagos (Arend *et al.*, 2008).

IL-18 é um fator indutor da produção de IFN- γ por macrófagos estimulados por microorganismos ou produtos bacterianos e, portanto esta citocina é considerada o elo da imunidade natural e adaptativa (Martinon *et al.*, 2009).

IL-1 α também é considerada como uma citocina inflamatória atuando como uma alarmina, porém em contraste com a IL-1 β pouco se sabe sobre mecanismos que precedem a sua secreção. No entanto, foi mostrado que agonistas que ativam o inflamassoma NLRP3, tais como o cristal de ácido úrico ou a nigericina induzem clivagem e secreção de IL-1 α . Dependendo do tipo de agonista de NLRP3, a liberação de IL-1 α é inflamassoma NLRP3 /caspase-1 dependente ou independente, mas em ambos os casos o processamento de IL-1 α depende da atividade da protease calpaína, uma cisteína protease ativada pelo cálcio associada à membrana plasmática, que é responsável pela clivagem do precursor da IL-1 α em uma molécula madura (Yazdi *et al.*, 2010).

A IL-33 é produzida como precursor proteico inativo que, quando clivado pela caspase-1, resulta na forma ativa da molécula. Esta citocina foi inicialmente identificada como proteína nuclear (*nuclear factor*) associada à célula endotelial especializada (HEVs) e com localização subcelular semelhante ao precursor IL-1 α . IL-33 se liga ao receptor da família T1/ST2 estimulando mastócitos e os linfócitos a produzir citocinas com perfil Th2 (Arend *et al.*, 2008).

A piroptose é, portanto uma morte celular induzida dependente da ativação de inflamassoma e caspase-1 com fragmentação do DNA e condensação nuclear como na apoptose, entretanto tem como principal característica a secreção de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-18, IL-33 envolvidas na resposta inflamatória (Keller *et al.*, 2008).

Lima-Junior e colaboradores (Lima-Junior *et al.*, 2013) mostraram que a resistência à infecção por *Leishmania* envolve a ativação NLRP3 com consequente secreção de IL-1 β seguida de produção de óxido nítrico (NO).

Estudo realizado por EISENBARTH e colaboradores permitiu demonstrar que o adjuvante hidróxido de alumínio (Alum) ativa NLRP3 resultando na secreção de IL-1 e aumenta a resposta imune adaptativa. Esses autores sugerem, portanto que a atividade adjuvante do hidróxido de alumínio está correlacionada com sua capacidade de ativar NLRP3 (Eisenbarth *et al.*, 2008).

Com relação ainda, à produção de IL-1 β , IL-18 e piroptose, He e colaboradores (He *et al.*, 2015) mostraram que a gasdermina D (GSDMD) participa do complexo inflamassoma e é requerida para piroptose e pode participar da secreção de IL-1 β , porém não é essencial para o processamento desta citocina. Neste sentido, os autores mostraram que GSDMD é recrutada pelo NLRP3 com a mesma cinética da caspase-1 após as células serem primadas com LPS e incubadas com nigericina.

Os trabalhos relatados acima revelam, portanto, que os inflamassomas estão envolvidos no reconhecimento de diferentes estímulos como os patógenos, danos teciduais/celulares ou moléculas com diferentes atividades biológicas e consequente geração de resposta inflamatória. No entanto, os mecanismos envolvidos na ativação dos inflamassomas e efeitos resultantes na geração da resposta imune ainda não estão completamente elucidados. Portanto, essas observações fundamentam os estudos voltados para o esclarecimento desse processo de ativação de inflamassoma em resposta à diferentes estímulos, como componentes de venenos de serpentes, e geração da resposta inflamatória.

Em se tratando de envenenamentos ofídicos, o entendimento dos mecanismos que medeiam a reação local inflamatória pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o tratamento destes acidentes.

CONCLUSÃO

Com os dados obtidos neste projeto, podemos sugerir que:

- ✓ BthTX-I e JAR induziram *in vivo* a migração de neutrófilos e macrófagos em camundongos WT e que a ausência da caspase 1/11 e NLRP3 interferiram nesse processo;
- ✓ BthTX-I induz a secreção de IL-1 β nos macrófagos peritoneais murinos, bem como a ativação de caspase-1;
- ✓ BthTX-I promove a produção de IL-1 β em culturas de monócitos/macrófagos humanos;
- ✓ O inflamassoma NLRP 3 está envolvido na produção de IL-1 β induzida pela BthTX-I e efluxo de K⁺ participa desse processo;
- ✓ A JAR, nas concentrações estudadas, não induz a produção de IL-1 β por macrófagos peritoneais;
- ✓ BthTX-I foi capaz de induzir atividade miotóxica em células C2C12, evidenciada pela indução de CK, LDH e análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ BthTX-I promoveu a liberação de IL-6 e MCP-1, enquanto JAR induziu a produção de MCP-1 pelas células C2C12;
- ✓ JAR induz a produção de MCP-1 por miotubos C2C12, porém exerce efeito proteolítico sobre essa quimiocina de maneira dependente da dose e tempo;
- ✓ BthTX-I é capaz de induzir a liberação de ATP em células C2C12 ;
- ✓ A ação da BthTX-I sobre miotubos promove a ativação de inflamassoma em macrófagos;
- ✓ Ambas as toxinas não induzem a produção de óxido nítrico (NO) em culturas de células C2C12;
- ✓ O receptor CCR2 é essencial para migração de macrófagos no foco inflamatório induzido por BthTX-I.

Figura 27 – Modelo proposto de ativação do inflamassoma NLRP3 por BthTX-I.

Um modelo esquemático para a ativação do inflamassoma NLRP3 em resposta a BthTX-I. A ativação de NLRP3 levando à secreção de IL-1 β é desencadeada por vários estímulos. Diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) e ou padrões moleculares associados ao dano (DAMP) estimulam duas etapas que ativam o inflamassoma NLRP3. Em nosso modelo, propomos a ativação do sinal 1 pelo *priming* com LPS, que leva à expressão do gene pró-IL-1 β e à produção da proteína pró-IL-1 β através da via de sinalização do receptor *Toll-like* (TLR) -MyD88- NF- κ B. O sinal 2 é fornecido pela toxina BthTX-I e é um passo crítico na ativação do inflamassoma. Estes sinais ou agonistas desencadeiam a montagem de um complexo macromolecular através do recrutamento de ASC e pró-caspase-1 a NLRP3. Em nosso modelo, a BthTX-I via sua ação miotóxica nas células musculares, induz a liberação de DAMPs, como por exemplo o ATP, resultando na ativação autócrina do receptor P2X7, seguido pela liberação de efluxo de K⁺. As múltiplas vias ativam o inflamassoma NLRP3, desencadeando a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β . (Adaptado de (Yang *et al.*, 2012).

ADINOLFI, E. et al. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. **Biochem Pharmacol**, v. 151, p. 234-244, May 2018.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 2006.

ANTONIOLI, L. et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends Mol Med**, v. 19, n. 6, p. 355-67, Jun 2013.

ARCE, V.; BRENES, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. **Int J Exp Pathol**, v. 72, n. 2, p. 211-26, Apr 1991.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunol Rev**, v. 223, p. 20-38, Jun 2008.

ARNOLD, L. et al. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **J Exp Med**, v. 204, n. 5, p. 1057-69, May 2007.

BAGBY, G. C. et al. Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. **J Clin Invest**, v. 78, n. 5, p. 1316-23, Nov 1986.

BALDO, C. et al. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 6, p. e727, 2010.

_____. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 54-65, Jan 2008.

BARON, L. et al. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1629, Feb 2015.

BAUERNFEIND, F. G. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **J Immunol**, v. 183, n. 2, p. 787-91, Jul 2009.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 889-96, Oct 2010.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol Ther**, v. 62, n. 3, p. 325-72, 1994.

BORTOLUCI, K. R.; MEDZHITOV, R. Control of infection by pyroptosis and autophagy: role of TLR and NLR. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 10, p. 1643-51, May 2010.

BROUGH, D.; ROTHWELL, N. J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 β is cytosolic and precedes cell death. **J Cell Sci**, v. 120, n. Pt 5, p. 772-81, Mar 2007.

BROZ, P.; DIXIT, V. M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 7, p. 407-20, Jul 2016.

BUSTILLO, S. et al. Synergism between baltergin metalloproteinase and Ba SPII RP4 PLA2 from Bothrops alternatus venom on skeletal muscle (C2C12) cells. **Toxicon**, v. 59, n. 2, p. 338-43, Feb 2012.

CARDOSO, J. L. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (Bothrops jararaca) in São Paulo, Brazil. **Q J Med**, v. 86, n. 5, p. 315-25, May 1993.

CARSON, D. A.; RIBEIRO, J. M. Apoptosis and disease. **Lancet**, v. 341, n. 8855, p. 1251-4, May 1993.

CASAIS-E-SILVA, L. L. et al. Lemnitoxin, the major component of Micrurus lemniscatus coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. **Toxicol Lett**, v. 257, p. 60-71, Aug 2016.

CHEN, K. W. et al. The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 β maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge. **Cell Rep**, v. 8, n. 2, p. 570-82, Jul 2014.

CHOI, J. et al. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 20, p. 7988-92, Oct 1990.

CHUMAN, Y. et al. Regional and accelerated molecular evolution in group I snake venom gland phospholipase A2 isozymes. **Toxicon**, v. 38, n. 3, p. 449-62, Mar 2000.

CICILIOT, S.; SCHIAFFINO, S. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 8, p. 906-14, 2010.

CINTRA, A. C. et al. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. **J Protein Chem**, v. 12, n. 1, p. 57-64, Feb 1993.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 10, p. 1718-28, May 2009.

CLISSA, P. B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567-73, Oct 2001.

_____. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 591-6, Apr 2006.

COSTA, E. P. et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, n. 1, p. 13-7, Feb 2002.

CRESCENZI, M. et al. MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 21, p. 8442-6, Nov 1990.

CUNHA, L. D. et al. AIM2 Engages Active but Unprocessed Caspase-1 to Induce Noncanonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Rep**, v. 20, n. 4, p. 794-805, Jul 2017.

DAVIS, B. K.; WEN, H.; TING, J. P. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 707-35, 2011.

DE CASTRO, R. C. et al. Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. **Toxicon**, v. 38, n. 12, p. 1773-85, Dec 2000.

DE OLIVEIRA, R. B.; RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. [Risk factors associated with coagulation abnormalities in Bothrops envenoming]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 6, p. 657-63, 2003 Nov-Dec 2003.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun 2009.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 519-50, 2009.

DINARELLO, C. A.; BENDTZEN, K.; WOLFF, S. M. Studies on the active site of human leukocytic pyrogen. **Inflammation**, v. 6, n. 1, p. 63-78, Mar 1982.

DINARELLO, C. A. et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. **J Immunol**, v. 139, n. 6, p. 1902-10, Sep 1987.

DIXON, R. W.; HARRIS, J. B. Myotoxic activity of the toxic phospholipase, notexin, from the venom of the Australian tiger snake. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 55, n. 12, p. 1230-7, Dec 1996.

DOIN-SILVA, R. et al. The ability of low level laser therapy to prevent muscle tissue damage induced by snake venom. **Photochem Photobiol**, v. 85, n. 1, p. 63-9, 2009 Jan-Feb 2009.

DOSTERT, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674-7, May 2008.

DUCHEN, L. W. et al. Changes in motor end-plates resulting from muscle fibre necrosis and regeneration. A light and electron microscopic study of the effects of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. **J Neurol Sci**, v. 21, n. 4, p. 391-417, Apr 1974.

DUNNE, A.; O'NEILL, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. **Sci STKE**, v. 2003, n. 171, p. re3, Feb 2003.

EISENBARTH, S. C. et al. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1122-6, Jun 2008.

ELTZSCHIG, H. K.; SITKOVSKY, M. V.; ROBSON, S. C. Purinergic signaling during inflammation. **N Engl J Med**, v. 367, n. 24, p. 2322-33, Dec 2012.

ENGLEZOU, P. C. et al. P2X7R activation drives distinct IL-1 responses in dendritic cells compared to macrophages. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 293-304, Aug 2015.

ESCALANTE, T. et al. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. **J Proteome Res**, v. 8, n. 11, p. 5120-31, Nov 2009.

FERRARI, D. et al. Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. **J Exp Med**, v. 185, n. 3, p. 579-82, Feb 1997.

_____. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. **J Immunol**, v. 176, n. 7, p. 3877-83, Apr 2006.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 4, p. 1907-16, Apr 2005.

_____. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 11, p. 1812-25, Nov 2006.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-85, Jun 2005.

_____. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J**, v. 275, n. 12, p. 3016-30, Jun 2008.

FRANCHI, L. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nat Immunol**, v. 10, n. 3, p. 241-7, Mar 2009.

_____. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 106-28, Jan 2009.

GALLAGHER, P. et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: in vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Arch Biochem Biophys**, v. 441, n. 1, p. 1-15, Sep 2005.

GAMBERO, A. et al. Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans. **Biochem Pharmacol**, v. 63, n. 1, p. 65-72, Jan 2002.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, Jul 2003.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, May 2010.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, Dec 2005.

GROUND, M. D. Towards understanding skeletal muscle regeneration. **Pathol Res Pract**, v. 187, n. 1, p. 1-22, Jan 1991.

GURCEL, L. et al. Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1135-45, Sep 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by Bothrops asper snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 976-87, Dec 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothrospoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake Bothrops jararacussu. **Exp Mol Pathol**, v. 55, n. 3, p. 217-29, Dec 1991.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 115-28, 1984a.

_____. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp Mol Pathol**, v. 40, n. 3, p. 367-79, Jun 1984b.

_____. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). **Toxicon**, v. 22, n. 5, p. 719-31, 1984c.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-50, 2000 Sep-Oct 2000.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Tissue pathology induced by snake venoms: how to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 166-70, Jan 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med**, v. 3, n. 6, p. e150, Jun 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. e2162, 2013.

_____. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1223-35, Dec 2010.

HANSEN, J. M. et al. A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: implications for regeneration in aged muscle. **Cell Biol Int**, v. 31, n. 6, p. 546-53, Jun 2007.

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 933-45, Dec 2003.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol (1985)**, v. 91, n. 2, p. 534-51, Aug 2001.

HE, W. T. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. **Cell Res**, v. 25, n. 12, p. 1285-98, Dec 2015.

HELUANY, N. F. et al. Effects induced by bothropstoxin, a component from Bothrops jararacussu snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1203-10, Oct 1992.

HODGETTS, S. et al. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNF α function with Etanercept in mdx mice. **Neuromuscul Disord**, v. 16, n. 9-10, p. 591-602, Oct 2006.

HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1149-55, Oct 1996.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of Bothrops jararacussu snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615-27, 1988.

HORNUNG, V.; LATZ, E. Critical functions of priming and lysosomal damage for NLRP3 activation. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 620-3, Mar 2010.

IP, W. K.; WONG, C. K.; LAM, C. W. Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 1, p. 162-72, Jul 2006.

JIA, T.; PAMER, E. G. Immunology. Dispensable but not irrelevant. **Science**, v. 325, n. 5940, p. 549-50, Jul 2009.

JOHNSON, E. K.; OWNBY, C. L. The role of extracellular ions in the pathogenesis of myonecrosis induced by a myotoxin isolated from Broad-Banded copperhead (Agkistrodon contortrix laticinctus) venom. **Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 107, n. 3, p. 359-66, Mar 1994.

JUNG, S. et al. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 11, p. 4106-14, Jun 2000.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. E. L.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v. 299, n. 1-2, p. 279-91, Oct 2002.

KAMIGUTI, A. S. et al. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Lett**, v. 549, n. 1-3, p. 129-34, Aug 2003.

_____. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, n. 6, p. 627-42, Jun 1996.

_____. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb Haemost**, v. 72, n. 2, p. 244-9, Aug 1994.

_____. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 29, n. 9, p. 1097-105, 1991.

KANASHIRO, M. M. et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A(2) from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem Pharmacol**, v. 64, n. 7, p. 1179-86, Oct 2002.

KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M.; NÚÑEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 549-59, Oct 2007.

KARMOUTY-QUINTANA, H.; XIA, Y.; BLACKBURN, M. R. Adenosine signaling during acute and chronic disease states. **J Mol Med (Berl)**, v. 91, n. 2, p. 173-81, Feb 2013.

KASSAR-DUCHOSSOY, L. et al. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 466-71, Sep 2004.

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666-71, Oct 2015.

KELLER, M. et al. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. **Cell**, v. 132, n. 5, p. 818-31, Mar 2008.

KNITTEL, P. S. et al. Characterising the enzymatic profile of crude tentacle extracts from the South Atlantic jellyfish *Olindias sambaquiensis* (Cnidaria: Hydrozoa). **Toxicon**, v. 119, p. 1-7, Sep 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LAING, G. D. et al. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 12, p. 3458-63, Dec 2003.

LANDUCCI, E. C. et al. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A2 homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur J Pharmacol**, v. 343, n. 2-3, p. 257-63, Feb 1998.

LEÓN, G. et al. Immune response towards snake venoms. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 381-98, Oct 2011.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-15, Jul 2013.

LIU, T. et al. Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response. **Cell Rep**, v. 8, n. 4, p. 974-82, Aug 2014.

LOMONTE, B.; ANGULO, 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, Dec 2003.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A(2) to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 520-30, Sep 2012.

LOPES, D. S. et al. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from Bothrops neuwiedi venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 42-9, Jul 2009.

MAHDAVIAN DELAVARY, B. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753-62, Jul 2011.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol**, v. 146, n. 1, p. 3-15, Jan 1995.

MAJNO, G.; LA GATTUTA, M.; THOMPSON, T. E. Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver. **Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med**, v. 333, p. 421-65, 1960.

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**, v. 25, n. 12, p. 677-86, Dec 2004.

_____. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol**, v. 23, n. 11, p. 549-55, Nov 2002.

MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228-32, Mar 2006.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-800, Dec 1998.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 599-607, Nov 2005.

MARTINELLO, T. et al. Extracellular ATP signaling during differentiation of C2C12 skeletal muscle cells: role in proliferation. **Mol Cell Biochem**, v. 351, n. 1-2, p. 183-96, May 2011.

MARTINEZ-POMARES, L. et al. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 5, p. 604-13, May 2003.

MARTINON, F. et al. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. **Curr Biol**, v. 14, n. 21, p. 1929-34, Nov 2004.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 229-65, 2009.

MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237-41, Mar 2006.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 1, p. 10-22, Jan 2007.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol**, v. 46, p. 153-85, 1995.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, Nov 2001.

MEGENEY, L. A.; RUDNICKI, M. A. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. **Biochem Cell Biol**, v. 73, n. 9-10, p. 723-32, 1995 Sep-Oct 1995.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39-44, Jul 2006.

MILANI JÚNIOR, R. et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. **QJM**, v. 90, n. 5, p. 323-34, May 1997.

MOHAMMED, F. F.; SMOOKLER, D. S.; KHOKHA, R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 62 Suppl 2, p. ii43-7, Nov 2003.

MONTEIRO-MACHADO, M. et al. Occurrence of sulfated fucose branches in fucosylated chondroitin sulfate are essential for the polysaccharide effect preventing muscle damage induced by toxins and crude venom from *Bothrops jararacussu* snake. **Toxicon**, v. 98, p. 20-33, May 2015.

MORA, R. et al. A Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 651-60, Apr 2005.

MORANDINI, A. C. et al. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae dampen P2X7-dependent interleukin-1 β secretion. **J Innate Immun**, v. 6, n. 6, p. 831-45, 2014.

MOREIRA-SOUZA, A. C. A. et al. The P2X7 Receptor Mediates. **Front Immunol**, v. 8, p. 1257, 2017.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BALDO, C. Jararhagin, a hemorrhagic snake venom metalloproteinase from Bothrops jararaca. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 280-9, Sep 2012.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch Biochem Biophys**, v. 409, n. 2, p. 395-401, Jan 2003.

_____. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 713-23, 1991.

_____. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 484-92, Mar 2008.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. **J Mol Evol**, v. 43, n. 3, p. 263-9, Sep 1996.

MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14-20, Jul 2014.

MÜLLER, U. R. Insect venoms. **Chem Immunol Allergy**, v. 95, p. 141-56, 2010.

NAMIKI, M. et al. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 1, p. 115-20, Jan 2002.

NISHIMURA, M. et al. Effects of dimethyl sulfoxide and dexamethasone on mRNA expression of housekeeping genes in cultures of C2C12 myotubes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 367, n. 3, p. 603-8, Mar 2008.

OLIVEIRA, J. S. et al. Local and hematological alterations induced by Philodryas olfersii snake venom in mice. **Toxicon**, v. 132, p. 9-17, Jun 2017.

OTERO, R. et al. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-114, Aug 2002.

OWNBY, C. L. et al. Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle in vivo. **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 67-80, Jan 1997.

PAINE, M. J. et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J Biol Chem**, v. 267, n. 32, p. 22869-76, Nov 1992.

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Role of the inflammasome in defense against venoms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 5, p. 1809-14, Jan 2013.

PERREGAUX, D.; GABEL, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. **J Biol Chem**, v. 269, n. 21, p. 15195-203, May 1994.

QUEIROZ, L. S. et al. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 22, n. 3, p. 339-46, 1984.

RANGEL, J. et al. Membrane cholesterol modulates the cytolytic mechanism of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of *Bothrops asper*. **Cell Biochem Funct**, v. 29, n. 5, p. 365-70, Jul 2011.

RANGEL-SANTOS, A. et al. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-10, Jun 2004.

RANTANEN, J. et al. Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after experimental muscle injury. **Am J Sports Med**, v. 27, n. 1, p. 54-9, 1999 Jan-Feb 1999.

RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S. et al. Up regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in anti-citrulline antibody and immunoglobulin M rheumatoid factor positive subjects precedes onset of inflammatory response and development of overt rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 66, n. 1, p. 121-3, Jan 2007.

RAYAMAJHI, M.; ZHANG, Y.; MIAO, E. A. Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. **Methods Mol Biol**, v. 1040, p. 85-90, 2013.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. [Bites by snakes in the genus Bothrops: a series of 3,139 cases]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 30, n. 6, p. 475-80, 1997 Nov-Dec 1997.

ROCK, K. L.; LAI, J. J.; KONO, H. Innate and adaptive immune responses to cell death. **Immunol Rev**, v. 243, n. 1, p. 191-205, Sep 2011.

RODRIGUES-SIMIONI, L.; BORGESE, N.; CECCARELLI, B. The effects of Bothrops jararacussu venom and its components on frog nerve-muscle preparation. **Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 475-89, Oct 1983.

RODRIGUES-SIMIONI, L. et al. No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca²⁺ stores in the muscular effects of bothropstoxin, a Lys49 phospholipase A2 myotoxin. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1479-89, Nov 1995.

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake Bothrops asper. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 2, p. 121-8, Apr 2002.

_____. Viperid Envenomation Wound Exudate Contributes to Increased Vascular Permeability via a DAMPs/TLR-4 Mediated Pathway. **Toxins (Basel)**, v. 8, n. 12, 11 2016.

SACLIER, M. et al. Monocyte/macrophage interactions with myogenic precursor cells during skeletal muscle regeneration. **FEBS J**, v. 280, n. 17, p. 4118-30, Sep 2013.

SAKURAI-YAMASHITA, Y. et al. Expression of MCP-1 in the hippocampus of SHRSP with ischemia-related delayed neuronal death. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, n. 4-6, p. 823-31, 2006 Jul-Aug 2006.

SALVINI, T. F. et al. Regeneration and change of muscle fiber types after injury induced by a hemorrhagic fraction isolated from Agkistrodon contortrix laticinctus venom. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 641-9, May 2001.

SASSOON, D. et al. Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. **Nature**, v. 341, n. 6240, p. 303-7, Sep 1989.

SATOH, T.; KAMBE, N.; MATSUE, H. NLRP3 activation induces ASC-dependent programmed necrotic cell death, which leads to neutrophilic inflammation. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e644, May 2013.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 191-5, Jul 2002.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-59, Nov 2006.

SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C.; SANDRI, M. The role of autophagy in neonatal tissues: just a response to amino acid starvation? **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 727-30, Jul 2008.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 101-37, 2007.

SHI, H. P. et al. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Surgery**, v. 128, n. 2, p. 374-8, Aug 2000.

SHI, J. et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 660-5, Oct 2015.

SHIRASAKI, Y. et al. Real-time single-cell imaging of protein secretion. **Sci Rep**, v. 4, p. 4736, 2014.

SILVEIRA, T. N.; ZAMBONI, D. S. Pore formation triggered by Legionella spp. is an Nlr4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. **Infect Immun**, v. 78, n. 3, p. 1403-13, Mar 2010.

SOARES, A. M. et al. Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in Bothrops moojeni venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 2, p. 258-70, Feb 2004.

STROWIG, T. et al. Inflammasomes in health and disease. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 278-86, Jan 2012.

TEIXEIRA, C. F. et al. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with Bothrops jararaca snake venom. **Int J Exp Pathol**, v. 86, n. 2, p. 107-15, Apr 2005.

TIDBALL, J. G.; VILLALTA, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1173-87, May 2010.

TING, J. P.; WILLINGHAM, S. B.; BERGSTRALH, D. T. NLRs at the intersection of cell death and immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 5, p. 372-9, May 2008.

TSCHOPP, J.; SCHRODER, K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 210-5, Mar 2010.

VILLALOBOS, J. C. et al. Cytotoxicity induced in myotubes by a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops asper*: evidence of rapid plasma membrane damage and a dual role for extracellular calcium. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1382-9, Dec 2007.

VINCE, J. E.; SILKE, J. The intersection of cell death and inflammasome activation. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 11-12, p. 2349-67, Jun 2016.

WARREN, G. L. et al. Chemokine receptor CCR2 involvement in skeletal muscle regeneration. **FASEB J**, v. 19, n. 3, p. 413-5, Mar 2005.

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

WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445-55, Apr 2013.

YABLONKA-REUVENI, Z. et al. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. **J Anim Sci**, v. 86, n. 14 Suppl, p. E207-16, Apr 2008.

YANG, C. S.; SHIN, D. M.; JO, E. K. The Role of NLR-related Protein 3 Inflammasome in Host Defense and Inflammatory Diseases. **Int Neurol J**, v. 16, n. 1, p. 2-12, Mar 2012.

YARON, J. R. et al. K(+) regulates Ca(2+) to drive inflammasome signaling: dynamic visualization of ion flux in live cells. **Cell Death Dis**, v. 6, p. e1954, 2015.

YAZDI, A. S. et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 45, p. 19449-54, Nov 2010.

YONA, S.; JUNG, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. **Curr Opin Hematol**, v. 17, n. 1, p. 53-9, Jan 2010.

YOSHIMOTO, T. et al. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. **Nat Immunol**, v. 1, n. 2, p. 132-7, Aug 2000.

ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB₄ and PGE₂ in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nat Commun**, v. 7, p. 10760, 2016.

ZUCKMAN, D. M.; HUNG, J. B.; ROY, C. R. Pore-forming activity is not sufficient for *Legionella pneumophila* phagosome trafficking and intracellular growth. **Mol Microbiol**, v. 32, n. 5, p. 990-1001, Jun 1999.