

**ODAIR JORGE FAIAD**

**Efeito da Crotoxina Sobre Função e o Metabolismo de Glicose e Glutamina  
de Macrófagos Durante a Progressão Tumoral**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni

Versão original

São Paulo  
2012

## RESUMO

Faiad OJ. Efeito da crotoxina sobre função e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos durante a progressão tumoral [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Dados da Literatura têm demonstrado que a CTX, toxina majoritária do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta efeitos anti-inflamatório, imunomodulatório e antitumoral. A CTX modula, particularmente, as funções de macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata e de importância central na gênese e progressão tumoral. No início da progressão tumoral, os macrófagos apresentam fenótipo pró-inflamatório, caracterizado pela liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , reativos intermediários do nitrogênio (RNI) e do reativos intermediários do oxigênio (ROI). No contexto tumoral, os macrófagos inflamatórios inibem o crescimento tumoral, erradicando as células tumorais e estimulando a resposta imune. Por outro lado, os macrófagos anti-inflamatórios encontrados quando o tumor está estabelecido, ou seja, quando atinge o tamanho de 1 cm<sup>3</sup>, contribuem para a progressão do tumor por produzir mediadores pró-angiogênicos por expressarem baixos níveis das citocinas inflamatórias, perda da capacidade de liberação e de produção de ROI e RNI, importantes para ação tumoricida. Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a CTX, após 14 dias de uma única administração, estimula a liberação de peróxido de hidrogênio e produção de óxido nítrico, além de modular a secreção de citocinas por macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos normais. Desta forma, considerando que esses mediadores são fundamentais no controle de progressão tumoral, é relevante investigar se a CTX estimula a produção desses mediadores pelos macrófagos obtidos de animais portadores de tumor. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da CTX sobre a função e o metabolismo de macrófagos peritoneais obtidos de ratos portadores de tumor de Walker 256. Para tanto, ratos machos da linhagem Wistar foram injetados, por via s.c., no flanco posterior direito, o volume de 1 mL de salina estéril contendo  $2 \times 10^7$  de células tumorais. Numa primeira abordagem, a CTX (18 $\mu$ g/animal) foi administrada no subcutâneo dos animais no 5º dia após a inoculação das células tumorais. Após 14 dias da inoculação das células tumorais, macrófagos peritoneais foram obtidos e os seguintes parâmetros foram avaliados: a) liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e, produção de NO e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e b) a atividade máxima da hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, citrato sintase e a produção de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> de glicose [U-<sup>14</sup>C] e glutamina [U-<sup>14</sup>C]. O tratamento com a CTX estimulou a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de NO, a secreção das citocinas IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  e a atividade do metabolismo de glicose e glutamina. Em outra abordagem, a administração da CTX foi concomitante à inoculação das células tumorais. Após 14 dias, os macrófagos apresentaram as atividades secretórias e metabólicas estimuladas. Esses dados colocam a CTX não apenas como ferramenta científica para investigar as funções e o metabolismo de macrófagos, como também para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral.

**Palavras-chave:** Crotoxina. Macrófago. Tumor de Walker 256. Metabolismo oxidativo. Metabolismo de glicose. Metabolismo de glutamina.

## ABSTRACT

Faiad OJ. Effect of crotoxin on function and metabolism of glucose and glutamine of macrophages during tumor progression. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Crotoxin (CTX), the major toxin of *Crotalus durissus terrificus* venom induces an inhibitory effect on tumoral growth and modulates, particularly, the functions of macrophages, fundamental cells to provide a defense mechanism against tumor cell. In early tumor progression, macrophages are avidly phagocytic (*inflammatory cell*) releasing reactive nitrogen intermediates-RNI/ROI and cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. However, when the tumor is installed, tumor-associated macrophage (*angiogenic cell*) presents a decrease in these abilities. Our group demonstrates that CTX stimulates the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release and NO production and the secretion of the cytokines by peritoneal M $\phi$  obtained from non-tumor-bearing rats. Thus, considering that these are key mediators in the control of tumor progression, it is important to investigate whether CTX stimulates the production of these mediators by macrophages obtained from tumor-bearing animals. The aim of this work was to evaluate the CTX effect on macrophage functions and metabolism of peritoneal macrophage obtained of Walker 256 tumor-bearing rats. For this purpose, male Wistar rats were inoculated subcutaneously in the right flank with 1 ml of sterile suspension of  $2 \times 10^7$  Walker 256 tumor cells. In a first approach, CTX (18 $\mu$ g/animal) was administered subcutaneously animals on day 5 after inoculation of tumor cells. After 14 days of tumor cell inoculation, peritoneal macrophages were obtained and the following parameters were evaluated: a) release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO production and pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6) and b) maximal activity of hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, citrate synthase and <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from [U-<sup>14</sup>C]-glucose and [U-<sup>14</sup>C]-glutamine. The treatment with CTX stimulated NO or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, cytokine secretion and glucose and glutamine metabolism. In another set of experiments, CTX injected concomitant with tumor cell inoculation. After 14 days macrophages presented metabolism and secretory activity stimulated. These data CTX not only as a scientific tool to investigate the functions and metabolism of macrophages, but also for better understanding of the mechanisms involved in tumor progression.

**Keywords:** Crotoxin. Macrophage. Walker 256 tumor cell. Oxidative metabolism. Glucose metabolism. Glutamine metabolism.

## 1 INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes, embora contenham substâncias tóxicas, são alvos de pesquisas com a finalidade de obtenção de substâncias que possam ser utilizadas na terapêutica (Brazil, 1934).

No início da década de 30, do século passado, foi relatado o emprego de venenos ofídicos como analgésicos, mostrando a eficácia do veneno de *Naja tripudians* e *Naja naja* em diminuir a dor de pacientes portadores de carcinoma e em retardar a evolução de algumas neoplasias (Monaessler T, 1933<sup>1</sup> apud Brazil, 1950). Estes trabalhos repercutiram no meio médico brasileiro e nesta mesma década, estudos clínicos utilizando a doses homeopáticas do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) foram iniciados em pacientes portadores de algias, principalmente de origem neoplásicas (Brazil, 1934, 1950).

O gênero *Crotalus* inclui as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis, causadoras de aproximadamente 7,6% dos acidentes ofídicos no Brasil (Brasil, 2011), sendo estes acidentes causados principalmente pela *Crotalus durissus terrificus*.

As manifestações clínicas do envenenamento por serpentes *Crotalus durissus terrificus* são decorrentes particularmente, da atividade neurotóxica do veneno e são caracterizadas pelo aparecimento do chamado “facies miastênico” ou “facies neurotóxico”, onde se observam ptose palpebral, diplopia, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos (Rosenfeld, 1971). Além disso, em decorrência desta atividade neurotóxica é observada também insuficiência respiratória (Amaral et al., 1991; Rosenfeld, 1971). Além desta atividade, o veneno destas serpentes possui atividades miotóxica e coagulante (Azevedo-Marques et al., 1985; Cupo et al., 1988; Nahas et al., 1964; Rosenfeld, 1971), induzindo o quadro de rabdomiólise generalizada e incoagulabilidade (Azevedo-Marques et al., 1987; Sano-Martins et al., 2001).

Apesar destes efeitos sistêmicos importantes, não são observados, nestes envenenamentos, sinais inflamatórios significativos no local da picada (Amorim et al., 1951; Brazil, 1934). São relatadas ainda, ausência de dor ou dor de pequena intensidade, seguida de parestesia local (Rosenfeld, 1971). Vale ressaltar que, além de não causar dor, Brazil (1934, 1950, para revisão) evidenciou que este veneno é capaz de causar analgesia em humanos, sendo utilizado no início do século passado, no tratamento de algias, principalmente de origem neoplásica (Brazil, 1934, 1950, para revisão).

---

<sup>1</sup> Monaessler, Taguet. Traitement des algies et des tumeurs par “ le venin de cobra,” Bull Acad de mCd. 1933;109:371-377.

As principais toxinas presentes neste veneno incluem a crotoxina, crotamina, convulxina e giroxina. Tem sido sugerido que a giroxina e a enzima tipo trombina sejam o mesmo componente, uma vez que ambas apresentam as mesmas características bioquímicas e biológicas (Alexander et al., 1988). A elevada toxicidade do veneno é atribuída à crotoxina, seu principal componente tóxico, (Vital-Brazil, 1972), que corresponde à 60% do veneno total (Slotta, Fraenkel-Conrat, 1938).

## **1.1 Crotoxina**

A crotoxina (CTX) foi isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat, em 1938, e sua estrutura foi descrita por Fraenkel-Conrat e Singer (1956), sendo uma  $\beta$ -neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não-covalente de duas diferentes subunidades: a crotapotina (CA) e a fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub> - CB). O peso molecular desta toxina é de 24 a 26 kDa, ponto isoelétrico de 4,7 e exibe atividades fosfolipásica, neurotóxica (bloqueio da transmissão neuromuscular) e miotóxica (Gopalakrishnakone, 1984; Sampaio et al., 2010, para revisão; Stoker, 1990; Vital Brazil, 1972).

A subunidade CA (crotapotina) apresenta peso molecular de 8,9 kDa, com ponto isoelétrico de 3,4, características ácidas, sendo desprovida de atividade enzimática e tóxica. Sua função não está totalmente evidenciada, porém é aceito que CA pode agir como uma molécula carreadora potencializando a atividade letal de CB, porém diminuindo sua atividade enzimática dentro do complexo crotoxina (Bon et al., 1989; Choumet et al., 1996).

A subunidade CB ou FLA<sub>2</sub> apresenta cerca de 14 kDa, ponto isoelétrico 9,7. (Aird et al., 1986). Para a subunidade CB são atribuídas as atividades fosfolipásicas encontradas no veneno crotálico ou na fração crotoxina. Esta fração possui maior atividade enzimática que o complexo crotoxina, porém com menor toxicidade (Choumet et al., 1996). Entretanto, para as ações farmacológicas já descritas, é importante a ação mútua das subunidades CA e CB, onde CA se comporta como um carreador dirigindo a CB para o seu alvo celular.

## **1.2 Estudos experimentais sobre os efeitos imunorregulatório, antitumoral e anti-inflamatório e do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e suas toxinas isoladas**

Vários estudos experimentais têm mostrado que, o VCdt ou substâncias isoladas deste veneno são capazes de modular as respostas inflamatória e imune. Em relação aos efeitos

sobre o sistema imune, foi evidenciado que o veneno crotálico ou a crotoxina apresentam papel supressor sobre a resposta imunológica humoral (Cardoso, Mota, 1997).

Em relação à resposta inflamatória, tem sido demonstrado que o veneno de *Crotalus* e suas toxinas isoladas inibem eventos vascular e celular envolvidos nesta resposta (Landucci et al., 1995, 2000; Sousa-e-Silva et al., 1996). Em continuidade a esses estudos, Nunes et al. (2007) mostraram que a ação inibitória do veneno sobre os componentes vascular e celular da resposta inflamatória induzida pela carragenina é de longa duração. Estes autores demonstraram que a CTX é a toxina responsável por este efeito prolongado (Nunes et al., 2010).

Sampaio et al. (2001), avaliando o efeito do veneno sobre o metabolismo de macrófagos e a possível correlação entre as modificações deste metabolismo e as alterações funcionais destas células, demonstraram dualismo na ação deste veneno, uma vez que foi observada tanto inibição de alguns parâmetros funcionais, como espriamento e fagocitose, quanto estimulação do “burst” respiratório (geração de peróxido de oxigênio), da geração de óxido nítrico, da atividade microbicida (fungicida) e do metabolismo de glicose e glutamina destas células. O incremento deste metabolismo foi demonstrado através da determinação da influência do veneno sobre a atividade máxima de enzimas-chave do metabolismo de glicose e glutamina (hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, citrato sintase e glutaminase dependente de fosfato) e da oxidação destes substratos. Tanto as ações estimulatórias quanto inibitórias são de longa duração, pois foram observadas por até 7 dias após a administração de uma única dose do veneno. Estes efeitos manifestam-se independentemente do estado de ativação do macrófago – residente, inflamatório ou ativado. Contudo, as ações estimulatórias do VCdt são mais significativas no macrófago residente. Recentemente, nosso grupo demonstrou, que a CTX é a toxina responsável pela ação estimulatória sobre o “burst” respiratório de macrófagos residentes obtidos da cavidade peritoneal de ratos normais, sendo este efeito prolongado, pois é observado após 14 dias da administração de uma única dose de CTX (Costa et al., 2010).

Dados de literatura mostram ainda, que a crotoxina inibe, *in vivo* e *in vitro*, o crescimento de células tumorais humanas e de murinos. Este efeito é decorrente da ligação específica da toxina à membrana celular e mediado pela atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (Corin et al., 1993; Newman et al., 1993; Rudd et al., 1994). Donato et al. (1996) mostraram correlação entre a atividade anti-proliferativa da crotoxina e receptores para o fator de crescimento epidermal (EGFr) são os alvos celulares e medeiam o efeito antiproliferativo da FLA<sub>2</sub>, a qual acarretaria a fosforilação das tirosinas ligadas a estes receptores.

Em estudos realizados em nosso laboratório, foi demonstrada a ação antitumoral da crotoxina *in vivo*, sobre tumor desenvolvido no coxim plantar de pata de ratos, induzido pela injeção do tumor de Walker 256 (Brigatte et al., 2007). Nestes estudos mostraram que células de tumor de Walker 256, injetadas por via intraplantar, são capazes de causar desenvolvimento de tumor sólido no coxim plantar de ratos a partir do 3º dia de inoculação. A presença marcante de células tumorais na pata dos ratos foi evidenciada, por análises histopatológicas, no 5º dia do desenvolvimento do tumor (Brigatte et al., no prelo). Animais tratados pela crotoxina apresentaram menor aumento do volume da pata causado pelo tumor, evidenciado por meio de pletismografia, quando comparado aos animais controles. Neste estudo, análises histológicas do coxim plantar sugerem que a crotoxina interfere com a neovascularização na vigência do tumor. Cabe ressaltar que, neste mesmo estudo, foi demonstrado que a crotoxina foi capaz também de inibir fenômenos nociceptivos, tais como, hiperalgesia, alodinia e dor espontânea, causados pelo câncer, observado no modelo de pressão de pata de ratos. Em continuidade a esses estudos, ensaios *in vitro* evidenciaram ação antitumoral da crotoxina, uma vez que a toxina inibiu a proliferação das células da linhagem LLC WRC 256, correspondente ao tumor de Walker 256 (Faiad et al., 2008). Neste estudo, foi demonstrado que a crotoxina interfere com os eventos fundamentais da progressão tumoral, agindo diretamente sobre as células tumorais desta linhagem, inibindo a proliferação, adesão da célula tumoral à fibronectina, além de inibir a polimerização dos filamentos de actina dessas células. Ainda, as proteínas sinalizadoras da família das GTPases Rho, tais como a RhoA e a quinase FAK apresentam a atividade diminuída após a incubação na presença da toxina, o que explica, pelo menos em parte, a diminuição da projeção do corpo celular durante a proliferação, conforme observado em ensaios de Microscopia Confocal (Faiad et al., 2008).

### **1.3 Características gerais do macrófago**

O macrófago foi descrito por Metchnikoff no final do século passado, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir dos estudos de MacKness e colaboradores (Karnovsky, 1981), no início dos anos 70, passou-se a estudar sua atividade secretora. Inicialmente classificado como pertencente ao sistema reticuloendotelial (Aschoff, 1924), o macrófago foi, posteriormente, incorporado ao sistema mononuclear fagocitário (Aschoff, 1969).

O macrófago caracteriza-se por ser uma célula grande, medindo entre 25-50  $\mu\text{m}$  de diâmetro, núcleo irregular e excêntricamente posicionado, com um ou dois nucléolos e cromatina dispersa. Esta célula apresenta complexo de Golgi bem desenvolvido, em posição justanuclear, número variável de vesículas de endocitose e grande número de mitocôndrias. A superfície da membrana apresenta-se irregular, com microvilos; o citoesqueleto é bem desenvolvido, rodeando o núcleo e estendendo-se até a periferia da célula (Auger, Ross, 1992; Hamilton et al., 1985; Zhang et al., 1989).

Ontogeneticamente, o macrófago deriva do saco vitelínico (Moore, Metcalf, 1970) e, no homem adulto, da medula óssea (van Furth, 1989). Origina-se da célula precursora para macrófagos e neutrófilos, (CFU-GM) (Metcalf, 1971), assim chamada devido a sua capacidade de originar, em meio semi-sólido, colônias de monócitos e neutrófilos. A primeira célula da linhagem macrofágica na medula óssea é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos que, ao contrário do seu precursor, já apresentam capacidade de pinocitose e expressam receptores característicos de macrófagos aos quais darão origem (van Furth, Diesselhoff -den Dulk, 1970; van Furth et al., 1980).

Os macrófagos têm grande atividade secretória, que inclui mais de cem substâncias biologicamente ativas, tais como enzimas, proteínas plasmáticas, hormônios, substâncias que regulam a função e crescimento de outras células (Nathan, 1987; Rappolee, Werb, 1988; Takemura, Werb, 1984). A secreção dessas substâncias determina a multifuncionalidade dos macrófagos e a sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, entre esses: a hematopoiese, hemostasia, inflamação, resposta imune, cicatrização, controle do desenvolvimento tumoral.

#### **1.4 Macrófago e o metabolismo de glicose e glutamina**

Os macrófagos, embora considerados células terminais (Gordon, 1986), utilizam taxas elevadas de glicose e glutamina, à semelhança de células de divisão rápida (Ardawi, Newsholme, 1983; Brand et al., 1984; Curi et al., 2005; Kovacevic, Mcgivan, 1983; Newsholme, 1987; Watford et al., 1979). A intensa atividade metabólica está relacionada com a necessidade da manutenção de quantidades adequadas de precursores biossintéticos, uma vez que, apesar da elevada atividade secretória, estas células não são capazes de armazenar estes produtos, necessitando então, de processos de síntese de proteínas, quando estimulados a produzi-las (Hammer, Rannels, 1981). Estes processos requerem grande quantidade de RNAm e envolvem a utilização de purinas, pirimidinas e ribose-5-fosfato.



Além disso, os macrófagos necessitam sintetizar os fosfolípidos de membrana, devida sua elevada capacidade endocítica, com internalização de grandes quantidades de membranas (Steinam et al., 1983), que precisam ser repostas. Este processo requer como precursor, o glicerol-3-fosfato e a presença de NADPH para a síntese *de novo* de ácidos graxos. Adicionalmente, a produção e liberação de metabólitos reativos do oxigênio, tais como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio depende de NADPH, uma oxidase de membrana dependente da NADPH-oxidase. Devido a estas necessidades de precursores biossintéticos, o macrófago apresenta taxas elevadas de utilização de glicose e glutamina.

A glicólise pode ser definida como a maneira pela qual a glicose é degradada para a geração de energia utilizada em funções biológicas.

A degradação da glicose pode ser dividida em: a) *glicólise anaeróbica* – que é a degradação de glicose sem necessitar da presença de oxigênio. O produto final é o ácido láctico; b) *glicólise aeróbica* – é a degradação da glicose com consumo de oxigênio, produzindo o ácido pirúvico, que por sua vez, entra na mitocôndria e pode ser totalmente oxidado a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O pelo Ciclo de Krebs e Cadeia Respiratória.

A sequência de reações, tanto da glicólise anaeróbica como aeróbica, até a produção do piruvato, são exatamente as mesmas.

Na glicólise, partindo de uma molécula de glicose para formar duas moléculas de piruvato nas seguintes reações:

A primeira via leva à degradação completa da glicose com a oxidação do grupo carboxil do piruvato gerando o grupo acetil da acetil-CoA que é então completamente oxidado a CO<sub>2</sub> no ciclo do ácido cítrico. O ciclo do ácido cítrico é a via metabólica mais importante para produção de energia, em condições aeróbicas (Philip et al., 1976). Neste ciclo, a citrato sintase é a enzima-chave para catalisar as reações mais precoces, sendo a responsável pela conversão do piruvato em acetil-CoA, formado no citoplasma da célula, após a difusão para o interior da mitocôndria (Philip et al., 1976).

A segunda via metabólica leva o piruvato a ser reduzido a lactato no processo de fermentação láctica, que ocorre em condições onde a concentração de oxigênio é baixa (glicólise anaeróbica).

Além dessas duas vias, a glicólise pode ocorrer também a via das pentoses-fosfato onde são gerados a NADPH e também a ribose-5-fosfato, sendo esta utilizada pelas células para a síntese de RNA, DNA, ATP, NADH, FADH<sub>2</sub> e coenzima A. Esta via é iniciada quando a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) oxida a glicose-6-fosfato, formada pela hexoquinase, para formar 6-fosfoglicona- $\delta$ -lactona.

A glicólise parcial gera ainda glicerol-3-fosfato, que pode ser desviado para a síntese de triglicerídeos, importantes constituintes de membrana (Curi et al., 1999).

A glutamina, um aminoácido não essencial, pode ser sintetizada, via glutamina sintetase, por, virtualmente, todos os tecidos do organismo (Lacey, Wilmore, 1990). No entanto, a síntese de glutamina ocorre preferencialmente no músculo esquelético, fígado e cérebro, enquanto que a hidrólise ocorre nos rins, linfonodo, macrófago, trato gastrointestinal e tecido adiposo (Curi, Newsholme, 1989; Kowalchuck et al., 1988; Newsholme et al., 1989).

O metabolismo da glutamina até  $\alpha$ -cetoglutarato e subsequente oxidação no ciclo de Krebs, gera até 30 mol ATP/mol de glutamina. Nos macrófagos o metabolismo da glutamina visa suprir as altas taxas de consumo de ATP por esta célula (Curi et al., 2005; Newsholme, 1987). A via glutaminolítica pode gerar alguns precursores como purinas e pirimidinas, envolvidos na síntese de RNA e DNA e também substratos para a produção de NADPH.

A alta taxa de utilização de glicose e glutamina pelo macrófago pode ser explicada pela teoria da regulação em ramo (Crabtree, Newsholme, 1985). Observa-se, nesta célula, intensa glicólise e glutaminólise, porém baixa atividade metabólica pelas vias geradoras de precursores biossintéticos, que surgem como ramificações das primeiras, quando a célula está quiescente. Este quadro permite rápida modulação do fluxo para as vias de produção de precursores, em acordo com a necessidade do macrófago de responder rapidamente quando solicitado (**Figura 1**).

Para se determinar a capacidade de fluxo de substratos por uma via metabólica, podemos avaliar a atividade máxima da enzima-chave desta via. Enzima-chave é aquela que catalisa uma reação em não-equilíbrio, com  $\Delta G$  negativo ( $< -5$  cal), sendo capaz de regular o fluxo de metabólitos pela via, na célula. Para tanto, deve-se identificar quais as enzimas-chave das vias metabólicas que se pretende estudar (Cooney, Newsholme, 1984; Newsholme, Crabtree, 1976; Newsholme, Leech, 1983; Newsholme, Start, 1973) e as condições padrão para a realização das dosagens de cada enzima (Krebs, 1980).

O estudo do metabolismo da glicose e glutamina pode ser realizado pela determinação da atividade máxima das enzimas hexoquinase, citrato sintase, glicose-6-fosfato desidrogenase e glutaminase-fosfato dependente (Crabtree, Newsholme, 1985) (**Figura 1**).

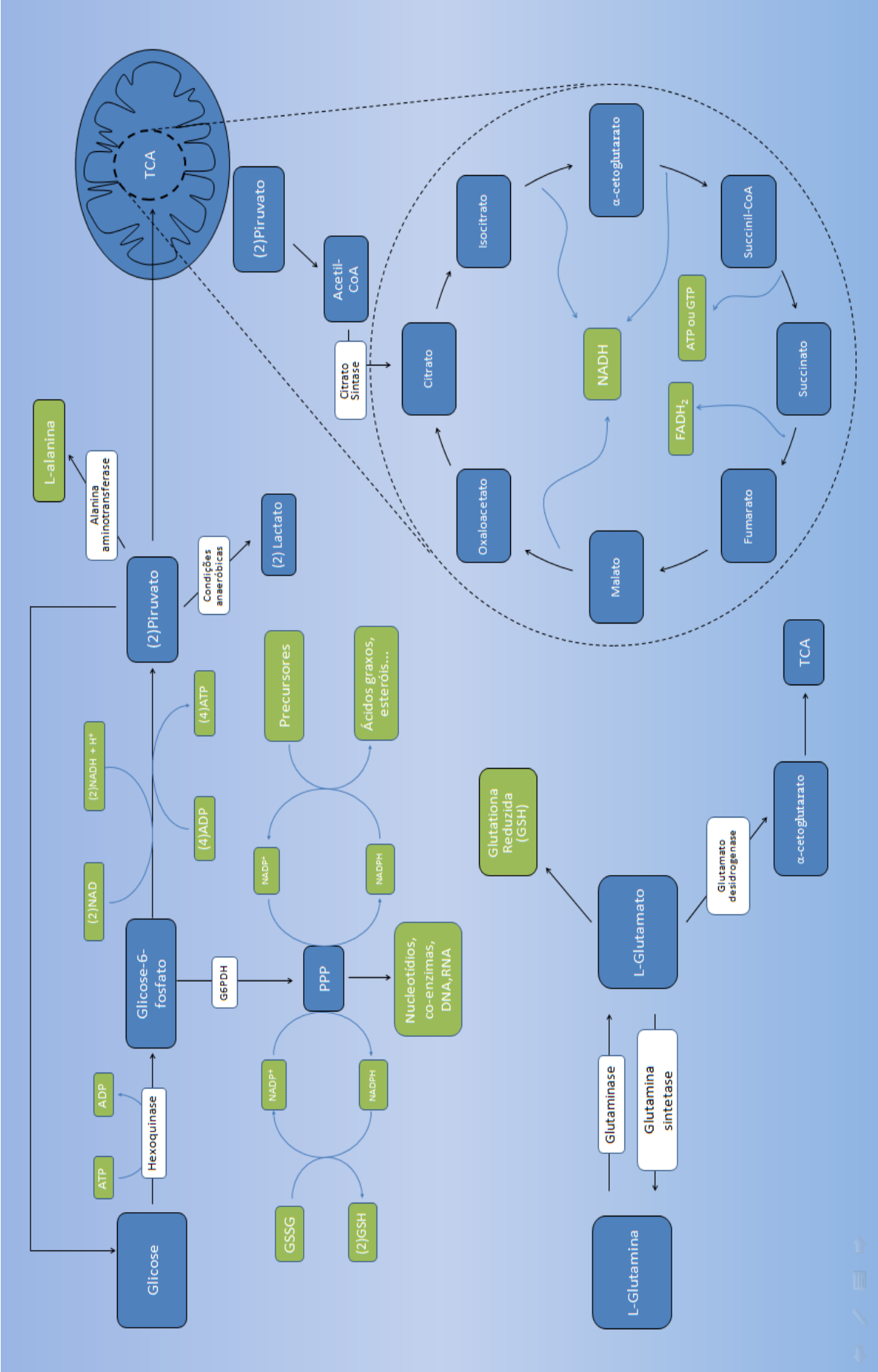
A hexoquinase é uma das enzimas-chave da glicólise e catalisa a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para a glicose formando a molécula de glicose-6-fosfato. O verdadeiro substrato desta enzima é o complexo  $Mg^{2+}$ -ATP, sendo o ATP não complexado um inibidor da hexoquinase. Esta enzima é ainda passível de regulação, como por exemplo, pelo seu produto.

A citrato sintase é a enzima que controla a entrada de carbono (Acetil-CoA) no ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico). Esta reação, embora seja reversível, *in vitro*, assume características de irreversibilidade pelo caráter cíclico da via, onde não se encontra acúmulo de substrato intermediário (Krebs, 1980).

A glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa a primeira reação do "shunt" da hexoquinase-monofosfato, a via das pentoses. A atividade máxima da enzima serve como índice quantitativo do fluxo pela via (Ardawi, Newsholme, 1983). Embora seja termicamente reversível (Horecker, Smyrniotis, 1953), a reação assume características de irreversibilidade, na via metabólica, pela hidrólise elevada do produto formado, a D-glicose- $\alpha$ -lactona-6-fosfato. Em adição a essa rápida hidrólise espontânea, uma lactonase de distribuição ampla, assegura a irreversibilidade da reação em condições fisiológicas (Brodie, Lipmann, 1985).

A glutaminase-fosfato dependente é a enzima-chave da via glutaminolítica, sendo que a determinação da atividade máxima dessa enzima determina a capacidade desta via (Cooney, Newsholme, 1984). Esta enzima requer a presença de íons fosfato para a sua atividade máxima, durante a hidrólise da glutamina e glutamato e a formação de amônia (Newsholme, Leech, 1983; Newsholme et al., 2003, para revisão). O glutamato produzido é mantido como "estoque" intracelular de glutamina para o fornecimento de energia e fornecimento de precursores para os processos biossintéticos (Newsholme et al., 1989). A conversão de glutamato para glutamina é controlada pela enzima glutamina sintetase, que tem como função sintetizar o aminoácido a partir de glutamato e amônia em um processo dependente de ATP (Henriksson, 1991; Hood, Terjung, 1990, Newsholme et al., 2003, para revisão) (**Figura 1**).

Além da atividade das enzimas-chave, o metabolismo de glicose e glutamina pode ser avaliado pelas alterações no fluxo de substratos por estas vias, medidas por meio da taxa de descarboxilação desses metabólitos, a partir da determinação do CO<sub>2</sub>, possibilitando a quantificação da oxidação de [U- <sup>14</sup>C]-glicose e U- <sup>14</sup>C]-glutamina (Kowalchuck et al., 1988).



## 1.5 Macrófagos e crescimento tumoral

Estudos experimentais recentes vêm demonstrando a importância dos macrófagos, tanto na gênese tumoral, como nos diversos eventos-chave da metástase de tumores (Biswas et al., 2008, para revisão).

No sítio tumoral os macrófagos, denominados *Macrófagos Associados ao Tumor* (TAM), apresentam função dual, uma vez que desempenham atividades que podem prevenir o estabelecimento e o espraiamento de células tumorais e, simultaneamente, podem estimular funções que favorecem o crescimento e disseminação tumoral (Sica et al., 2008, para revisão). Nesse sentido, foi demonstrado que macrófagos pró-inflamatórios encontrados nos sítios da inflamação crônica liberam diferentes substâncias, o que poderia, cronicamente, predispor o crescimento tumoral (Balkwill et al., 2005). Estas células podem ser, fenotipicamente, polarizadas em dois estágios distintos: o macrófago *M1* (ou *ativados classicamente*) e o macrófago *M2* (ou tipo II, *ativados alternativamente*) (Gordon, Taylor, 2005; Mantovani et al., 2002, 2004).

O fenótipo *M1* é comumente encontrado nas infecções e na inflamação crônica, sendo, portanto, pró-inflamatório. Esta célula é caracterizada pela liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , reativos intermediários do nitrogênio (RNI) e dos reativos intermediários do oxigênio (ROI). No contexto do tumor, os macrófagos *M1* inibem o crescimento tumoral, erradicando as células tumorais e estimulando a resposta imune. Por outro lado, os macrófagos *M2*, encontrados quando o tumor está estabelecido, ou seja, quando atinge o tamanho de 1 cm<sup>3</sup> e a angiogênese torna-se necessária para sua manutenção (Dvorak, 1986). Neste contexto, os macrófagos *M2* contribuem para a progressão do tumor por produzir mediadores pró-angiogênicos e mediadores anti-inflamatórios, além de proteases e fatores de crescimento (Gordon, 2003; Lamagna et al., 2006; Mantovani et al., 2002; Mantovani et al., 2004; Pollard, 2004; Sica, 2006). Ainda, expressam baixos níveis das citocinas inflamatórias e perdem a capacidade de liberação e de produção de ROI e RNI, importantes para ação tumoricida. Entre os reativos do nitrogênio, o óxido nítrico é a principal molécula, e este reagente interage com proteínas e ácidos ribonucleicos, inibindo a proliferação das células tumorais.

Estudos experimentais recentes vêm demonstrando que a migração e infiltração de monócitos à massa tumoral parece ser especificamente regulada por fatores originados do tumor, tais como substâncias quimioatratantes (Mantovani et al., 1992) e proteínas da matriz extracelular os quais podem atrair e ativar macrófagos diretamente (Alleva et al., 1994). Estes,

por sua vez produzem TNF- $\alpha$  e óxido nítrico que amplificam a migração de macrófagos para o sítio tumoral (Alleva et al., 1994). Células peritoneais obtidas de animais portadores de tumor apresentam alta produção de superóxido e aumento na produção de óxido nítrico, na fase de rejeição tumoral (Alleva et al., 1994; Bhaumik, Khar, 1998).

Mais recentemente, foi demonstrado que monócitos presentes na medula óssea de animais portadores de tumor já estão polarizados em *M1* e *M2*, de acordo com a fase de desenvolvimento tumoral (Redente et al., 2010).

A adaptação metabólica é um componente-chave para a polarização de macrófagos e, portanto, para sua plasticidade funcional. Uma melhor compreensão sobre os mecanismos que regulam a “conexão” entre o metabolismo e a polarização dos macrófagos pode contribuir com o desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas (Biswas, Mantovani, 2012).

## **1.6 Modelos experimentais para o estudo de neoplasias – Tumores sólidos e ascíticos**

Várias linhagens de células tumorais são potencialmente capazes de crescer tanto na forma sólida como ascítica, dependendo do sítio onde são injetadas, do número de células administradas e da responsividade imunológica do hospedeiro (Culo et al., 1978). Os tumores sólidos são formados por dois compartimentos distintos, porém interdependentes: as próprias células tumorais (parênquima) e o estroma de sustentação, no qual estas células estão dispersas (Cotran, 1989). Todo tumor sólido, independente de sua origem ou tipo, requer o desenvolvimento do estroma, quando atinge o tamanho de 1 a 2 mm<sup>3</sup> (Folkman, 1985). Entretanto, o crescimento e sobrevivência dos tumores malignos são dependentes da angiogênese (Folkman 1971, 1976), uma vez que a doença metastática não poderia progredir sem a formação de um suprimento de sangue para a massa de tumores sólidos primários, fato agora que está bem aceito (Bergers e Benjamin, 2003; Folkman, 2006a). Foi demonstrado também que, sem a formação de um suporte sanguíneo intra-tumoral, os tumores não seriam capazes de obter o oxigênio e os nutrientes necessários para crescer além de 2 mm<sup>3</sup> de diâmetro (Duffy, 1996). Entre outros benefícios, o estroma proporciona a vascularização necessária para o suprimento de nutrientes, troca gasosa e eliminação de metabólitos.

O tumor de Walker 256 é uma neoplasia mista com características de sarcoma e carcinoma, identificada pela primeira vez, na região da glândula mamária de uma rata albina prenhe (Earle, 1935; Walker, 1928). O próprio investigador iniciou a manutenção do tumor, implantando-o em mamas de ratas. Desde então, o tumor tem sido mantido por transplantes sucessivos ou em culturas de células *in vitro*.

Desde sua descoberta em 1928 esta linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos antineoplásicos e de caquexia induzida por tumor, por ser específica para ratos e facilmente transplantada (Earle, 1935; Guaitani et al., 1982; Fernandes et al., 1995; Folador et al., 2009; Pavlaki et al., 2009).

O tumor de Walker 256 é capaz de desenvolver-se na forma sólida ou ascítica dependendo do local de sua inoculação e possui capacidade de disseminação, tanto por via linfática como hematogênica (Carr et al., 1980; Mattos, 1980). Este tumor apresenta, ainda, grande capacidade para estimular a vascularização local expressando fatores angiogênicos (Fencelau et al., 1981; Folkman, 1971, 1972, 1990; George et al., 1981; Li et al., 2003). Desenvolve-se facilmente em regiões distintas, tais como cérebro (Morioka et al., 1992), tecido subcutâneo (Bacurau et al., 2000; Belo et al., 2010; Maria et al., 1994; Veiga et al., 2008), tecido muscular (Soares et al., 1994), cavidade peritoneal (Rosa et al., 1993).

\* \* \*

Dados da Literatura têm demonstrado que a crotoxina apresenta efeito antitumoral. Ainda, estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a CTX, após 14 dias de uma única administração, estimula a liberação de peróxido de hidrogênio e produção de óxido nítrico, além de modular a secreção de citocinas por macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos normais. Desta forma, considerando que esses mediadores são fundamentais no controle de progressão tumoral, é relevante investigar se a CTX estimula a produção desses mediadores pelos macrófagos obtidos de animais portadores de tumor.

## **6 CONCLUSÕES**

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo nos permite concluir que a CTX, independentemente da fase de desenvolvimento tumoral, estimula a liberação e produção de  $H_2O_2$  e NO, a secreção das citocinas TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , além estimular o metabolismo de glicose e glutamina. Estas ações são de longa duração, podendo ser observadas após 14 dias de uma única administração da CTX.



## REFERÊNCIAS\*

- Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol.* 1984;2:283-318.
- Aikawa J, Moretto KD, Denes F, Yamazaki RK, Freitas FA, Hirabara SM, Tchaikovski Jr O, Kaelher MA, Brito GA, Curi R, Fernandes LC. Glucose metabolism by lymphocytes, macrophages, and tumor cells from Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with fish oil for one generation *Cell Biochem Funct.* 2008;874-80.
- Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* 1976;154(3):689-700.
- Ardawi MS, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat *Biochem J.* 1983;212:835-42.
- Ardawi MS, Newsholme EA. Metabolism in lymphocytes and its importance in the immune response. *Essays Biochem.* 1985;21:1-44.
- Aschoff. *Lectures on pathology.* New York: Paul B. Hoeber, Inc; 1924; 1.
- Auger MJ, Ross JA. The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JOD, editors. *The natural immune system: the macrophage.* Oxford: IRL Press; 1992. p. 1-57.
- Bacurau RF, Belmonte MA, Seelaender MC, Costa Rosa LF. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochem Funct.* 2000;18: 249-58.
- Bacurau AV, Belmonte MA, Navarro F, Moraes MR, Pontes Jr FL, Pesquero JL, Araújo RC, Bacurau RF. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of walker 256 tumor bearing rats. *Exp Biol Med.* 2007;232(10):1289-99.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005;7(3):211-7.
- Bardos H, Juhasz A, Repassy G, Adany R. Fibrin deposition in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Thromb Haemost.* 1998;80:767-72.
- Bergers G, Benjamin L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:401-10.

---

\* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>.

Bergmeyer HU. Reaction kinetic investigations to measure glycolysis. *Biochem Z.* 1952;323(3):163-80.

Bergmeyer HU, Bernet, E, Mölerner H, Pfeleider G. L-aspartate and L-asparagine. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* London: Academic Press; 1974.

Bernet E, Bergmeyer HU, L-glutamate UV-assay with glutamate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer, HU editor. *Methods of enzymatic analysis.* London: Academic Press; 1974.

Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.* 2012;15(4):432-7.

Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 2008;180(4):2011-7.

Bittencourt Jr PI, Curi R, Williams JF. Glutathione metabolism and glutathione S-conjugate export ATPase (MRP1/GS-X pump) activity in cancer. I. Differential expression in human cancer cell lines. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;1243-54.

Blomstrand E, Challiss RA, Cooney GJ, Newsholme EA. Maximal activities of hexokinase, 6-phosphofructokinase, oxoglutarate dehydrogenase, and carnitine palmitoyltransferase in rat and avian muscles. *Biosci Rep.* 1983;3(12):1149-53.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72: 248-53.

Bragança BMP, Badrinath PG, A highly selective carcinolytic agent isolated from cobra venom. *Biochem Biophys Acta.* 1967;136:508-20.

Brand K, Williams JF, Weidemann MJ. Glucose and glutamine metabolism in rat thymocytes. *Biochem J.* 1984; 221: 471-5.

Brazil V. Do emprego da peçonha em terapêutica. São Paulo: An Paul Med Cir. 1950;60:398-408.

Brazil V. Do emprego da peçonha em terapêutica. São Paulo: An Paul Med Cir. 1950; 60:398-408.

Brazil V. Do emprego da peçonha na terapêutica. São Paulo; 1934.

Brigatte P, Sampaio SC, Gutierrez VP, Guerra JL, Sinhorini IL, Curi R, Cury Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. *J Pain.* 2007; 8(5):412-21.

Brodie AF, Lipmann F. Identification of a gluconalactonase. *J Biol Chem.* 1985;212: 677-85.

Brozna JP, Hauff NF, Phillips WA, Johnston RB. Activation of the respiratory burst in

macrophages. Phosphorylation specifically associated with Fc receptor-mediated stimulation. *J Immunol.* 1988;141:1642-7.

Calorini L, Mannini A, Bianchini F, Mugnai G, Ruggieri S. The change in leukotrienes and lipoxins in activated mouse peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2000;12:87-92.

Camargo A, Costa FF. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Bases da oncologia. São Paulo: Lemar Livraria; 2003. p. 71-86.

Cardoso DF, Mota I. Effect of Crotalus venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon.* 1997;4:607-12.

Cardoso DF, Lopes-Ferreira M, Faquim-Mauro EL, Macedo MS, Farsky SHP. Role of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from Crotalus durissus terrificus snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators of Inflammation.* 2001;10:125-33.

Carr J, Carr I, Dreher B, Betts K. Lymphatic metastasis: invasion of lymphatic vessels and efflux of tumour cells in the afferent popliteal lymph as seen in the Walker rat carcinoma. *J Pathol.* 1980;132:287-305.

Cezar-de-Mello PFT, Vieira, AM, Nascimento-Silva V, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Fierro IM. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A<sub>4</sub>, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *British Journal of Pharmacology.* 2008;153:956-65.

Chaim-Matyas A, Ovadia M. Cytotoxic activity of various snake venoms on melanoma, B16F10 and chondrosarcoma. *Life Sci.* 1987;40:1601-7.

Chwetzoff S, Takeshi M, Fromageot P, Menez A. Basic phospholipase from the venom of Naja nigricollis is cytotoxic. *C R Acad Sci III.* 1988;306:31-3.

Claria J, Lee MH, Serhan CN. Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549) -neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation. *Mol Med.* 1996;2(5):583-96.

Cohn ZA. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J Immunol.* 1978;121:813-6.

Cooney GJ, Newsholme EA. The maximum capacity of glycolysis in brown adipose tissue and its relationship to control of the blood glucose concentration. *FEBS Lett.* 1982;148(2):198-200.

Corda S, Samuel JL, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev.* 2000;5(2):119-30.

Corin RE, Viskatis LJ, Vidal JC, Etcheveny MA. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. *Invest New Drugs.* 1993;11:11-5.

Costa ES, Francisco AMSC, Faiad OJ, Cury Y, Sampaio SC. Effect of Crotoxin, the main toxin of the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom, on secretory activity of peritoneal macrophages during tumor progression. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*

In: 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology; 2010. Official Journal of World Pharma. 2010;107 Suppl 1: 2729. ISSN: 1742-7835.

Costa ES, Faiad OJ, Curi R, Cury Y, Sampaio SC. Effect of crotoxin on secretory activity of peritoneal macrophages co-cultivated with tumor cells. Involvement of formyl peptide receptors. *Inflammation Research*. In: 10th World Congress on Inflammation. 2011;60 Suppl 1;601. Official Journal of The International Association of Inflammation Societies and The European Histamine Research Society, 2011. doi: 10.1007/s00011-011-0341-6.

Costa Rosa LFBP, Safi DA, Curi R. Effect of thioglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages. *Journal of Leucocyte Biology*. 1994;56:10-4.

Cotran RSK, Robbins S. *Pathologic basis of disease*. Cambridge, UK: W. B. Saunders Company; 1989.

Crabtree B, Newsholme EA. A quantitative approach to metabolic control. *Curr Top Cell Regul*. 1985;25: 21-76.

Crabtree B, Newsholme EA. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*. 1972;126:49-58.

Culo F, Allegretti N, Marusic, M. Ascitic versus solid growth of Ehrlich ascites tumor influenced by immunological factors. *Oncology*. 1978;35:15-21.

Cura JE, Blanzaco DP, Brisson C, Cura M A, Cabrol R, Larrateguy L, Mendez C, Sechi JC, Silveira JS, Theiller E, De Roodt A R, Vidal JC. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:1033-41.

Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme EA. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol*. 2005; 8: 204(2): 392-401.

Curi R, Newsholme EA. The effect of adenine nucleotides on the rate and fate of glutamine utilization by incubated mitochondria isolated from rat mesenteric lymph nodes. *Mol Cell Biochem.*, 1989;86:71-6.

Curthoys NP, Lowry OH. The distribution of glutaminase isoenzymes in the various structures of the nephron in normal, acidotic, and alkalotic rat kidney. *J Biol Chem*. 1973;248(1):162-8.

Di Napoli MP, Di Napoli P. Cytosolic phospholipase A2 induction after global ischemia: don't forget the role of adenosine. *Stroke*. 1996;27(9):1698-700.

Donato JN, Martin CA, Perez M, Newman RA, Vidal JC, Etcheveny M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin. A novel growth inhibitory mechanism. *Biochem Pharmacol*. 1996;51:1535-43.

- Duffy J. The biochemistry of metastasis. *Adv Clin Chem.* 1996;32:135–60.
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986;315(26):1650-9.
- Earle WR. A study of Walker rat mammary carcinoma 256, in vivo and in vitro. *American Journal of Cancer.* 1935;24:556-612.
- Eccles SA. Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr Opin Genet. Dev.* 2005;15(1):77-86.
- Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol.* 1998;64: 275–90.
- Enge PC, Jones JB. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD<sup>+</sup> in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal Biochem.* 1978; 88(2):475-84.
- Faiad OJ, Della-Casa MS, Sampaio SC. Lipoxin A4 contributes to inhibitory effect of Crotoxin on growth of Walker 256 tumor. In: X Annual Scientific Meeting; 2008. 65: 8.04.
- Faure G, Bon C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon.* 1987;25:229-38.
- Fenselau A, Watt S, Mello RJ, Fierro IM. Angiogenesis and lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;73(3-4):271-5.
- Fenselau A, Watt S, Mello RJ. Tumor angiogenic factor. Purification from the Walker 256 rat tumor. *J Biol Chem.* 1981;256(18):9605-11.
- Fierro IM, Kutok JL, Serhan CN. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300(2):385-92.
- Folador A, Hirabara SM, Bonattoo SJ, Aikawa J, Yamazaki RK, Curi R, Fernandes LC. Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. *Int J Cancer.* 2007;344:50.
- Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 1972;175(3):409–16.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(1):4-6.
- Folkman J. Angiogenesis. *Ann Ver Med.* 2006a;57:1–18.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1985;43:175-203.
- Fraenkel-Conrat H, Singer B. Fractionation and composition of crotoxin. *Archs Biochem.* 1956;60:64-73.

Garcia F, Toyama MH, Castro FR, Proença PL, Marangoni S, Santos LMB. Crotopotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE2 synthesis. *Toxicon*. 2003;42:433-7.

Gartner LP, Hiatt JL, Integument. In: *Color atlas of histology*. Baltimore: Williams & Williams; 1994. p. 206-11.

George A. Fournier, Gerard DA, Sandra LW, Fenselau A, Arnall P. A corneal micropocket assay for angiogenesis in the rat eye. *Assoc for Res in Vis and Ophthalmol Inc Report*. 1981.

Giorgi R. Antinociceptive activity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. In: *IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia*; 1996; Recife, PE, Brasil. 1996. p. 100.

Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y, Gordon S. Biology of the macrophages. *J Cell Sci*. 1986;4:267-86.

Gopalakrishnakone P, Dempsster DW, Hawgood BJ, Elder HY. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> complex. *Toxicon*. 1984;22:85-98.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;12:953-64.

Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;1:23-35.

Gordon S. Biology of the macrophages. *J Cell Sci*. 1986;4:267-86.

Gronert K, Martinsson-Niskanen T, Ravasi S, Chiang N, Serhan CN. Selectivity of recombinant human leukotriene D<sub>4</sub>, leukotriene B<sub>4</sub>, and lipoxin A<sub>4</sub> receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA<sub>4</sub> and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol*. 2001;158(1):3-9.

Gutjahr MC, Rossy J, Niggli V. Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Exp Cell Res*. 2005;308(2):422-38.

Haad JL. Accidentes humanos por las serpientes de los géneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Memórias do Instituto Butantan*. 1980/81;44-45:403-23.

Hamilton TA, Ohmori Y, Tebo J. Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. *Immunol Res*. 2002;25:229-45.

Hammer JA, Rannels DE. Effects of halothane on protein synthesis and degradation in rabbit pulmonary macrophages. *Am Respir Dis*. 1981;124:50-5.

Hannun YAB, Signal transduction in cancer. In: *Cancer Medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 48-65.

Henriksson J. Effect of exercise on amino acid concentrations in skeletal muscle and plasma. *J Exp Biol*. 1991;160:149-65.

- Hood DA, Terjung RL. Amino acid metabolism during exercise and following endurance training. *Sports Med.* 1990;9:23-35.
- Horecker BL, Smyrniotis PZ. Reversibility of glucose-6-phosphate oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1953;12:98-102.
- Hull RN. Establishing long-term cultures of mammalian normal, solid tumor, and ascites tumor cells on glass. *Science.* 1953;117:223-5.
- Imai Y, Kolb H, Burkart V. Nitric oxide production from macrophages is regulated by arachidonic acid metabolites. *Biochem. Biophys Res Commun.* 1993;197(1):105-9.
- Katayama K, Shirota H, Kobayashi S, Terato K, Ikuta H, Yamatsu I. In vitro effect of N-methoxy-3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2-pyrrolidone (E-5110), a novel nonsteroidal antiinflammatory agent, on generation of some inflammatory mediators. *Agents Actions.* 1987;21(3-4):269-71.
- Jorens PG, Matthys KE, Bult H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. *Mediators of Inflammation.* 1995;4:75-89.
- Karnovsky MJ, Robinson JM, Briggs RT, Karnovsky ML. Oxidative cytochemistry in phagocytosis: the interface between structure and function. *Histochem. J.* 1981; 1: 22.
- Kassis J, Lauffenburger DA, Turner T, Wells A. Tumor invasion as dysregulated cell motility. *Semin. Cancer Biol.* 2001;11(2):105-17.
- Katayama K, Shirota H, Kobayashi S, Terato K, Ikuta H, Yamatsu I. In vitro effect of N-methoxy-3-(3,5-ditert-butyl-4-hydroxybenzylidene)-2-pyrrolidone (E-5110), a novel nonsteroidal antiinflammatory agent, on generation of some inflammatory mediators. *Agents Actions.* 1987;21(3-4):269-71.
- Kovacevic Z, McGivan JD. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiologic significance. *Physiol Rev.* 1983;63:547-605.
- Kowalchuk JM, Curi R, Newsholme EA. Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. *Biochem J.* 1988;249:705-8.
- Krebs HA. Aspects of metabolic regulation. *Febs Lett.* 1980;117:K1-K85.
- Krebs HA. Bovine ketosis. *Vet Rec.* 1966;78:187-92.
- Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev.* 1990;48:297-309.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.
- Li CY, Shan S, Huang Q, Braun RD, Lanzen J, Hu K, Lin P, Dewhirst MW. Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(2):143-7.
- Lipps BV. Novel snake venom proteins cytotoxic to cancer cells in vitro and in vivo

systems. *J. Venom Anim. Toxins*. 1999; 5: 173-83.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;11:549-55.

Maria DA, Pagliarini RC, Mistrone RJ, Pozzi DH, Zyngier S. Mononuclear cell cytotoxicity in rats with Walker 256 tumor. *Braz J Med Biol Res*. 1994;27:1343-6,

Masferrer JL, Koki A, Seibert K. COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann NY Acad Sci*. 1999;889:84-6.

Mattos MCFIDM, Vieira E Silva, CR. Walker 256 carcinoma sarcoma: pathology microscopic and ultrastructural features of the circulant cells. *Ciênc Cult*. 1980;32:849-57.

McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;6(2):F189-201.

McMahon B, Stenson C, McPhillips F, Fanning A, Brady HR, Godson C. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J Biol Chem*. 2000; 275(36):27566-75.

Metcalf D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. *J Cell Physiol*. 1971;77:277-80.

Mitchell D, Rodgers K, Hanly J, McMahon B, Brady HR, Martin F, Godson C. Lipoxins inhibit Akt/PKB activation and cell cycle progression in human mesangial cells. *Am J Pathol*. 2004;164(3):937-46.

Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*. 1996; 9;84(3):371-9.

Moore MAS, Metcalf D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br J Haematol*. 1970;18:279-96.

Morioka T, Baba T, Black KL, Streit WJ. Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. *Neurosurgery*. 1992;30:891-6.

Nagy JA, Brown L F, Senger DR, Lanir N, Van De Water L, Dvorak AM, Dvorak H F. Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim Biophys Acta*. 1989;948:305-26.

Nagy JA, Morgan ES, Herzberg KT, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. Pathogenesis of ascites tumor growth: angiogenesis, vascular remodeling, and stroma formation in the peritoneal lining. *Cancer Res*. 1995;55:376-85.



- Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987;79:319-26.
- Newman RA, Vidal JC, Viskatis LJ, Johnson J, Etcheveny MA. Urctc-310. A novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. *Invest. New Drugs.* 1993;11:151-9.
- Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr.* 2001;131(9):2515S-22S; discussion 2523S-4S.
- Newsholme EA, Crabtree B. Substance cycles metabolic regulation and in heat generation. *Biochem Soc Symp.* 1976;41:61-9.
- Newsholme EA, Leech AR. In: *Biochemical for the medical sciences.* New York: John Wiley & Sons; 1983. p. 915.
- Newsholme EA, Start C. *Regulation in metabolism.* London: John Wiley & Sons; 1973. 349 p.
- Newsholme EA, Newsholme P, Curi R, Crabtree B, Ardawi SM. Glutamine metabolism in different tissues in different tissues. Its pathological and physiological importance: Kinney JM, Borum PG, editors. *Perspectives in clinical nutrition.* Baltimore-Munich; 1989. p. 71-98.
- Newsholme P. *Studies on metabolism in macrophages.* [Ph. D. thesis]. Oxford: Oxford University; 1987.
- Newsholme P, Costa Rosa LFBP, Newsholme EA, Curi R. The importance of fuel metabolism to macrophage function. *Cell Biochem. Functions.* 1996;14:1-10.
- Newsholme P, Gordon S, Newsholme EA. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem J.* 1987;242:631-6.
- Newsholme P, Procopio J, Lima MM, Pithon-Curi TC, Curi R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 2003;21(1):1-9.
- Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem. Soc Trans.* 1995;23(3):456-9.
- Nunes FP, Zychar BC, Della-Casa MS, Sampaio SC, Gonçalves LR, Cirillo MC. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon.* 2010;55(6):1100-6.
- Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R, Walsh K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem.* 2010;285(9):6153-60.
- Oosterling SJ, van der Bij GJ, Meijer GA, Tuk CW, van Garderen E, van Rooijen N,

- Meijer S, van der Sijp JR, Beelen RH, van Egmond M. Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *J Pathol.* 2005;207(2):147-55.
- Pearson PL, Van der Looij RB. The genetic analysis of cancer. *Journal of Internal Medicine.* 1998;243:413-7.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2004;1:71-8.
- Rangel-Santos A, Lima C, Lopes-Ferreira M, Cardoso DF. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon.* 2004;44(6):609-16.
- Rappolee DA, Werb Z. Secretory products of phagocytes. *Curr Opin Immunol.* 1988;1:47-55.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 1992;70(3):401-10.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-9.
- Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 15):2713-22.
- Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. *Pathologic basis of disease.* Chicago, Illinois: Saunders Company; 1995.
- Rosa LF, Guimaraes AR, Safi DA, Curi R, Williams JF. Effects of various dietary fatty acids on enzyme activities of carbohydrate and glutamine metabolism and the metabolic response of lymphocytes and macrophages during Walker-256 ascites cell tumour growth in rats. *Biochem Mol Biol Int.* 1993;29:33-45.
- Rosenfeld G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: Bücherl W, Buckley E, editors. *Venomous animals and their venoms.* New York: Academic Press; 1971. p. 345-84.
- Rudd CJ, Viskatis LJ, Vidal JC, Etchevery MA. In vitro. Comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumours and a normal human epidermal keratinocyte cell line. *Invest New Drugs.* 1994;12:183-4.
- Sampaio SC, Alba-Loureiro TC, Brigatte P, Landgraf RG, Dos-Santos EC, Curi R, Cury Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon.* 2006;47(3):313-21.
- Sampaio SC, Brigatte P, Sousa-E-Silva MCC, Dos-Santos EC, Rangel-Santos AC, Curi R, Cury Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon.* 2003;41:899-907.
- Sampaio SC, Sousa-E-Silva MCC, Borelli P, Curi R, Cury Y. *Crotalus durissus*

terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J Leukoc Biol.* 2001;70:551-8.

Santoro ML, Sousa-E-Silva MCC, Gonçalves LRC, Almeida-Santos SM, Cardoso DF, Laporta-Ferreira IL, Saiki M, Peres CA, Sano-Martins IS. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Compar Biochemistry and Physiol.* 1999;122:61-73.

Sasada M, Johnston RBJr. Macrophage microbicidal activity. Correlation between phagocytosis-associated oxidative metabolism and the killing of *Candida* by macrophage. *J Exp Med.* 1980;152:85-98.

Segal AW, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *TIBS.* 1993;18:43-7.

Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(17):5335-9.

Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 2008;26.

Simony J, Rossi JF, Shishehian B, Ursule E, Radal M, Pujol H. Characterization of proliferative cells in malignant melanomas and their inflammatory infiltrates. *Cancer Detect Prev.* 1991;15:183-7.

Simpkins H, Lehman JM, Mazurkiewicz JE, Davis BH. A morphological and phenotypic analysis of Walker 256 cells. *Cancer Res.* 1991;51:1334-8.

Brasil. Ministério da Saúde. Sinan: acidente por animais peçonhentos: notificações registradas no sistema de informação de agravos de notificação. Brasília; 2011.

Slotta KH, Fraenkel-Conrat H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4-Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem Inst Butantan.* 1938;12:505-12.

Soares FA. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 1989.

Soares FA, Shaughnessy SG, Maclarkey WR, Orr FW. Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cells in vitro and during metastasis in vivo. *Lab Invest.* 1994;71:480-9.

Sousa-E-Silva MCC, Gonçalves LRC, Mariano M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediators of Inflammation,* 1996;5:18-23.

Srene PA, Matsuoka Y. Inhibition of rat citrate synthase by acetoacetyl CoA and NADH. *Biochem Med.* 1972;6:262-6.

- Steiman RM, Millman IS, Muller WA, Cohn ZA. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol.* 1983;96:1-27.
- Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001;10(2):383-92.
- Stocker K. Composition of snake venoms. In: Stocker KF. Medical use of snake venom proteins. Boca Raton, Boston: CRC; 1990. p. 33-56.
- Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 2005;175(1):342-9.
- Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology.* 2006;211(6-8):609-18.
- Takemura R, Werb Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am J Physiol.* 1984;246:C1-C9.
- Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(1):86-92.
- Tapper H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1996; 59: 613-20.
- Tarling JD, Lin HS, Hsu S. Self renewal of pulmonary alveolar macrophages. *J Leukoc Biol.* 1987;42:443-6.
- Thelen M, Dewald B, Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev.* 1993;73:197-821.
- Umeki S. Activation factors of neutrophil NADPH oxidase complex. *Life Sciences.* 1994;55:1-13.
- Van Arman CG, Begany AJ, Miller JM, Pless HH. Some details of the inflammation caused by yeast and carragenin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1965;150:328-33.
- Van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1968;128:415-35.
- Van Furth R, Diesselhoff-Den Dulk MMC. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J Exp Med.* 1970;132:813-28.
- Van Furth R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr Top Pathol.* 1989;79:125-50.
- Van Furth R, Diesselhoff-Den Dulk MMC, Mattie H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J Exp Med.* 1973;138:1314-30.
- Van Furth R, Diesselhoff-Den Dulk MMC, Raeburn JA, Van Zwet HL, Crofton R, Blussé Van Oud Alblas A. Characteristics, origin and kinetics of human and murine

mononuclear phagocytes. In: Van Furth, editor. Mononuclear phagocytes: functional aspects. Boston: Martinus Nijhoff, The Hague; 1980.

Vital-Brazil O. Neurotoxins from South American rattlesnake. J Formosan Med. Assoc. 1972;71:394-6.

Watford M, Lund P, Krebs HA. Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes. Biochem J. 1979;178:589-96.

Werb Z, Hembry RM, Murphy G, Aggeler J. Commitment to expression of metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. J Cell Biol. 1986;102:697-702.

Whitelaw DM. The intravascular lifespan of monocytes. Blood. 1966;28:445-64.

Wicki A, Niggli V. The Rho/Rho-kinase and the phosphatidylinositol 3-kinase pathways are essential for spontaneous locomotion of Walker 256. Int J Cancer. 2001; 91(6):763-71.

Zhang Y, Lin J-X, Yip YK, Vilcek J. Stimulation of interleukin-6 mRNA levels by tumour necrosis factor and interleukin-1. Ann N Y Acad Sci. 1989;557:548-9,

Zambelli VO, Sampaio SC, Sudo-Hayashi LS, Greco K, Britto LR, Alves AS, Zychar BC, Gonçalves LR, Spadacci-Morena DD, Otton R, Della-Casa MS, Curi R, Cury Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. Toxicol. 2008;51(8):1357-67.