VANESSA MOREIRA

**Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A₂,
isoladas do veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus
durissus terrificus*, e dos respectivos venenos,
sobre a expressão de ciclooxigenases e produção
de prostaglandinas**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
Obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Farmacologia).**

São Paulo

2007

VANESSA MOREIRA

**Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A_2 ,
isoladas do veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus
durissus terrificus*, e dos respectivos venenos,
sobre a expressão de ciclooxygenases e produção de
prostaglandinas**

**Tese (Doutorado) apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para Obtenção do Título de Doutor em
Ciências (Farmacologia).**

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Dra. Catarina F. P. Teixeira

São Paulo

2007

Trabalho realizado na Unidade de Inflamação
do Laboratório de Farmacologia do Instituto
Butantan, com auxílio da Fundação de
Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP).

**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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 134 nas fls. 10 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Catarina F. P.Teixeira, Coordenadora da Linha de Pesquisa "**Farmacologia da Resposta inflamatória induzida por venenno e toxinas animais**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Vanessa Moreira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **17.02.2005**.

São Paulo, 18 de fevereiro de 2005.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 177/04, sobre o projeto intitulado "Estudo dos efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A₂ isoladas de venenos de *Bothrops asper* e de *Crotalus durissus terrificus* e dos venenos brutos, sobre a expressão de ciclooxigenases e formação de prostanóides", sob a responsabilidade de Vanessa Moreira está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **10/08/2004**.

São Paulo, 13 de agosto de 2004.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

*Agradeço a Deus pela vocação e
oportunidades concendidas...*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Antonio Carlos e Élia,

Pela compreensão de que eu tinha que seguir meu caminho, mesmo que isso implicasse na distância e ausência em muitos momentos. Reconheço que vocês compreenderam e torceram por mim e que esse trabalho representa para vocês um grande motivo de orgulho. Obrigada por tudo que fizeram por mim!

Amo vocês!

Ao meu esposo

Eduardo,

Este trabalho é um pouco seu. Tenho muito a agradecer, pois você foi muito companheiro, paciente, compreensivo, além da mão amiga e conselhos dados nos momentos difíceis desta jornada.

Você é o anjo que Deus colocou em minha vida.

Te amo muito!

Agora que finalizo esta etapa, compartilho minha enorme alegria e vitória e dedico este trabalho a vocês.

À minha orientadora

Catarina,

Quero dizer que admiro muito o seu profissionalismo, competência e rigor científico e o quanto tudo isso contribuiu para o meu crescimento e amadurecimento profissional.

Agradeço tudo o que fez por mim, em todos estes anos de convivência.

Agradeço a valiosa orientação, o incentivo, o carinho, as oportunidades, a preocupação, o apoio e a confiança em meu trabalho.

Muito obrigada!

Aos meus irmãos,

Marcelo e Alessandro,

E ao meu tio,

Ivo,

Em muitos momentos, durante esta jornada, eu não estava presente, porém vocês sempre compreendiam e apoiavam-me incondicionalmente.

Saibam que vocês representam em minha vida, os melhores exemplos de conhecimento, competência e dedicação!

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, agradeço muito:

Ao Prof. Dr. **José Maria Gutiérrez**, pela amizade e, também, pela doação do veneno de *Bothrops asper* e das miotoxinas utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. **Andreimar M. Soares**, pela disponibilidade e também pela doação da fosfolipase A₂ (CB2), utilizada neste estudo.

Às minhas companheiras **Rafaela e Pollyana** que colaboraram para a realização deste trabalho e também pela grande amizade que brotou durante esta jornada, cada uma no seu devido período. Acreditem, eu aprendi muito mais com vocês, do que vocês comigo. Muito obrigada!

Às amigas do Laboratório **Cristina, Renata, Neide, Sílvia, Paula e Juliana**, sempre presentes, nos momentos de alegria e dificuldade, pelo convívio e amizade, pela disponibilidade e colaboração.

Aos amigos do Laboratório **Marlos, Élbio, Sérgio, Márcio e Fábio**, que sempre de bom humor, proporcionaram um convívio tranquilo e amistoso e pelas intermináveis e proveitosas discussões científicas e outros “papos-cabeça”.

À Dra. **Stella Zamunér** por ter dado os primeiros passos neste trabalho, pelo apoio científico e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, **Antonio, Aparecida (Binha), Cleonice, Joana, Sônia, Wanda, Valério, Vilma e Zelma**, a quem tenho muito respeito, carinho e amizade. Sempre estiveram prontos para atender às minhas solicitações e a colaborar na realização deste trabalho.

Ao amigo **Jean**, pelas discussões científicas, apoio e grande amizade.

Às amigas do “andar de cima” **Ana, Thalma, Bianca, Paula, Juliana, Cíntia, Aline, Marcela e Geane** pela grande amizade, carinho e convívio sempre agradável, durante toda esta jornada.

Aos amigos da “Farmaco I” **Rafaela, Leonardo, Leandro, Camila, Sayuri, Elisângela, Milene, Mariana**, pelas agradáveis conversas, amizade e colaboração nas horas de necessidade.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica, do Instituto Butantan, **Linda, Paola, Simone e Janaína** e em especial à **Dra. Isabel**, pela gentileza, amizade e auxílio científico, nos momentos de necessidade.

Às minhas amigas **Jacqueline e Rosângela** e tantos outros que sempre torceram por mim e muitas vezes compreenderam a minha ausência.

Às minhas amigas da Toxicologia, da época do mestrado, **Michela, Nádia, Eliane, Cláudia, Simone, Patrícia e Isarita**, pela amizade duradoura. Vocês sempre torceram por mim e me apoiaram.

Ao **Dr. Adair**, pela amizade e pelas grandes dicas para a realização da técnica de *western blot*.

À Prof. **Dra. Beatriz R. Cordenuzzi** do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela amizade e por permitir a utilização do espectrofotômetro de microplaca, para as análises de dosagem de atividade enzimática de ciclooxygenases.

Ao Prof. **Dr. Franco M. Lajolo** do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por permitir a utilização do densitômetro, para as análises bandas protéicas obtidas na técnica de *western blot*.

Ao Prof. **Dr. Fernando S. Moreno** do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por permitir a utilização da câmara escura, para revelação das bandas protéicas obtidas na técnica de *western blot*.

À **Dra. Marina Assakura** do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, por permitir a utilização da câmara escura e revelador automático, para revelação das bandas protéicas obtidas na técnica de *western blot*.

À **Dra. Diva Denelle S. Morena** do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por permitir a utilização da câmara escura para revelação das bandas protéicas, obtidas na técnica de *western blot*.

À **Dra. Marilene Demasi** do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, por permitir a utilização da câmara escura para revelação das bandas protéicas obtidas na técnica de *western blot*.

À **Selma** e ao **Celso** da secretária da pós-graduação da Farmacologia do ICB-USP e da pós-graduação do ICB-USP, respectivamente, pela atenção, simpatia e profissionalismo.

Aos **animais** (camundongos) utilizados neste estudo, meu profundo respeito e agradecimento, por todas as vezes que foram solicitados, vocês estiveram presentes sem poder escolher.

Aos **funcionários do Biotério Central** do Instituto Butantan, pelo fornecimento dos animais.

Aos **funcionários da Biblioteca** do ICB-USP e do Instituto Butantan, pela disponibilidade e atenção.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão da Bolsa de Doutorado (02/13458-0) e Auxílio à Pesquisa (02/13863-2).

"As ciências têm as raízes amargas,
porém os frutos são doces."

(Aristóteles)

RESUMO

MOREIRA.V. 2007. **Efeitos de toxinas, com estrutura de fosfolipase A₂, isoladas do veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus durissus terrificus* e dos respectivos venenos, sobre a expressão de ciclooxigenases e produção de prostaglandinas.** 2007. 142f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Os venenos de serpentes da família Viperidae contêm fosfolipases A₂ (FLA₂), que apresentam homologia estrutural com as FLA₂s de mamíferos. Essas enzimas, por hidrolisarem fosfolipídeos de membrana, liberam o ácido araquidônico, o substrato de ciclooxigenases (COX), originando as prostaglandinas, importantes segundos mensageiros fisiológicos e inflamatórios. As FLA₂s de veneno de serpentes *Bothrops asper* e este veneno desencadeiam uma reação inflamatória local, com a liberação de citocinas e eicosanóides. Contudo, os mecanismos envolvidos na liberação desses mediadores, particularmente os prostanóides, são pouco conhecidos. Por outro lado, a FLA₂ do complexo crotoxina, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e este veneno bruto, além de atividade inflamatória, exibem atividade antiinflamatória. Desse modo, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito de duas FLA₂s, isoladas do veneno de *Bothrops asper* (VBa) - a miotoxina (MT)-II, sem atividade catalítica e a MT-III com atividade catalítica - e da CB2, uma FLA₂ isolada do VCdt bem como dos venenos brutos de *B.asper* e *C. durissus terrificus* sobre a expressão das COX-1 (constitutiva) e COX-2 (constitutiva e induzível) e a liberação dos prostanóides PGE₂ e PGD₂, após a sua injeção na cavidade peritoneal de camundongos Swiss machos ou incubação com macrófagos ou neutrófilos, isolados, *in vitro*. Os resultados obtidos *in vivo* demonstraram que a concentração de PGD₂ e PGE₂ foi aumentada na cavidade peritoneal dos camundongos, após a injeção das três FLA₂s e do VBa, mas não do VCdt, em relação aos controles. Além disso, as MTs e o VBa, mas não a CB2 nem o VCdt, induziram a expressão da COX-2, mas não da COX-1, em leucócitos recrutados para o local da injeção. A COX-2, induzida, apresentou atividade catalítica. *In vitro*, as MT-II e MT-III também induziram a produção de prostaglandinas e a expressão de COX-2, por macrófagos e o VBa por macrófagos e neutrófilos isolados. Por outro lado, a CB2 induziu a produção de prostaglandinas por macrófagos, mas não foi capaz de induzir a expressão da COX-2 por estas células. Adicionalmente, foram avaliadas as vias de sinalização envolvidas na síntese dos prostanóides e expressão de COX-2, pelas FLA₂s *in vitro*. A inibição da FLA₂ citosólica (cFLA₂), pelo pré-tratamento dos macrófagos com AACOCF₃, reduziu, de modo marcado, a liberação de PGD₂ e PGE₂, mas não a expressão de COX-2, induzidas por ambas as MTs. No

caso da CB2, os níveis de prostaglandinas não foram alterados. A inibição da FLA₂ independente de Ca⁺², pelo PACOCF₃, não causou alteração da síntese de prostaglandinas, induzida pelas três FLA₂s, nem afetou a expressão de COX-2, induzida pelas MT-II e MT-III. A incubação dos macrófagos com os inibidores do fator de transcrição NF-κB, o TPCK ou o SN50 inibiu a expressão de COX-2, induzida pelas MT-II e MT-III. Em conjunto, estes resultados permitiram concluir que as sFLA₂s MT-II, MT-III e CB2 e o VBa, mas não o VCdt, são capazes de induzirem a produção de PGE₂ e PGD₂ *in vivo* e *in vitro*. A expressão de COX-2 deve constituir uma etapa importante no mecanismo de ação das MT-II, MT-III e VBa, mas não da CB2, para a produção de prostaglandinas. No caso desta última, a COX-1 deve ser a isoforma envolvida. Estes efeitos decorrem, ao menos em parte, de uma ação direta das toxinas sobre macrófagos e do VBa sobre macrófagos e neutrófilos, sugerindo que estas células sejam alvos importantes para estes agentes *in vivo*. O fato da MT-II ser destituída de atividade enzimática sugere que a atividade catalítica das FLA₂s estudadas, não seja relevante para os efeitos observados. Ainda, a indução da expressão de COX-2, pelas MT-II e MT-III, ocorre por um mecanismo dependente do NF-κB, mas não da cFLA₂ ou da iFLA₂. A cFLA₂ é importante para a formação de prostanóides, induzida pela MT-II e MT-III, mas não pela CB2. A diferença funcional, entre as MT-II, MT-III e CB2 pode decorrer da diferença estrutural entre estas proteínas, embora apresentem similaridade entre 40 e 70% quanto à sequência de aminoácidos. As diferenças entre os efeitos do VBa e do VCdt, sobre a via de síntese de prostaglandinas, podem decorrer de seus efeitos regulatórios antagônicos sobre a inflamação. Esses estudos contribuem para a melhor compreensão dos mecanismos de ação dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* e das FLA₂s, isoladas destes venenos. Em função do detalhamento de ações moleculares, as sFLA₂s, aqui investigadas, poderão constituir ferramentas úteis para estudo de mecanismos e funções celulares específicas e/ou de agentes antiinflamatórios. Ainda, considerando a relevância das ciclooxigenases, em processos fisiopatológicos, de natureza inflamatória, este estudo poderá contribuir para terapêuticas mais eficazes para o tratamento de acidentes com serpentes da família Viperidae.

Palavras-chave: FLA₂ secretadas, ciclooxigenases, prostaglandinas, veneno de serpentes, macrófagos, neutrófilos.

ABSTRACT

MOREIRA.V. 2007. **Effects of toxins with phospholipase A₂ structure isolated from *Bothrops asper* and *Crotalus durissus terrificus* venoms and the respective crude venoms on expression of cyclooxygenases and biosynthesis of prostaglandins.** 2007. 142f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The effects of three secretory phospholipases A₂ (sPLA₂): the myotoxins MT-II, devoid of catalytic activity and MT-III, with catalytic activity, isolated from *Bothrops asper* venom and CB2, isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venoms as well as these two crude venoms on cyclooxygenases (COXs) and biosynthesis of prostaglandins (PGs) E₂ and D₂ were evaluated in *in vivo* and *in vitro* experimental models. Upon intraperitoneal injection the sPLA₂s and BaV but not CdtV promoted release of PGD₂ and PGE₂ into the peritoneal cavities of mice. In addition, MT-II, MT-III and BaV, but neither CB2 nor CdtV induced expression of COX-2 by peritoneal leukocytes without modification of constitutive expression of COX-1. Release of both PGs was also observed *in vitro* after incubation of macrophages with subcytotoxic concentrations of those sPLA₂s or macrophages and neutrophils with BaV thus evidencing their direct stimulatory effect on these inflammatory cells. Moreover, MT-II, MT-III but not CB2 induced expression of COX-2 but not COX-1 by macrophages, whereas BaV induced COX-2 expression, but not COX-1, in both macrophages and neutrophils in culture. Inhibition of cytosolic PLA₂ (cPLA₂) by AACOCF₃ significantly reduced PGD₂ and PGE₂ increments caused by myotoxins, but not by CB2, whereas inhibition of iPLA₂ by PACOCF₃ did not affect prostaglandin production induced by all the studied sPLA₂s. However, these inhibitors did not affect the increased expression of COX-2 induced by both myotoxins. In addition, the involvement of transcription factor NF-κB in COX-2 expression induced by MT-II and MT-III was demonstrated using the specific inhibitors TPCK and SN50. In conclusion, these results demonstrate that the studied MT-II, MT-III, CB2 and BaV stimulate the synthesis of PGD₂ and PGE₂ in inflammatory cells *in vivo* and *in vitro* and that MT-II, MT-III and BaV, but not CB2, induce expression of COX-2, but not COX-1 by inflammatory leukocytes *in vivo* and *in vitro*. However, VCdt does not induce neither prostaglandins synthesis nor COX-2 expression. The effect of MT-II and MT-III on COX-2 expression is mediated by NF-κB, whereas cPLA₂ is involved in stimulation of prostaglandin synthesis by a pathway different from COX-2 expression. In contrast, iPLA₂ does not take part in the proinflammatory effects induced by both sPLA₂s. The stimulatory

effects of CB2 on PGs occur by pathways different from cPLA₂, iPLA₂ and COX-2. Since MT-II lacks catalytic activity, the phospholipase activity *per se* is not relevant for activation of this cascade. On the other hand, the antagonistic effects of BaV and CdtV on endogenous modulatory mechanisms of inflammation may be responsible for differences observed on their ability to regulate PGs synthesis and COX-2 expression. These findings show novel regulatory mechanisms for secretory PLA₂s and viperid venoms in inflammatory cells.

Keywords: Phospholipase A₂, cyclooxygenase, prostaglandins, mytoxins, snake venoms, leukocytes.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 Quadro esquemático dos mediadores produzidos a partir do ácido araquidônico.	33
---	----

CAPÍTULO 1

Figura 1.1 Liberação de PGD ₂ e PGE ₂ induzidas pelas MT-II, MT-III e CB2.	60
Figura 1.2 Efeito das miotoxinas II e III na expressão de COX-1 e -2 por leucócitos peritoneais.	62
Figura 1.3 Efeito da CB2 na expressão na expressão de COX-1 e -2 por leucócitos peritoneais.	63
Figura 1.4 Efeito da MT-II e MT-III sobre a atividade enzimática de COX-1 e -2, em leucócitos peritoneais.	64
Figura 1.5 Liberação de PGD ₂ e PGE ₂ induzida pelas MT-II, MT-III e CB2 em macrófagos residentes em cultura.	66
Figura 1.6 Efeitos das MT-II e MT-III na expressão protéica de COX-1 e COX-2, por macrófagos peritoneais residentes isolados.	68
Figura 1.7 Efeito da CB2 na expressão de COX-1 e COX-2 por macrófagos peritoneais residentes isolados.	69
Figura 1.8 Efeito do AACOCF ₃ e PACOCF ₃ sobre a produção de PGD ₂ e PGE ₂ por macrófagos residentes, induzidas pela MT-II, MT-III e CB2.	71
Figura 1.9 Efeito do AACOCF ₃ e PACOCF ₃ na expressão de COX-2 por macrófagos residentes, induzida pela MT-II e MT-III.	72
Figura 1.10 Efeito do TPCK e SN50 na expressão de COX-2 por macrófagos peritoneais residentes, induzida pelas MT-II e MT-III.	74
Figura 1.11 Esquema representativo de algumas vias de sinalização envolvidas na produção da prostaglandina E ₂ e prostaglandina D ₂ , por macrófagos estimulados pelas MT-II e MT-III, isoladas do veneno de <i>Bothrops asper</i> e pela CB2, isolada do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .	83

CAPÍTULO 2

Figura 2.1 Liberação de PGD ₂ e PGE ₂ induzidas pelo VBa.	93
Figura 2.2 Efeito do veneno de <i>B. asper</i> na expressão de COX-1 e -2 por leucócitos peritoneais.	94
Figura 2.3 Efeito do veneno de <i>B. asper</i> sobre a atividade enzimática de COX-1 e -2 em leucócitos peritoneais.	95
Figura 2.4 Efeito do veneno de <i>B. asper</i> na liberação de PGD ₂ e PGE ₂ por macrófagos residentes em cultura.	96
Figura 2.5 Efeito do veneno <i>B. asper</i> na liberação de PGE ₂ por neutrófilos isolados, em cultura.	97
Figura 2.6 Efeito do veneno de <i>B. asper</i> na expressão protéica de COX-1 e -2, por macrófagos peritoneais residentes isolados.	98
Figura 2.7 Efeito do veneno de <i>B. asper</i> na expressão protéica de COX-1 e -2, por neutrófilos isolados.	99
Figura 2.8 Esquema representativo de vias de sinalização envolvidas na produção da prostaglandina E ₂ e prostaglandina D ₂ , por macrófagos estimulados pelo veneno de <i>Bothrops asper</i> .	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Grupos da FLA₂s secretadas.	39
Tabela 1.2 Grupos de fosfolipases A₂ intracelulares.	40

LISTA DE PRINCIPAIS ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
CA	crotapotina
CB	componente B (fosfolipase A ₂ do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>)
cFLA₂	fosfolipase A ₂ citosólica
COX	ciclooxigenase
EIA	enzima imunoensaio
E.P.M.	erro padrão da média
FLA₂	fosfolipase A ₂
HCl	ácido clorídrico
iFLA₂	fosfolipase A ₂ independente de cálcio
IL	interleucina
KCl	cloreto de potássio
LTB₄	leucorieno B ₄
LDH	“lactate dehydrogenase” (lactato desidrogenase)
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
MT-II	miotoxina-II
MT-III	miotoxina III
MTT	brometo de 3, 4,5-dimetiltiazol – 2il 2,5- difenil tetrazol
PAF	fator ativador de plaquetas
PGD₂	prostaglandina D ₂
PGE₂	prostaglandina E ₂
SDS	“sodium dodecil sulfate” (Dodecil sulfato de sódio)
sFLA₂	fosfolipase A ₂ secretada
TEMED	“N,N,N', N'- Tetramethylethylenediamine”
TNF-α	“tumoral necrosis factor-alpha” (Fator de necrose tumoral alfa)
TXA₂	tromboxana A ₂
VBa	veneno de <i>Bothrops asper</i>
VCdt	veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>

SUMÁRIO

Prefácio	25
INTRODUÇÃO GERAL	26
1 Prostanóide e Ciclooxygenases-Considerações gerais	27
2 Resposta inflamatória aguda. Participação de neutrófilos e macrófagos	34
CAPÍTULO 1 Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A ₂ , isoladas do veneno de <i>Bothrops asper</i> e <i>Crotalus durissus terrificus</i> , sobre a expressão de ciclooxygenases e produção de prostaglandinas	36
1.1 INTRODUÇÃO	37
1.1.1 Fosfolipase A ₂	37
1.1.2 sFLA ₂ s isoladas de venenos de serpentes	41
1.1.2.1 Miotoxinas isoladas do veneno de <i>Bothrops asper</i>	41
1.1.2.2 sFLA ₂ s isoladas do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	43
1.2 OBJETIVOS	46
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	47
1.3.1 Animais	47
1.3.2 Toxinas	47
1.3.3 Ensaios <i>in vivo</i> : injeção das toxinas e obtenção de leucócitos peritoneais	47
1.3.4 Ensaios <i>in vitro</i> : coleta de macrófagos peritoneais e preparação das amostras	48
1.3.5 Tratamento com inibidores específicos	48
1.3.6 Determinação do efeito citotóxico	49
1.3.6.1 Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH)	49
1.3.6.2 Ensaio da redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2il 2,5-difenil tetrazol (MTT)	49
1.3.7 Análise por <i>Western blot</i>	50
1.3.8 Determinação da concentração de PGE ₂ e PGD ₂ por ensaio imunoenzimático específico (EIA)	51
1.3.9 Determinação da atividade enzimática das COX-1 e de COX-2	51
1.3.10 Análise estatística	52
1.3.11 Soluções utilizadas	52
1.3.11.1 Líquido de Turk	52
1.3.11.2 Meio de cultura RPMI (Solução Estoque)	52
1.3.11.3 Solução de RPMI pH 7,2 (Solução de Uso)	53
1.3.11.4 Solução de glutamina (2 mM)	53
1.3.11.5 Soluções para dosagem de lactato desidrogenase (LDH)	53
1.3.11.5.1 Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4	53
1.3.11.5.2 Tampão de uso	53

1.3.11.6 Soluções para <i>Western blot</i>	53
1.3.11.6.1 Tampão Tris-HCl 2 M (pH 8.8)	53
1.3.11.6.2 Tampão Tris-HCl 1 M (pH 6.8)	54
1.3.11.6.3 Solução SDS 10%	54
1.3.11.6.4 Solução Azul de Bromofenol 1 %	54
1.3.11.6.5 Solução de acrilamida 30% (Solução A)	54
1.3.11.6.6 Tampão para o gel de separação (Solução B)	54
1.3.11.6.7 Tampão para o gel de empilhamento (Solução C)	54
1.3.11.6.8 Persulfato de amônio 10%	54
1.3.11.6.9 Tampão de eletroforese	54
1.3.11.6.10 Tampão de Transferência	55
1.3.11.6.11 Tampão de Lavagem	55
1.3.11.6.12 Gel de Separação 10%	55
1.3.11.6.13 Gel de Empilhamento	55
1.3.11.6.14 Corante Comassie blue R	55
1.3.11.6.15 Solução Descorante	56
1.3.11.6.16 Solução Potencial-S	56
1.3.11.6.17 Tampão de Amostra (Tampão Laemmli)	56
1.3.11.6.18 Tampão “Stripping”	56
1.3.12 Lista de Reagentes	56
 1.4 RESULTADOS	 59
1.4.1 Liberação de PGD ₂ e PGE ₂ induzida pelas miotoxinas II e III e pela CB2, na cavidade peritoneal de camundongos.	59
1.4.2 Efeito das MT-II e -III na expressão de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais.	61
1.4.3 Efeito das CB2 na expressão de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais.	63
1.4.4 Efeito da MT-II e MT-III sobre a atividade catalítica de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais.	64
1.4.5 Liberação de PGD ₂ e PGE ₂ , a partir de macrófagos peritoneais isolados, induzidas, <i>in vitro</i> , pelas MT-II e -III e pela CB2.	65
1.4.6 Efeitos das MT-II e MT-III na expressão de COX-2 e COX-1 em macrófagos peritoneais residentes, isolados.	67
1.4.7 Efeito da CB2 na expressão de COX-2 e COX-1 em macrófagos peritoneais residentes, isolados.	69
1.4.8 Efeito do AACOCF ₃ e PACOCF ₃ , na produção de PGD ₂ e PGE ₂ , por macrófagos isolados, induzidas pelas MT-II e -III e CB2 <i>in vitro</i> .	70
1.4.9 Efeito do AACOCF ₃ e PACOCF ₃ na expressão de COX-2, por macrófagos isolados, induzidas pelas MT-II e -III.	72
1.4.10 Efeito do composto TPCK e SN50 na expressão de COX-2, induzidas pelas MT-II e MT-III em macrófagos isolados.	73
 1.5 DISCUSSÃO	 75
 1.6 CONCLUSÕES	 84
 CAPÍTULO 2 Efeito do veneno de serpentes <i>Bothrops asper</i> sobre as ciclooxigenases e produção de prostaglandinas	 85
 2.1 INTRODUÇÃO	 86

2.2 OBJETIVOS	89
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	90
2.3.1 Animais	90
2.3.2 Veneno	90
2.3.3 Ensaios <i>in vivo</i> : injeção do VBa e obtenção de leucócitos peritoneais	90
2.3.4 Ensaios <i>in vitro</i> : coleta de macrófagos, neutrófilos e preparação das amostras	91
2.3.5 Determinação do efeito citotóxico: análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH)	91
2.3.6 Análise por <i>Western blot</i>	91
2.3.7 Quantificação da concentração de PGD ₂ e PGE ₂ por ensaio imunoenzimático específico (EIA)	92
2.3.8 Determinação da atividade enzimática das COX-1 e COX-2	92
2.3.9 Análise estatística	92
2.3.10 Soluções utilizadas	92
2.3.11 Lista de reagentes	92
2.4 RESULTADOS	93
2.4.1 Liberação de PGD ₂ e PGE ₂ induzidas pelo veneno de <i>B. asper</i> (VBa)	93
2.4.2 Efeito do veneno de <i>B. asper</i> na expressão de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais	94
2.4.3 Efeito do VBa sobre a atividade catalítica COX-1 e COX-2	95
2.4.4 Liberação de PGD ₂ e PGE ₂ , por macrófagos peritoneais isolados induzidas pelo veneno de <i>B. asper in vitro</i>	96
2.4.5 Liberação de PGE ₂ , por neutrófilos isolados, induzida pelo veneno de <i>B. asper in vitro</i>	97
2.4.6 Efeito do veneno de <i>B. asper</i> sobre a expressão de COX-2 e COX-1, em macrófagos peritoneais residentes, isolados	98
2.4.7 Efeito do veneno <i>B. asper</i> sobre a expressão de COX-1 e COX-2 em neutrófilos isolados	99
2.5 DISCUSSÃO	100
2.6 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106
CAPÍTULO 3 <i>Bothrops jararaca</i> and <i>Crotalus durissus terrificus</i> venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E ₂ and D ₂ , and expression of cyclooxygenases	132

PREFÁCIO

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* induzem reação inflamatória e ativam funções leucocitárias (ZAMUNÉR *et al.*, 2001; 2005; CURY *et al.*, 1994; LOMONTE *et al.*, 1993). O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, por sua vez, exerce efeitos de natureza antiinflamatória e inibe algumas funções de macrófagos (SOUSA-e-SILVA *et al.*, 1996; SAMPAIO *et al.*, 2001). Esses venenos contêm níveis elevados de fosfolipases A₂ (FLA₂), associadas ou não a outras subunidades, que apresentam homologia estrutural e tridimensional significativa com FLA₂ de mamíferos, com funções fisiológicas e fisiopatológicas relevantes. As FLA₂ de veneno de serpentes do gênero *Bothrops* são miotóxicas e induzem inflamação, caracterizada por liberação de eicosanóides (ZULIANI *et al.*, 2005a.). Dentre as FLA₂ isoladas do veneno de *C. durissus terrificus*, podem apresentar efeitos inflamatórios (LANDUCCI *et al.*, 2000a; CÂMARA *et al.*, 2003; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004) e antiinflamatórios, dependendo do modelo experimental, como a inibição da fagocitose em macrófagos (SAMPALIO *et al.*, 2005). Contudo, as ações dessas toxinas e venenos, na produção de prostaglandinas e, especialmente, na via das ciclooxigenases, não eram conhecidas. Desse modo, este estudo teve por objetivos, avaliar os efeitos de FLA₂s, isoladas do veneno de *Bothrops asper* (MT-II e MT-III) e da isoforma CB2, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, além dos respectivos venenos brutos, quanto aos mecanismos envolvidos na produção de prostanóides, com ênfase na via das ciclooxigenases e fosfolipases A₂ intracelulares, em leucócitos, *in vivo* e *in vitro*.

Para melhor apreciação e compreensão, este trabalho foi dividido em quatro partes, a saber: Introdução geral; Capítulo I, em que está apresentado o estudo dos efeitos de FLA₂s isoladas de venenos de serpentes Viperidae na via das ciclooxigenases; Capítulo II, em que está apresentado o estudo dos efeitos do veneno de *Bothrops asper* na via das ciclooxigenases e Capítulo III, em que está apresentado um artigo científico, publicado, relacionado ao estudo dos efeitos dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* sobre a mesma via. Os estudos referentes ao veneno de *Bothrops jararaca* não constam dos objetivos deste trabalho de tese, por não serem inéditos.

Introdução Geral

1 Prostanóides e Ciclooxygenases – Considerações gerais

Os prostanóides são autacóides de natureza lipídica, sintetizados a partir de um ácido graxo essencial, que possui 20 átomos de carbono e três, quatro ou cinco duplas ligações - ácido-5, 8, 11, 14 – eicosatetraenóico - denominado ácido araquidônico (AA) (COREY *et al.*, 1980).

O AA, gerado a partir da hidrólise de fosfolípidos de membranas celulares, por fosfolipases A₂, é metabolizado, rapidamente, por vários complexos enzimáticos, que incluem as ciclooxygenases, as lipoxigenases e o citocromo P450. A ação destas enzimas (Figura 1) promove a síntese de produtos oxigenados, genericamente denominados de eicosanóides, que incluem as prostaglandinas (PG) ou prostanóides, os leucotrienos (LT) (YOKOMIZO *et al.*, 1997; SARAU *et al.*, 1999), os ácidos hidroperoxi-(HPETE) e hidroxi-eicosatetraenóicos (HETE), os epóxidos (EET) (CHEN *et al.*, 1999), as lipoxinas (LX) (SERHAN *et al.*, 1999) e as hepoxilinas (PACE-ASCIK *et al.*, 1999), além de outros produtos que não são formados enzimaticamente (KHASELEV *et al.*, 1999).

A metabolização do AA, pelo sistema enzimático das ciclooxygenases, leva à formação das prostaglandinas que, por sua vez, regulam numerosas funções fisiológicas e patológicas, tais como o desenvolvimento e a inflamação (BOS *et al.*, 2004; HATA e BREYER, 2004).

Atualmente, são descritas três isoformas de ciclooxygenases, denominadas ciclooxygenase-1 (COX-1), ciclooxygenase-2 (COX-2) e ciclooxygenase-3 (COX-3). As duas primeiras isoformas são as mais amplamente estudadas, enquanto a terceira foi recentemente descoberta (WARNER e MITCHELL, 2004). Alguns autores sugerem, ainda, a existência de uma quarta isoforma de ciclooxygenase, que poderia ser induzida pelo diclofenaco, cuja função estaria relacionada à fase de resolução do processo inflamatório. No entanto, a existência de COX-4 ainda é alvo de especulações (BOTTING e AYOB, 2005).

A COX-1, isolada por HEMLER e LANDS (1976), é a isoforma expressa constitutivamente, na maioria das células e tecidos, que incluem o endotélio, monócitos, plaquetas, células renais e vesículas seminais (BOTTING, 2006). Esta enzima é responsável pela formação dos prostanóides que, em condições fisiológicas, são responsáveis pela regulação da homeostasia (O'NEILL e FORD-HUTCHINSON, 1993; DUBOIS *et al.*, 1998; BOTTING *et al.*, 2006). Esta função inclui a manutenção da integridade da mucosa gástrica (WHITTLE *et al.*, 1978), do fluxo sanguíneo renal (PALMER e HENRICH, 1995), da homeostase dependente de plaquetas (SCHAFER, 1995; FUNK *et al.*, 1991) e do endotélio

(MONCADA *et al.*, 1976). Por outro lado, alguns estudos indicaram que a COX-1 também está envolvida na resposta inflamatória (LANGENBACH *et al.*, 1995; WALLACE *et al.*, 1998,1999; OCHI e GOTO, 2002). Normalmente, a concentração desta enzima é constante, porém, em alguns casos, pequenos aumentos podem ocorrer em resposta a estímulos por hormônios ou fatores de crescimento (DEWITT, 1991; UEDA *et al.*, 1997).

A COX-2 (O' BANION *et al.*, 1991; SIROIS e RICHARDS, 1992), pode ser expressa constitutivamente ou ser induzida em vários tipos celulares e desempenha um importante papel fisiológico e fisiopatológico (WU *et al.*, 2005). A expressão constitutiva dessa isoforma ocorre em algumas áreas do sistema nervoso central (YAMAGATA *et al.*, 1993; BREDER *et al.*, 1995; CAO *et al.*, 1995), em tecidos envolvidos na reprodução (durante a ovulação e implantação do blastocisto) (GIBB *et al.*, 1996) e no sistema gástrico (KARGMAN *et al.*, 1996). Ainda, a COX-2 é a principal fonte de prostaciclina, em tecido cardíaco, células endoteliais vasculares e células renais, a partir de sinais endógenos e exógenos, para a proteção das funções cardiovascular e renal (HARRIS *et al.*, 1994; GUAN *et al.*, 1997; WU, 1998). Por outro lado, a expressão de COX-2 é reconhecida como um componente chave em patologias de cunho inflamatório, na injúria tecidual e em processos tumorais (DUBOIS *et al.*, 1998; SIMMONS *et al.*, 2004). A indução da expressão desta isoforma foi relatada em tecidos e células presentes em processos inflamatórios exudativos como a artrite reumatóide (KANG *et al.*, 1996), a absorção óssea (ALLISON *et al.*, 1993; PILBEAM *et al.*, 1997), o câncer do cólon (EBEHART *et al.*, 1994), a hiperalgesia (YAMAMOTO *et al.*, 1996; CASHMAN *et al.*, 1996) e na doença de Alzheimer (TOCCO *et al.*, 1997). A indução da COX-2 pode ser dada por mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento- β (TGF- β), interferon- α (INF- α) (BARRIOS-RODILES, 1998; DIAZ *et al.*, 1998), interleucina-1 (IL-1) α e β (JACOBS *et al.*, 1994; DIAZ *et al.*, 1998; ASANO *et al.*, 1997) e por lipopolissacarídeos (LPS) (LEE *et al.*, 1992) da parede de bactérias gram negativas. Além disso, a expressão da COX-2 pode ser induzida por hormônios, como o folículo estimulante (FSH), o luteinizante (LH) e o estrógeno (SIROIS *et al.*, 1992; MORRIS e RICHARDS, 1995) e por fatores de crescimento, como os fatores de crescimento epidérmico (EGF) e de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) (CHEPENIK *et al.*, 1994; KELNER e UGLIK, 1994). A diminuição da expressão da COX-2, por outro lado, é efetuada por citocinas antiinflamatórias, como a IL-4, IL-10 e IL-13 além dos glicocorticóides (ONOE *et al.*, 1996; SCOTT *et al.*, 1999).

Uma outra isoforma, denominada COX-3, foi clonada e sequenciada (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). Esta ciclooxigenase é sintetizada a partir de uma junção alternativa da sequência gênica, correspondente à COX-1, mas que retém o íntron 1 em seu RNA mensageiro (RNAm) (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). Em função desta origem, alguns autores (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; DINCHUK *et al.*, 2003) consideram que a denominação mais apropriada para a COX-3 seria COX-1b. A expressão desta enzima foi detectada no córtex cerebral canino e, em menor quantidade, em outros tecidos (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). Em humanos, ratos e em camundongos, a enzima COX-3 está presente no córtex cerebral e no tecido cardíaco (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; DINCHUK *et al.*, 2003; KIS *et al.*, 2003; QIN *et al.*, 2005; SNIPES *et al.*, 2005, 2006). Essa proteína possui baixa atividade para a síntese de prostaglandinas, quando comparada à COX-1, porém fármacos analgésicos/antipiréticos, como o acetaminofen e a dipirona, podem inibir, com alta afinidade, a sua atividade. Assim, os autores sugerem a participação da isoforma COX-3, em processos de dor e febre, embora ainda não existam estudos mais detalhados sobre suas atividades e funções (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002; DINCHUK *et al.*, 2003; KIS *et al.*, 2006).

As COX-1 e -2 apresentam muitas similaridades quanto aos seus mecanismos catalíticos, cinéticos e natureza dos produtos originados. Ademais, possuem cerca de 60 a 70% de homologia na sequência de aminoácidos (aa), sendo que a COX-1 contém 576 aa, enquanto que a COX-2 é constituída por 587 aa (BAKHLE, 1999; SMITH, *et al.*, 2000). Estas enzimas são codificadas por dois genes diferentes, localizados em cromossomos distintos (SMITH e LANGEBACH, 2001).

Duas diferenças estruturais, entre essas isoenzimas, determinam importantes consequências biológicas e farmacológicas: 1) o sítio ativo da COX-2 é maior e possui maior plasticidade que o da COX-1; esta diferença pode ser explorada para o desenvolvimento de inibidores específicos para a COX-2. Apesar da maioria das propriedades cinéticas da COX-1 e -2 serem praticamente iguais, somente a COX-1 exibe um alosterismo negativo para baixas concentrações de AA; esta diferença confere uma maior eficiência para a COX-2 no processamento enzimático do ácido araquidônico recém liberado, quando as isoenzimas são expressas numa mesma célula (SMITH *et al.*, 2000); 2) a localização intracelular é outra diferença importante entre essas isoformas: ambas estão presentes na membrana de retículo endoplasmático, mas a COX-2 é também encontrada, em altas concentrações, na membrana nuclear (OTTO e SMITH, 1994; MORITA *et al.*, 1995). Além disso, a isoenzima COX-1 foi encontrada em estruturas filamentosas de células endoteliais da linhagem ECV304 (LIOU *et*

et al., 2000) e já foi localizada em corpúsculos lipídicos presentes em leucócitos (BOZZA *et al.*, 1996). Ainda, a isoforma COX-2 foi localizada em cavéolas, de células endoteliais de artéria bovina e em fibroblastos humanos, após estímulo por éster de forbol ou IL-1 (LIOU *et al.*, 2000, 2001).

Quanto ao mecanismo enzimático, as ciclooxigenases apresentam duas atividades distintas: uma atividade ciclooxigenase, em que o AA reage com duas moléculas de O₂, para formar o endoperóxido PGG/PGG₂ (prostaglandina G₂) e uma atividade peroxidase, que reduz o grupo 15-hidropéroxí, deste último metabólito, para formar a PGH₂ (Figura 1). Tanto a PGG₂ quanto a PGH₂ são quimicamente instáveis e sofrem a ação de sintases específicas, originando uma variedade de eicosanóides, dentre as quais as prostaglandinas, das séries E, D e F, além das PGI₂ (prostaciclina) e tromboxana (TXA₂). A formação desses produtos está relacionada ao sistema enzimático predominante em cada tecido (HERSCHMAN, 1996; SMITH *et al.*, 2000). Após a síntese, as prostaglandinas são liberadas rapidamente das células e agem na proximidade de seu sítio de produção, por meio de interação com receptores de alta afinidade, presentes em membranas plasmáticas (HARRIS *et al.*, 2002).

Os prostanóides são mediadores lipídicos que modulam ou medeiam uma variedade de processos fisiológicos e patológicos, via receptores da superfície de células alvo e possuem uma meia vida biológica curta (MEAD, 1984; BREYER *et al.*, 1996). Esses 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 e FITZGERALD, 2001).

A PGE₂ é a prostaglandina mais abundante do organismo (SERHAN *et al.*, 2003). Este prostanóide é produzido por várias células, incluindo os fibroblastos, leucócitos e células renais. Este mediador lipídico é o principal membro da família das prostaglandinas, pois desempenha um importante papel em sistemas fisiológicos, como os sistemas gastrointestinal, renal e cardiovascular (HARRIS *et al.*, 2002; NARUMIYA e FITZGERALD, 2001; WARNER *et al.*, 1999). Em processos de defesa, é importante por suas ações imunomodulatórias e na reação inflamatória (PORTANOVA *et al.*, 1996; MOLLOY e MCCARTHY, 2005). De maneira geral, as prostaglandinas da série E promovem vasodilatação, potenciam o aumento da permeabilidade vascular, causado pela histamina e a bradicinina e estão envolvidas no fenômeno de dor e febre (MILLS *et al.*, 1993; PORTANOVA *et al.*, 1996; GERRITSEN, 1996). No entanto, a PGE₂ pode exercer efeitos opostos, tais como suprimir a produção de

citocinas inflamatórias, como o TNF- α , a IL-1 e a IL-6 (KNUNDSSEN *et al.*, 1986; RENZ *et al.*, 1988; TAKAYAMA *et al.*, 2002; NOGUCHI *et al.*, 2005), inibir a fagocitose por macrófagos (DAVIDSON *et al.*, 1998) e a proliferação de células T (NATARAJ *et al.*, 2001). Os diversos efeitos pró e anti-inflamatórios da PGE₂, são desencadeados por quatro subtipos de receptores, denominados de EP1, EP2, EP3 e EP4, codificados por genes distintos (BOS *et al.*, 2004).

A PGD₂, outro membro da família das prostaglandinas, é produzida em vários tecidos e está associada a efeitos fisiológicos no sistema nervoso central, tais como indução do sono, modulação da temperatura corporal, função olfativa, liberação de hormônios, nocicepção e neuromodulação (MATSUYAMA *et al.*, 1983; FÖRSTERMANN *et al.*, 1985; GILES e LEFF, 1988; OKUMURA e DAITO, 1990; MIZOGUCHI *et al.*, 2001; HAYAISHI e URADE, 2002). Em processos inflamatórios e processos alérgicos, a PGD₂ é a principal prostaglandina liberada por mastócitos e medeia a vasodilatação e/ou vasoconstrição, glicogenólise, broncoconstrição, em respostas alérgicas, e inibe a agregação plaquetária (ELLIS *et al.*, 1979; LEWIS *et al.*, 1981; ALVING *et al.*, 1991; DUMITRASCU, 1996). Esta prostaglandina também pode exercer efeitos antiinflamatórios e inibir a produção de citocinas (TNF α , IL-6 e IL-1 β) (KIYOMIYA e OH-ISHI, 1985; JIANG *et al.*, 1998) e funções de neutrófilos (NEY e SCHRÖR, 1991; DARIUS *et al.*, 1994). Esses efeitos opostos são modulados, de maneira específica, por dois tipos de receptores: DP e CRTH2 (*chemoattractant receptor homologous molecule expressed on T helper type 2 cells*), este também conhecido como DP2 (BOIE *et al.*, 1995; HIRAI *et al.*, 2001). Ainda, os efeitos antiinflamatórios, mediados pela PGD₂, podem ocorrer pela ação de um produto derivado, a 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, que interage com receptores PPAR γ (RICOTE *et al.*, 1998; NARUMIYA e FITZGERALD, 2001). Como exemplo, a 15-d-PGJ₂ inibe a síntese de óxido nítrico sintase (iNOS) e citocinas, em macrófagos de camundongos e mamíferos, por inibir os fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e STAT (RICOTE *et al.*, 1998; CASTRILLO *et al.*, 2000; ROSSI *et al.*, 2000).

A PGI₂ é produzida, principalmente, pelas células endoteliais, em processos inflamatórios e exerce ação vasodilatadora, potencia o aumento de permeabilidade vascular induzido pela bradicinina, inibe a agregação plaquetária e contribui para o aparecimento da dor (SIMONS, 2004). A TXA₂ é produzida por plaquetas estimuladas; é instável sob condições fisiológicas, com meia-vida de 30 segundos e convertida, rapidamente, em um composto estável, a tromboxana B₂ (TXB₂). Em condições fisiológicas, a TXA₂ possui ação

vasoconstritora e agregante de plaquetas (GERRITSEN, 1996). Em condições inflamatórias, é quimiotática para leucócitos, está envolvida no aumento de permeabilidade vascular e induz a expressão de moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas (ISHIZUKA *et al.*, 1996).

Provavelmente, o melhor indicador da importância dos prostanóides, em processos fisiopatológicos, é o emprego de inibidores de ciclooxigenases em uma grande variedade de contextos clínicos. Muitos fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), que inibem a atividade das ciclooxigenases, apresentam capacidade analgésica, antipirética e antiinflamatória, em processos agudos, indicando, assim, a ação das prostaglandinas em processos algésicos, febris e infecciosos, respectivamente (SIMON, 1996).

2 Resposta inflamatória aguda. Participação de neutrófilos e macrófagos

A reação inflamatória é a resposta do organismo a uma agressão local, caracterizada por uma série de eventos complexos, que envolvem vasodilatação arteriolar, seguida de aumento de fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade venular, exsudação plasmática e migração leucocitária para o espaço extravascular. A seguir, a eliminação de eventuais microorganismos ou outros agentes injuriosos, pelos fagócitos, são fenômenos centrais do processo, tendo como consequência o reparo e a substituição do tecido lesado. Estas alterações homeostáticas se traduzem nos sinais clássicos da inflamação aguda, descritos como rubor, tumor, calor e dor. O desenvolvimento destes sinais se deve à ação coordenada de mediadores químicos, liberados no local da lesão (RYAN e MAJNO, 1977; LENTSCH e WARD, 2000; KULINSKY, 2007).

Durante a reação inflamatória, ocorre o recrutamento de leucócitos, para o foco da lesão, sendo os neutrófilos as primeiras células a migrarem para o local, seguidos pelos monócitos. A interação dos leucócitos circulantes, com o endotélio vascular, é o primeiro passo para o recrutamento dessas células (SHERWOOD *et al.*, 2004). Este fenômeno decorre da interação entre moléculas de adesão, expressas na superfície dos leucócitos, com seus ligantes, presentes na superfície das células endoteliais, proporcionando um movimento de rolamento e adesão firme dos leucócitos (GRANGER e KUBES, 1994; POLIOUT *et al.*, 1998). Estes eventos levam à migração dos leucócitos, através dos espaços intercelulares, de células endoteliais, em direção ao gradiente de mediadores quimiotáticos, iniciado no tecido injuriado (HUBBARD e ROTHLEIN, 2000).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e permanecem pouco tempo no sangue periférico; possuem a capacidade de migrar para os tecidos, mediante a presença de estímulos quimiotáticos. Estas células desempenham um importante papel na eliminação de agentes estranhos, pela fagocitose e geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de liberarem agentes hidrolíticos, estocados em grânulos (LAMBETH, 1988; KASAMA *et al.*, 1993). Ainda, os neutrófilos são capazes de liberar metabólitos do ácido araquidônico, como os eicosanóides e o PAF (MOILANEN *et al.*, 1993; BAULDRY e WOOTEN, 1996; SYRBU *et al.*, 1999), expressar COX-1 e COX-2 e produzir citocinas, como a IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF- α (LINDEMANN *et al.*, 1989; DUBRAVEC *et al.*, 1990; LORD *et al.*, 1991; MALONEY *et al.*, 1998; NIRO *et al.*, 1997). Além da sua função primária, a fagocitose, os neutrófilos podem ser considerados células imunorreguladoras, uma vez que a produção de

citocinas pode influenciar a resposta imune (CASSATELLA, 1995). Ainda, em relação à fisiologia destas células e à sua participação na resposta inflamatória, foi demonstrado que os neutrófilos apoptóticos expressam marcadores de superfície que são reconhecidos por macrófagos e prontamente fagocitados pelos mesmos, no local da lesão (SAVILL *et al.*, 1989; HASLETT, 1997).

O macrófago é a principal célula diferenciada do sistema fagocítico mononuclear e participa de inúmeros processos fisiológicos e patológicos. Os macrófagos estão normalmente distribuídos em diversos tecidos, tais como o hematopóietico e o linfóide (GORDON, 1992). Estas células se originam da medula óssea, a partir de um precursor comum à linhagem granulocítica (DAVIES, 1994). Após deixarem a medula, os monócitos permanecem na circulação sanguínea por 70 horas, até migrarem para diferentes tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos teciduais (JOHNSTON, 1988). Estes permanecem residentes, por alguns meses e podem sofrer a estimulação de agentes inflamatórios e/ou imunológicos e adquirirem características próprias, tanto morfológicas quanto funcionais, como a fagocitose e capacidade microbicida, além do processamento e apresentação de antígenos e interação com o sistema linfóide, com conseqüente produção de anticorpos ou sensibilização de células (GRAF *et al.*, 1999; KAISER *et al.*, 1990; DAVIES, 1994).

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

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

Capítulo 1

**Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A₂,
isoladas do veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus
durissus terrificus*, sobre a expressão de
ciclooxigenases e produção de prostaglandinas**

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Fosfolipases A₂

As FLA₂ ou fosfatidil-acil-hidrolases, compreendem uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de fosfolipídeos. A reação de hidrólise é dependente de íons cálcio, sendo a unidade catalítica formada pelos aminoácidos His 48, Asp 99 e uma molécula de água (YU *et al.*, 1990, 1998; DENNIS *et al.*, 1994). Os produtos, gerados da catálise por estas enzimas, são ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico (AA), precursor de eicosanóides, segundos mensageiros de processos fisiológicos e fisiopatológicos (DENNIS, 1994) e o ácido oléico (AO) (GIJÓN e LESLIE, 1999). Os lisofosfolipídeos liberados, por outro lado, estão envolvidos na sinalização celular e na remodelagem de fosfolipídios (VALENTIN e LAMBEAU, 2000; BROWN, *et al.*, 2003). Adicionalmente, a atividade catalítica de FLA₂s leva à produção do lisofosfolipídeo liso-PAF, que é precursor do fator ativador de plaquetas (PAF), um mediador inflamatório importante, que induz a agregação plaquetária (QUINN *et al.*, 1988).

As FLA₂ estão classificadas em quatro grupos, que incluem as FLA₂ secretadas (sFLA₂) e as fosfolipases A₂ intracelulares, como as citosólicas (cFLA₂), as FLA₂ independentes de Ca⁺ (iFLA₂s) e as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) (MURAKAMI, *et al.*, 1997). Por outro lado, os avanços da biologia molecular e celular conduziram à identificação de diversas isoenzimas FLA₂. Atualmente, as FLA₂ estão subdivididas em 14 grupos (I-XIV) (BROWN *et al.*, 2003; BALSINDE *et al.*, 2002), com base em critérios como a localização celular, a sequência de aminoácidos, o peso molecular, a presença de pontes dissulfeto intramoleculares e a dependência de cálcio, para a atividade enzimática (SIX e DENNIS, 2000; BALSINDE *et al.*, 2002).

As FLA₂ secretadas (sFLA₂) estão classificadas nos grupos I, II, III, V e IX a XIV. Estas enzimas são de baixo peso molecular (12 kDa-19 kDa), contêm de 5 a 7 ligações do tipo dissulfeto, possuem resíduos de histidina no sítio catalítico e dependem do Ca⁺ para o processo de catálise. O grupo I compreende as enzimas do tipo secretada, que são encontradas em venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae e no pâncreas de mamíferos. As sFLA₂s de venenos de serpentes da família Viperidae estão classificadas no Grupo II, que também engloba as enzimas presentes no fluido sinovial humano e em plaquetas (MURAKAMI *et al.*, 1995). O Grupo III compreende as sFLA₂s de venenos de abelhas e de lagartos do gênero *Heloderma* e o grupo V contém as sFLA₂ expressas em tecidos de

mamíferos, como do coração e pulmão, em resposta a estímulos inflamatórios. O Grupo IX é constituído pela sFLA₂ isolada do veneno do caracol marinho, denominada de conodipina M. O Grupo X compreende FLA₂s encontradas em leucócitos e em células endoteliais alveolares de humanos e o Grupo XI é constituído por FLA₂ de plantas (RIZZO *et al.*, 2000; SIX e DENNIS, 2000). As sFLA₂s do Grupo XII são localizadas nos músculos cardíaco e esquelético, nos rins e pâncreas de mamíferos (MURAKAMI e KUDO, 2002). Por fim, as sFLA₂s dos Grupos XIII e XIV são encontradas em vírus (Parvovírus) e em fungos simbióticos (*Streptomyces*), respectivamente (BROWN *et al.*, 2003; BALSINDE *et al.*, 2002; CHAKRABORTI, 2003).

As fosfolipases A₂ citosólicas (cFLA₂) são enzimas de alto peso molecular (85 kDa) e são encontradas na fração citosólica de diversos tipos celulares. Estas FLA₂s expressam atividade catalítica, na presença de concentrações mínimas de íons cálcio e apresentam um domínio catalítico contendo resíduos de serina (Ser²²⁸ e Ser⁵⁴⁹). Dentre as cFLA₂, são conhecidas três isoenzimas: a cFLA₂α (Grupo IVA), expressa constitutivamente em muitos tipos celulares e tecidos; a cFLA₂β (Grupo IVB), expressa no pâncreas, sistema nervoso central, tecidos cardíaco e hepático e a cFLA₂γ (Grupo IVC), encontrada no músculo esquelético (MURAKAMI e KUDO, 2002).

As FLA₂ independentes de Ca⁺ (iFLA₂s) pertencem ao grupo VI e contém cerca de 120 aminoácidos (85-90 kDa). Este grupo está localizado intracelularmente e não depende do cálcio para exercer a atividade catalítica. Estas enzimas foram encontradas em macrófagos da linhagem P388D₁, células cardíacas e testículo (SIX e DENNIS, 2000). Finalmente, as FLA₂ dos Grupos VII e VIII compreendem enzimas com 42 e 45 kDa e são do tipo secretada e citosólica, respectivamente. Estas FLA₂ são denominadas de PAF acetil-hidrolases (PAF-AH) e catalisam a hidrólise da ligação *sn*-2 do PAF e de outros fosfolipídios pró-inflamatórios. Quatro isoformas distintas desta FLA₂ foram caracterizadas: isoformas 1a, 1b e II e eritrocitária. As PAF-AH foram identificadas no plasma humano e no tecido cerebral bovino (MURAKAMI *et al.*, 1997; CHAKRABORTI, 2003).

Tabela 1.1 Grupos de FLA₂s secretadas (SAMPAIO, 2002).

GRUPO	FLA ₂ DE VENENOS	TAMANHO (kDa)	FLA ₂ MAMÍFEROS		
			NOME COMUM	FONTES	PAPEL BIOLÓGICO
IA	Serpentes Elapidae, Hidrophidae	13-15	Não equivalente aos mamíferos		
IB	Alguns tipos de serpentes	13-15	FLA ₂ pancreática	Pâncreas, pulmão e baço	Digestão de lipídeos, formação de eicosanóides, proliferação, migração
IIA	Serpentes Viperidae	13-15	FLA ₂ inflamatória	Diversos tecidos e células inflamatórias	Formação de eicosanóides, doenças cancerígenas, defesa bacteriana
IIB	Alguns tipos de serpentes	15	Não equivalente aos mamíferos		
IIC	Não equivalentes aos venenos	14-15	FLA ₂ grupo IIC	Testículos	Desconhecido
IIIA	Abelhas, Lagartos	14	Não equivalente aos mamíferos		
IIIB	Escorpiões	14	Não equivalente aos mamíferos		
V	Não equivalentes aos venenos	14	FLA ₂ grupo V	Coração, placenta, macrófagos	Formação de eicosanóides
IX	Caracóis marinhos	14	Não equivalentes aos mamíferos		
X	Não equivalente aos venenos	14	FLA ₂ grupo X	Baço, timo, leucócitos, pâncreas	Desconhecido
XIA	Não equivalente aos venenos	12,4-12,9	Não equivalentes aos mamíferos		
XII	Não equivalente aos venenos	18,7	FLA ₂ grupo XII	Coração, rins e pâncreas	Desconhecido
XIII	Parvovírus	<10	Não equivalentes aos mamíferos		
XIV	Fungos	13-19	Não equivalentes aos mamíferos		

Tabela 1.2 Grupos de fosfolipases A₂ intracelulares (SIX e DENNIS, 2000).

GRUPO	FONTES	SIGLAS	TAMANHO (kDa)
IVA	Células humanas U937, plaquetas, rins de ratos	cFLA ₂ α	85
IVB	Pâncreas humano, fígado, coração, cérebro	cFLA ₂ β	114
IVC	Coração humano, músculo esquelético	cFLA ₂ γ	61
VIA-1	Macrófagos P388D ₁	iFLA ₂ ou iFLA ₂ -A	84-85
VIA-2	Linfócito B, testículos	iFLA ₂ -B	88-90
VIB	Coração, músculo esquelético	iFLA ₂ γ ou IFLA ₂ -2	88
VIIA	Plasma humano, de porco, e camundongo e cérebro bovino	PAF-AH	45
VIIB	Fígado bovino, rim humano	PAF-AH (II)	40
VIIIA	Cérebro humano	PAF-AH 1b α_1	26
VIIIB	Cérebro humano	PAF-AH 1b α_2	26

Dentre as fosfolipases A₂, as FLA₂s secretadas (sFLA₂s) compreendem o grupo de enzimas mais amplamente estudado. O envolvimento de sFLA₂s do grupo IIA, de mamíferos, no desenvolvimento de diversas patologias, de origem inflamatória e imunológica foi descrito. Vários estudos mostraram que essas sFLA₂s, do grupo IIA, estão presentes em níveis elevados na artrite reumatóide (HARA *et al.*, 1988), na pancreatite aguda (SHRÖDER *et al.*, 1980), no choque séptico (VADAS e PRUZANSKI, 1986), na doença de Crohn e colite ulcerativa (HAAPAMÄKI, *et al.*, 1999a,b), na síndrome do desconforto respiratório do adulto (STADEL *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1995), na asma brônquica, rinite alérgica (STADEL *et al.*, 1994) e na aterosclerose (MENSCHIKOWSKI *et al.*, 2006). Estas observações implicam que tanto a inflamação local quanto a sistêmica estão associadas à liberação de sFLA₂s *in vivo*, emergindo, assim, a questão, não esclarecida, do papel dessas FLA₂s em reações inflamatórias. Adicionalmente, foi verificado que citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF), induzem, em uma variedade de tecidos, a transcrição gênica de sFLA₂s e o subsequente aumento da secreção dessas enzimas, reforçando a hipótese do envolvimento das sFLA₂s na inflamação (SCHALKWIJK *et al.*, 1991; BECK *et al.*, 2003). Além disso, as sFLA₂s ativam eventos de sinalização intracelular, em células que participam de processos inflamatórios, a partir da geração segundos mensageiros, fosforilação de quinases (proteína quinase ativada por mitógenos, MAPKs) (BAEK *et al.*, 2001; BECK *et al.*, 2003).

Dessa forma, as sFLA₂s representam um importante alvo para a investigação, no que se refere aos mecanismos de eventos inflamatórios.

1.1.2 sFLA₂s isoladas de venenos de serpentes

1.1.2.1. Miotoxinas isoladas do veneno de *Bothrops asper*

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

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

Atualmente, são descritas dois tipos de sFLA₂s miotóxicas. As sFLA₂s, conhecidas como “clássicas”, contêm um aminoácido (aa) aspartato na posição 49 (Asp-49) e catalisam, de maneira dependente de Ca⁺², a hidrólise da ligação éster, na posição *sn*-2 de glicerofosfolipídeos. O outro tipo de sFLA₂s é descrito como “variante” e contém uma lisina na mesma posição 49 (Lys-49), sem atividade ou com baixa atividade catalítica (KRIZAJ *et al.*, 1991; PÓLGAR *et al.*, 1996). Tal substituição afeta a habilidade dessas proteínas se ligarem ao Ca⁺², que é um cofator essencial para estabilização do intermediário tetraédrico, que ocorre na reação catalítica, promovida pelas sFLA₂s Asp-49 (VAN DEN BERG *et al.*, 1995). Além disso, foi demonstrado, para algumas sFLA₂s Lys-49, a capacidade de estabelecer

uma ligação de alta afinidade com o ácido araquidônico, presente na membrana, de forma que este produto não pode ser liberado do sítio catalítico da enzima, sem ser detectado por ensaios convencionais de atividade enzimática, levando à inibição das enzimas, após um ciclo de catálise (LEE *et al.*, 2001). No entanto, um consenso sobre esta questão, ainda não foi alcançado.

As sFLA₂ Asp-49, miotóxicas, de venenos de serpentes, apresentam uma alta atividade catalítica, como as miotoxinas (MT) de *Bothrops atrox* e de *Bothrops godmani*, a MT-III de *Bothrops asper* e as frações SIII e SIV de *Bothrops insularis*. No entanto, as sFLA₂s Lys-49, com baixa ou nenhuma atividade catalítica, mantêm potente atividade miotóxica. Como exemplo, cita-se a MT-II, do veneno de *Bothrops asper*, a BTX-I de *Bothrops jararacussu*, a PrTX-I de *Bothrops pirajai*, a MjTX-I da *Bothrops moojeni* e a BnSP-7 da *Bothrops neuwiedi pauloensis*, que contêm uma molécula de lisina na posição 49 (Lys 49) (SOARES *et al.*, 2003). Neste contexto, foi descrito que resíduos hidrofóbicos e catiônicos, próximos à região C terminal FLA₂ Lys-49, são responsáveis pela ação miotóxica (CALDERÓN e LOMONTE, 1998; WARD *et al.*, 2002; LOMONTE *et al.*, 1994; 2003). Para algumas sFLA₂s Lys-49, foi demonstrada a necessidade da interação com o ácido araquidônico, para a exposição destes resíduos hidrofóbicos. No entanto, outras isoformas de sFLA₂s Lys-49, como a miotoxina-II, do veneno de *B. asper* e a bothropstoxina-I, do veneno de *B. jararacussu*, já possuem este sítio exposto (AMBROSIO *et al.*, 2005).

A partir do veneno da serpente *Bothrops asper*, da América Central, foram isoladas quatro miotoxinas (MT-I a MT-IV): duas delas, Asp-49, são cataliticamente ativas (MT-I e MT-III) e as outras duas (MT-II e MT-IV) são homólogas, Lys-49, sem atividade catalítica (LOMONTE e CARMONA, 1992; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995, 1997). Apesar da ausência de atividade enzimática, as FLA₂-Lys 49 mantêm a capacidade lesiva em membranas biológicas e sintéticas, por um mecanismo ainda pouco conhecido e independente de cálcio (DIAZ *et al.*, 1991). Neste contexto, LOMONTE *et al.* (1994) relataram que uma região da molécula da MT-II de *Bothrops asper*, rica em grupamentos hidrofóbicos e catiônicos, próxima ao C-terminal, seja relevante para a atividade miotóxica da mesma. De fato, foi demonstrado que a região que compreende os resíduos de aminoácidos 115 a 129, da MT-II, está associada aos efeitos miotóxicos e citotóxicos desta toxina (PÁRAMO *et al.*, 1998). Ainda, anticorpos, obtidos contra esse peptídeo, inibiram os efeitos miotóxicos e citotóxicos tanto do peptídeo quanto da MT-II *in vitro* (CALDERON e LOMONTE, 1998; 1999). No entanto, são necessários estudos adicionais, que investiguem, de modo mais detalhado, a relação entre a atividade catalítica e os efeitos fisiopatológicos dessas sFLA₂s de veneno.

Além dos efeitos miotóxicos, as MT-II e MT-III, de interesse neste estudo, desencadeiam outros efeitos biológicos semelhantes, como o efeito edematogênico (CHAVES, *et al.*, 1998), a hiperalgesia (CHACUR *et al.*, 2003), a atividade microbicide (PARAMO *et al.*, 1998) e o influxo leucocitário (GAMBERO *et al.*, 2004; ZULIANI *et al.*, 2005a). Essas miotoxinas induzem também a liberação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e tromboxana A₂ (TXA₂), em modelos experimentais *in vivo* (ZULIANI *et al.*, 2005a), a atividade fagocitária de macrófagos isolados (ZULIANI *et al.*, 2005b) e alterações do citoesqueleto (ZULIANI, 2005c). Adicionalmente, foi demonstrado que essas duas sFLA₂s promovem a liberação das citocinas IL-1, IL-6 e o TNF- α , a partir de leucócitos (ZULIANI *et al.*, 2005a). Uma vez que a IL-1 e o TNF- α são capazes de induzirem a expressão de COX-2 (BARRIOS-RODILES, 1998; JACOBS *et al.*, 1994; DIAZ *et al.*, 1998; ASANO *et al.*, 1997), que levam à formação de vários eicosanóides, o estudo dos efeitos destas toxinas, nas vias de síntese de prostanóides, reveste-se de importância.

1.1.2.2 sFLA₂ isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

As sFLA₂s provenientes de venenos de serpentes podem exibir ação neurotóxica (*opus cit.*). Para este efeito, tais enzimas evoluíram e tornaram-se potentes neurotoxinas, com seletividade para estruturas neuronais e proteínas aceptoras específicas do tecido neuronal (FAURE *et al.*, 2000). Essas toxinas podem ser agrupadas quanto aos seus efeitos sobre a junção neuromuscular (crotoxina, β -bungarotoxina), sistema nervoso autônomo (taipoxina), sistema nervoso central (β -bungarotoxina) e sinaptossomos (taipoxina, β -bungarotoxina e FLA₂ da *Naja naja siamensis*) (ROSSETTO *et al.*, 2006). As sFLA₂s com atividade pré-sináptica, compreendem uma lista bastante heterogênea e são encontradas em serpentes das famílias Hydrophidae, Elapidae e Viperidae e denominadas de β -neurotoxinas (BON *et al.*, 1994). Estas sFLA₂s inibem a liberação de acetilcolina, na junção neuromuscular, levando à morte, por paralisia respiratória (HAWGOOD 1989; ROSSETTO *et al.*, 2006).

Dentre as β -neurotoxinas, está uma classe de proteínas estruturalmente monoméricas, formadas por uma única cadeia polipeptídica, de 13-15 kDa, como a notexina, presente no veneno da serpente *Notechis scutatus scutatus* e a agkistrotoxina, do veneno da serpente *Agkistrodon blomhoffii brevicadus*. Uma outra classe compreende as FLA₂s neurotóxicas ligadas a outras subunidades polipeptídicas. Esta classe inclui, por exemplo, a taipoxina, da

serpente *Oxyuranus scutellatus scutellatus* e a crotoxina, do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, da América do Sul. A crotoxina (CTX), de interesse neste estudo, é o componente majoritário do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (BON *et al.*, 1989). A CTX é um heterodímero; uma de suas subunidades é composta por uma sFLA₂ alcalina, com forte atividade enzimática e fracamente tóxica, denominada componente B (CB) e a outra subunidade, por um polipeptídeo de caráter ácido, desprovido de atividade enzimática, conhecida como crotapotina (CA) (RÜBSAMEN *et al.*, 1971; HENDON e FRAENKEL-CONRAT, 1971; BREITHAUPT, 1976; BON, 1988). Quando presentes, 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 da expressão de diferentes RNA mensageiros dessas subunidades (FAURE *et al.*, 1991; 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2002; TOYAMA *et al.*, 2003; HERNANDEZ-OLIVEIRA *et al.*, 2005). Dessa forma, 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 que os componentes formadores de CTX se dissociam, logo após a sua interação com as membranas biológicas: a CB liga-se à membrana e desencadeia o efeito e a CA, desprovida de atividade farmacológica, é liberada do complexo (HABERMANN e 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 fracamente tóxico, CB, conferindo-lhe habilidade para interagir com sítios específicos e exercer a sua ação farmacológica (HABERMANN e BREITHAUPT, 1978; BON *et al.*, 1989).

A subunidade CB é uma proteína cuja sequência de aas é semelhante às das fosfolipases A₂ presentes no pâncreas de mamíferos e em venenos de serpentes (AIRD *et al.*, 1986). A CB é classificada como uma miotoxina com estrutura de FLA₂S, com propriedade neurotóxica (LOMONTE *et al.*, 2003). Quando a CB encontra-se associada à CA, a atividade hidrolítica é reduzida, porém as atividades neurotóxica e miotóxica são potencializadas (MARLAS e BON, 1982; KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986; BON *et al.*, 1989).

Além dos efeitos neurotóxicos, foi demonstrado que a CTX, injetada pela via subcutânea, induz neutrofilia pronunciada, com diminuição de linfócitos e monócitos circulantes, aumento do nível de corticosterona e das citocinas IL-6 e IL-10, este último um

importante mediador antiinflamatório (CARDOSO *et al.*, 2001). Além disso, foi descrito que a subunidade CA inibe a resposta edematogênica em ratos (LANDUCCI *et al.*, 1995). Ainda, SAMPAIO *et al.* (2003) mostraram que a CTX inibe funções de macrófagos, como o espriamento e a fagocitose e que a FLA₂ (CB), mas não a subunidade CA, é a responsável por este efeito inibitório (SAMPAIO *et al.*, 2005). Este resultado diferiu de trabalhos anteriores, que apontam a crotapotina como a fração responsável pelos efeitos antiinflamatórios e imunomodulatórios da crotoxina (LANDUCCI *et al.*, 1995, 2000a; GARCIA *et al.*, 2003). Considerando estes fatos e que a subunidade CB, quando não associada à CA, pode promover efeitos miotóxico (RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004) e edematogênico (LANDUCCI *et al.*, 2000a; CÂMARA *et al.*, 2003; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004), nota-se que ainda são necessários estudos adicionais para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas ações inflamatórias e imunomodulatórias causadas por esta sFLA₂.

Considerando que o estudo das ações de sFLA₂s secretórias, sobre os elementos envolvidos na estimulação funcional de leucócitos, é um aspecto pouco explorado na literatura, este trabalho poderá favorecer o entendimento das ações de sFLA₂ de venenos de serpentes da família Viperidae e das sFLA₂s de mamíferos, do grupo IIA, de um modo geral, em mecanismos que levam à produção de prostanoídes. Dada a dificuldade de obtenção de sFLA₂s humanas, com atividades inerentes conservadas e em quantidades suficientes, quer por processos de isolamento e purificação, quer por clonagem e expressão, o detalhamento dos efeitos das sFLA₂ de venenos poderá evidenciar proteínas, potencialmente úteis, para o estudo de mecanismos e funções celulares específicas e/ou de mecanismos de ação de sFLA₂ de mamíferos.

1.2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de toxinas, com estrutura de sFLA₂, como da MT-II (Lys-49), destituída de atividade enzimática, da MT-III (Asp-49), enzimaticamente ativa, isoladas do veneno de *Bothrops asper* e, da CB2, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em mecanismos envolvidos na liberação de prostanóides, em leucócitos, *in vivo* e *in vitro*.

- I- A partir de estudos *in vivo* foram avaliados os efeitos da injeção intraperitoneal das toxinas em questão, em camundongos, quanto:
 - a) à liberação de prostaglandinas;
 - b) à expressão de COX-1 e COX-2 por leucócitos peritoneais totais;
 - c) à atividade enzimática de COX-1 e COX-2.

- II- Em estudos *in vitro* foram investigados os efeitos das toxinas, sobre macrófagos peritoneais, isolados, quanto:
 - a) à liberação de prostaglandinas;
 - b) à expressão de COX-1 e COX-2;
 - c) à participação das FLA₂s intracelulares e do NF-κB, nestes eventos.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, de peso compreendido entre 18 e 20 g, obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de biotério, com água e alimentação *ad libitum*, até o momento dos experimentos. Esses estudos foram realizados segundo as normas determinadas pela Comissão de Ética de Utilização de Animais de Experimentação, do Instituto Butantan sob o protocolo 177/04 e do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, sob o número 134, folha 10, do livro 2.

1.3.2 Toxinas

As fosfolipases FLA₂-Lys-49 (MT-II) e FLA₂-Asp-49 (MT-II) foram isoladas e purificadas a partir do veneno de *Bothrops asper*, de acordo com o método de LOMONTE e GUTIÉRREZ (1989) e KAISER *et al.* (1990) e, respectivamente. A atividade fosfolipásica das MTs purificadas MT-II foi verificada pelo método descrito em GUTIÉRREZ *et al.* (1986) e LOMONTE e GUTIÉRREZ (1989). A FLA₂, isoforma CB2, foi isolada e purificada a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, segundo HENDON e FRAENKEL-CONRAT (1971) e SOARES *et al.* (2001). A homogeneidade das três toxinas foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970). As MT-II e MT-III foram fornecidas pelo Dr. José Maria Gutiérrez, do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica. A CB2 foi fornecida pelo Dr. Andreimar M. Soares, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. As toxinas foram liofilizadas e mantidas a -20 °C, até o momento de sua utilização.

1.3.3 Ensaios *in vivo*: injeção das toxinas e obtenção de leucócitos peritoneais

Para os estudos *in vivo*, as MT-II, MT-III, e CB2 foram diluídas em salina apirrogênica (0,9%), pH 7,2 e filtradas em filtros esterilizantes, de poro de 0,22 µm, e injetadas na cavidade peritoneal dos animais (i.p.), nas doses de 1, 1 e 0,25 mg/kg, respectivamente, em volume constante de 1 mL/ cavidade. Os animais do grupo controle receberam administração i.p. de volume equivalente de solução salina apirrogênica.

Decorridos, 1, 3, 6 e 12 h da injeção das toxinas, os animais foram mortos sob atmosfera excessiva de CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 2,0 mL de salina, pH 7,2. Após a coleta e homogeneização do líquido de lavagem, uma alíquota foi diluída em Solução de Turk (1:20; v/v), para a contagem do número total de leucócitos, em câmara de Neubauer e microscopia de luz. A seguir, uma alíquota contendo 1×10^6 células foi, então, centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22°C. O precipitado de leucócitos totais foi utilizado para a análise da expressão das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) por *western blot*. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de PGE₂ e PGD₂, por ensaio imunoenzimático específico (EIA). Para a análise da atividade catalítica das COXs, foram utilizadas alíquotas de 1×10^7 leucócitos.

1.3.4 Ensaios *in vitro*: coleta de macrófagos peritoneais e preparação das amostras

Para os estudos *in vitro*, os macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal. Para a coleta das células, os animais foram mortos sob atmosfera excessiva de CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 2 mL de solução salina apirogênica 0,9 % pH 7,2. Após a coleta e homogeneização do líquido de lavagem, uma alíquota foi diluída (1:20 v/v) em solução de Turk, para a contagem do número total de leucócitos, em câmara de Neubauer e microscopia de luz. A predominância de macrófagos (>95%) foi confirmada por características morfológicas e de coloração, em esfregaços celulares corados com Hema³[®] (Fisher, USA). Uma alíquota contendo 1×10^6 células foi então centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22°C. O precipitado celular foi ressuspenso em meio de cultura RPMI (Sigma Aldrich Company, USA) e incubados em tubos de polipropileno com a MT-II ou MT-III ou CB2 (6,5 µg/mL) em períodos de 1, 3, 4,5 e 6 horas. Ao final de cada período de incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22°C. A seguir, o precipitado celular foi utilizado para a análise da expressão das COX-1 e COX-2, por *western blot* e o sobrenadante para a dosagem de PGE₂ ou PGD₂, por EIA.

1.3.5 Tratamentos com inibidores específicos

Para a avaliação da participação do NF-κB, cFLA₂ e iFLA₂, as células, obtidas segundo o protocolo descrito no item 4, foram incubadas com 50 µL dos diferentes inibidores ou seus veículos (controles), por diferentes períodos de tempo, antes da adição da MT-II ou da MT-III ou da CB2 (6,5 µg/mL) e analisadas quanto à expressão de COXs e/ou liberação de PGs, como descrito nos itens 7 e 8.

Abaixo estão indicadas as condições de incubação das células com os diferentes compostos utilizados, previamente à adição das toxinas:

- N- α -tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) (2,5 μ M), por 30 min - inibidor da ativação de NF- κ B (KIM *et al.*, 1995);
- Peptídeo SN50, por 30 min - competidor da translocação do NF- κ B ativado para o núcleo (LIN *et al.*, 1995);
- Araquidonil trifluormetil cetona (AACOCF₃) (20 μ M), por 2 h - inibidor da cFLA₂ (MARSHALL, *et al.*, 1997);
- palmitoil trifluormetil cetona (PACOCF₃) (4 μ M), por 2 h - inibidor da iFLA₂ (ACKERMANN *et al.*, 1995).

Após os períodos de incubação prévia, os compostos foram mantidos no meio de incubação com as toxinas.

1.3.6 Determinação do efeito citotóxico

1.3.6.1 Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A atividade enzimática da LDH, presente no sobrenadante das culturas, foi tomada como parâmetro da viabilidade celular. Após cada período de incubação, descritos no item 4, o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 200 x g, por 6 minutos. A seguir, 30 μ L do sobrenadante foram adicionados a outras placas de cultura de 96 poços, acompanhados da adição de 200 μ L do substrato, em tampão fosfato contendo: NaCl 200 mM, NADH 0,2 mM, piruvato 1,6 mM/poço. A leitura da D.O. foi feita a 340 nm, no intervalo de tempo entre 0 e 10 minutos. Os resultados foram expressos pelo decréscimo da D.O., resultante da oxidação do NADH, na presença de piruvato, em relação ao tempo zero.

1.3.6.2 Ensaio da redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il 2,5-difenil tetrazol (MTT)

A atividade metabólica dos macrófagos peritoneiais isolados foi avaliada pelo método da redução do MTT. Após cada período de incubação, descritos no item 4, as células foram centrifugadas a 1000 rpm, por 10 minutos, e o sobrenadante de cada amostra foi retirado. A seguir, foram acrescentados, em cada poço, 100 μ L de meio RPMI e 10 μ L de MTT em solução a 5 mg/mL, tamponada. Em seguida, os macrófagos isolados foram incubados a

37°C, em estufa a 5% de CO₂, por 3 horas. Para dissolver os cristais de formazan, oriundos da redução do MTT pelas células viáveis, foram adicionados 100 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 5%, em HCl 0,01 N. As placas foram então incubadas por mais 18 horas. Após este período, D.O. foi determinada a 540 nm, em espectrofotômetro. A viabilidade foi definida como a porcentagem de diminuição da D.O., observada na monocamada submetida à ação dos agentes, em relação à monocamada controle.

1.3.7 Análise por Western blot

Os precipitados celulares, resultantes tanto dos estudos *in vivo* quanto *in vitro*, foram lisados com 100 µL de tampão de amostra (LAEMMLI, 1970) (SDS 20%; glicerina; β-mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6,8; Azul de bromofenol a 0,1%) e aquecidas a 100°C, por 10 minutos.

As proteínas, contidas em alíquotas de 14 µL de amostra, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE). Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 150 V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas, em sistema tamponado, para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, UK), com uma voltagem de 100 V, durante 90 minutos, a 4°C. Os sítios inespecíficos, da membrana de nitrocelulose, foram bloqueados por uma solução contendo leite desnatado a 5% em tampão de lavagem (10% Tween-20, pH 7,4), durante 1 hora. A seguir, para a detecção de COX-1 e COX-2, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (Cayman Co., USA) ou COX-2 (Cayman Co., USA) (diluição 1:1500 v/v e 1:2000 v/v, respectivamente), durante 1 hora. Em seguida, foi adicionado um segundo anticorpo, conjugado à peroxidase, para a detecção das COX-1 e -2 (anti-IgG de camundongo, 1:1500 v/v e anti-IgG de coelho, 1:2000 v/v) (GE Healthcare, UK), durante 1 hora. Para o controle do *western blot*, as membranas foram incubadas também com anticorpo monoclonal anti-β-actina (Sigma Aldrich Company, USA) na diluição de 1:2000 v/v e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (GE Healthcare, UK) na diluição de 1:1500 v/v.

As bandas imunoreativas para as isoformas da COX-1 e COX-2 foram reveladas por quimiluminescência, com solução de luminol (GE Healthcare, UK) e, em seguida, reveladas em filme (GE Healthcare, UK), em câmara escura. As densidades das bandas foram determinadas pelo Densitômetro GS 700 (Bio Rad Laboratories, USA) utilizando o programa de análise *Molecular Analyst*[®] (Bio Rad Laboratories, USA) e normalizadas a partir das densidades das bandas de β-actina.

1.3.8 Determinação da concentração de PGE₂ e PGD₂ por ensaio imunoenzimático específico (EIA)

Os sobrenadantes obtidos segundo a descrição dos itens 3 e 4, primeiramente passaram por um processo de extração de prostaglandinas, por meio de Colunas Sep Pak C-18. Estas colunas foram previamente ativadas com 10 mL de etanol absoluto, seguido de 20 mL de água de água ultrapura. Em seguida os sobrenadantes foram acidificados (pH 3,5) com solução de HCl 0,1 N e adicionados às colunas. Posteriormente, as colunas foram lavadas com uma solução de etanol a 35% e, finalmente, com etanol absoluto, para a eluição das prostaglandinas (PRADELLES *et al.*, 1985). Os eluatos foram concentrados por um sistema de centrifugação a vácuo (Savant) e, posteriormente, ressuspensos em tampão específico e analisados por EIA, utilizando-se um kit comercial (Cayman Chemical, USA). O teor de recuperação de PGE₂ e PGD₂ (>95%) foi confirmado com aplicação dos respectivos padrões.

Para a dosagem de PGD₂, após o processo de extração, as amostras correspondentes passaram por um processo de derivatização. Para esta etapa, foi adicionado o reagente para derivatização (Metil Oximação), seguido de aquecimento a 60°C por 30 min e centrifugação por 10 minutos a 1000 rpm, para a obtenção da PGD₂ metoxima (PGD₂-MOX), que é mais estável para o EIA.

Alíquotas, contendo 50 µL de cada amostra, foram adicionadas às placas de 96 poços e incubadas com igual volume do prostanóide conjugado à acetilcolinesterase e antisoro específico de coelho. Após a adição do substrato, absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro de microplaca (LabSystem Multiscan®) a 405 nm e as concentrações foram estimadas a partir da curva padrão específica em concentrações em pg/mL.

1.3.9 Determinação da atividade enzimática das COX-1 e de COX-2

Uma alíquota contendo 1×10^7 células, obtida como descrito no item 3, foi ressuspensa e sonicada em 100 µL de tampão Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,8, contendo 1 mM EDTA e, em seguida, centrifugada a $10.000 \times g$ por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido para análise e estocado em gelo. A atividade enzimática das COXs foi determinada de acordo com o protocolo do fabricante do kit comercial (Cayman Chemical, USA), em placas de 96 poços. Em resumo, cada amostra foi dividida em três alíquotas de 10 µL, sendo que em uma delas, foi utilizada para o ensaio da atividade total de COXs; na segunda alíquota foi adicionado o inibidor de COX-1 (SC-560) para a determinação diferencial das duas isoformas; a terceira a amostra constituiu o controle negativo da reação (branco), que foi

fervida por 10 minutos a 100°C, para inativação enzimática. Em cada amostra foi adicionado 0,5 µM de heme. Após 5 minutos de incubação, 10 µM of TMPD (N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine) e 100 µM de ácido araquidônico foram adicionados e, após alguns segundos de homogeneização, a placa foi novamente incubada por 5 minutos, a 25°C. As absorbâncias das amostras foram determinadas no comprimento de onda de 590 nm. O valor de absorbância real de cada amostra foi determinado pela subtração do valor do branco. A atividade enzimática foi calculada, segundo a recomendação do fabricante, utilizando-se o valor do coeficiente de extinção de TMPD ($0,00826^{-14}$), pela seguinte equação:

$$\text{Atividade de COX} = \frac{\Delta A_{590}/5 \text{ min}}{0,00826 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,21 \text{ mL}}{0,01 \text{ mL}} + 2 = \text{nmol/ min/ mL}$$

A atividade da COX-2 corresponde às amostras que foram incubadas com o composto SC-560, enquanto a atividade de COX-1 foi determinada pela subtração da atividade total (amostras sem inibidor), com a atividade das amostras incubadas com o inibidor de COX-1.

1.3.10 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

1.3.11 Soluções utilizadas

1.3.11.1 Líquido de Turk

Ácido acético.....	2,0 mL
Cristal violeta 1%.....	1,0 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

1.3.11.2. Meio de Cultura RPMI (Solução Estoque)

RPMI 1640.....	10,4 g
Na ₂ HCO ₃	2,0 g
Hepes.....	2,383 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

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

RPMI.....	100 mL
L-glutamina	1,0 mL
Garamicina.....	50 µL

1.3.11.4 Solução de Glutamina (2 mM)

L-glutamina.....	0,292 g
Solução salina q.s.p.....	1000 mL

1.3.11.5 SOLUÇÕES PARA DOSAGEM DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

1.3.11.5.1 Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4

Solução A (Solução Na₂HPO₄·H₂O 0,2 M)

Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O.....	28 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

Solução B (Solução Na₂HPO₄·7H₂O 0,2 M)

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O.....	28 g
Água destilada q.s.p.....	1000 mL

1.3.11.5.2 Tampão de Uso

Solução A.....	1,9 mL
Solução B.....	8,1 mL
NaCl.....	0,23 g
NADH.....	0,0028 g
Piruvato de Sódio.....	0,32 mL
Água destilada q.s.p.....	20 mL

1.3.11.6 SOLUÇÕES PARA WESTERN BLOT

1.3.11.6.1 Tampão Tris-HCl 2M (pH 8,8)

Tris base.....	24,2 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

1.3.11.6.2 Tampão Tris-HCl 1M (pH 6,8)

Tris base..... 12,1 g
 Água destilada q.s.p.....100 mL

1.3.11.6.3 Solução SDS 10%

SDS.....10 g
 Água destilada q.s.p.....100 mL

1.3.11.6.4 Solução Azul de Bromofenol 1%

Azul de bromofenol.....0,1 g
 Água destilada q.s.p.....10 mL

1.3.11.6.5 Solução de Acrilamida 30% (Solução A)

Acrilamida.....29,2 g
 Bis-acrilamida.....0,8 g
 Água destilada q.s.p.....100 mL

1.3.11.6.6 Solução para o Gel de Separação (Solução B)

Tampão Tris-HCl (pH 8.8) 2 M.....75 mL
 SDS 10%.....4 mL
 Água destilada.....21 mL

1.3.11.6.7 Solução para o Gel de Empilhamento (Solução C)

Tampão Tri-HCl (pH 6.8) 1 M.....50 mL
 SDS 10%.....4 mL
 Água destilada.....46 mL

1.3.11.6.8 Persulfato de Amônio 10%

Persulfato de amônio.....0,5 g
 Água destilada.....5 mL

1.3.11.6.9 Tampão de Eletroforese (pH 8,3)

Tris.....3 g
 Glicina.....14,4 g
 SDS.....1g

Água destilada q.s.p.....1 L

1.3.11.6.10 Tampão de Transferência (pH 8,3)

Tris.....3 g

Glicina.....14,4 g

Água destilada q.s.p.....1 L

1.3.11.6.11 Tampão de Lavagem (pH 7,2)

NaCl.....4 g

KCl.....0,1 g

Tris.....1,5 g

Tween-20.....0,5 mL

Água destilada q.s.p.....500 mL

1.3.11.6.12 Gel de Separação 10%

Solução A.....3,33 mL

Solução B.....2,5 mL

Água destilada.....4,0 mL

Persulfato de Amônio.....50 µL

TEMED.....10 µL

1.3.11.6.13 Gel de Empilhamento

Água destilada.....2,3 mL

Solução A.....0,67 mL

Solução C.....1,0 mL

Persulfato de amônio.....30 µL

TEMED.....5 µL

1.3.11.6.14 Corante Comassie Blue R

Comassie Blue (R-250).....0,5 g

Metanol.....225 mL

Ácido acético.....50 mL

Água destilada q.s.p.....225 mL

1.3.11.6.15 Solução Descorante

Etanol.....	5 mL
Ácido acético.....	7,5 mL
Água destilada q.s.p.....	100 mL

1.3.11.6.16 Solução Ponceau-S

Corante de Ponceau-S.....	0,2 g
Ácido Tricloroacético.....	3 g
Água destilada q.s.p.....	100 mL

1.3.11.6.17 Tampão de Amostra (Tampão Laemmli)

Tampão Tris 1M (pH 6,8).....	0,44 mL
SDS 20 %.....	1,11 mL
Glicerol.....	1,11 mL
Mercaptoetanol.....	111 µL
Corante Azul de Bromofenol 1%.....	222 µL
Água destilada q.s.p.....	10 mL

1.3.11.6.18 Tampão “Stripping”

Tampão Tris 0,5 M pH 6,8.....	1,25 mL
SDS 20%.....	2 mL
β-mercaptoetanol.....	25 µL
Água destilada q.s.p.....	10 mL

1.3.12 Lista de Reagentes

- AACOCF3 (Calbiochem, GE)
- Ácido acético glacial (Merck, GE)
- Ácido clorídrico (Merck, GE)
- Ácido tricloroacético (Merck, USA)

Acrilamida (Bio Rad Laboratories, USA)

Anticorpos primários:

- anti-COX-2 (Cayman Chemicals, USA)
- anti-COX-1 (Cayman Chemicals, USA)
- anti- β -actina (Sigma Aldrich Co.,USA)

Anticorpos secundários:

- anti-mouse (GE Healthcare,USA)
- anti-rabbit (GE Healthcare, USA)

Azul de Bromofenol (Bio Rad Laboratories, USA)

Bis-acrilamida (Bio Rad Laboratories, USA)

Comassie Blue (Bio Rad Laboratories, USA)

Cristal Violeta (Inlab, Brasil)

Garamicina (Shering-Plough, GE)

Glicerol (JT Backer, USA)

Glicogênio de ostra (Sigma Aldrich Co., USA)

Hema₃ (Fisher Scientific Company, USA)

Heparina (Roche, Brasil)

Hepes (Sigma Aldrich Co., USA)

ECL (GE Healthcare,UK)

EDTA (Sigma Aldrich Co., USA)

Etanol (Merck, GE)

Fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Sigma Aldrich Co, USA)

Fosfato de sódio monobásico (Sigma Aldrich Co., USA)

Glicina (Bio Rad Laboratories, USA)

Kit para dosagem de PGD₂ e PGE₂ (Cayman Chemicals, USA)

Kit para dosagem de atividade de COX (Cayman Chemicals, USA)

Leite desnatado em pó (Glória, Brasil)

L-glutamina (Amresco, USA)

β -mercaptoetanol (Calbiochem, GE)

Metanol (Merck, Ge)

MTT (Sigma Aldrich Co., USA)

NADH (Sigma Aldrich Co. USA)

PACOCF₃ (Calbiochem, GE)

Padrão de peso molecular (GE Healthcare,UK)

Persulfato de amônia (Bio Rad Laboratories, USA)

Piruvato de sódio (Sigma Aldrich Co., USA)

Ponceau.-S (Amresco, USA)

RPMI-1640 (Sigma Aldrich Co., USA)

SDS (Bio Rad Laboratories, USA)

SN50 (Calbiochem, GE)

Sais (Merck, GE)

Solução salina apirrogênica 0,9%, pH 7,2 (Aster, Brasil)

TPCK (Calbiochem, GE)

Tris base (GE Healthcare,UK)

TEMED (GE Healthcare, UK)

Tween-20 (Sigma Aldrich Co., USA)

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Liberação de PGD₂ e PGE₂ induzida pelas miotoxinas II e III e pela CB2, na cavidade peritoneal de camundongos

A concentração de PGD₂ e PGE₂, na cavidade peritoneal dos camundongos, foi avaliada no sobrenadante do lavado peritoneal, coletado após 1, 3, 6 e 12 horas da injeção i.p. de MT-II, III e CB2 ou salina apirogênica (Controle). As doses das miotoxinas e CB2, utilizadas, foram baseadas em dados da literatura (CHISARI *et al.*, 1998; ZULIANI, 2001). As Figuras 1.1A e 1.1B mostra que a injeção i.p. de salina (Controle) não alterou a produção basal de PGD₂ e PGE₂, em todos os períodos estudados, com valores médios de 72±15 pg/mL e de 1466± 123 pg/mL, respectivamente. A Figura 1.1A mostra que a injeção i.p. de MT-II ou de MT-III ou de CB2 causou aumento significativo da concentração da PGD₂, nas 1^a e 3^a horas de suas injeções. O aumento da liberação de PGD₂, na 1^a hora, foi da ordem de 388%, 524% e 758%, respectivamente, em comparação ao controle. No período de 6 a 12 horas, a injeção da MT-II e a MT-III não causou diferença significativa em relação aos níveis basais, mas a CB2 promoveu novo aumento da liberação de PGD₂, da ordem de 548%, quando comparado aos controles. A Figura 1.1B mostra que a injeção i.p. de MT-II causou aumento significativo da concentração da PGE₂ nas 1^a e 12^a horas de sua injeção, com percentual médio de 319%, se comparado aos controles. A injeção de MT-III causou um aumento significativo da liberação de PGE₂, desde a 1^a hora até as 12 horas, com percentual médio de 335%, em relação aos controles. A Figura 1.1B mostra, também, que a injeção i.p. de CB2 causou aumento significativo da concentração da PGE₂, entre 3 e 12 h de sua injeção, com aumento médio 2000%, se comparado aos controles. Na 1^a hora, não houve diferença significativa em relação ao controle.

Figura 1.1 Liberação de PGD₂ e PGE₂ induzida pelas MT-II, MT-III e CB2. Os animais receberam injeção i.p. de MT-II ou III (1 mg/kg) ou CB2 (0,25 mg/kg) ou salina apirrogênica (0,9%) (Controle). As concentrações de PGD₂ (A) e de PGE₂ (B) foram avaliadas por EIA, como descrito em Material e Métodos, em lavados peritoneais coletados 1, 3, 6 e 12 horas após aquelas injeções. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4-5 animais. *p < 0,05, em relação aos controles. ()p < 0,05 em relação à MT-III 6 h. #p < 0,05 em relação à MT-II 12 h. +p < 0,05 em relação à MT-III 12 h. (ANOVA).

1.4.2 Efeito das miotoxinas II e III na expressão de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais

A expressão da COX-1 e da COX-2 foi analisada em leucócitos totais, coletados da cavidade peritoneal dos animais após 1, 3, 6 e 12 horas da injeção das MT-II e -III ou salina apirogênica (Controle). A Figura 1.2A mostra as bandas imunoreativas para COX-1 e/ou COX-2, obtidas em homogenatos de leucócitos coletados após a injeção de MT-II ou III ou salina. As bandas protéicas correspondentes à COX-1 foram detectadas tanto em homogenatos de leucócitos controles, quanto de animais injetados com a MT-II ou MT-III, em todos os períodos analisados. Por outro lado, bandas imunoreativas para COX-2 foram reveladas em homogenatos de leucócitos coletados 1, 3, 6 e 12 h após a injeção da MT-II e MT-III, mas não de animais que receberam salina apirogênica. A análise densitométrica mostra que, para as duas miotoxinas, a intensidade das bandas de COX-2 foi significativa entre 1 e 12 h (Figura 1.2B). Ainda, na 1^a hora, a expressão de COX-2, para MT-II, foi significativamente maior do que para MT-III. As intensidades das bandas de COX-1 não foram modificadas significativamente, após a injeção de MT-II ou MT-III, em relação aos controles, nos períodos de tempo analisados (dados não demonstrados).

Figura 1.2 Efeito das miotoxinas II e III na expressão de COX-1 e 2 por leucócitos peritoneais. Leucócitos peritoneais foram coletados 1, 3, 6 e 12 h após a injeção i.p. da miotoxina II ou III (1 mg /kg) ou salina apirrogênica (Controle). As células foram lisadas e submetidas ao *western blot*: **(A)**: *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:2000), anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000), representativo de amostras de homogenatos de leucócitos peritoneais de camundongo (n=3). **(B)**: Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β-actina. *p< 0,05, em relação aos controles. #p< 0,05 em relação à MT-III 1 h. (ANOVA).

1.4.3 Efeito das CB2 na expressão de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais

A expressão da COX-1 e da COX-2 foi analisada em leucócitos totais, coletados da cavidade peritoneal dos animais, após 1, 3, 6 e 12 horas da injeção de CB2 ou salina apirogênica (Controle). A Figura 3A mostra que a CB2 não alterou a expressão constitutiva COX-1 e não induziu a expressão de COX-2, em homogenatos celulares, nos períodos de tempo avaliados. A análise densitométrica (Figura 1.3B) mostra que não houve alteração significativa da expressão constitutiva de COX-1, em relação aos controles, em todos os períodos estudados após a injeção de CB2.

Figura 1.3 Efeito da CB2 na expressão de COX-1 e -2 por leucócitos peritoneais. Leucócitos peritoneais foram coletados 1, 3 e 6 e 12 horas após a injeção i.p. da CB2 (0,25 mg/kg) ou salina apirogênica (0,9%) (Controle) em volume final de 1 mL. As células foram lisadas e analisadas por *western blot*: (A): *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:2000), anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000), representativo de amostras de homogenatos de leucócitos peritoneais (n=3). (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-1, normalizadas a partir das bandas de β-actina (ANOVA).

1.4.4 Efeito da MT-II e MT-III sobre a atividade catalítica de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais

A atividade enzimática, da COX-1 e COX-2, foi verificada em leucócitos totais, coletados da cavidade peritoneal de camundongos após 1, 3, 6 e 12 h da injeção das miotoxinas ou salina apirogênica (Controle). Como demonstrado na Figura 1.4B, as duas miotoxinas não afetaram, de forma significativa, a atividade enzimática da COX-1, em nenhum dos períodos analisados. Por outro lado, tanto a MT-II quanto a MT-III aumentaram a atividade catalítica da COX-2 (Figura 1.4A), de forma significativa, em relação aos respectivos grupos controles, desde a 1ª até as 12ª hora. Não houve diferença estatística entre os efeitos das duas miotoxinas nos períodos de tempo estudados.

Figura 1.4 Efeito da MT-II e MT-III sobre a atividade enzimática de COX-1 e 2 em leucócitos peritoneais.

Os animais foram injetados com a MT-II e MT-III i.p. (1 mg/kg) ou salina apirogênica (0,9%) (Controle), em volume final de 1 mL. As células foram lisadas e as atividades enzimáticas de COX-1 e de COX-2 foram determinadas em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 6, 12 h), por ensaio colorimétrico, como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos controles. (ANOVA).

1.4.5 Liberação de PGD₂ e PGE₂, a partir de macrófagos peritoneais isolados, induzida, *in vitro*, pelas miotoxinas II e III e pela CB2

Para avaliar a liberação das PGD₂ e E₂, *in vitro*, macrófagos peritoneais, residentes, isolados, foram incubados, em suspensão, por 1 a 6 h, com as MT-II ou III ou CB2 (6,5 µg/mL) ou meio de cultura apenas (RPMI) (Controle). A concentração das toxinas, ora empregada, foi previamente testada quanto à citotoxicidade, pela análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH). Em períodos de até 6 h, esta concentração não alterou, de modo significativo, a viabilidade celular (> 90% células viáveis) (dados não demonstrados).

As Figuras 1.5A e 1.5B mostram que os macrófagos controles, incubados apenas com RPMI (Controle), apresentaram uma liberação média de 192±30 pg/mL de PGD₂ e de 3463±215 pg/mL de PGE₂, ao longo do período estudado. Após a incubação das células com a MT-II, os níveis de PGD₂ foram aumentados, de modo significativo, em cerca de 650 %, entre a 1^a e a 6^a hora. A partir das 3 horas, a incubação com a MT-III e CB2 causou aumento significativo da produção desse prostanóide, em relação ao controle. Na 6^a hora, o aumento de PGD₂ foi da ordem de 450% e 621%, respectivamente. Na primeira hora, tanto a MT-III quanto a CB2 não modificaram o nível de PGD₂, se comparado ao controle. Figura 1.5B mostra que tanto a MT-II quanto a MT-III aumentaram significativamente a concentração de PGE₂, em percentuais médios de 725% e 500%, respectivamente, entre 1 e 6 horas de incubação, em comparação aos controles. A CB2 causou aumento significativo da concentração de PGE₂, entre a 3^a e 6^a hora de incubação, máximo na 6^a h (804% de aumento). Na 1^a hora de incubação, a concentração da PGE₂, liberada pela MT-II, foi significativamente maior do que a induzida pela MT-III e CB2.

Figura 1.5 Liberação de PGD₂ e PGE₂ induzida pelas MT-II, MT-III e CB2 em macrófagos residentes em cultura. Macrófagos peritoneais isolados (1×10^6 células/ 1mL RPMI) foram incubados, em suspensão, com a MT-II ou a MT-III ou a CB2 (6,5 µg/ mL) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂. As concentrações de PGD₂ (A) e PGE₂ (B) foram avaliadas por EIA, como descrito em Material e Métodos, nos sobrenadantes das culturas. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em relação aos controles. # $p < 0,05$ em relação à CB2 3 h. () $p < 0,05$ em relação à MT-III 1 h. $\phi p < 0,05$ em relação à CB2 6 h. (ANOVA).

1.4.6 Efeitos das MT-II e MT-III na expressão de COX-2 e COX-1 em macrófagos peritoneais residentes, isolados

A expressão da COX-1 e da COX-2 foi analisada em macrófagos peritoneais residentes, isolados e incubados em suspensão, com a MT-II ou a MT-III ou apenas em meio de cultura (RPMI) (Controle), por 1, 3, 4,5 e 6 h. Ensaios preliminares, realizados com macrófagos elicitados ou residentes, aderidos a placas de Petri, mostraram que o fenômeno de aderência dos macrófagos às placas *per se*, estimulou, de modo marcante, a expressão da COX-2 pelos macrófagos, o que inviabilizaria a observação de um eventual efeito estimulatório dos agentes em estudo (dados não demonstrados). Estas observações estão de acordo com TORDJMAN *et al.*, (1995). Por este motivo, optou-se por estudos com macrófagos residentes, em suspensão, pois, neste protocolo, o fenômeno é menor.

A Figura 1.6A demonstra as bandas imunoreativas para COX-1 e/ou COX-2, obtidas em células controles ou incubadas com as MT-II ou MT-III. A análise densitométrica, das bandas obtidas, revelou que as células controles expressaram a COX-1, em todos os períodos de tempo analisados e não apresentaram um padrão significativo de expressão de COX-2. Após a incubação das células com a MT-II ou a MT-III, não houve alteração nas intensidades das bandas correspondentes à COX-1, em todos os períodos de tempo analisados (dados não demonstrados). Por outro lado, como mostra a Figura 1.6B, houve aumento significativo das intensidades das bandas de COX-2 entre a 3^a e 6^a h, máximo entre 3 e 4,5 h, em comparação aos controles, com aumentos percentuais médios de 254% e 520%, para a MT-II e MT-III, respectivamente. O efeito da MT-III foi significativamente maior do que o da MT-II, no período de máxima indução correspondente a 3 e 4,5 h. Na 1^a de incubação com as miotoxinas, não houve diferença na expressão da COX-2, em relação aos controles.

Figura 1.6 Efeitos das MT-II e -III na expressão protéica de COX-1 e -2, por macrófagos peritoneais residentes isolados. Macrófagos peritoneais isolados (1×10^6 células/ 1mL RPMI) foram incubados, em suspensão, com as MT-II ou MT-III (6,5 μ g/ mL) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 4,5 e 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂. (A): *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:2000); anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:2000), representativo (n=3) de amostras de homogenatos de leucócitos peritoneais. (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2 normalizadas a partir das bandas de β -actina. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4-5 animais. *p< 0,05 em relação aos controles. #p< 0,05 em relação à MT-II 3 h. ϕ p< 0,05 em relação à MT-II 4,5 h. (ϕ p< 0,05 em relação à MT-III 1 h. (ANOVA).

1.4.7 Efeito da CB2 na expressão de COX-2 e COX-1 em macrófagos peritoneais residentes, isolados

A expressão da COX-1 e da COX-2 foi analisada em macrófagos, isolados e incubados em suspensão, com a CB2 ou apenas com meio de cultura (RPMI) (Controle), por 1, 3, e 6 h. A Figura 1.7A demonstra as bandas imunoreativas para COX-1 e COX-2, obtidas em células controles ou incubadas com a MT-II ou MT-III. A análise densitométrica, das bandas obtidas, revelou que as células controles expressaram a COX-1, em todos os períodos de tempo analisados (Figura 1.7B) e não apresentaram um padrão significativo de expressão de COX-2 (dados não demonstrados). Após a incubação das células com a CB2, por 1, 3 ou 6 h não foi observada a expressão de COX-2, em comparação aos controles (dados não demonstrados). Em relação à COX-1, a Figura 1.7B demonstra que não houve diferença significativa, na expressão dessa isoforma, entre os grupos, em entre todos os períodos de tempo analisados.

Figura 1.7 Efeito da CB2 na expressão protéica de COX-1 e -2 por macrófagos peritoneais residentes isolados. Macrófagos peritoneais isolados (1×10^6 células/ 1mL RPMI) foram incubados, em suspensão, com a CB2 (6,5 µg/ mL) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂. (A): *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:2000); anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000), representativo (n=3) de amostras de homogenatos de leucócitos peritoneais. (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-1 normalizadas a partir das bandas de β-actina. (ANOVA).

1.4.8 Efeito do AACOCF₃ e PACOCF₃ na produção de PGD₂ e PGE₂, por macrófagos isolados, induzida pelas MT-II ou -III ou CB2 *in vitro*

Para analisar a participação das cFLA₂ e iFLA₂, na liberação de PGE₂ e PGD₂, estimulada pelas MT-II ou MT-III ou CB2, os macrófagos foram incubados com inibidores específicos de fosfolipases A₂ intracelulares. As concentrações dos inibidores AACOCF₃ (20 µM) e PACOCF₃ (4 µM), utilizadas neste estudo, foram baseadas na literatura (MARSHALL *et al.*, 1997; ACKERMANN *et al.*, 1995).

Como mostram as Figuras 1.8A e 1.8B, em macrófagos, incubados com o veículo ou com os inibidores apenas (controles não estimulados), por 6 h, a produção média de PGD₂ foi de 82±5,68 pg/mL e de PGE₂ foi de 283,41±66,82 pg/mL. Estas concentrações de prostaglandinas foram significativamente aumentadas após a incubação das células com a MT-II (controle MT-II) ou com a MT-III (controle MT-III) ou com a CB2 (controle CB2) na presença do veículo. Quando as células foram incubadas com o composto AACOCF₃, inibidor de FLA₂ citosólica, por 2 horas e estimuladas com a MT-II, por 6 h, houve uma diminuição significativa da liberação de PGD₂ e PGE₂, em cerca de 40% e 37,5%, respectivamente, em relação ao controle estimulado. A incubação, por 6 h, das células com a MT-III, na presença do AACOCF₃, também causou a diminuição, significativa, dos níveis de PGD₂ e PGE₂ liberadas, em 43% e 56,67%, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas miotoxinas, quanto à liberação das prostaglandinas PGD₂ e PGE₂, sob efeito do inibidor de cFLA₂. No entanto, a incubação das células com a CB2, na presença de AACOCF₃, não alterou a produção de PGD₂ e PGE₂, em comparação aos controles estimulados. A incubação dos macrófagos com o composto PACOCF₃, inibidor da FLA₂ independente de cálcio, não alterou a produção dos prostanóides, induzida pelas três toxinas, quando comparadas aos respectivos controles MT-II ou MT-III ou CB2.

Figura 1.8 Efeito do AACOCF₃ e PACOCF₃ sobre a produção de PGD₂ e PGE₂ por macrófagos residentes, induzida pelas MT-II, MT-III e CB2. Uma alíquota de macrófagos peritoneais isolados, 1×10^6 células/ 1mL, foi incubada em suspensão com meio de cultura (RPMI), contendo MT-II ou MT-III ou CB2 (6,5 µg/ mL) a 37°C e 5% de CO₂, ou DMSO apenas (controle veículo). AACOCF₃ (20 µM) ou PACOCF₃ (4 µM) foram adicionados às células, 2 h antes das MT-II, MT-III e CB2, ou apenas ao meio de incubação (controle). As concentrações de PGD₂ (A) e PGE₂ (B) foram avaliadas por EIA, em sobrenadantes do meio de cultura, coletados após 6 h das incubações. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 4 animais. * $p < 0,05$ em relação aos controles. # $p < 0,05$ em relação à MT-II/veículo. + $p < 0,05$ em relação à MT-III/veículo. (ANOVA).

1.4.9 Efeito do AACOCF₃ e PACOCF₃ na expressão de COX-2, por macrófagos isolados, induzida pelas MT-II e -III

Para analisar a participação das cFLA₂ e iFLA₂, na expressão de COX-2 induzidas pelas MT-II e -III em macrófagos isolados, foram realizados experimentos *in vitro*, na vigência de ação dos inibidores AACOCF₃ (20 μ M) e PACOCF₃ (4 μ M).

As figuras 1.9A e 1.9B mostram as bandas imunoreativas para a COX-2, obtidas nos diferentes protocolos experimentais. As Figuras 1.9C e 1.9D representam a análise densitométrica das bandas obtidas. Nestas, pode-se verificar a expressão irrelevante de COX-2 em homogenatos de macrófagos incubados apenas com o veículo (controle não estimulado). A expressão de COX-2 foi significativamente aumentada, após a incubação das células com MT-II (controle MT-II) ou MT-III (controle MT-III), na presença do veículo. A incubação das células com o composto AACOCF₃ ou com PACOCF₃, 2 h antes do estímulo com a MT-II ou a MT-III, não alterou a expressão de COX-2, induzida pelas miotoxinas.

Figura 1.9 Efeito do AACOCF₃ e PACOCF₃ na expressão de COX-2 por macrófagos residentes, induzida pela MT-II e MT-III. AACOCF₃ (20 μ M) ou PACOCF₃ (4 μ M) ou DMSO apenas (controle veículo) foram adicionados a suspensões de macrófagos (1×10^6 / 1mL), 2 h antes da adição de MT-II ou MT-III (6,5 μ g/ mL), a 37°C e 5% de CO₂. Após 6 h de incubação com as toxinas, determinou-se a expressão de COX-2 por *western blot*. (A e B): *Western blot* representativo (n=4) de COX-2 e β -actina, efetuado em homogenatos de células, na presença de anticorpos monoclonais específicos. (C e D): Quantificação, por densitometria das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. *p < 0,05 em relação aos controles. (ANOVA).

1.4.10 Efeito do composto TPCK e SN50 na expressão de COX-2, induzida pelas MT-II e MT-III em macrófagos isolados

Para avaliar a participação do fator NF- κ B, na expressão de COX-2, induzida pelas MT-II e -III, em macrófagos isolados, foram realizados experimentos *in vitro*, na vigência da ação de inibidores específicos deste fator de transcrição. Preliminarmente, foram realizados ensaios para a avaliação do efeito dos compostos TPCK e SN50 sobre a viabilidade dos macrófagos, pela liberação de LDH e pela redução do MTT, nas condições experimentais deste estudo. A partir dos resultados obtidos, a concentração definida para o TPCK foi de 2,5 μ M e para o SN50, a 50 μ g/mL. Nestas concentrações, estes compostos não causaram alterações significativas na viabilidade celular (> 90% células viáveis) (dados não demonstrados).

As Figuras 1.10A e 1.10B mostram as bandas imunoreativas para COX-1 e COX-2, obtidas em homogenatos de macrófagos, sob os diferentes protocolos de incubação utilizados. A análise densitométrica, apresentada nas Figuras 10C e 10D, mostra a expressão de COX-2 em baixa intensidade, em macrófagos incubados apenas com veículos ou com os compostos TPCK ou SN50 somente (controle não estimulado). A expressão de COX-2 foi significativamente aumentada após a incubação das células com a MT-II (controle MT-II) ou com a MT-III (controle MT-III), na presença dos veículos do TPCK ou do SN50. A adição do TPCK, inibidor da ativação do NF- κ B, ao meio de incubação, 30 minutos antes da estimulação das células com MT-II, por 4 h, causou uma redução de 72% da expressão de COX-2, significativa em relação ao controle MT-II (Figuras 1.10A e 1.10C). Quando os macrófagos foram estimulados com MT-III, na presença de TPCK, ocorreu supressão da expressão protéica da COX-2 (Figuras 1.10A e 1.10B). A incubação das células com SN50, inibidor da translocação do NF- κ B ativo para o núcleo, por 30 minutos, antes das mitotoxinas, reduziu, significativamente, a expressão da COX-2, induzida pelas MT-II e MT-III, em 53% e 47,6%, respectivamente, de modo estatisticamente significativo em relação aos controles (Figuras 1.10B e 1.10D).

Figura 1.10 Efeito do TPCK e SN50 na expressão de COX-2 por macrófagos peritoneais residentes, induzida pelas MT-II e MT-III. O TPCK (2,5 µM) ou o SN50 (50 µg/mL) ou RPMI (Controle RPMI) foram adicionados a suspensões de macrófagos (1×10^6 / 1mL), 30 minutos antes da adição de MT-II ou MT-III (6,5 µg/ mL), a 37°C e 5% de CO₂. Após 4 h de incubação com as toxinas, determinou-se a expressão de COX-2 por *western blot*. **(A e B)**: *Western blot* representativo (n=4) de COX-2 e β-actina, efetuado em homogenatos de células, na presença de anticorpos monoclonais específicos. **(C e D)**: Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2 normalizadas a partir das bandas de β-actina. *p< 0,05 em relação ao controle/MT-II/veículo. #p< 0,05 em relação ao controle/MT-III/veículo. (ANOVA).

1.5 DISCUSSÃO

As fosfolipases A₂ secretadas, do grupo IIA, ao qual pertencem FLA₂s de serpentes Viperidae, são reconhecidas como elementos importantes do processo inflamatório, por favorecerem a produção de prostanóides, pela capacidade de liberarem ácido araquidônico (PRUZANSKI e VADAS, 1991). No entanto, os efeitos destas proteínas, sobre outras etapas das vias biossintéticas de prostanóides, são pouco conhecidos.

No presente trabalho, foi investigada, inicialmente, a capacidade das sFLA₂s, MT-II, MT-III e CB2, induzirem a liberação de prostaglandinas *in vivo*. Os resultados demonstraram que as três sFLA₂s induziram a liberação de PGD₂ e de PGE₂, no exsudato peritoneal. Estes dados estão em concordância com a literatura, que demonstra que as miotoxinas MT-II e MT-III liberam outros eicosanóides *in vivo*, como a tromboxana A₂ (TXA₂) e o leucotrieno B₄ (LTB₄) (ZULIANI *et al.* 2005a) e que uma sFLA₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus* libera LTB₄, lipoxina e PGE₂ (SAMPAIO *et al.* 2006). Da mesma forma, a ação, de FLA₂s secretadas, humanas, em induzirem a produção de prostaglandinas foi demonstrada, anteriormente, em diferentes modelos experimentais *in vitro* (HARA *et al.*, 1991; MURAKAMI *et al.*, 1991; PFEILSCHIFTER *et al.*, 1993). No entanto, esta é a primeira demonstração da ação estimulatória de sFLA₂s de venenos e de sFLA₂s do grupo IIA, de um modo geral, sobre a produção de PGD₂ e de PGE₂ *in vivo* e o perfil temporal deste efeito. Os dados indicaram também, que a atividade catalítica das toxinas avaliadas não é importante para a indução destes prostanóides, visto que a MT-II, enzimaticamente inativa, causou efeito semelhante ao da MT-III e da CB2. Embora não tenham sido realizados ensaios farmacológicos para estudo da relação dose-efeito, os dados ora obtidos evidenciaram a maior capacidade da CB2, uma proteína com atividade neurotóxica, desencadear a produção de prostaglandinas, em relação às miotoxinas MT-II e -III. No caso da PGE₂, em dose quatro vezes menor que a CB2 induziu uma produção três vezes maior deste prostanóide, em relação às outras sFLA₂s estudadas. Esse fato pode ser explicado, pela alta atividade enzimática apresentada pelas sFLA₂s, isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, quando comparadas às miotoxinas isoladas do veneno de *B. asper* (ROSEMBERG, 1997). Por outro lado, cabe ressaltar que a dose de CB2, empregada neste estudo, deve-se à baixa DL50 desta toxina (0,54 mg/kg) (RUBSAMEN *et al.*, 1971).

Em adição, os resultados obtidos demonstraram que a liberação de PGD₂ e PGE₂, sob ação das três sFLA₂s, apresentou um perfil temporal distinto, com uma liberação rápida e de

curta duração da PGD₂ e liberação contínua de PGE₂. Os fatores responsáveis por essa variação não foram investigados neste estudo. Contudo, é possível sugerir que os mastócitos tenham sido uma fonte importante de PGD₂, no presente modelo experimental. A desgranulação de mastócitos, por várias sFLA₂s, isoladas de venenos de serpentes, foi demonstrada em estudos *in vivo* (CIRINO *et al.*, 1989; MORENO *et al.*, 1992; LANDUCCI *et al.*, 1998) e *in vitro* (LAU e ROCHE, 1997). Portanto, um efeito das sFLA₂s, ora estudadas, sobre mastócitos, poderia explicar a liberação rápida e intensa deste mediador. Ainda, no caso das MT-II e -III, um efeito regulatório do TNF- α , citocina também liberada por estas miotoxinas (ZULIANI *et al.*, 2005a), pode ter contribuído para o rápido decaimento dos níveis de PGD₂, na cavidade peritoneal, uma vez que o efeito inibitório do TNF- α , sobre a produção de PGD₂, foi descrito (FOURNIER *et al.*, 1997). De outra parte, um dado curioso da CB2, diferentemente das MT-II e -III, é ter promovido um segundo pico de liberação de PGD₂. Uma vez que a CB2, mas não as miotoxinas, promoveu, neste período, uma intensa migração de células mononucleares (dados não demonstrados), com predominância de macrófagos, estas células recrutadas podem estar relacionadas ao segundo pico de produção de PGD₂. No entanto, essas hipóteses necessitam serem investigadas.

Com relação à PGE₂, as miotoxinas promoveram a sua rápida liberação, enquanto a CB2 exerceu ação apenas após a 3^a h de sua administração. Por outro lado, enquanto os efeitos da MT-III e da CB2 foram contínuos, embora de diferentes magnitudes, o efeito da MT-II foi interrompido entre 3 e 6 h. Os fatores responsáveis por esta diferença de perfil temporal, entre as sFLA₂s, não foram investigados. No entanto, a natureza catalítica, da MT-III e da CB2, pode ter favorecido a produção contínua de PGE₂.

As PGE₂ e a PGD₂ têm ação vasodilatadora e a PGE₂ pode potencializar o aumento da permeabilidade vascular, promovido por alguns mediadores deste fenômeno, com conseqüente formação de edema (GERRITSEN, 1996). Uma vez que as MT-II, MT-III e as sFLA₂s, isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, induzem, experimentalmente, resposta edematogênica e promovem o aumento da permeabilidade vascular (CHAVES *et al.*, 1998; LANDUCCI *et al.*, 2000a; CÂMARA *et al.*, 2003; ZULIANI *et al.*, 2005a), é possível sugerir que a PGD₂ e a PGE₂ estejam envolvidas nesses efeitos. Porém, o papel das prostaglandinas em processos inflamatórios não depende somente dos seus níveis de concentração no foco de lesão e de sua interação com outros mediadores liberados, mas também do perfil de receptores, presentes em leucócitos e células adjacentes e das respectivas vias de sinalização (TILLEY *et al.*, 2001). Assim, a partir do conhecimento de que as prostaglandinas E₂ e D₂,

liberadas pela ação das sFLA₂s, aqui estudadas, podem ligar-se a uma variedade de receptores e desencadear eventos inflamatórios ou não, estudos futuros deverão mostrar a contribuição desses mediadores para os efeitos dessas sFLA₂s.

Os estudos desenvolvidos a seguir, demonstraram que tanto a MT-II quanto a MT-III foram capazes de induzir a expressão de COX-2, sem alterarem os níveis de COX-1, em leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal de camundongos. O efeito da MT-II foi consistente, entre 1 e 12 horas de sua injeção e o da MT-III, entre 3 e 12 h. Neste caso, também, a atividade catalítica de sFLA₂ não foi essencial para o efeito desencadeado. ZULIANI *et al.*, (2005a) demonstraram que MT-II e MT-III liberam IL-1, IL-6 e o TNF- α *in vivo*. Uma vez que estas citocinas induzem a expressão de COX-2, em processos inflamatórios (JACOBS *et al.*, 1994; BARRIOS-RODILES, 1998; ASANO *et al.*, 1997; DIAZ *et al.*, 1998), é possível supor que esses mediadores estejam envolvidos nos efeitos estimulantes das duas miotoxinas, quanto à expressão desta isoforma. Adicionalmente, verificou-se que a proteína recém sintetizada, COX-2, estava funcionalmente ativa, pois a atividade catalítica desta enzima foi detectada em todos os períodos referentes à sua expressão. Nestes períodos, porém, não foi observada qualquer alteração da atividade catalítica basal da COX-1. Além disso, a atividade enzimática da COX-2 apresentou uma correlação temporal com o aumento dos níveis de prostaglandinas, nos lavados peritoneais, sugerindo que esta seja a principal isoforma responsável pela produção destes mediadores, induzida pelas miotoxinas, especialmente a de PGE₂. No entanto, a contribuição da COX-1 não pode ser descartada, em períodos anteriores aos 60 minutos, pois esta isoforma também pode ser importante para a produção de prostaglandinas em processos inflamatórios (LANGENBACH *et al.*, 1995; REDDY *et al.*, 1999; WALLACE *et al.*, 1998,1999; OCHI e GOTO, 2002). Nesse sentido, as evidências apontam que, durante a inflamação, as COX-1 e -2 regulam diferentes fases da biossíntese de prostanóides e não exercem funções sobrepostas (NARABA *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 1999). Apesar dessas informações, está claro que o papel de cada isoforma, nos efeitos da MT-II e MT-III, para a produção de prostaglandinas será definido somente após estudos que utilizem tratamentos farmacológicos, com os inibidores seletivos de COX-1 e de COX-2.

A CB2, por sua vez, não foi capaz de induzir a expressão COX-2 e não alterou os níveis de expressão protéica da COX-1, nos períodos avaliados. Este dado é curioso, dada a intensa produção das prostaglandinas D₂ e E₂, induzida por esta sFLA₂. Neste caso, é bastante provável que a COX-1 seja a isoforma responsável pela produção destas prostaglandinas. Estudos adicionais, sobre a atividade da COX-1, são necessários para a verificação desta

hipótese. Chisari *et al.* (1998) demonstraram que uma sFLA₂, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, cuja isoforma não foi informada, estimulou tanto vias endógenas de controle negativo da resposta inflamatória (eixo hipotálamo-pituitária-adrenal), promovendo a liberação de corticosteróides, quanto vias pró-inflamatórias, com a produção de uma citocina inflamatória, o TNF- α , por células circulantes. Desse modo, é possível sugerir que este efeito dual, quanto à inflamação, tenha ocorrido no presente estudo.

A seguir, com o intuito de detalhar os efeitos das três sFLA₂s, foram realizados ensaios *in vitro*, que avaliaram as suas ações sobre macrófagos peritoneais, isolados, quanto à liberação de prostaglandinas. Os dados obtidos demonstraram que a MT-II, a MT-III e a CB2 exerceram um efeito direto sobre os macrófagos e acarretaram o aumento da produção de PGD₂ e PGE₂ por estas células. Portanto, estes dados apontam os macrófagos como alvos relevantes para essas toxinas, no modelo experimental *in vivo*. À semelhança dos resultados obtidos *in vivo*, foram observadas algumas diferenças no perfil temporal da produção destas prostaglandinas. No caso da PGD₂ sob a ação da MT-II, os macrófagos responderam rapidamente e sob o efeito das MT-III e CB2, mais tardiamente. A ausência de atividade catalítica, da MT-II, pode ter contribuído, de algum modo, para o desencadeamento de uma via de sinalização mais específica para a produção imediata de PGD₂, pelos macrófagos. Além disso, estes dados favorecem uma melhor interpretação dos resultados *in vivo* e permitem inferir que a produção inicial de PGD₂ *in vivo*, deva-se a uma ação das MT-III e CB2, em mastócitos. No caso da MT-II e MT-III, a presença de PGD₂ em períodos tardios de incubação, pode ter decorrido de efeito cumulativo, em função da estimulação constante pelas miotoxinas. Em relação à produção de PGE₂, os dados *in vitro* demonstraram que a ação das MT-II e MT-III foi mais rápida do que a da CB2, sendo que a MT-II foi mais potente que a MT-III. Os mecanismos responsáveis por estas diferenças não foram investigados.

O passo seguinte, deste estudo, foi investigar o efeito das toxinas em macrófagos isolados, quanto à expressão de ciclooxigenases. Os resultados obtidos demonstraram que a MT-II e a MT-III induziram a expressão de COX-2, em macrófagos residentes isolados, sem afetar a expressão protéica de COX-1. Estes dados indicam uma ação estimulante e direta das miotoxinas, em macrófagos, e sugerem que estas células constituem um alvo importante para as sFLA₂s. Portanto, é plausível supor que o efeito *in vivo* dessas sFLA₂s, sobre a COX-2, deva-se, em parte, à sua ação sobre os macrófagos residentes, e que esta isoforma seja relevante para a produção de prostaglandinas *in vivo*.

Em apoio aos dados deste estudo, a literatura mostra que as sFLA₂s de mamíferos, dos grupos IIA e V, quando associadas a citocinas, induzem a expressão de COX-2, por mastócitos (TADA *et al.*, 1998), monócitos (HERNANDEZ *et al.*, 2002) e células sinoviais (BIDGOOD *et al.*, 2000). Além disso, TADA *et al.*, (1998), demonstraram que mutações, efetuadas no sítio catalítico, mantiveram a capacidade das sFLA₂s induzirem a expressão de COX-2, em mastócitos isolados de ratos. No entanto, o presente estudo mostra, pela primeira vez, que sFLA₂s, do grupo IIA, de venenos de serpentes, podem estimular diretamente a expressão de COX-2, em macrófagos.

Em contrapartida, a CB2 não foi capaz de induzir a expressão de COX-2 em macrófagos isolados e não alterou os níveis constitutivos de expressão de COX-1. Estes dados corroboram aqueles obtidos *in vivo* e sugerem que um aumento da atividade da COX-1 esteja envolvido no incremento da produção de prostaglandinas *in vitro*. A partir desse conhecimento, é possível sugerir que sFLA₂s de um mesmo grupo estimulam a biosíntese de prostaglandinas por mecanismos distintos.

A existência de uma interação funcional entre FLA₂s secretadas e FLA₂s intracelulares (cFLA₂ e iFLA₂), através de *feedback* positivo, na resposta celular a diversos mediadores e agentes inflamatórios, está bem descrita (THOMMENSEN *et al.*, 1998; ANTHONSEN *et al.*, 2001; CHAKRABORTI, 2003; BALSINDE *et al.*, 1998). No presente estudo, verificou-se que o composto AACOCF₃, inibidor da cFLA₂ (MARSHALL *et al.*, 1997), reduziu significativamente a produção de PGE₂ e PGD₂, induzida pelas duas miotoxinas, mas não pela CB2. Por outro lado, o PACOCF₃, um inibidor da FLA₂ independente de cálcio (iFLA₂) (ACKERMANN *et al.*, 1995), não alterou a produção desses mediadores, nas mesmas condições experimentais. Estes dados sugerem que cFLA₂, mas não a iFLA₂, seja relevante para a produção de prostanóides, induzida pelas MT-II e MT-III. Por outro lado, tanto a cFLA₂ quanto a iFLA₂ não são essenciais para a liberação de prostaglandinas, produzidas pela ação da CB2.

A cFLA₂ é capaz de ativar o NF-κB, um fator de transcrição importante para a expressão de COX-2 (ANTHONSEN *et al.*, 2001; LESLIE, 2004). Assim sendo, avaliou-se o efeito dos antagonistas de cFLA₂ e da iFLA₂ na expressão de COX-2, induzida pelas MT-II e MT-III. Os resultados demonstraram que os dois inibidores, empregados, não afetaram a expressão de COX-2. Desse modo, é possível sugerir que a contribuição da cFLA₂, para a produção de prostaglandinas, causada pelas sFLA₂s do veneno botrópico, deve decorrer, ao menos em parte, de sua capacidade de disponibilizar o ácido araquidônico (AA) para as ciclooxigenases. Em apoio a esta hipótese, a literatura mostra que as cFLA₂s, especialmente a

cFLA₂ α , do grupo IV e as sFLA₂s 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). A atividade da iFLA₂ tem sido relacionada, principalmente, ao fornecimento de AA para a remodelagem e manutenção de membranas celulares (MURAKAMI *et al.*, 1998; 2000; BALSINDE *et al.*, 1995). Portanto, a ausência de efeito do composto PACOCF₃, sobre os parâmetros ora avaliados, tem subsídios.

Os elementos transduccionais, recrutados pelas duas miotoxinas, para a ativação da cFLA₂, não foram investigados neste estudo. A cFLA₂ é expressa constitutivamente e sua atividade catalítica é positivamente regulada por fosforilação, realizada por quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e cálcio. Ainda, a expressão desta enzima pode ser induzida por citocinas inflamatórias como o TNF- α e a IL-1 β (CLARK *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1992). A partir destas informações e considerando que as MT-II e -III, em concentrações equivalentes às aquelas utilizadas neste estudo, induzem a liberação de TNF- α e IL-1 β (ZULIANI *et al.*, 2005a) e que a MT-II induz o influxo de cálcio (MORA *et al.*, 2006), pode-se sugerir que, na presente condição experimental, estas citocinas participem do mecanismo de ativação da cFLA₂, pelas miotoxinas. Esta hipótese necessita ser investigada e não exclui uma possível ativação das MAPKs, tanto pelo efeito da MT-II quanto da MT-III. Quanto à CB2, os dados demonstraram que a ação desta sFLA₂ é independente das FLA₂s intracelulares investigadas. Este fato poderia ser explicado pela alta atividade enzimática desta isoforma, que *per se*, deve prover quantidades suficientes de substrato - AA - para a ciclooxigenase. Este resultado é inédito e necessita ser investigado em maior detalhe.

A seguir, foram avaliados os mecanismos envolvidos na expressão de COX-2, induzida pelas MT-II e MT-III. A literatura mostra que a expressão de COX-2 é dependente da ativação transcricional, induzida por mediadores pró-inflamatórios (WU, 2005). A região promotora do gene da proteína de COX-2 é regulada por vários elementos transcripcionais, como o CREB, AP2, SP1, NF-IL6 e NF- κ B (YAMAMOTO *et al.*, 1995; SCHMEDTJE, *et al.*, 1997; D'AQUISTO *et al.*, 1997; ABATE e SCHRÖDER, 1998). Dentre estes elementos, o NF-IL6 e o NF- κ B regulam positivamente a transcrição do gene de COX-2 (YAMAMOTO, *et al.*, 1995). O fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) é o principal fator de transcrição envolvido a expressão da COX-2 e exerce um papel fundamental em respostas imunológicas e inflamatórias (WU *et al.*, 2003). Além disso, o NF- κ B regula outros genes, que codificam outras proteínas que participam de processos inflamatórios (BARNES e KARIN, 1997).

O NF- κ B consiste de um homo ou heterodímero, formado por subunidades polipeptídicas, da família NF- κ B/Rel, como o p50, p65, c-Rel e RelB. Este fator de transcrição encontra-se no citoplasma celular, ligado a proteínas inibitórias, da família I κ B (LIN *et al.*, 1995; POLIGONE e BALDWIN, 2001). A partir de ativação celular, iniciam-se vias de sinalização, que levam à fosforilação das moléculas de I κ B, por quinases específicas. Estas últimas levam à dissociação do complexo NF- κ B/I κ B, acarretando a liberação do fator de transcrição ativo. Nesta forma, este fator migra para o núcleo, liga-se a elementos importantes da região promotora do DNA e ativa a transcrição de vários genes envolvidos na inflamação (BALDWIN, 2001; VERMA, 2004; VIATOUR *et al.*, 2005).

Tendo como base este conhecimento, o efeito de inibidores de NF- κ B, na expressão de COX-2, induzida pelas MT-II e -III, foi avaliado em macrófagos residentes, isolados, com o intuito de esclarecer uma via de transdução estimulada pelas miotoxinas. Os dados obtidos demonstraram que o TPCK, um inibidor da ativação do NF- κ B, diminuiu a expressão de COX-2, induzida pela MT-II e bloqueou a expressão induzida pela MT-III. Estes resultados indicam que o fator de transcrição NF- κ B participa da sinalização, estimulada pelas duas sFLA₂s de veneno, que promove a transcrição do gene da enzima COX-2. No entanto, os mecanismos da ativação do NF- κ B, pelas MT-II e -III, que resultam na expressão de COX-2, não foram esclarecidos e serão investigados em futuro próximo. Este resultado indica que o NF- κ B está envolvido na indução de COX-2, por estas miotoxinas. O TPCK impede a fosforilação de I κ B- α e, consequentemente, a liberação do fator de transcrição ativo, por inibir as proteínas C quinase, adenilato ciclase e a proteína quinase-dependente de AMP cíclico, importantes para a fosforilação do I κ B (KUPFER *et al.*, 1979; SOLOMON *et al.*, 1985; NEEDHAM e HOUSLAY, 1988; GRISCAVAGE *et al.*, 1996). Assim sendo, é possível sugerir que, para a ativação do NF- κ B, as MT-II e -III favoreçam a descomplexação do fator de transcrição do seu inibidor, por meio de ações sobre a cascata de quinases que fosforilam o I κ B.

Para confirmar a participação do NF- κ B, na indução de COX-2 pelas MT-II e MT-III, foi utilizado o inibidor SN50. Este peptídeo, por competição, impede a translocação do NF- κ B, ativado, para o núcleo, por conter uma sequência de aminoácidos semelhante à “sequência de localização nuclear” (NLS), da subunidade p50 desse fator de transcrição (LIN *et al.*, 1995). Como esperado, o SN50 reduziu, de modo marcado, a expressão protéica da COX-2, confirmando a participação do NF- κ B no efeito das duas miotoxinas. O fato deste inibidor não ter abolido o efeito da MT-III, como o TPCK o fez, pode ser explicado pela existência de

moléculas de NF- κ B, contendo subunidades diferentes do p50, não antagonizadas pelo peptídeo. Estes outros dímeros podem ter migrado para o núcleo e induzido alguma expressão de COX-2. Estes resultados confirmam que as duas miotoxinas induzem a expressão protéica de COX-2, por mecanismo dependente do NF- κ B. Em apoio a esses resultados, estão os resultados de BAEK *et al.* (2001), demonstrando que uma fosfolipase A₂ secretada, humana, recombinante, do grupo IIA, induziu a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), em linhagem de macrófagos, por ativação da via do NF- κ B. Até onde se pode verificar, esta é a primeira demonstração da participação da via do NF- κ B na expressão de ciclooxigenases induzida por FLA₂s secretadas, tanto de venenos quanto de mamíferos.

De outra parte, considerando que a MT-II é destituída de atividade enzimática e que o composto AACOCF₃ não inibiu o efeito das duas sFLA₂s, quanto à expressão de COX-2, a produção de AA não parece ser relevante para o desencadeamento das ações estimulantes da MT-II ou MT-III, na via do NF- κ B e expressão de COX-2. A perturbação de membranas celulares, via interação com receptores específicos, ou não, para o desencadeamento da sinalização intracelular, responsável pelos efeitos das duas miotoxinas, é uma hipótese provável, que deverá ser investigada. Segundo KINI e EVANS (1989; 1995), em mecanismos independentes de atividade catalítica, a ligação das sFLA₂s às regiões aceptoras, pode causar o efeito farmacológico, a partir de ações do tipo agonista ou antagonista ou por interferência na interação das proteínas alvo com seus ligantes fisiológicos. Em mecanismos dependentes da atividade enzimática, tanto a hidrólise de fosfolipídios quanto a liberação de produtos, como ácidos graxos livres, podem causar o efeito farmacológico; a atividade catalítica pode causar alterações da membrana celular e afetar a natureza de interação proteína-membrana, particularmente, em sítios aceptores (proteínas alvo). No entanto, alguns efeitos farmacológicos devem-se a combinações de ambos os mecanismos, enzimático e não enzimático (KINI e EVANS, 1995) e este fato deve ser considerado na interpretação dos efeitos das MT-III e CB2.

Em conjunto, os dados ora obtidos demonstraram as sFLA₂s MT-II, MT-III e CB2 induzem a liberação de PGE₂ e PGD₂ *in vivo* e *in vitro*. As MT-II e MT-III, mas não a CB2, são capazes de induzirem a expressão de COX-2 ativa *in vivo* e, por ação direta sobre macrófagos isolados, *in vitro*, sugerindo que a COX-2 seja relevante para a produção de prostanóides induzida pelas duas miotoxinas. O fato da MT-II ser destituída de atividade enzimática sugere que a atividade catalítica das miotoxinas não seja relevante para esses efeitos. Ainda, a indução da expressão de COX-2, pelas MT-II e MT-III, ocorre por um mecanismo dependente do NF- κ B, mas não da cFLA ou da iFLA₂. Estes efeitos devem-se, ao

menos em parte, a uma ação direta dessas sFLA₂s sobre macrófagos. Por outro lado, a cFLA₂ é importante para a formação de prostanoídes, induzida pela MT-II e MT-III, mas não pela CB2. A diferença funcional, observada entre as MT-II, MT-III e CB2 pode decorrer da diferença estrutural entre estas proteínas, embora apresentem similaridade entre 40 e 70%, quanto às seqüências de aminoácidos.

Os dados aqui apresentados são inéditos e permitem o melhor conhecimento dos mecanismos de ação das sFLA₂s de venenos da família Viperidae e, em última análise, de FLA₂s secretadas, do grupo IIA. Em função do detalhamento de ações moleculares, as sFLA₂s, aqui investigadas, poderão constituir ferramentas úteis para o estudo de mecanismos e funções celulares específicas e/ou de agentes antiinflamatórios.

Figura 1.11 Esquema representativo de algumas vias de sinalização envolvidas na produção da prostaglandina E2 e prostaglandina D2, por macrófagos estimulados pelas MT-II e a MT-III, isoladas do veneno de *Bothrops asper* e pela CB2, isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

1.6 CONCLUSÕES

- A administração das sFLA₂, MT-II, MT-III e CB2, na cavidade peritoneal de camundongos, induz liberação de prostaglandina E₂ e prostaglandina D₂;
- A sFLA₂, MT-II, MT-III e CB2 exercem ação direta sobre macrófagos, levando a liberação de PGE₂ e PGD₂;
- A atividade catalítica das miotoxinas, não deve ser relevante para a indução destes efeitos;
- A MT-II e MT-III, mas não a CB2, induzem a expressão de COX-2, *in vivo* e *in vitro*, mas não de COX-1;
- A cFLA₂, mas não a iFLA₂, contribui para a síntese de PGD₂ e PGE₂ induzidas pelas MT-II e MT-III;
- A indução da expressão de COX-2, pelas miotoxinas MT-II e MT-III, ocorre por um mecanismo dependente do NF-κB, mas não da cFLA₂ e da iFLA₂.
- A síntese de PGD₂ e PGE₂, pela CB2, ocorre por mecanismos independentes da cFLA₂, iFLA₂ e COX-2.

Capítulo 2

Efeito do veneno da serpente *Bothrops asper* sobre as ciclooxigenases e produção de prostaglandinas

2.1 INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes têm grande importância na clínica médica e na pesquisa científica, uma vez que os acidentes ofídicos são, ainda, freqüentes e graves, particularmente nas regiões tropicais do mundo (CHIPPAUX e GOYFFON, 1998).

As serpentes, responsáveis pelo maior número de acidentes ofídicos, na América Latina, pertencem ao gênero *Bothrops*, da família Viperidae. Essas serpentes estão distribuídas desde o México até a Argentina (HOGE e ROMANO-HOGE, 1978). No Brasil, os envenenamentos, de maior ocorrência, são causados por serpentes *Bothrops jararaca* (ROSENFELD, 1971) e, na América Central, por serpentes *Bothrops asper* (BOLANOS *et al.*, 1982).

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* induzem, em geral, um quadro fisiopatológico complexo, caracterizado por efeitos sistêmicos e reações locais imediatas. As ações locais são caracterizadas por mionecrose, dor, edema, hemorragia e resposta inflamatória intensa (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1985; 1989). Os efeitos sistêmicos envolvem alterações da coagulação sangüínea e do sistema cardiovascular (MANDELBAUM *et al.*, 1982; AMARAL *et al.*, 1985). O soro antibotrópico não neutraliza, de modo eficaz, as reações locais, mesmo quando administrado logo após o acidente (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981). Por este motivo, os estudos sobre os mecanismos responsáveis pelos efeitos fisiopatológicos dos venenos e suas toxinas são relevantes.

A patogênese dos efeitos locais e sistêmicos, induzidos pelo veneno de *B. asper*, tem sido investigada. Várias toxinas, presentes neste veneno, agem no local da picada e acredita-se que a maior parte dos efeitos é provocada por metaloproteinases e fosfolipases A₂ (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003).

A inflamação está freqüentemente associada ao envenenamento botrópico (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; FLORES *et al.*, 1993; CURY *et al.*, 1994). Dados da literatura mostram que este fenômeno é multimediado. A resposta edematogênica local, induzida pelos venenos de *B. jararaca* e de *B. asper*, envolve a participação de mediadores α e β -adrenérgicos, do fator ativador de plaquetas (PAF), da serotonina e histamina além de eicosanóides, derivados do ácido araquidônico (TREBIEN e CALIXTO, 1989; CHAVES *et al.*, 1995). A participação de eicosanóides também foi

observada no desenvolvimento da hiperalgesia, induzida pelos venenos de *B. jararaca* (TEIXEIRA *et al.*, 1994) e de *B. asper* (CHACUR, *et al.*, 2001). Neste último caso, detectou-se a contribuição relevante de toxinas com estrutura de FLA₂ para este efeito (CHACUR, *et al.*, 2003). Além disso, estudos deste laboratório demonstraram que o recrutamento leucocitário, induzido pelo veneno botrópico, acompanha a liberação de mediadores lipídicos quimiotáticos (LTB₄ e TXB₂) e de citocinas, no foco de lesão (FARSKY *et al.*, 1997; ZAMUNER *et al.*, 2005). Este conjunto de dados indica um papel importante dos eicosanóides na reação inflamatória, causada por esses venenos, porém, não foram esclarecidos os mecanismos e o(s) tipo(s) celular(es) envolvidos na produção desses mediadores.

A literatura mostra a participação relevante de leucócitos no processo inflamatório local, induzido por venenos botrópicos. Lomonte *et al.*, (1994) demonstraram a presença de leucócitos no tecido muscular de camundongos, após a injeção do veneno de *B. asper* e Flores *et al.*, (1993) relataram o acúmulo de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos, após a administração dos venenos de *B. erythromelas* e *B. alternatus*. Acosta de Pérez *et al.* (1996) mostraram um infiltrado neutrofilico no músculo gastrocnêmico de ratos, após a injeção do veneno de *B. jararaca* da Argentina e Farsky *et al.*, (1997), caracterizaram o componente leucocitário da reação inflamatória induzida pelo veneno de *B. jararaca*, em ratos, com um influxo marcante de neutrófilos, nas primeiras 6 horas da injeção deste veneno e de macrófagos, em fases mais tardias. Ainda, Zamunér *et al.*, (2005) demonstraram um perfil semelhante de tipos celulares, recrutados por ação dos venenos de *B. jararaca* e de *B. asper* e algumas moléculas de adesão relevantes para o influxo de neutrófilos, induzido pelo veneno de *B. asper*, para a cavidade peritoneal de camundongos.

Os leucócitos têm um papel importante no desenvolvimento e resolução da reação inflamatória e podem, em situações particulares de ativação, contribuir para a evolução de lesões teciduais e/ou vasculares, causadas pelos diferentes componentes dos venenos. Os venenos botrópicos, além de induzirem a liberação de mediadores inflamatórios, podem, eventualmente, ativar mecanismos intracelulares, naquelas células, que levam à geração de substâncias capazes de ampliarem seu efeito lesivo. Apesar do papel dos leucócitos, em diversas patologias de caráter inflamatório, ser bem conhecido, o estado de ativação dessas células, na vigência de ação dos venenos botrópicos, foi pouco estudado. Dessa maneira, os estudos voltados ao esclarecimento desses efeitos revestem-se de importância. Pouco se sabe sobre a influência dos venenos ofídicos sobre atividades enzimáticas de macrófagos e

neutrófilos, particularmente no que se refere às vias de síntese de prostanóides, justificando estudos adicionais a este respeito.

Os macrófagos e neutrófilos são elementos importantes em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, como a inflamação e a resposta imunológica. Quando estimuladas, estas células sofrem alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais, com aumento da capacidade de produção e secreção de mediadores inflamatórios, agentes microbicidas e tumorícos (CALDER *et al.*, 1995). Desse modo, estudos complementares àqueles iniciados por Zamunér (2002), relacionados à síntese de mediadores lipídicos e ativação de ciclooxigenases nestas células, na vigência de ação dos venenos botrópicos, são relevantes. Estes estudos deverão ampliar o conhecimento dos mecanismos de ação intracelular dos venenos de serpentes desse gênero.

2.2 OBJETIVOS

Este estudo visou detalhar os efeitos do veneno botrópicos da *Bothrops asper*, quanto à síntese de prostanóides, em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

I. A partir de ensaios *in vivo*, foram avaliados os efeitos da injeção intraperitoneal do veneno de *B. asper*, em camundongos, quanto:

- a) à liberação das prostaglandinas E_2 e D_2 ;
- b) à expressão e atividade da COX-1 e COX-2, em leucócitos peritoneais totais.

II. A partir de ensaios *in vitro*, foram investigados os efeitos do veneno *B. asper* em macrófagos e neutrófilos isolados, quanto:

- a) à liberação das prostaglandinas E_2 e D_2 ;
- b) à expressão de COX-1 e COX-2.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, de peso compreendido entre 18 e 20 g, obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. As condições de manutenção dos animais, bem como as comissões de Ética, para realização deste trabalho, estão descritas no capítulo 1, pg. 47, item 1.3.1

2.3.2 Veneno

O veneno de *Bothrops asper* foi extraído de vários exemplares de serpentes adultas, coletadas na região do Pacífico e, gentilmente, fornecido pelo Dr. José Maria Gutiérrez, do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica. O veneno, liofilizado, foi estocado a -20 °C e dissolvido em salina apirogênica (0,9%), no momento do uso. Antes de cada utilização, o veneno solubilizado foi filtrado, através de uma membrana PVDF, com poros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore, USA) para esterilização.

2.3.3 Ensaios *in vivo*: injeção do VBa e obtenção de leucócitos peritoneais

Para os estudos *in vivo*, o VBa foi injetado na cavidade peritoneal dos animais (i.p.), na dose de 0,25 mg/ kg, respectivamente, em volume constante de 1 mL/ cavidade. Os animais do grupo controle receberam administração i.p. de volume equivalente de salina apitogênica.

Decorridos 15 e 30 minutos e 1, 3, 6, 12 h da injeção desse veneno, os animais foram mortos, sob atmosfera excessiva de CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 2,0 mL de salina, pH 7,2. Após a coleta e homogeneização do líquido de lavagem, uma alíquota foi diluída em solução de Turk (1:20; v/v), para a contagem do número total de leucócitos, em câmara de Neubauer e sob microscopia de luz. A seguir, uma alíquota contendo 1x10⁶ células foi, então, centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22°C. O precipitado de leucócitos totais foi utilizado para a análise da expressão das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) por *western blot*. O sobrenadante foi utilizado para a dosagem de PGE₂ e PGD₂, por ensaio imunoenzimático específico. Para a análise da atividade catalítica das COXs, foram utilizadas alíquotas de 1x10⁷ leucócitos.

2.3.4 Ensaios *in vitro*: coleta de macrófagos, neutrófilos e preparação das amostras

Para os estudos *in vitro*, macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal. Para a coleta destas células, os animais foram mortos sob atmosfera excessiva de CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 2 mL de solução salina apirogênica. Os neutrófilos foram obtidos da cavidade peritoneal, 4 horas após a injeção i.p. de 1,5 mL de solução de glicogênio de ostra, a 4%. Para a coleta das células, os animais foram mortos por exposição a concentrações tóxicas CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com solução salina, contendo heparina (10 UI/mL).

Após a coleta e homogeneização do líquido de lavagem, uma alíquota foi diluída (1:20; v/v) em solução de Turk, para a contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer e microscopia de luz. A predominância de macrófagos (>95%) ou de neutrófilos (85-90%) foi confirmada em esfregaços celulares, corados com Hema^{3®}. Uma alíquota contendo 1×10^6 células foi então centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22°C. O precipitado celular foi ressuspensão em meio de cultura RPMI e incubado em tubos de polipropileno com o VBa (5 µg/mL), em períodos de 1, 3, 4,5 e 6 h. Ao final de cada período de incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22°C. A seguir, o precipitado celular foi utilizado para a análise da expressão das COX-1 e COX-2, por *western blot* e o sobrenadante para a dosagem de PGE₂ ou PGD₂, por ensaio imunoenzimático específico (EIA).

2.3.5 Determinação do efeito citotóxico: Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A determinação da atividade da LDH em sobrenadantes obtidos, segundo descrito nos item 4, foi realizada segundo o protocolo descrito no capítulo 1, pg. 49, item 1.3.6.1

2.3.6 Análise por *Western blot*

A análise de expressão COX-1 e -2 de precipitados celulares, resultantes tanto dos estudos *in vivo* quanto *in vitro*, foram realizados por *western blot*, como descrito no capítulo 1, pg. 50, item 1.3.7

2.3.7 Quantificação da concentração de PGE₂ e PGD₂ por ensaio imunoenzimático específico (EIA)

Nos sobrenadantes obtidos, segundo a descrição dos itens 3 e 4, foram determinadas as concentrações de PGD₂ e PGE₂ por EIA específico, utilizando kit comercial (Cayman Co., USA), como descrito no capítulo 1, pg. 51, item 1.3.8

2.3.8 Determinação da atividade enzimática das COX-1 e de COX-2

A atividade enzimática de COX-1 e-2 dos precipitados celulares, resultantes dos estudos *in vivo* foi determinada, segundo o método descrito no capítulo 1, pg. 51, item 1.3.9, utilizando kit comercial (Cayman Co., USA).

2.3.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo método de Tukey. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

2.3.10 Soluções utilizadas

As soluções, bem como o protocolo de preparo, estão descritos no capítulo 1, pg. 52, item 1.3.11

2.3.11 Lista de reagentes

Os reagentes utilizados para este estudo estão descritos no capítulo 1, pg. 56, item 1.3.12

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Liberação de PGD₂ e PGE₂ induzidas pelo veneno de *B. asper* (VBa)

A concentração de PGD₂ e PGE₂, na cavidade peritoneal dos camundongos, foi avaliada no sobrenadante do lavado peritoneal, coletado após 15 e 30 minutos e 1, 3, 6 e 12 horas da injeção i.p. de VBa ou salina apirogênica (Controle). A dose do VBa foi baseada em dados da literatura (ZAMUNÉR *et al.*, 2001). Como mostram as Figura 1A e 1B, os lavados peritoneais, coletados de animais que receberam injeção i.p. de salina (Controle), apresentaram valores médios de 110±11 pg/mL e de 696±35 pg/mL, de PGD₂ e PGE₂, respectivamente, sem variações significativas ao longo do período estudado. A Figura 1A mostra que a injeção i.p. de VBa causou aumento significativo da concentração da PGD₂ entre 30 minutos e 1 hora, com aumento percentual médio de 204%, em comparação aos controles. Nos demais períodos de tempo analisados, não houve diferença significativa, em relação à liberação basal. A Figura 2B mostra que a injeção i.p. de VBa causou aumento significativo da concentração da PGE₂, entre 15 minutos e 1 hora de sua injeção, com incremento marcante nas 3 horas, se comparado aos controles, com aumento percentual de 580% . Na 12^a hora, não houve diferença significativa, em relação ao controle.

Figura 2.1 Liberação de PGD₂ e PGE₂ induzida pelo VBa. Os animais receberam injeção i.p. de VBa (0,25 mg/kg) ou salina apirogênica (Controle). As concentrações de PGD₂ (A) e PGE₂ (B) foram avaliadas por EIA, como descrito em Material e Métodos em lavados peritoneais coletados 0,25, 0,5, 1, 3, 6 e 12 horas, daquelas injeções. Os dados representam a média ± E.P.M. de 4-5 animais. *p < 0,05 em relação aos controles #p < 0,05 em relação aos grupos VBa-0,5, 1 e 12 horas (ANOVA).

2.4.2 Efeito do veneno de *B. asper* na expressão de COX-1 e COX-2 em leucócitos peritoneais

A expressão da COX-1 e da COX-2 foi analisada em leucócitos totais. Para tanto, estas células foram coletadas da cavidade peritoneal dos animais após 1, 3, 6 e 12 horas da injeção de VBa ou salina apirrogênica (Controle). A Figura 2A demonstra as bandas representativas da expressão de COX-1 e COX-2, em leucócitos coletados após a injeção de VBa ou o controle. Nesta, verifica-se o aparecimento de bandas características de COX-2, em homogenatos de leucócitos coletados 1, 3, 6 e 12 horas após a injeção da VBa, mas não de leucócitos controles. Em todos os períodos foram detectadas bandas protéicas correspondentes à COX-1, tanto em amostras controles, quanto em amostras de animais injetados com o VBa. A análise densitométrica (Figura 2B) mostra que a intensidade das bandas de COX-2 foi significativa entre 3 e 12 h, com expressão máxima na 3^a h. Quanto à COX-1, a análise densitométrica demonstrou que não houve alteração significativa da sua expressão constitutiva, em relação aos controles, em todos os períodos analisados após a injeção de VBa (dados não demonstrados).

Figura 2.2 Efeito do veneno de *B. asper* na expressão de COX-1 e 2 por leucócitos peritoneais. Leucócitos peritoneais foram coletados 1, 3, 6 e 12 h após a injeção i.p. de VBa (0,25 mg /kg) ou salina apirrogênica (0,9%) (Controle). As células foram lisadas e submetidas ao *western blot*: (A): *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:2000), anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000), representativo de amostras de homogenato de leucócitos peritoneais (n=3). (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β-actina. *p< 0,05, em relação aos controles. #p< 0,05, em relação aos grupos VBa-1 e 12 horas (ANOVA). C: controle.

2.4.3 Efeito do VBa sobre a atividade catalítica de COX-1 e COX-2

A atividade enzimática de COX-1 e COX-2 foi determinada em leucócitos totais, coletados da cavidade peritoneal de camundongos 1, 4 e 6 h da injeção do VBa. O valor da atividade catalítica média, basal, de COX-1 e de COX-2, após injeção de salina apirrogênica, foi de $3,0 \pm 0,28$ e $0,18 \pm 0,06$ nm/min/mL, respectivamente (Figuras 3A e 3B). Como demonstrado na Figura 3A, o VBa aumentou a atividade catalítica de COX-1 desde 1^a até a 4^a hora, de forma significativa, em relação aos grupos controles, com valor médio de $6,55 \pm 0,32$ nm/min/mL. Por outro lado, a isoforma COX-2, apresentou atividade enzimática significativa, em relação aos respectivos grupos controles, na 6^a hora após a injeção de VBa, com valor de $3,4 \pm 0,6$ nm/min/mL (Figura 3B).

Figura 2.3 Efeito do veneno de *B. asper* sobre a atividade enzimática de COX-1 e 2 em leucócitos peritoneais. Os animais receberam VBa i.p. (0,25 mg/kg) ou salina apirrogênica (0,9%) (Controle), em volume final de 1 mL. As atividades enzimáticas de COX-1 e COX-2 foram medidas em diferentes intervalos de tempo (1, 4 e 6 h), em homogenato de leucócitos, utilizando-se um *kit* comercial como descrito em Material e Métodos. Cada barra representa a média $\pm$ EPM de 4-5 animais. * $p < 0,05$ em comparação aos controles (ANOVA).

2.4.4 Liberação de PGD₂ e PGE₂, por macrófagos peritoneais isolados induzida pelo veneno de *B. asper* *in vitro*

Para avaliar a liberação de PGD₂ e PGE₂ *in vitro*, macrófagos residentes, isolados da cavidade peritoneal, foram incubados, em suspensão, com o VBa ou apenas em meio de cultura (RPMI) (Controle), pelos períodos de 1 a 6 h. A concentração de VBa empregada (5 µg/mL), foi previamente testada quanto à citotoxicidade, pela análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH). Em períodos de até 6 h, esta concentração de VBa não causou alterações significativas da viabilidade celular (>90% células viáveis) (dados não demonstrados). As Figuras 4A e 4B mostram que os macrófagos isolados, incubados apenas com RPMI (Controle), apresentaram liberação média de 195±25,23 pg/mL de PGD₂ e de 5410±363,25 pg/mL de PGE₂, respectivamente. A Figura 4^a mostra que os níveis de PGD₂ foram aumentados de modo significativo, em média de 430%, após a estimulação das células com VBa, da 1^a até a 6^a hora de incubação. A Figura 4B mostra que o VBa aumentou, significativamente, a concentração de PGE₂, com aumentos percentuais, que variaram de 216 a 736%, entre 1 e 6 horas de incubação, em comparação aos controles.

Figura 2.4 Efeito do veneno de *B. asper* na liberação de PGD₂ e PGE₂ por macrófagos residentes em cultura. Macrófagos isolados (1×10^6 células/ 1mL) foram incubados em suspensão, com o VBa (5 µg/ mL) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 4,5 e 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂. As concentrações de PGD₂ e PGE₂ foram avaliadas por EIA, como descrito em Material e Métodos, nos sobrenadantes das culturas. Os dados representam a média ± E.P.M. de 3-5 animais. *p< 0,05 em relação aos controles. #p< 0,05 em relação aos grupos VBa-3 e 4,5 h (ANOVA).

2.4.5 Liberação de PGE₂, por neutrófilos isolados, induzida pelo veneno de *B. asper* *in vitro*

Para avaliar a liberação de PGE₂ *in vitro*, os neutrófilos isolados foram incubados, em suspensão, com o VBa ou apenas em meio de cultura (RPMI) (Controle), pelos períodos de 1, 3, 4,5 e 6 h. A concentração utilizada (5 µg/mL) foi previamente testada, quanto à citotoxicidade, pela análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH). Em períodos de até 6 h, esta concentração de VBa não causou alterações significativas na viabilidade celular (> 90% células viáveis) (dados não demonstrados). A Figura 7 mostra que os neutrófilos incubados apenas com RPMI (Controle), apresentaram liberação média de 3005,5±543 pg/mL de PGE₂. Os níveis de PGE₂ foram aumentados, de modo significativo, em cerca de 317%, da 3^a até a 6^a hora, após a estimulação das células com o VBa,.

Figura 2.5 Efeito do veneno *B. asper* na liberação de PGE₂ por neutrófilos isolados, em cultura. Neutrófilos isolados (1×10⁶ células/ 1mL) foram incubados em suspensão, com o VBa (5 µg/ mL) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 4,5 e 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂. As concentrações de PGE₂ foram avaliadas por EIA, como descrito em Material e Métodos, nos sobrenadantes das culturas. Os dados representam a média ± E.P.M. de 3-5 animais. *p< 0,05 em relação aos controles (ANOVA).

2.4.6 Efeito do veneno de *B. asper* sobre a expressão de COX-2 e COX-1, em macrófagos peritoneais residentes, isolados

A expressão da COX-1 e da COX-2 foi analisada em macrófagos peritoneais residentes, isolados e incubados, em suspensão, com o VBa ou apenas em meio de cultura (RPMI) (Controle), por períodos de 1, 3, 4,5 e 6 h. A Figura 8A mostra as bandas imunoreativas para COX-1 e/ou COX-2, obtidas em células controles ou incubadas com o VBa. Após a incubação das células com o VBa, não houve alteração nas intensidades das bandas correspondentes à COX-1, em todos os períodos de tempo analisados (dados não demonstrados), porém, como mostra a Figura 8B, houve aumento significativo das intensidades das bandas de COX-2 entre a 3^a e 6^a h, máximo em 4,5 h, em comparação aos controles, com aumento de 268%.

Figura 2.6 Efeito do veneno de *B. asper* na expressão protéica de COX-1 e -2, por macrófagos peritoneais residentes isolados. Macrófagos peritoneais isolados (1×10^6 células/ 1mL RPMI) foram incubados, em suspensão, com o VBa (5 µg/ mL) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 4,5 e 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂. (A): Western blot com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:2000), anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000), representativo (n=3) de amostras de homogenatos de leucócitos peritoneais. (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β-actina. *p < 0,05 em relação aos controles. #p < 0,05 em relação ao VBa-1, 3 e 6 h (ANOVA).

2.4.7 Efeito do veneno de *B. asper* sobre a expressão de COX-2 e COX-1 em neutrófilos isolados

A expressão da COX-1 e da COX-2 foi analisada em neutrófilos isolados e incubados, em suspensão, com VBa ou em meio de cultura (RPMI) (Controle), por períodos de 1, 3, 4,5 e 6 h. A Figura 9A demonstra as bandas imunoreativas para COX-1 e/ou COX-2, obtidas em células controles ou incubadas com o VBa. Após a incubação das células com o VBa, não houve alteração nas intensidades das bandas correspondentes à COX-1, em todos os períodos de tempo analisados (dados não demonstrados), porém, de acordo com a Figura 9B, houve aumento significativo das intensidades das bandas de COX-2 entre a 3^a e 6^a h, máximo em 6 h, em comparação aos controles, com aumento percentual de 250%.

Figura 2.7 Efeito do veneno de *B. asper* na expressão protéica de COX-1 e -2, por neutrófilos isolados. Neutrófilos isolados (1×10^6 células/ 1mL RPMI) foram incubados, em suspensão, com o VBa (5 μg/ mL) ou meio de cultura apenas (Controle), por 1, 3, 4,5 e 6 horas, a 37°C e 5% de CO₂. (A): Western blot com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:2000), anti-COX-2 (1:2500) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:2000), representativo (n=3) de amostras de homogenatos de leucócitos peritoneais. (B): Quantificação, por densitometria, das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β-actina. *p < 0,05 em relação ao controle. #p < 0,05 em relação ao VBa-1, 3 e 4,5 h. (ANOVA).

2.5 DISCUSSÃO

A reação inflamatória local, causada pelo veneno de *Bothrops asper* (LOMONTE *et al.*, 1993), depende, em parte, da liberação de eicosanóides (ZAMUNÉR *et al.*, 2005). No entanto, o mecanismo desta ação, especialmente no que diz respeito às ciclooxygenases, ainda não foi esclarecido.

No presente estudo, observou-se que a injeção intraperitoneal do veneno de *B. asper*, em camundongos, induziu o aumento da produção de PGD₂ e de PGE₂, na cavidade peritoneal dos animais. Estas prostaglandinas possuem ação vasodilatadora e podem potencializar o aumento da permeabilidade vascular, causado pela bradicinina e histamina (RAUD, 1990; ITO *et al.*, 1989; HERSCHAMN, 1996; GERRITSEN, 1996). Desse modo, a presença de elevadas concentrações das PGE₂ e PGD₂, no sítio inflamatório, induzido pelo veneno de *B. asper*, reforça a idéia de sua participação na reação local inflamatória edematogênica e hiperalgésica, causada por este veneno (CHAVES *et al.*, 1998; CHACUR *et al.*, 2001). Os dados demonstraram, ainda, diferenças no perfil temporal de liberação de ambas prostaglandinas: a PGD₂ foi liberada rapidamente e por um curto período de tempo, enquanto a PGE₂, embora liberada rapidamente, persistiu por um período prolongado e atingiu níveis basais apenas nas 12 horas. Os fatores determinantes dessas diferenças não foram avaliados neste estudo, porém, as diferentes células, presentes no foco inflamatório, devem ter um papel importante na determinação desse perfil, por possuírem capacidades distintas de produção de mediadores. Nesse sentido, a literatura mostra que a PGD₂ é a principal prostaglandina liberada de mastócitos, em períodos iniciais de processos inflamatórios (IKAI *et al.*, 1984; ENNIS *et al.*, 1984). Embora não tenha sido descrito qualquer efeito do veneno de *B. asper* em mastócitos, este veneno contém um elevado teor de fosfolipase A₂ (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; 1997), com capacidade de desgranular mastócitos (CIRINO *et al.*, 1989; MORENO *et al.*, 1992). Portanto, é possível que os mastócitos peritoneais sejam estimulados pelo VBa e constituam uma fonte importante de PGD₂s, nos períodos iniciais da ação deste veneno. Outro tipo celular, potencialmente importante, para o perfil de liberação de prostaglandinas, no presente modelo experimental, é o macrófago. Estas células são centrais na inflamação e, quando ativadas, liberam uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo a PGD₂ (KAY, 1988), e a PGE₂, sendo este o prostanóide mais importante (HATA e BREYER, 2004). Em adição ao tipo celular, a contribuição de citocinas pode ser considerada no presente modelo experimental. Segundo Fournier (1997), o TNF- α exerce, em macrófagos, uma ação

regulatória sobre a liberação de prostaglandinas, causando aumento da liberação de PGE_2 e diminuição da produção de PGD_2 . Uma vez que o veneno de *B.asper* induz a liberação de $\text{TNF-}\alpha$ (ZAMUNÉR et al., 2001), sugere-se que esta citocina possa regular, de alguma maneira, a liberação dos prostanóides analisados.

Estudos prévios demonstraram que o veneno de *B.asper* induziu a expressão de COX-2, em leucócitos peritoneais, a partir da 3ª h de sua injeção (ZAMUNER, 2002). No presente estudo, reproduziu-se o perfil temporal deste efeito, na condição experimental utilizada. Recentemente, demonstrou-se que o veneno de outra espécie, a *Bothrops jararaca*, embora mais lentamente, induziu a expressão COX-2, em leucócitos peritoneais (MOREIRA et al., 2007). Em seguida, avaliou-se a atividade catalítica da COX-2 e COX-1, em leucócitos recrutados para a cavidade peritoneal dos camundongos, na vigência de ação do veneno de *B. asper*. Os resultados demonstraram que este veneno aumentou a atividade catalítica da COX-2, somente a partir da 6ª hora de sua injeção, indicando, a necessidade de um intervalo de tempo, após a expressão, para que esta proteína adquira capacidade enzimática. Este fato encontra apoio na literatura, que demonstra que proteínas recém sintetizadas nem sempre se encontram funcionalmente ativas, em função de processos de pós-tradução (ÉTIENNE, 2003). No que se refere à COX-1, embora não tenha sido verificado um aumento de sua expressão protéica, os resultados ora obtidos revelaram que o veneno de *B. asper* aumentou a atividade catalítica desta isoforma, nos períodos iniciais após a sua injeção.

A literatura mostra que a ativação catalítica das COX-1 e COX-2 está relacionada ao nível de ácido araquidônico, liberado no citoplasma das células (MURAKAMI et al., 2000). Assim sendo, estímulos inflamatórios, que causam a liberação de um elevado teor de ácido araquidônico, ativam imediatamente a COX-1, enquanto somente baixas concentrações desse substrato, podem ativar a COX-2. Isto é observado, geralmente, em períodos tardios da reação inflamatória (MORITA, et al., 1995; REDDY e HERSCHMAN, 1997; REDDY et al., 1997). Desse modo, é possível sugerir que, no presente modelo experimental, a ativação das COXs, pelo veneno de *B. asper*, obedeça a este tipo de regulação, com a ativação inicial da COX-1. Por outro lado, o aparecimento de um novo incremento nos níveis de PGE_2 , a partir da terceira hora após a injeção de VBa, em paralelo à expressão e atividade catalítica da COX-2, sugere que esta isoforma contribua para a produção de PGE_2 nos períodos mais tardios. Em apoio a esta hipótese, há evidências de que, durante um processo inflamatório, as COX-1 e -2 regulam diferentes fases da biosíntese de prostanóides e não exercem funções sobrepostas (NARABA, et al., 1998). Em contraste, Olivo et al. (2007), mostraram que COX-2, mas não a COX-1, está

envolvida na produção de prostaglandinas e no desenvolvimento de edema podal, induzido pelo VBa. De qualquer modo, a ciclooxigenase envolvida na produção de cada prostanóide, induzida pelo VBa, poderá ser definida somente a partir de ensaios efetuados com inibidores específicos de COX-1 e de COX-2, os quais serão realizados em futuro próximo.

De outra parte, um possível efeito do veneno de *B. asper*, em sintases específicas, acopladas às COXs, não pode ser descartada para explicar o aumento da produção de prostaglandinas, verificado neste estudo. A PGE₂ e a PGD₂ são produzidas por sintases específicas, que podem estar acopladas tanto à COX-1 quanto à COX-2, sendo induzíveis as sintases associadas à COX-2. Portanto, o tipo de sintase, acoplada à isoforma de COX, mobilizada em distintos estados de ativação celular, pode determinar a produção diferencial de prostanóides, induzida pelo veneno. Esta hipótese será alvo de pesquisas futuras.

A seguir, com o intuito de detalhar os efeitos veneno de *B. asper*, foram realizados ensaios *in vitro*, com a análise do efeito deste veneno em macrófagos e neutrófilos isolados, quanto à síntese de prostanóides. Estes tipos celulares foram definidos a partir do conhecimento de que o infiltrado leucocitário, induzido veneno de *B. asper* é constituído predominantemente neutrófilos, nas primeiras 24 h e por macrófagos, na 48^a h após a sua injeção (ZAMUNÉR, 2002). O veneno de *Bothrops asper* ativa funções dessas células, causando aumento de fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio *in vivo* além da liberação de NO e expressão de iNOS por macrófagos isolados (ZAMUNÉR *et al.*, 2001). Além disso, o papel destas células, no processo inflamatório, é bem conhecido. Os macrófagos residentes, juntamente com os mastócitos, representam a primeira linha de defesa do organismo (CRAWFORD *et al.*, 1994). Os neutrófilos, por sua vez, são as primeiras células que migram, em direção ao sítio inflamatório, para fagocitarem os agentes injuriosos e liberarem mediadores inflamatórios (SCAPINI *et al.*, 2000).

Os resultados deste estudo mostraram que o VBa foi capaz ativar, diretamente, macrófagos e neutrófilos isolados e de induzir a expressão de COX-2, nestas células. O perfil temporal deste efeito foi diferente em ambas as células: em macrófagos, a expressão máxima de COX-2 ocorreu após 4,5 h de incubação, enquanto em neutrófilos, após 6 h de incubação. Por outro lado, a expressão de COX-1 não foi modificada pelo VBa, em ambas as células. Esses dados indicaram que os macrófagos respondem mais rapidamente ao estímulo dado pelo veneno, para a expressão de COX-2 se comparados aos neutrófilos. Neste contexto, vale mencionar que este é o primeiro relato da ação direta de um veneno botrópico, em leucócitos isolados, quanto à expressão de COX-2. A diferença de resposta, entre dois tipos celulares, quanto ao perfil de indução de COX-2, está de acordo com a literatura, que mostra um padrão

distinto de indução e regulação da expressão de COX-2, entre PMNs e MNs, frente a um mesmo estímulo (MALONEY *et al.*, 1998; POLIOUT *et al.*, 1998). Provavelmente, devido às diferenças funcionais, que se conjugam durante o processo inflamatório, estas células apresentam diferenças importantes quanto às vias de transdução de sinal. Diante desses fatores, pode-se sugerir que esses tipos celulares respondem de forma diferenciada ao VBa, do ponto de vista temporal, por possuírem repertórios particulares de vias de transdução de sinal,

Em relação à produção de prostaglandinas, tanto os macrófagos quanto os neutrófilos responderam ao veneno *B. asper*, com a produção de PGE₂. Estes resultados são interessantes, pois reforçam o conceito de que este veneno é capaz de induzir a liberação de prostanóides e apontam estas células como fontes potenciais desses mediadores, nos efeitos *in vivo* do mesmo. De fato, a literatura mostra que os dois tipos celulares são importantes fontes de PGE₂, em processos inflamatórios (HUMES *et al.*, 1977). Do ponto de vista de perfil temporal, foram observadas diferenças entre os dois tipos celulares:—em macrófagos, embora a liberação de PGE₂ tenha decaído nas 4,5 h, após o estímulo pelo VBa, seus níveis foram novamente elevados, após 6 horas de incubação. Neste período observou-se a expressão máxima da COX-2, o que sugere a sua contribuição também no período final da produção de PGE₂. Por outro lado, em neutrófilos, embora a produção de PGE₂ tenha ocorrido mais tardiamente, seu nível manteve-se elevado durante todo o período de estudo. Este fato sugere a contribuição da COX-2 para este efeito, desde o período inicial. No entanto, a participação desta isoforma, na liberação de PGE₂, por estas células, necessita ser melhor investigada.

Quanto à PGD₂, este mediador foi analisado somente em macrófagos isolados, pois não há descrição na literatura, sobre a produção deste prostanóide por neutrófilos. Estas células são importantes fontes dos mediadores lipídicos LTB₄, PGE₂ e TXA₂ (FORD-HUTCHINSON *et al.*, 1980; ZURIER, 1976). A incubação de VBa, com os macrófagos isolados, levou à produção contínua de PGD₂, em todos os períodos estudados. A literatura mostra que nos períodos iniciais de uma reação inflamatória, a principal célula fornecedora de PGD₂ é o mastócito (IKAI *et al.*, 1984; ENNIS *et al.*, 1984). No entanto, o macrófago também pode contribuir para esta resposta imediata, dependendo do estímulo (KAY, 1988). Desse modo, o perfil temporal da liberação de PGD₂, por macrófagos *in vitro*, na vigência de ação do VBa, sugere que *in vivo* estas células representem uma fonte importante de PGD₂ liberada pelo veneno. De outra parte, os dados obtidos mostraram que o padrão de liberação de PGD₂ *in vitro* não correspondeu àquele observado nos estudos *in vivo*. Nestes ensaios, a PGD₂ foi continuamente liberada, independentemente do período de início da resposta. Provavelmente, a linearidade observada nos níveis desta prostaglandina, nos sobrenadantes das culturas

celulares, tenha resultado da oferta contínua de ácido araquidônico, gerado por ação do VBa, que foi mantido nas culturas celulares, por todo o período experimental. Além disso, pode-se supor que, nestas condições, a regulação deste prostanóide, por citocinas não seja efetiva.

Em síntese, os dados obtidos indicam que o veneno de *Bothrops asper* induz atividades inflamatórias importantes *in vivo*, que incluem a liberação de prostaglandinas E_2 e D_2 , via indução da expressão da COX-2 e atividade das COX-1 e -2. Os dados obtidos *in vitro* mostraram uma ação direta desse veneno, em macrófagos e neutrófilos, sendo que os macrófagos respondem mais prontamente que os neutrófilos para expressão de COX-2. Estes resultados reforçam os dados obtidos *in vivo* e sugerem que estas células sejam alvos importantes do VBa, para a produção de prostanóides *in vivo*.

Estes estudos adicionaram conhecimento aos mecanismos da ação inflamatória dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. Dessa maneira, esta investigação poderá contribuir, futuramente, para aplicação de tratamentos mais adequados e eficazes, que visem elementos determinantes da reação inflamatória, no que se refere às reações locais, induzidas por venenos botrópicos.

Figura 2.8 Esquema representativo de vias de sinalização envolvidas na produção da prostaglandina E_2 e prostaglandina D_2 , por macrófagos estimulados pelo veneno de *Bothrops asper*.

2.6 CONCLUSÕES

- A administração do veneno de *B. asper*, na cavidade peritoneal de camundongos, induz liberação de prostaglandina E_2 e prostaglandina D_2 ;
- O VBa não afeta a expressão constitutiva de COX-1, mas promove a expressão protéica de COX-2, cuja atividade catalítica é detectada 3 h após a expressão.
- O VBa aumenta a atividade catalítica da COX-1.
- O VBa exerce ação direta sobre macrófagos e neutrófilos isolados: induz a expressão de COX-2, mas não de COX-1, a liberação de PGD_2 em macrófagos e PGE_2 em macrófagos e neutrófilos, com perfil temporal distinto.
- Os macrófagos respondem ao estímulo pelo VBa, mais rapidamente do que os neutrófilos, para a produção de PGE_2 .

REFERÊNCIAS

(Capítulos 1 e 2)

ABATE, A.; SCHRÖDER, H.; Protease inhibitors protect macrophages from lipopolysaccharide-induced cytotoxicity: possible role for NF- κ B. **Life Sci.**, v. 62, p. 1081-1088, 1998.

ACKERMANN, E. J.; CONDE-FRIEBOES, K.; DENNIS, E. A. Inhibition of macrophage Ca(2+)-independent phospholipase A₂ by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 445-450, 1995.

ACOSTA DE PÉREZ, O.; TEIBLER, P.; KOSCINCZUK, P.; SÁNCHEZ NEGRETTE, M.; TRULLS, H.; MARUÑAK, S. Edema and myonecrosis induced by *Bothrops jararaca* venom of Argentina in mice. **Acta Physiol. Pharmacol. Ther. Latinoam.**, v. 46, n. 4, p. 233-238, 1996.

AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; 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.

ALLISON, A. C.; CHIN, R. C.; CHENG, Y. Cyclooxygenase inhibitors vary widely in potency for preventing cytokine-induced bone resorption. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 696, p. 303-306. 1993.

ALVING, K.; MATRAN, R.; LUNDBERG, J. M. The possible role of prostaglandin D₂ in the long-lasting airways vasodilatation induced by allergen in the sensitized pig. **Acta Physiol. Scand.**, v. 143, n. 1, p. 93-103, 1991.

AMARAL, C. F. S.; DA SILVA, O. A.; GODOY, P.; MIRANDA, D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. **Toxicon**, v. 23, p. 877-885, 1985.

AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; ARAÚJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. F. GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys⁴⁹-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 8, p. 7326-7335, 2005.

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.

ASANO, K.; NAKAMURA, H.; LILLY, C. M.; KLAGSBRUN, M.; DRAZEN, J. M. Interferon gamma induces prostaglandin G/H synthase-2 through an autocrine loop via the epidermal growth factor receptor in human bronchial epithelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 5, p. 1057-1063, 1997.

BAEK, S. H.; LIM, J. H.; PARK, D. W.; KIM, S. Y.; LEE, Y. H.; KIM, J. R.; KIM, J. H. Group IIA secretory phospholipase A(2) stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF-kappaB in macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 9, p. 2709-2717, 2001.

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. The transcription factor NF-kB and human disease. **J. Clin. Invest.**, v. 107, 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.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett.**, v. 531, n. 1, p. 2-6, 2002.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, p. 1066-1071, 1997.

BARRIOS-RODILES, M.; CHADEE, K. Novel regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by IFN-gamma in human macrophages. **J. Immunol.**, v. 161, n. 5, p. 2441-2448, 1998.

BAULDRY, S. A.; WOOTEN, R. E. Leukotriene B4 and platelet activating factor production in permeabilized human neutrophils: role of cytosolic PLA2 in LTB4 and PAF generation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1303, n. 1, p. 63-73, 1996.

BECK, S.; LAMBEAU, G.; SCHOLZ-PEDRETTI, K.; GELB, M. H.; JANSSEN, M. J.; EDWARDS, S. H.; WILTON, D. C.; PFEILSCHIFTER, J.; KASZKIN, M. Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A2 (sPLA2)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA2 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 32, p. 29799-29812, 2003.

BIDGOOD, M. J.; JAMAL, O. S.; CUNNINGHAM, A. M.; BROOKS, P. M.; SCOTT, K. F. Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes. **J. Immunol.**, v. 165, n. 5, p. 2790-2797, 2000.

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. Review.

- BOIE, Y.; SAWYER, N.; SLIPETZ, D. M.; METTERS, K. M.; ABRAMOVITZ, M. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 32, p. 18910-18916, 1995.
- BOLAÑOS, R.; ROJAS, O.; ULLOA FLORES, C. E. Biomedical aspects of 4 cases of snake bites by *Lachesis muta* (Ophidia: Viperidae) in Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.**, v. 30, n. 1, p. 53-58, 1982.
- BON, C.; CHOUMET, V.; DELOT, E.; FAURE, G.; ROBBE-VINCENT, A.; SALIOU, B. Different evolution of phospholipase A2 neurotoxins (beta-neurotoxins) from Elapidae and Viperidae snakes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 710, p. 142-148, 1994. Review.
- 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. Review.
- 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.
- 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. M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **J. Physiol. Pharmacol.**, s. 5, p. 113-124. 2006. Review.
- BOTTING, R.; AYOB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostagl. Leuk. Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 85-87, 2005.
- BOZZA, P. T.; PAYNE, J. L.; MORHAM, S. G.; LANGENBACH, R.; SMITHIES, O.; WELLER, P. F. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 20, p. 11091-11096, 1996.
- BREDER, C. D.; DEWITT, D.; KRAIG, R. P. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 355, n. 2, p. 296-315, 1995.
- BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of crotalus phospholipase A₂ and crotoxin complex. **Toxicon**, v. 14, p. 221-233, 1976.
- 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.
- 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. Review.

- CALDER, P. C. The effects of dietary lipid manipulation upon the production of reactive oxygen species by murine peritoneal macrophages. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 23, n. 2, p. 280S, 1995.
- CALDERON, L.; LOMONTE, B. Inhibition of the myotoxic action of *Bothrops asper* myotoxin II in mice immunization with its synthetic peptide 115-129. **Toxicon**, v. 37, p. 683-687, 1999.
- CALDERON, L.; LOMONTE, B. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 358, p. 343-350, 1998.
- CÂMARA, P. R. S.; ESQUISATTO, L. C. M.; CAMARGO, E. A.; RIBELA, M. T. C. P.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory oedema induced by phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus* sp. in the rat dorsal skin: a role for mast cell and sensory C-fibers. **Toxicon**, v. 41, p. 823-829, 2003.
- CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain; its possible role in the febrile response. **Brain Res.** v. 697, n. 1-2, p. 187-196. 1995.
- 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, p. 125-133, 2001.
- CASHMAN, J. N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, v. 5, p. 13-23, 1996.
- CASSATELLA, M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunol. Today**, v. 16, n. 1, p. 21-26, 1995.
- CASTRILLO, A.; DÍAZ-GUERRA, M. J.; HORTELANO, S.; MARTÍN-SANZ, P.; BOSCA, L. Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, n. 5, p.1692-1698, 2000.
- CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v. 41, p. 667-678, 2003.
- CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 39, p. 1173-1181, 2001.
- CHAKRABORTI, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspectiva. **Cell Signal.**, v. 15, p. 637-665, 2003. Review.

- CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAÍ, H.; LAMAR, K. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. U. S. A.**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.
- CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, p. 1861-1869, 1998.
- CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon**, v. 33, p. 31-39, 1995.
- CHEN, J. K.; WANG, D. W.; FALCK, J. R.; CAPDEVILA, J.; HARRIS, R. C. Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 8, p. 4764-4769, 1999.
- CHEPENIK, K. P.; DIAZ, A.; JIMENEZ, S. A. Epidermal growth factor coordinately regulates the expression of prostaglandin G/H synthase and cytosolic phospholipase A₂ genes in embryonic mouse cells. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 34, p. 21786-21792, 1994.
- CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998. Review.
- CHISARI, A.; SPINEDI, E.; VOIROL, M. J.; GIOVAMBATISTA, A.; GAILLARD, R. C. A phospholipase A₂-related snake venom (from *Crotalus durissus terrificus*) stimulates neuroendocrine and immune functions: determination of different sites of action. **Endocrinology**, v. 139, p. 617-625, 1998.
- CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R. J. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 166, n. 3, p. 505-510, 1989.
- CLARK, J. D.; SCHIEVELLA, A. R.; NALEFSKI, E. A.; LIN, L. L. Cytosolic phospholipase A₂. **J. Lipid. Mediat. Cell Signal.**, v. 12, p. 83-117, 1995.
- COREY, E. J.; NIWA, H.; FALCK, J. R.; MIOSKOWSKI, C.; ARAI, Y.; MARFAT, A. Recent studies on the chemical synthesis of eicosanoids. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.**, v. 6, p. 19-25, 1980.
- CRAWFORD, R. M.; LEIBY, D. A.; GREEN, S. J.; NACY, C. A.; FORTIER, A. H.; MELTZER, M. S. Macrophage activation: a riddle of immunological resistance. **Immunol. Ser.**, v. 60, p. 29-46, 1994. Review.
- CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P.; SUDO, L. S. Edematogenic responses induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of lymphocytes. **Toxicon**, v. 32, p. 1425-1431, 1994.
- D'AQUISTO, F.; IUZONE, T.; ROMBOLA, L.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M.; CARNUCCIO, R. Involvement of NF-κB in regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. **FEBS Lett.**, v. 418, p. 175-178, 1997.

- DARIUS, H.; MICHAEL-HEPP, J.; THIERAUCH, K. H.; FISCH, A. Inhibition of human platelets and polymorphonuclear neutrophils by the potent and metabolically stable prostaglandin D2 analog ZK 118.182. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 258, n. 3, p. 207-213, 1994.
- DAVIDSON, J.; KERR, A.; GUY, K.; ROTONDO, D. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. **Immunology**, v. 94, n. 2, p. 228-234, 1998.
- DAVIES, J. D. Mammary ductal foam cells: macrophage immunophenotype for further cells? **Hum. Pathol.**, v. 25, n. 2, p. 214-215, 1994.
- 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.
- DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1083, n. 2, p. 121-134, 1991.
- DIAZ, A.; CHEPENIK, K. P.; KORN, J. H.; REGINATO, A. M.; JIMENEZ, S. A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta 1 in human lung fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, v. 241, n. 1, p. 222-229, 1998.
- DIAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1070, n. 2, p. 455-460, 1991.
- DINCHUK, J. E.; LIU, R. Q.; TRZASKOS, J. M. COX-3: in the wrong frame in mind. **Immunol. Lett.**, v. 86, n. 1, p. 121, 2003.
- DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.**, v. 12, p. 1063-1073, 1998. Review.
- DUBRAVEC, D. B.; SPRIGGS, D. R.; MANNICK, J. A.; RODRICK, M. L. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 17, p. 6758-6761, 1990.
- DUFTON, M. J.; EAKER, D.; HIDER, R. C. Conformational properties of phospholipases A2. Secondary-structure prediction, circular dichroism and relative interface hydrophobicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 137, n. 3, p. 537-544, 1983.
- DUMITRASCU, D. Mast cells as potent inflammatory cells. **Rom. J. Intern. Med.**, v. 34, n. 3-4, p. 159-172, 1996. Review.
- EBERHART, C. E.; COFFEY, R. J.; RADHIKA, A.; GIARDIELLO, F. M.; FERRENBACH, S.; DUBOIS, R. N. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. **Gastroenterology**, v. 107, n. 4, p. 1183-1188, 1994.

ELLIS, E. F.; WEI, E. P.; KONTOS, H. A. Vasodilation of cat cerebral arterioles by prostaglandins D2, E2, G2, and I2. **Am. J. Physiol.**, v. 237, n. 3, p. H381-385, 1979.

ENNIS, M.; BARROW, S. E.; BLAIR, I. A. Prostaglandin and histamine release from stimulated rat peritoneal mast cells. **Agents Actions**, v. 14, n. 3-4, p. 397-400, 1984.

ÉTIENNE, J. As sínteses das proteínas. In:_____. **Bioquímica Genética e Biologia Molecular**. Santos: Santos Livraria Editora, 2003. p. 62-141.

FALCONI, M.; DESIDERI, A.; RUFINI, S. Membrane-perturbing activity of Viperidae myotoxins: an electrostatic surface potential approach to a puzzling problem. **J. Mol. Recognit.**, v. 13, n. 1, p. 14-19, 2000.

FARSKY, S. H. P.; COSTA-CRUZ, J. W. M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* venom. *In vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, v. 35, p. 185-193, 1997.

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.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from postranslational modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074-8083, 1991.

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.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 31, p. 1551-1559, 1993.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; SMITH, M. J. Lipoxygenase products and the polymorphonuclear leucocyte. **Agents Actions**, v. 10, n. 6, p. 548-550, 1980.

FÖRSTERMANN, U.; HELDT, R.; HERTTING, G. Studies on the mechanism of central cardiovascular and temperature responses to prostaglandin D2. **Prostaglandins Leukot. Med.**, v. 18, n. 3, p. 301-308, 1985.

FOURNIER, T.; FADOK, V.; HENDON, P. M. Tumor necrosis factor- α inversely regulates prostaglandin D2 and prostaglandin E2 production in murine macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 31065-31072, 1997.

FUNK, C. D.; FUNK, L. B.; KENNEDY, M. E.; PONG, A. S.; FITZGERALD, G. A. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. **FASEB J.**, v. 5, n. 9, p. 2304-2312, 1991.

- GAMBERO, A.; THOMAZZI, S. M.; CINTRA, A. C.; LANDUCCI, E. C.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A2. **Toxicon**, v. 44, n. 5, p. 473-481, 2004.
- GARCIA LEME, J.; SCHAPOVAL, E. E. S. Stimulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. **Braz. J. Pharmacol.**, v. 53, p. 75-83, 1975.
- GARCIA, F.; TOYAMA, M. H.; CASTRO, F. R.; PROENÇA, P. L.; MARANGONI, S.; SANTOS, L. M. Crota-potin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 433-437, 2003.
- GERRITSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanóides in the microcirculation. **Cardiov. Res.**, v. 32, p. 720-732, 1996. Review.
- GIBB, W.; MATTHEWS, S. G.; CHALLIS, J. R. Localization and developmental changes in prostaglandin H synthase (PGHS) and PGHS messenger ribonucleic acid in ovine placenta throughout gestation. **Biol. Reprod.**, v. 54, n. 3, p. 654-659, 1996.
- GIJÓN, M. A.; LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 65, n. 3, p. 330-336, 1999. Review.
- GILES, H.; LEFF, P. The biology and pharmacology of PGD2. **Prostaglandins**, v. 35, n. 2, p. 277-300, 1988.
- GORDON, S.; FRASER, I.; NATH, D.; HUGHES, D.; CLARKE, S. Macrophages in tissues and *in vitro*. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 25-32, 1992. Review.
- GRAF, B. A.; NAZARENKO, D. A.; BORRELLO, M. A.; ROBERTS, L. J.; MORROW, J. D.; PALIS, J.; PHIPPS, R. P. Biphenotypic B/macrophage cells express COX-1 and up-regulate COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in response to pro-inflammatory signals. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 11, p. 3793-3803, 1999.
- GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, n. 5, p. 662-675, 1994.
- GRISCAVAGE, J. M.; WILK, S.; IGNARRO, L. J. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF- κ B. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, p. 3308-3312, 1996.
- GUAN, Y.; CHANG, M.; CHO, W.; ZHANG, Y.; REDHA, R.; DAVIS, L.; CHANG, S.; DUBOIS, R. N.; HAO, C. M.; BREYER, M. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 273, p. F18-26, 1997.
- GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ROJANS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralization of local effects of *Bothrops asper* venom by polyvalent antivenon. **Toxicon**, v. 19, p. 493-500, 1981.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; CHAVES, F.; MORENO, E.; CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Com. Biochem. Physiol.**, v, 84, p. 159-164, 1986.

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. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom A₂ Enzymes Structure, Function and Mechanism**. Wiley: United Kindgom, 1997. p. 321-352.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.

HAAPAMÄKI, M. M.; GRÖNROOS, J. M.; NURMI, H.; ALANEN, K.; NEVALAINEN, T. J. Gene expression of group II phospholipase A₂ in intestine in Crohn's disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 94, n. 3, p. 713-720, 1999a.

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, 1999b.

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

HARA, S.; KUDO, I.; INOUE, K. Augmentation of prostaglandin E₂ production by mammalian phospholipase A₂ added exogenously. **J. Biochem.**, v. 110, n. 2, p. 163-165, 1991.

HARA, S.; KUDO, I.; MATSUTA, K.; MIYAMOTO, T.; INOUE, K. Amino acid composition and NH₂-terminal amino acid sequence of human phospholipase A₂ purified from rheumatoid synovial fluid. **J. Biochem.**, v. 104, n. 3, p. 326-328, 1988.

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.

HARRIS, R. C.; MCKANNA, J. A.; AKAI, Y.; JACOBSON, H. R.; DUBOIS, R. N.; BREYER, M. D. Cyclooxygenase-2 is associated with the *macula densa* of rat kidney and increases with salt restriction. **J. Clin. Invest.**, v. 94, n. 6, p. 2504-2510, 1994.

HASLETT, C. Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **Br. Med. Bull.**, v. 53, n. 3, p. 669-683, 1997. Review.

- HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol. Ther.**, v. 103, n. 2, p. 147-166, 2004. Review.
- HAWGOOD, B. J. How similar are the actions of crotoxin and beta-bungarotoxin? **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, n. 4, p. 397-406, 1989. Review.
- HAYAISHI, O.; URADE, Y. Prostaglandin D2 in sleep-wake regulation: recent progress and perspectives. **Neuroscientist**, v. 8, n. 1, p. 12-15, 2002.
- HEMLER, M.; LANDS, W. E. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 251, n. 18, p. 5575-5579, 1976.
- 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.
- HERNÁNDEZ, M.; FUENTES, L.; FERNÁNDEZ AVILÉS, F. J.; CRESPO, M. S.; NIETO, M. L. Secretory phospholipase A(2) elicits proinflammatory changes and upregulates the surface expression of fas ligand in monocytic cells: potential relevance for atherogenesis. **Circ. Res.**, v. 90, n. 1, p. 38-45, 2002.
- 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.
- HERSCHMAN, H. R. Prostaglandin synthase 2. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1299, p. 125-140, 1996. Review.
- HIRAI, H.; TANAKA, K.; YOSHIE, O.; OGAWA, K.; KENMOTSU, K.; TAKAMORI, Y.; ICHIMASA, M.; SUGAMURA, K.; NAKAMURA, M.; TAKANO, S.; NAGATA, K. Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J. Exp. Med.**, v. 193, n. 2, p. 255-261, 2001.
- HUBBARD, A.; ROTHLEIN, R.; HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 9, p. 1379-1386, 2000.
- HUMES, J. L.; BONNEY, R. J.; PELUS, L.; DAHLGREN, M. E.; SADOWSKI, S. J.; KUEHL, F. A.; DAVIES, P. Macrophages synthesis and release prostaglandins in response to inflammatory stimuli. **Nature**, v. 269, n. 5624, p. 149-151, 1977.
- IKAI, K.; OGOROCHI, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandin D2 and prostaglandin D synthetase in mast cell deficient mice. **Prostaglandins**, v. 27, n. 6, p. 877-885, 1984.
- ISHIZUKA, T.; SUZUKI, K.; KAWAKAMI, M.; HIDAKA, T.; MATSUKI, Y.; NAKAMURA, H. Thromboxane A₂ receptor blockade suppresses intercellular adhesion

molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, p. 367-377, 1996.

ITO, S.; NARUMIYA, S.; HAYAISHI, O. Prostaglandin D2: a biochemical perspective. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 37, n. 4, p. 219-234, 1989. Review.

JACOBS, A.; HWANG, D.; JULIAN, J.; CARSON, D. D. Regulated expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by uterine stroma. **Endocrinology**, v. 135, n. 5, p. 1807-1815, 1994.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-86, 1998.

JOHNSTON, R. B. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. **N. Engl. J. Med.**, v. 318, n. 12, p. 747-752, 1988. Review.

KAISER, I. I.; GUTIERREZ, J. M.; PLUMMER, D.; AIRD, S. D.; ODELL, G. D. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 278, p. 319-325, 1990.

KANG, R. Y.; FREIRE-MOAR, J.; SIGAL, E.; CHU, C. Q. Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 35, n. 8, p. 711-718, 1996.

KARGMAN, S.; CHARLESON, S.; CARTWRIGHT, M.; FRANK, J.; RIENDEAU, D.; MANCINI, J.; EVANS, J.; O'NEILL, G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. **Gastroenterology**, v. 111, n. 2, p. 445-454, 1996.

KASAMA, T.; STRIETER, R. M.; STANDIFORD, T. J.; BURDICK, M. D.; KUNKEL, S. L. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 1, p. 63-72, 1993.

KATORI, M.; MAJIMA, M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. **Inflamm. Res.**, v. 49, p. 367-392, 2000.

KAY, A. B. Leucocytes in asthma. **Immunol. Invest.**, v. 17, n. 8-9, p. 679-705, 1988. Review.

KELNER, M. J.; UGLIK, S. F. Mechanism of prostaglandin E2 release and increase in PGH2/PGE2 isomerase activity by PDGF: involvement of nitric oxide. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 12, n. 1, p. 240-243, 1994.

KHASELEV, N.; MURPHY, R. C. Susceptibility of plasmenyl glycerophosphoethanolamine lipids containing arachidonate to oxidative degradation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, n. 3-4, p. 275-284, 1999.

KIM, H.; LEE, H. S.; CHANG, K. T.; KO, T. H.; BAEK, K. J.; KWON, N. S. Chloromethyl ketones block induction of nitric oxide synthase in murine macrophages by preventing activation of nuclear factor- κ B. **J. Immunol.**, v. 154, p. 4741-4748, 1995.

- KINI, R. M.; EVANS, H. J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon**, v. 33, n. 12, p. 1585-1590, 1995.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989. Review.
- KIS, B.; SNIPES, J. A.; GASPAR, T.; LENZSER, G.; TULBERT, C. D.; BUSIJA, D. W. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. **Inflamm. Res.**, v. 55, n. 7, p. 274-278, 2006.
- KIS, B.; SNIPES, J. A.; ISSE, T.; NAGY, K.; BUSIJA, D. W. Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 23, n. 11, p. 1287-1292, 2003.
- KIYOMIYA, K.; OH-ISHI, S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF1 alpha, thromboxane B2 and PGD2 in rat pleurisy induced by phorbol myristate acetate. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 39, n. 2, p. 201-206, 1985.
- KNUDSEN, P. J.; DINARELLO, C. A.; STROM, T. B. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. **J. Immunol.**, v. 137, n. 10, p. 3189-3194, 1986.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, n. 6, p. 575-583, 1986.
- KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A2 homologue from *Vipera ammodytes* venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 202, n. 3, p. 1165-1168, 1991.
- KULINSKY, V. I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry**, v. 72, n. 6, p. 595-607, 2007. Review.
- KUPFER, A.; GANI, V.; JIMENEZ J. S.; SHALTIEL, S. Affinity labeling of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by *N*-alpha-tosyl-lysine chloromethyl ketone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 76, p. 3073-3077, 1979.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMBETH, J. D. Activation of the respiratory burst oxidase in neutrophils: on the role of membrane-derived second messengers, Ca⁺⁺, and protein kinase C. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 20, n. 6, p. 709-733, 1988.
- LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, O.; 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, p. 199-208, 2000.
- LANDUCCI, E. C.; CASTRO, R. C.; PEREIRA, M. F.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell

degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 343, n. 2-3, p. 257-263, 1998.

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, p. 578-583, 1995.

LANGENBACH, R.; MORHAM, S. G.; TIANO, H. F.; LOFTIN, C. D.; GHANAYEM, B. I.; CHULADA, P. C.; MAHLER, J. F.; LEE, C. A.; GOULDING, E. H.; KLUCKMAN, K. D.; KIM, H. S.; SMITHIES, O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. **Cell**, v. 83, p. 483-492, 1995.

LAU, H. Y.; ROCHE, C. M. Effects of secretory PLA₂ on rat peritoneal mast cells activated by different secretagogues. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 407, p. 105-108, 1997.

LEE, S. H.; SOYOOLA, E.; CHANMUGAM, P.; HART, S.; SUN, W.; ZHONG, H.; LIOU, S.; SIMMONS, D.; HWANG, D. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 36, p. 25934-25938, 1992.

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

LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Regulation of inflammatory vascular damage. **J. Pathol.**, v. 190, n. 3, p. 343-348, 2000. Review.

LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 82, p. 1-17, 2004.

LEWIS, R. A.; HOLGATE, S. T.; ROBERTS, L. J.; OATES, J. A.; AUSTEN, K. F. Preferential generation of prostaglandin D₂ by rat and human mast cells. **Kroc. Found. Ser.**, v. 14, p. 239-254, 1981.

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. 270, p. 14255-14258, 1995.

LIN, L. L.; LIN, A. Y.; DEWITT, D. L. IL-1 α induces the accumulation of cytosolic phospholipase A₂ and the release of PGE₂ in human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 23451-23454, 1992.

LINDEMANN, A.; RIEDEL, D.; OSTER, W.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W.; MERTELSMANN, R.; HERRMANN, F. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 83, n. 4, p. 1308-1312, 1989.

LIU, J. Y.; DENG, W. G.; GILROY, D. W.; SHYUE, S. K.; WU, K. K. Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 37, p. 34975-34982, 2001.

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.

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.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 47, p. 29867-29873, 1994

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; BAGGE, U.; HANSON, L. A. Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. **Biochem. Pharmacol.**, v. 47, p. 1509-1518, 1994.

LOMONTE, B.; TARKAWESHI, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of oedema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, n. 2, p. 93-105. 1993.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 102, n. 2, p. 325-329, 1992.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-733, 1989.

LORD, P. C.; WILMOTH, L. M.; MIZEL, S. B.; MCCALL, C. E. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 87, n. 4, p. 1312-1321, 1991.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MALONEY, C. G.; KUTCHERA, W. A.; ALBERTINE, K. H.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 160, n. 3, 1402-1410, 1998.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 20, p. 955-972, 1982.

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.

MARSHALL, L. A.; BOLOGNESE, B.; WINKLER, J. D.; ROSHAK, A. Depletion of human monocyte 85-kDa phospholipase A₂ does not alter leukotriene formation. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 759-765, 1997.

MATSUYAMA, T.; HORIE, H.; NAMBA, M.; NONAKA, K.; TARUI, S. Glucose dependent stimulation by prostaglandin D₂ of glucagon and insulin in perfused rat pancreas. **Life Sci.**, v. 32, n. 9, p. 979-982, 1983.

MEAD, J. F. The non-eicosanoid functions of the essential fatty acids. The non-eicosanoid functions of the essential fatty acids. **J. Lipid. Res.**, v. 25, n. 13, p. 1517-1521, 1984.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol. Ther.**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

MENSCHIKOWSKI, M.; HAGELGANS, A.; SIEGERT, G. Secretory phospholipase A₂ of group IIA: is it an offensive or a defensive player during atherosclerosis and other inflammatory diseases? **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 79, n. 1-2, p. 1-33, 2006.

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

MILLS, P. C.; NG, J.C.; SEAWRIGHT, A. A.; AUER, D. E. Vascular leakage induced by histamine, bradykinin, serotonin and prostaglandin E₂ in greyhounds. **Aust. Vet. J.**, v. 70, n. 1, p. 21-24, 1993.

MIZOGUCHI, A.; EGUCHI, N.; KIMURA, K.; KIYOHARA, Y.; QU, W. M.; HUANG, Z. L.; MOCHIZUKI, T.; LAZARUS, M.; KOBAYASHI, T.; KANEKO, T.; NARUMIYA, S.; URADE, Y.; HAYAISHI, O. Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 20, p. 11674-11679, 2001.

MOILANEN, E.; KIRKKOLA, A. L.; KANKAANRANTA, H.; NIEMINEN, M. M.; VAPAATALO, H. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ in isolated human polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation**, v. 17, n. 6, p. 705-714, 1993.

MOLLOY, E. S.; MCCARTHY, G. M. Eicosanoids, osteoarthritis, and crystal deposition diseases. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 17, n. 3, p. 346-350, 2005. Review.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, n. 5579, p. 663-665, 1976.

MORA, R.; MALDONADO, A.; VALVERDE, B.; GUTIERREZ, J. M. Calcium plays a key role in the effects induced by a snake venom Lys49 phospholipase A₂ homologue on a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, v. 47, p. 75-86, 2006.

MOREIRA, V.; ZAMUNER, S. R.; WALLACE, J. L.; TEIXEIRA, C. F. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 615-624, 2007.

MORENO, J. J.; FERRER, X.; ORTEGA, E.; CARGANICO, G. PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. **Agents Actions.**, v. 36, n. 3-4, p. 258-263, 1992.

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.

MORRIS, J. K.; RICHARDS, J. S. Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide synthase-2 and luteinization *in vitro* by A-kinase and C-kinase pathways. **Endocrinology**, v. 136, n. 4, p.1549-1558, 1995.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **J. Biochem.**, v. 131, p. 285-292. 2002.

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.; 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.; HARA, N.; KUDO, I.; INOUE, K. Role of phospholipase A₂ in mast cells activation and function. In: GLASER, K. B., VADAS, P. (Ed.). **Phospholipase A₂ in clinical inflammation: molecular approaches to pathophysiology**. CRC Press, 1995. p. 93-124.

MURAKAMI, M.; KUDO, I.; INOUE, K. Eicosanoid generation from antigen-primed mast cells by extracellular mammalian 14-kDa group II phospholipase A₂. **FEBS Lett.**, v. 294, n. 3, p. 247-251, 1991.

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, p. 2974-2982, 1998.

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.

NATARAJ, C.; THOMAS, D. W.; TILLEY, S. L.; NGUYEN, M. T.; MANNON, R.; KOLLER, B. H.; COFFMAN, T. M. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 8, p. 1229-1235, 2001.

NEEDHAM, L.; HOUSLAY, M. D. Tosyl-lysyl chloromethylketone detects conformational changes in the catalytic unit of adenylate cyclase induced by receptor and G-protein stimulation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 6, p. 855-859, 1988.

NEY, P.; SCHRÖR, K. PGD2 and its mimetic ZK 110.841 are potent inhibitors of receptor-mediated activation of human neutrophils. **Eicosanoids**, v. 4, n. 1, p. 21-28, 1991.

NIRO, H.; OTSUKA, T.; IZUHARA, K.; YAMAOKA, K.; OHSHIMA, K.; TANABE, T.; HARA, S.; NEMOTO, Y.; TANAKA, Y.; NAKASHIMA, H.; NIHO, Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. **Blood**, v. 89, n. 5, p. 1621-1628, 1997.

NOGUCHI, K.; MAEDA, M.; RUWANPURA, S. M.; ISHIKAWA, I. Prostaglandin E2 (PGE2) downregulates interleukin (IL)-1 α -induced IL-6 production via EP2/EP4 subtypes of PGE2 receptors in human periodontal ligament cells. **Oral Dis.**, v. 11, n. 3, p. 157-162, 2005.

O'BANION, M. K.; SADOWSKI, H. B.; WINN, V.; YOUNG, D. A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 34, p. 23261-23267, 1991.

O'NEILL, G. P.; FORD-HUTCHINSON, A. W. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. **FEBS Lett.**, v. 330, p. 156-160, 1993.

OCHI, T.; GOTO, T. Differential effect of FR122047, a selective cyclo-oxygenase-1 inhibitor, in rat chronic models of arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 135, n. 3, p. 782-788, 2002.

OKUMURA, T.; SAITO, K. Effect of prostaglandins on glycogenesis and glycogenolysis in primary cultures of rat hepatocytes-a role of prostaglandin D2 in the liver. **Prostaglandins**, v. 39, n. 5, p. 525-540. 1990.

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.

OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C. F.; WALLACE, J. L.; GUTIERREZ, J. M.; ZAMUNER, S. R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 670-677, 2007.

ONOE, Y.; MIYAURA, C.; KAMINAKAYASHIKI, T.; NAGAI, Y.; NOGUCHI, K.; CHEN, Q. R.; SEO, H.; OHTA, H.; NOZAWA, S.; KUDO, I.; SUDA, T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. **J. Immunol.**, v. 156, n. 2, p. 758-764, 1996. Review.

- OTTO, J. C.; SMITH, W. L. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. **Cell Signal.**, v. 12, p. 139-156, 1994. Review.
- OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; WHITE, S. P. Isolation, characterization and crystallization of a phospholipase A₂ myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Toxicon**, v. 35, n. 1, p. 111-124, 1997.
- PACE-ASCIAC, C. R.; REYNAUD, D.; DEMIN, P.; NIGAM, S. The hepxilins. A review. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 447, p. 123-132, 1999. Review.
- PALMER, B. F.; HENRICH, W. L. Clinical acute renal failure with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Semin. Nephrol.**, v. 15, n. 3, p. 214-227, 1995.
- PARAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; BENGOCHEA, J. A.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. **Eur. J. Biochem.**, v. 253, p. 452-461, 1998.
- PFEILSCHIFTER, J.; SCHALKWIJK, C.; BRINER, V. A.; VAN DEN BOSCH, H. Cytokine-stimulated secretion of group II phospholipase A₂ by rat mesangial cells. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandin synthesis by cultured rat glomerular cells. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 5, p. 2516-2523, 1993.
- PILBEAM, C. C.; KAWAGUCHI, H.; VOZNESENSKY, O. S.; ALANDER, C. B.; RAISZ, L. G. Regulation of inducible prostaglandin G/H synthase by interleukin-1, transforming growth factors- α and - β , and prostaglandins in bone cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 400B, p. 617-623, 1997.
- POLGÁR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v. 319, n. 3, p. 961-968, 1996.
- 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.
- POLIOUT, M.; GILBERT, C.; BERGEAT P.; POUBELLE, P. E.; BOURGOIN, S.; CREMION, C.; MACLOUF, J.; MCCOLL, S. R.; NACCACHE, P. H. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p. 1109-1123, 1998.
- PORTANOVA, J. P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G. D.; HAUSER, S. D.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; GREGORY, S. A.; ISAKSON, P. C. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 3, p. 883-891, 1996.
- PRADELLES, P.; GRASSI, J.; MAC LOUF, J. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. **Analyt. Chem.**, v. 57, p. 1170-1173, 1985.

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. Review.

QIN, N.; ZHANG, S. P.; REITZ, T. L.; MEI, J. M.; FLORES, C. M. Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splicing variants: evidence for intron 1 retention. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 315, n. 3, p. 1298-1305, 2005.

QUINN, M. T.; PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 85, n. 8, p. 2805-2809, 1988.

RANGEL-SANTOS, A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CARDOSO, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 44, n. 6, p. 609-616, 2004.

RAUD, J. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, n. 3, p. 449-454, 1990.

REDDY, S. T.; TIANO, H. F.; LANGENBACH, R.; MORHAM, S. G.; HERSCHMAN, H. R. Genetic evidence for distinct roles of COX-1 and COX-2 in the immediate and delayed phases of prostaglandin synthesis in mast cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 265, n. 1, p. 205-210, 1999.

REDDY, S. T.; HERSCHMAN, 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, p. 3231-3237, 1997.

REDDY, S. T.; WINSTEAD, M. V.; TISCHFIELD, J. A.; HERSCHMAN, H. R. Analysis of the secretory phospholipase A(2) that mediates prostaglandin production in mast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 27, p. 13591-13596, 1997.

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

RENZ, H.; GONG, J. H.; SCHMIDT, A.; NAIN, M.; GEMSA, D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. **J. Immunol.**, v. 141, n. 7, p. 2388-2393, 1988.

RICOTE, M.; LI, A. C.; WILLSON, T. M.; KELLY, C. J.; GLASS, C. K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998.

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.

ROSEMBERG, P. Lethal potency of snake venom phospholipase A2 enzymes. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism**. John Wiley e Sons, 1997. p.129-153.

- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake in South America. In: BÜCHERT, W.; BUCKLEY, E. (Ed.). **Venomous Animals and Their Venoms**, New York: Academic Press, 1971. p. 345-384.
- ROSSETTO, O.; MORBIATO, L.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. Presynaptic enzymatic neurotoxins. **J. Neurochem.**, v. 97, n. 6, p.1534-1545, 2006. Review.
- ROSSI, A.; KAPAH, P.; NATOLI, G.; TAKAHASHI, T.; CHEN, Y.; KARIN, M.; SANTORO, M. G. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase. **Nature**, v. 403, n. 6765, p.103-108, 2000.
- RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Arch. Pharmak.**, v. 270, p. 274-288, 1971.
- RUFINI, S.; CESARONI, P.; DESIDERI, A.; FARIAS, R.; GUBENSEK, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LULY, P.; MASSOUD, R.; MORERO, R.; PEDERSEN, J. Z. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, v. 31, n. 49, p.12424-12430, 1992.
- RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **Am. J. Pathol.**, v. 86, n. 1, p.183-276, 1977. Review.
- 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, p. 313-321, 2006.
- 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.
- 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, p. 899-907, 2003.
- SAMPAIO, S. C. Phospholipase A₂ In: CURI, R; POMPEIA, C., MIYASAKA, C. K.,; PROCOPIO, J. (Ed.). **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**, Barueri: Manole, 2002, p. 367-377.
- SAMPAIO, S. C.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; BORELLI, P.; CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 70, p. 551-558, 2001.
- SARAU, H. M.; FOLEY, J. J.; SCHMIDT, D. B.; MARTIN, L. D.; WEBB, E. F.; TZIMAS, M.N.; BRETON, J. J.; CHABOT-FLETCHER, M.; UNDERWOOD, D. C.; HAY, D. W.; KINGSBURY, W. D.; CHAMBERS, P. A.; PENDRAK, I.; JAKAS, D. R.; SATHE, G. M.; VAN HORN, S.; DAINES, R. A.; GRISWOLD, D. E. *In vitro* and *in vivo* pharmacological characterization of SB 201993, an eicosanoid-like LTB₄ receptor antagonist with anti-

inflammatory activity. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, v. 61, n. 1, p. 55-64, 1999.

SAVILL, J. S.; WYLLIE, A. H.; HENSON, J. E.; WALPORT, M. J.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 83, n. 3, p. 865-875, 1989.

SCAPINI, P.; LAPINET-VERA, J. A.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol. Rev.**, v. 177, p. 195-203, 2000. Review.

SCHAFER, A. I. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 35, n. 3, p. 209-219, 1995.

SCHALKWIJK, C.; PFEILSCHIFTER, J.; MÄRKI, F.; VAN DEN BOSCH, H. Interleukin-1 beta, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A2 in rat mesangial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 174, n. 1, p. 268-275, 1991.

SCHMEDTJE JR., J. F.; JI, Y. S.; LIU, W. L.; DUBOIS, R. N.; RUNGE, M. S. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappa B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 601-608, 1997.

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.

SCOTT, K. F.; BRYANT, K. J.; BIDGOOD, M. J. Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A₂ - cyclooxygenase pathways in inflammation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 66, p. 535-541, 1999. Review.

SERHAN, C. N.; TAKANO, T.; MADDOX, J. F. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and stable analogs on lipoxin A4 are potent inhibitors of acute inflammation. Receptors and pathways. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 447, p. 133-149, 1999.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004. Review.

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.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isoenzymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Am. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 56, p. 387-437, 2004. Review.

SIMON, L. S. Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 8, n. 3, p. 169-175, 1996. Review.

SIROIS, J.; RICHARDS, J. S. Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 9, p. 6382-6388, 1992.

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.

SMITH, W. L.; LANGENBACH, R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. **J. 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.

SNIPES, J. A.; KIS, B.; SHELNESS, G. S.; HEWETT, J. A.; BUSIJA, D. W. Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 313, n. 2, p. 668-676, 2005.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANÇA, S. C.; GUTIÉRREZ, 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, p. 877-888, 2001.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000a.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, n. 2, p. 201-209, 2000b.

SOLOMON, D. H.; O'BRIAN, C. A.; WEINSTEIN, I. B. *N*- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone and *N*- α -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone inhibit protein kinase C. **FEBS Lett.**, v. 190, n. 92, p. 342-344, 1985.

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

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. 1, n. 1, p. 108-113, 1994.

SYRBU, S. I.; WATERMAN, W. H.; MOLSKI, T. F.; NAGARKATTI, D.; HAJJAR, J. J.; SHA'AFI, R. I. Phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 162, n. 4, p. 2334-2340, 1999.

TADA, K.; MURAKAMI, M.; KAMBE, T.; KUDO, I. Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A2 in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. **J. Immunol.**, v. 161, n. 9, p. 5008-5015, 1998.

TAKAYAMA, K.; GARCÍA-CARDENA, G.; SUKHOVA, G. K.; COMANDER, J.; GIMBRONE, M. A.; LIBBY, P. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 46, p. 44147-44154, 2002.

TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor. **Toxicon**, v. 32, p. 419-426, 1994.

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- κ B and expression of ICAM-1. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3421-3430, 1998.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 1, p. 15-23, 2001. Review.

TOCCO, G.; FREIRE-MOAR, J.; SCHREIBER, S. S.; SAKHI, S. H.; AISEN, P. S.; PASINETTI, G. M. Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. **Exp. Neurol.**, v. 144, n. 2, p. 339-349, 1997.

TORDJMAN, C.; COGE, F.; ANDRE, N.; RIQUE, H.; SPEDDING, M.; BONNET, J. Characterization of cyclooxygenase 1 and 2 expression in mouse resident peritoneal macrophages *in vitro*: interactions of non steroidal anti-inflammatory drugs with COX-2. **Biochimophys. Acta**, v. 1256, n. 2, p. 249-256, 1995.

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.

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

UEDA, N.; YAMASHITA, R.; YAMAMOTO, S.; ISHIMURA, K. Induction of cyclooxygenase-1 in a human megakaryoblastic cell line (CMK) differentiated by phorbol ester. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1344, n. 1, p. 103-110, 1997.

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

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, n. 1-2, p. 59-70, 2000. Review.

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

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

VERMA, I. M. Nuclear factor (NF)- κ B proteins: therapeutic targets. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 63, p. ii57-ii61, 2004.

VIATOUR, P.; MERVILLE, M. P.; BOURS, V.; CHARIOT, A. Phosphorylation of NF- κ B and I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. **Trends Biochem. Sci.**, v. 30, p. 43-52, 2005. Review.

WALLACE, J. L. Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Am. J. Med.**, v. 107, p. 11S-16S, 1999.

WALLACE, J. L.; BAK, A.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; SHARKEY, K. A.; MACNAUGHTON, W. K. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 101-109, 1998.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **FASEB J.**, v. 18, p. 790-804, 2004. Review.

WARNER, T. D.; GIULIANO, F.; VOJNOVIC, I.; BUKASA, A.; MITCHELL, J. A.; VANE, J. R. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 13, p. 7563-7568, 1999. Review.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SÁ, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J.**, v. 362, n. 1, p. 89-96, 2002.

WHITTLE, B. J.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Some actions of prostacyclin (PGI₂) on the cardiovascular system and the gastric microcirculation. **Acta Biol. Med. Ger.**, v. 37, n. 5-6, p. 725-728, 1978.

- WU, D.; MARKO, M.; CLAYCOMBE, K.; PAULSON, K. E.; MEYDANI, S. N. Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity. **J. Biol. Chem.**, v. 278, 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. Review.
- WU, K. K. Cyclooxygenase-2 induction in congestive heart failure: friend or foe? **Circulation.**, v. 98, n. 2, p. 95-96, 1998. Review.
- YAMAGATA, K.; ANDREASSON, K. I.; KAUFMANN, W. E.; BARNES, C. A.; WORLEY, P. F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron**, v. 11, n. 2, p.371-386, 1993.
- YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. **Brain Res.**, v. 739, n. 1-2, p.104-110, 1996.
- YAMAMOTO, K.; ARAKAWA, T.; UEDA, N.; YAMAMOTO, S. Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 52, p. 31315-31320, 1995.
- YOKOMIZO, T.; OGAWA, Y.; UOZUMI, N.; KUME, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. cDNA cloning and mutagenesis study of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 407, p. 151-156, 1997.
- YU, C. L.; HUANG, M. H.; KUNG, Y. Y.; TSAI, Y. Y.; TSAI, S. T.; HUANG, D. F.; SUN, K. H.; HAN, S. H.; YU, H. S. Interleukin-13 increases prostaglandin E₂ (PGE₂) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. **Inflamm. Res.**, v. 47, n. 4, p. 167-173, 1998.
- 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.
- ZAMUNÉR, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIERREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 806-813, 2005.
- ZAMUNÉR, S. R. **Mecanismos envolvidos no recrutamento e ativação leucocitários e o papel dos neutrófilos nos efeitos locais induzidos pelos venenos das serpentes *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* e na regeneração após a injeção desses venenos.** 109 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- ZAMUNÉR, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-1513, 2001.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 335-346, 2005a.

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; CASAIS E SILVA, L. L.; SAMPAIO, S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. F. P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A(2). **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 523-532. 2005b.

ZULIANI, J. P. **Vias de sinalização envolvidas no processo de fagocitose de partículas de zimosan, por macrófagos estimulados por duas toxinas com estrutura de fosfolipase A2 (MT-II e MT-III) isoladas do veneno da *Bothrops asper*.** 154 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005c.

ZULIANI, J. P. **Estudos dos efeitos pró-inflamatórios induzidos por duas toxinas com estrutura de fosfolipase A2 (MT-II e MT-III) isoladas do veneno de *Bothrops asper*.** 108 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ZURIER, R. B. Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.**, v. 2, p. 815-818, 1976.

Capítulo 3

***Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E₂ and D₂, and expression of cyclooxygenases**

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCS-4KX2DC3-1&_user=5674931&_coverDate=04%2F30%2F2007&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000049650&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5674931&md5=ac0f5cf4ae094f65a7151868035132a2