

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do envolvimento da Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório

Marco Aurélio Sartim

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do envolvimento da Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Marco Aurélio Sartim

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sartim, Marco Aurélio

Avaliação do envolvimento da Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório. Ribeirão Preto, 2010.

106 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Sampaio, Suely Vilela.

1. Peçonhas Animais. 2. *Bothrops atrox*. 3. Lectina. 4. Inflamação. 5. Atividade Neutrófilos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Marco Aurélio Sartim

Título: Avaliação do envolvimento da Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Aprovado em:

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes na minha vida e que sempre estiveram comigo durante todos os momentos. Sejam esses de felicidade ou não tão felizes assim. Minha mãe Maria Madalena, meu pai Ademir, meus irmãos Rafael e Thaisa, e minha noiva Ariandra com quem terei início a uma nova jornada da minha vida. Sincero obrigado à todos vocês. Amo todos!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar um espaço neste mundo para colocar em prática todas as minhas habilidades sempre visando, no final, o bem estar entre as pessoas.

À professora Suely Vilela, que apesar de sua ausência por motivos mais do que compreendidos e honrosos, sempre se mostrou à disposição e competência em sua função como orientadora.

Aos companheiros de laboratório Raquel, Gilmara, Lanuze e Lorane pelo apoio, amizade, compreensão e experiência compartilhada nesse ambiente que acaba se tornando uma segunda casa.

À Adélia Cristina, por toda sua experiência, paciência e amizade. Com certeza, por mais que informalmente, sempre foi nossa co-orientadora.

Ao Franco, grande amigo onde sempre procurou nos ajudar com conselhos ou atitudes, seja no laboratório ou fora dele.

Aos companheiros da República Bacuri que estão presente ou que já passaram, Daniel, Gerson, Denis, Cesar, Santiago, Fernando, Mateus, Luis, dentre outros. Sempre grandes pessoas.

Aos companheiros do laboratório de Toxinas Animais, Lucas, Danilo, Carol, Silvana, Renata, Joara e outros que por ali passaram e deixaram lembranças.

Ao professor Andreimar, que sempre se mostrou disponível em auxiliar em tudo que fosse necessário para nossa formação como pesquisador.

Em especial ao grande amigo Norival (“Chuck Noris”) por estar sempre presente e um verdadeiro companheiro.

Ao Laboratório de Glicoimunologia da FCFRP. Agradeço por toda a estrutura para desenvolvimento do projeto. Sem vocês não compreenderia a inflamação corretamente. Não apenas a estrutura, mas também a atenção e conhecimento compartilhado. Aos amigos Camilo, Thalita, Lilian, Willian, Rubinho, Marlise, Jenifer, Karina, dentre outros. Muito obrigado.

A todo segundo andar do bloco M referente à análises clínicas, Ana Luisa, Claudia, Elení que sempre me ajudaram em tudo que precisei para desenvolvimento do meu projeto.

Ao Laboratório de Bioquímica onde a professora Yara e a Aninha sempre estiveram dispostas a ajudar nos experimentos e discussões pertinentes.

Ao Laboratório de Inflamação e Imunologia de Parasitoses, sob orientação da professora Lucia Faccioli pela colaboração nos experimentos. E especialmente ao Carlos pela disposição em ajudar sempre que precisei com muito bom humor.

À todos os companheiros graduandos da faculdade de farmácia que me aceitaram como pós-graduando, amigo e atleta sempre brigando pela faculdade.

Aos amigos, dentro e fora do ambiente da Universidade, Kanashiro e Weverton.

Aos familiares espalhados por todo Brasil que no momento não estão tão perto para compartilhar esse momento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para desenvolvimento do projeto de pesquisa, dentro do projeto temático (processo FAPESP nº 05/54855-0) e para a bolsa de mestrado (processo FAPESP nº 07/57007-6), os quais foram essenciais para alcançar os objetivos propostos.

À todos os amigos em Vitória.

i. RESUMO

SARTIM, M.A. **Avaliação do envolvimento da Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório.** 2010. 106f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.

Lectinas consistem de um vasto grupo de proteínas de origem não-imunológica e de caráter não enzimático, que reconhecem carboidratos de modo específico e não-covalente. Além disso, essas proteínas participam de vários eventos fisiológicos e patológicos, com embriogenese, resposta imunológica, apoptose, diferenciação celular e câncer. Recentemente, foi purificada da peçonha da serpente *Bothrops atrox* uma lectina do tipo-C, ligante de lactose, com propriedades bioquímicas e funcionais semelhantes à de outras lectinas de serpentes do gênero, denominada Galatrox. O presente projeto teve como objetivos a investigação do envolvimento da Galatrox no processo inflamatório agudo através de experimentos *in vivo* e *in vitro* e a produção de anticorpos policlonais anti-Galatrox. A lectina isolada foi obtida através de dois processos cromatográficos, apresentando um valor final de recuperação protéica de 0,3% (mg) em relação ao conteúdo protéico da peçonha bruta. De modo interessante, a Galatrox conjugada ao fluorocromo FITC (8µg/mL) foi capaz de ligar-se a superfície de neutrófilos (91,47%±0,5650). Além disso, esta proteína reconheceu a laminina imobilizada, e não a fibronectina, uma glicoproteína da matriz extracelular que contém sequências de poli-N-acetilactosamina. Avaliando seu potencial inflamatório, Galatrox mostrou-se capaz de induzir a migração de neutrófilos humanos *in vitro* de forma dose-dependente, tendo máxima atividade quimiotática na concentração de 32µg/mL (41,57±3,42 neutrófilos por campo). Apesar da Galatrox induzir um discreto nível de *burst* oxidativo em neutrófilos humanos não primados, ela apresentou um efeito três vezes maior quando essas células foram primadas com fMLP. Esta lectina quando injetada na cavidade peritoneal de camundongos Balb/C provocou migração leucocitária, sendo que na dose (50µg/cavidade) e no tempo (4 horas) ótimos ocorreu um influxo celular de $2,05 \times 10^6 \pm 0,101$ leucócitos/mL. Ainda, esse infiltrado celular mostrou-se, basicamente, composto por neutrófilos. Avaliando o perfil de mediadores da resposta inflamatória nesse ensaio *in vivo*, nos lavados peritoneais foi indicada a liberação máxima de IL-1α e IL-6 após 4 horas de tratamento, mas não foram detectadas a presença de TNF-α e óxido nítrico em qualquer tempo de resposta. Células de baços murinos tratados com Galatrox produziram as citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IFN-γ e não produziram IL-10 ou NO. A produção de anticorpos policlonais foi realizada por imunização de camundongos e purificação cromatografia de afinidade em colunas com Galatrox imobilizada. A monitoração por *ELISA* e *Western blot* comprovaram a produção de anticorpos da classe IgG anti-Galatrox reconhecedores da lectina em sua forma nativa e desnaturada além de suas formas monoméricas e diméricas. Em todos os ensaios biológicos que a Galatrox foi testada na presença da lactose (carboidrato ligante da Galatrox, 20 mM) ocorreram inibições significativas das atividades dessa lectina, indicando que o seu domínio de reconhecimento de carboidrato participa das funções dessa molécula. Com base nos resultados obtidos é possível sugerir que a Galatrox participe da resposta imune inata por mediar eventos biológicos da resposta inflamatória aguda.

No entanto, a lectina mostrou-se como um moderado agente pró-inflamatória, quando relacionada à peçonha bruta tendo em vista a fisiopatologia inflamatória do envenenamento. O anticorpo anti-Galatrox poderá ser usado como uma importante ferramenta estudos moleculares e funcionais dessa lectina de serpente.

Palavras-chave: peçonha serpente, *Bothrops atrox*, lectina do tipo-C, processo inflamatório, liberação citocinas, atividade neutrofílica.

ii. ABSTRACT

SARTIM, M.A. Evaluation on the involvement of Galatrox, a lactose binding lectin isolated from Bothrops atrox venom, on the inflammatory process. 106p. 2010. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2010.

Lectins are proteins with no enzymatic activity and are able to bind specifically and non-covalently (reversible manner) to carbohydrates. In addition, these proteins are involved in several physiological and pathological events, as embryogenesis, immune response, cancer, and others. Galatrox, a lactose-binding protein, was purified from *Bothrops atrox* snake venom and partially characterized concerning its biochemical and functional properties. The present work aimed to investigate the involvement of Galatrox in the inflammatory process. In addition, was carry out the production of a polyclonal antibody against Galatrox. This lectin was purified by one chromatographic step with yield around 0.3% (w/w) of total protein from *Bothrops atrox* crude venom. Interestingly, Galatrox-FITC (8µg/mL) binds on human neutrophil surface (91.47% ± 0.5650). Also, this lectin recognized laminin, but not fibronectin, a glycoprotein of the extracellular matrix that contains poly-N-acetyllactosamine sequences. Galatrox was able to induce human neutrophils migration in vitro in a dose-dependent manner, with maximum chemotactic activity at 32µg/mL (41.57 ± 3.42 neutrophils per well). Galatrox is more efficient to induce oxidative burst on fMLP primed neutrophils rather than non-primed neutrophils. When injected into mouse peritoneal cavity, Galatrox induced dose and time-dependent leukocyte migration, with optimal effect at 50µg/animal after 4 hours of the injection (2.05x10⁶±0.101 leukocytes/mL). Galatrox also induced release of IL-1α and IL-6 up to 12 hours after injection in the peritoneal cavity. However, TNF-α and NO were not detected. The treatment of splenocytes with Galatrox in vitro promotes the production of INF-γ and TNF-α. The biological activities of Galatrox were inhibited by lactose (specific sugar, 20 mM), indicating that its recognition carbohydrate domain participates of its functions. The production of polyclonal antibody anti-Galatrox was performed by immunization of mice and purified by affinity chromatography using immobilized Galatrox resin. Gamma-globulins against Galatrox were able to recognize this lectin under native and reduced conditions, using ELISA and Western-blot, respectively. The antibody anti-Galatrox can be use as important tool to further molecular and functional characterization of this snake venom lectin. These results suggest that Galatrox is immunogenic and may participate in the acute inflammatory process, acting as a pro-inflammatory agent through its lectin property.

Keywords: Snake venom, *Bothrops atrox*, C-type lectin, inflammatory response, cytokine release, neutrophil activity.

iii. LISTA DE FIGURA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interações lectinas-carboidratos	34
Figura 2 – Perfil cromatográfico relativo à primeira etapa de purificação da Galatrox em coluna de agarose-lactose a partir da peçonha bruta de <i>B. atrox</i>	54
Figura 3. Avaliação do grau de pureza da Galatrox por CLAE e SDS-PAGE.....	57
Figura 4. Produção de soro de camundongo anti-Galatrox	59
<i>Figura 5. Purificação das imunoglobulinas anti-Galatrox dos soros dos camundongos hiperimunizados em coluna de AffGel 15 acoplada com essa lectina</i>	<i>60</i>
Figura 6- Imunodeteção da Galatrox com o uso do anticorpo anti-Galatrox purificado em condições redutoras ou não, por <i>Western Blotting</i>	61
Figura 7- A Galatrox liga-se à superfície de neutrófilos humanos de modo carboidrato dependente.....	63
Figura 8- Indução da Galatrox na produção de radicais intermediários do oxigênio em neutrófilos primados e não primados ..	65
Figura 9- Avaliação do potencial de atividade indutora da neutrófilos humanos da Galatrox, <i>in vitro</i>	67
Figura 10- Análise da atividade indutora de migração leucocitária “ <i>in vivo</i> ” promovida por diferentes concentrações de Galatrox	69
Figura 11- Análise temporal <i>in vivo</i> da atividade quimiotática para neutrófilos promovida pela Galatrox.....	71
Figura 12 – Detecção de IL-1 α e IL-6 no lavado peritoneal de camundongos tratados com diferentes concentrações de Galatrox	73
Figura 13- Detecção de IL-1 α e IL-6 no lavado peritoneal de camundongos tratados com Galatrox por diferentes períodos tempo ..	74
Figura 14- Detecção de INF- γ e TNF- α no sobrenadante de cultura de células do baço tratadas com diferentes concentrações de Galatrox...	76
Figura 15- Interação Galatrox-componentes da matriz extracelular	77

iv. LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de recuperação da Galatrox obtida a partir da peçonha bruta de <i>B. atrox</i> pelos procedimentos de purificação.....	55
--	----

**v. LISTA DE
ABREVIATURAS E SIGLAS**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSA** – Albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)
- CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- cpm** - Contagem de fótons por minuto
- CRD** - Domínio de reconhecimento de carboidrato
- D.O.** – Densidade Ótica
- EDTA** - Ácido Etilenodiaminotetraacético
- ELISA** – (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) Ensaio imunoenzimático
- fMLP** - N-formilmetionil-leucil-fenilalanina
- Gal-FITC** - Galatrox-Fluoresceína isocianetada
- EPM** - Erro Padrão Médio
- IL** – Interleucina
- INF γ** - Interferon gamma
- LacR** – Fração da peçonha retida na coluna de Lactose-Agarose
- Lac-nR** – Fração da peçonha não retida na coluna Lactose-Agarose
- Linfócito Th** – (*Lymphocyte T helper*) Linfócito T auxiliar
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MEC**- Matriz Extracelular
- Mr** - Massa Molecular realtiva
- NO**- (Nitric oxide) Óxido nítrico
- PAGE** – (*polyacrilamide gel electrophoresis*) Eletroforese em Gel de Poliácridamida
- PBS** – (*Phosphate buffered saline*) Tampão Fosfato em Salina
- PMA** - Miristato forbol acetato
- QL** - Quimioluminescência
- ROS** – (*Reactive oxygen species*) Espécies Reativas de Oxigênio
- SDS** - dodecil sulfato de sódio
- TMB** Tetra metil benzidina
- TFA** - Ácido trifluoracético
- TMB** - tetrametilbenzidina
- TNF- α** - (*Tumor necrosis factor- alpha*) Fator de necrose tumoral-alfa

SUMÁRIO

i. Resumo	
ii. Abstract	
iii. Lista de Figuras	
iv. Lista de Tabelas	
v. Lista de Abreviaturas e Siglas	
1. INTRODUÇÃO	23
1.1- Inflamação	24
1.1.1- Eventos vasculares	24
1.1.2- Eventos celulares.....	24
1.1.3- Mediadores químicos da inflamação.....	27
1.1.4- Neutrófilos.....	28
1.2- Acidentes botrópicos.....	29
1.2.1- Resposta inflamatória no envenenamento.....	29
1.2.2- Citocinas envolvidas no envenenamento.....	30
1.3- Reconhecimento celular.....	31
1.4- Lectinas.....	33
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1- Peçonha.....	41
3.2- Animais	41
3.3- Amostras de sangue humano para obtenção de suspensões de neutrófilos e ensaios de atividade de hemaglutinante.....	41
3.4- Purificação de lectina ligante de lactose derivada do veneno de <i>B. atrox</i> (Galatrox)	41
3.4.1. Preparação da amostra de peçonha bruta de <i>B. atrox</i>	41
3.4.2. Cromatografia de afinidade em agarose-lactose.....	42
3.4.3. Filtração em gel de Sephadex G-25.....	42
3.4.4. Avaliação do grau de homogeneidade da fração Lac-R	42

3.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	43
3.6- Determinação da concentração protéica de amostras: ensaio de microbiureto	43
3.7- Atividade hemaglutinante.....	43
3.8- Produção de imunoglobulinas de camundongos anti-Galatrox	44
3.8.1- Imunização de animais e obtenção de anticorpos policlonais anti-Galatrox	44
3.8.2. Purificação das imunoglobulinas anti-Galatrox dos soros dos camundongos imunizados com essa lectina.....	45
3.8.3. Detecção de anticorpos anti-Galatrox por ELISA.....	45
3.8.4- Western Blot	46
3.9- Indução de migração de neutrófilos humanos <i>in vitro</i>	46
3.10- Ligação à superfície de neutrófilos humanos por citometria de fluxo...	47
3.11- Medida do “burst” oxidativo por quimioluminescência dependente de luminol de neutrófilos humanos primados e não primados	48
3.12- Ensaio de indução de migração de leucócitos <i>in vivo</i> . Cavidade peritoneal de camundongos	48
3.13- Avaliação da produção de mediadores inflamatórios no sobrenadante de células de baço de camundongo tratadas com Galatrox...	49
3.13.1- Obtenção de sobrenadantes de células do baço estimuladas com Galatrox	49
3.13.2- Detecção de citocinas pelo Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)	50
3.14- Dosagem de NO dos sobrenadantes do lavado peritoneal e cultura de esplenócitos	50
3.15- Ensaio de ligação à componentes de matriz extracelular	51
3.16- Análise estatística	51
4. RESULTADOS	52
4.1- Obtenção e confirmação do caráter lectínico da Galatrox, uma lectina que reconhece β -galactosídeos	53
4.2- Avaliação do grau de pureza da amostra de Galatrox	56

4.3- Produção de imunoglobulinas de camundongos anti-Galatrox	58
4.4- Galatrox liga-se à superfície de neutrófilos de modo dependente da sua atividade lectínica.....	62
4.5- Galatrox é capaz de induzir o “burst” oxidativo, preferencialmente, em neutrófilos humanos primados	64
4.6- Galatrox induz migração de neutrófilos humanos <i>in vitro</i>	66
4.7- Galatrox induz migração de neutrófilos <i>in vivo</i>	68
4.7.1- A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por Galatrox foi dose dependente	68
4.7.2- O recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por Galatrox foi tempo dependente	70
4.8- Avaliação do perfil de liberação de citocinas a partir do sobrenadante do lavado peritoneal.....	72
4.8.1- Galatrox induz <i>in vivo</i> a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6 de modo dose-dependente	72
4.8.2- Galatrox apresenta perfil cinético de liberação de citocinas inflamatórias de forma aguda.....	72
4.9- Indução da produção de INF- γ e TNF- α por células do baço.....	75
4.10- Interação Galatrox-componente da matriz extracelular	77
5. DISCUSSÃO.....	78
5.1- Purificação e confirmação do caráter lectínico da Galatrox	79
5.2- Anticorpo anti-Galatrox	80
5.3- Galatrox interage com glicoconjugados de neutrófilos.....	80
5.4- Indução de liberação de espécies reativas do oxigênio em neutrófilos humanos	81
5.5- Galatrox e recrutamento neutrofílico <i>in vitro</i>	82
5.6- Avaliação do potencial quimioatrativo da Galatrox <i>in vivo</i>	83
5.7- Galatrox induz <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> a liberação de citocinas pró-inflamatórias.....	84
5.8- Galatrox interage seletivamente com a laminina, um importante componente glicosilado da matriz extracelular.....	86

6. CONCLUSÃO	88
7. REFERÊNCIAS	91
ANEXOS.....	104
Certificado de aceite to projeto junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	105
Certificado de aceite to projeto junto ao Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CEP).....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1- INFLAMAÇÃO

A inflamação é definida como uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado frente a uma determinada injúria, na qual a resposta compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos, tendo como finalidade a eliminação do agente lesivo, o estabelecimento da funcionalidade tecidual e a manutenção da homeostasia do organismo (MALE, 2006).

1.1.1- EVENTOS VASCULARES

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas, que culminam no extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Inicialmente ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação que favorece o aumento do fluxo sanguíneo, causando calor e vermelhidão no local da injúria. Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso caracterizadas principalmente pela contração das células endoteliais e abertura de junções entre células. Essas alterações levam ao aumento da permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (KOWAL-VERN *et al.*, 1997; RANKIN, 2004), o qual caracteriza o edema inflamatório (ROITT, 1999; TEDGUI & MALE, 2006). O extravasamento de proteínas para o tecido intersticial causa ainda o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à estase sanguínea e conseqüente alteração da orientação das células sanguíneas, isto é, estas células que antes se localizavam na região central do vaso, passam para a periferia deste, Esta alteração propicia o contato dos leucócitos com as células endoteliais, fenômeno este denominado de marginação leucocitária (COTRAN *et al.*, 1999).

1.1.2- EVENTOS CELULARES

Nos vasos periféricos, a interação dos leucócitos com as células endoteliais ocorre em diferentes fases, envolvendo moléculas de adesão de diferentes classes. Inicialmente os leucócitos rolam sobre o endotélio e em seguida aderem-se firmemente à superfície vascular. Posteriormente, migram em direção ao foco inflamatório. Esses eventos denominados respectivamente de *rolling*, adesão e migração de leucócitos envolvem a expressão de uma grande variedade de

moléculas de adesão, entre elas, as selectinas, as integrinas e seus ligantes (SPRINGER, 1995; RANKIN, 2004).

Resumidamente, as moléculas de adesão podem ser encontradas na forma solúvel como proteínas circulantes ou ligadas à superfície das células. Entretanto, a expressão dessas moléculas depende do tipo celular (BRASILEIRO-FILHO, 2000).

A migração leucocitária é um evento multimediado, pois as células que migram encontram nos tecidos diferentes sinais que potencialmente podem direcionar sua locomoção (KUMAR *et al.*, 2005), podendo acontecer por dois eventos distintos: quimiotaxia e haptotaxia. A quimiotaxia tem como definição a migração de leucócitos para o sítio inflamatório orientado por um gradiente solúvel de molécula indutora, diferenciando do evento de haptotaxia onde nesse as moléculas quimioatrativas encontram-se imobilizadas junto a matrix extracelular do sítio inflamatório (SNYDERMAN & GOETZL, 1981; WILKINSON, 1987; ROT, 1992a). Nessa situação os leucócitos alteram sua forma, tornando-se morfologicamente polarizados em direção ao gradiente, corrigindo continuamente sua direção de movimento (SNYDERMAN & GOETZL, 1981). Esse fenômeno envolve a interação dos agentes quimiotáticos com seus receptores específicos, presentes na membrana dos leucócitos. Essa ligação leva a ativação da fosfolipase C que hidrolisa o fosfatidilinositol-4-5bifosfato (PIP₂) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), com conseqüente ativação da proteína quinase C e aumento de cálcio intracelular, resultando na movimentação celular (COTRAN *et al.*, 1999). Assim, a migração destas células para o sítio inflamatório depende basicamente da produção de substâncias atraentes, direcionadores da migração celular, e de interações adesivas, mediadoras do reconhecimento célula-célula e célula-matriz extracelular (STOOLMAN, 1989; SPRINTER, 1990; VAN DEN BERG *et al.*, 1994). Considera-se que um bom indutor de migração de leucócitos deva atender aos requisitos de ligar-se a proteoglicanas do endotélio, disparar a adesão de leucócitos e estimular a migração de células por haptotaxia e/ou quimiotaxia (DE TOLEDO *et al.*, 2007).

O exsudato celular é caracterizado na fase inicial inflamatória pela presença predominante de neutrófilos e, posteriormente, pela predominância de células mononucleares (COTRAN *et al.*, 1999; MAJNO & JORIS, 2004). Uma vez no sítio inflamatório, essas células iniciam o processo de fagocitose do agente lesivo e dos

debris celulares (AUGER & ROSS, 1992). O sucesso desse evento determina a resolução da lesão.

O macrófago é a principal célula efetora do sistema mononuclear fagocitário. Estas células tem grande atividade secretória que inclui mais de cem substâncias biologicamente ativas, tais como proteínas plasmáticas e substâncias que modulam a função e crescimento de outras células (citocinas, collagenases, ativador do plasminogênio, prostaglandinas, componentes do sistema complemento entre outras) (NATHAN, 1987; RAPPOLLE & WERB, 1988). A secreção destas substâncias determina a multifuncionalidade dos macrófagos e a sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos: hematopoese, hemostasia, inflamação, resposta imune, cicatrização, controle do desenvolvimento tumoral, destruição de microorganismos e outros (TAPPER, 1996).

A inflamação fornece sinais fundamentais para a ativação de linfócitos T e conseqüentemente o desenvolvimento da resposta imune adaptativa. O sistema imunológico adaptativo é ativado se as primeiras linhas de defesa do organismo não conseguem conter os antígenos, a partir daí ocorre a formação de uma resposta produzida por linfócitos. Para isso, muitas células de vários tipos interagem entre si e com o agente invasor. Essas interações bidirecionais otimizam a resposta imune e garantem uma função protetora mais eficiente. As células dendríticas constituem a população de leucócitos capaz de integrar as resposta imune inata e adaptativa (REIS & SOUSA, 2004). São células apresentadoras de antígeno (APC) que exercem diferentes funções dependendo da sua localização, fenotipagem, estado de maturação e imunogenicidade. Em resposta a uma variedade de estímulos, as células dendríticas residentes em tecidos periféricos sofrem um complexo processo de maturação que envolve a regulação de milhares de genes que controlam as distintas funções como captura do antígeno, apresentação, migração, expressão de moléculas co-estimulatórias e produção de citocinas que polarizam a resposta imune adaptativa e ativação de clones específicos de linfócitos T (MACAGNO *et al.*, 2007). A apresentação antigênica pela APC ao receptor do linfócito T cria um estímulo e garante a sua ativação; quando o linfócito T é ativado, inicia-se o processo de proliferação e diferenciação em célula efetora Th1 ou Th2. Vários estudos sugerem que os níveis de moléculas co-estimulatórias expressas nas células dendríticas e as citocinas presentes no micro-ambiente durante a ativação da célula T são importantes para sua ativação (FEILI-HARIRI *et al.*, 2005).

1.1.3- MEDIADORES QUÍMICOS DA INFLAMAÇÃO

As manifestações uniformes que caracterizam a resposta inflamatória ocorrem principalmente devido à liberação de substâncias endógenas produzidas após o estímulo lesivo, denominados mediadores inflamatórios (SAADI *et al.*, 2002). Vários são os mediadores envolvidos nesse processo. Dentre eles, pode-se citar os metabólicos lipídicos derivados do ácido araquidônico, como as prostaglandinas, leucotrienos e as lipoxinas, gerados a partir de fosfolípidos de membrana. Além destes, outros mediadores tais como aminas vasoativas, citocinas, interleucinas, mediadores derivados do NO, serotonina, histamina, entre outros, atuam como importantes moduladores da resposta inflamatória (CABRAL *et al.*, 2005).

IL-1 α , IL-6 e TNF- α são importantes citocinas pró-inflamatórias que medeiam diversas respostas inflamatórias. São produzidas principalmente por macrófagos ativadas e em conjunto induzem aumento na expressão de moléculas de adesão, síntese de proteínas hepáticas, ativação de linfócitos T e B. A citocina TNF- α também induz a síntese de substâncias tóxicas, como o óxido nítrico, pelos leucócitos. O NO é formado a partir da L-arginina pela ação de N-sintase e desempenha um papel importante na função vasculares durante o processo inflamatório, assim como as prostaglandinas, por serem potentes vasodilatadores. Além disso, o leucotrieno B₄ e o óxido nítrico regulam o recrutamento de leucócitos através da expressão de moléculas de adesão importantes na interação leucócito-endotélio (FARSKY *et al.*, 2004).

Ainda, é sabido que diferentes populações de linfócitos T auxiliares podem ser divididos em diferentes sub-populações de acordo com o perfil de citocinas produzidas e atividades biológicas (COFFMAN, 2006; REINER, 2007, STEINMAN, 2007). Linfócitos do tipo Th1 produzem IL-2 e INF- γ e estão envolvidos com a eliminação de patógenos intracelulares e reações de hipersensibilidade tardia. Os linfócitos do tipo Th2 sintetizam IL-4, IL-5 e IL-10 e participam efetivamente do controle de microorganismos extracelulares e de processos alérgicos.. Uma outra sub-população de linfócitos T auxiliares produtoras de interleucina IL-17 (Th-17), juntamente com linfócitos Th1, podem participar do processo de inflamação tecidual e da exacerbação de patologia autoimunes (BETTELLI *et al.*, 2007; STEINMAN 2007). Entretanto, linfócitos Th2 podem antagonizar o efeito pro-inflamatório das células Th1 e Th17 (BETTELLI *et al.*, 2007 ; STEINMAN 2007).

1.1.4- NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são granulócitos polimorfonucleares que são produzidos e armazenados na medula óssea, e liberados para o sangue periférico, onde tem uma média de vida na circulação de apenas 6 - 7 horas. Essas células representam cerca de 50 a 70% do total de leucócitos no sangue periférico humano, são esféricas e possuem tamanho de 10 a 20 μ m de diâmetro, com núcleo segmentado constituído de cromatina purpúrea escura e densa e com 3 a 5 lóbulos interligados (RAVEL, 1997). Os grânulos intracelulares são classificados em primários (ou azunófilos), secundários (ou específicos), terciários (ou de gelatinase) e vesículas secretórias, cujos componentes estão relacionados à fagocitose e à morte intracelular de microrganismos (matrix rica em enzimas e peptídeos com atividade microbicidas) (ZAGO *et al.*, 2004). Estas células são fagócitos profissionais e participam da primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de microrganismos dentre eles bactérias e fungos (VAN EEDEN *et al.*, 1999). Ainda, os neutrófilos são capazes de liberar metabólitos do ácido aracdônico, como os eicosanóides e o PAF (MOILANEN *et al.*, 1993; 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 (DUBRAVEC *et al.*, 1990; NIIRO *et al.*, 1997; MALONEY *et al.*, 1998).

Os neutrófilos auxiliam na remoção de células mortas, de corpos celulares, e na remoção de tecidos (LÖFGREN *et al.*, 1999). A fagocitose é acompanhada de um conjunto de alterações metabólicas nas células fagocíticas, denominado "burst", ou explosão respiratória, metabólica ou oxidativa (VAN EEDEN *et al.*, 1999). Os neutrófilos quando estimulados, manifestam um aumento do consumo de oxigênio, que gera uma grande quantidade de reativos intermediários do oxigênio como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que microbicidas e, ao mesmo tempo, tóxicos ao tecido circundante, o que os torna importantes na defesa do hospedeiro e na reação inflamatória. Apesar de suas propriedades destrutivas, o superóxido e os radicais livres a ele relacionados, podem também estar envolvidos na mediação da diferenciação, ativação (YANG *et al.*, 2000), proliferação (SAUER *et al.*, 2001) e sinalização celular (DROGE, 2002; RETH, 2002), o que pode explicar a geração dessas substâncias também por fibroblastos, linfócitos B, células endoteliais (YANG *et al.*, 2000) e plaquetas (SENO *et al.*, 2001).

1.2- ACIDENTES BOTRÓPICOS

O ofidismo consiste em um importante problema de saúde pública no Brasil em virtude de sua grande freqüência e gravidade. Dos acidentes ofídicos notificados ao Ministério da Saúde durante os anos de 1990 a 1993, onde o gênero da serpente foi identificado, 90,5% foram causados pelo gênero *Bothrops*, 7,7% por *Crotalus*, 1,4% por *Lachesis* e 0,4% pelo gênero *Micrurus*. Os acidentes causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* não apresentam uma alta letalidade (0,31%), porém devido à alta incidência, são considerados de grande importância epidemiológica no país (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1999).

O quadro clínico observado no envenenamento botrópico pode ser didaticamente dividido em sistêmico e local (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1999). As manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por distúrbios na homeostasia, caracterizados por deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (HATI *et al.*, 1999). A sequência destes eventos culmina em sangramentos de ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância, como por exemplo a gengivorragia. Ainda em nível sistêmico é observado sudorese, hipotensão arterial e hipotermia (CARDOSO, 1997). As manifestações locais são caracterizadas por dor e edema persistentes no local da picada, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. Esquimose e hemorragias no ponto da picada são frequentes e bolhas podem aparecer na evolução do quadro clínico, acompanhado ou não de necrose (CARDOSO, 1997). Nos casos mais graves, dano tecidual pode resultar em sérias seqüelas, tais como a perda funcional ou permanente do tecido ou membro afetado. A magnitude dos efeitos locais em envenenamentos botrópicos depende basicamente da quantidade de veneno inoculada, do tempo entre a picada e o início da soroterapia e do eventual uso de torniquete (FRANÇA, 1997).

1.2.1- RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO ENVENENAMENTO

Os sinais da resposta inflamatória induzida pelo veneno botrópico são característicos de um quadro de inflamação aguda. Durante o processo agudo, assim como no processo crônico da resposta inflamatória, uma variedade de fatores solúveis está envolvida no recrutamento de leucócitos, através do aumento da

expressão de moléculas de adesão celular e de fatores quimiotáticos. Muitos destes fatores regulam a ativação das células residentes (tais como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos) e também das células inflamatórias recém recrutadas (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos), além de alguns destes mediadores induzirem uma resposta sistêmica do processo inflamatório (febre, hipotensão, síntese de proteínas da fase aguda, leucocitose e caquexia) (FEGHALI & WRIGHT, 1997). Estes mediadores encontram-se divididos em seis categorias distintas, segundo Collins, 1999:

- Derivados do ácido aracdônico;
- As três cascatas solúveis de proteases/substratos (cascata da coagulação, das cininas e do complemento);
- Óxido nítrico, como um potente agente vasodilatador;
- Citocinas, como um grupo de polipeptídeo de origem com ação reguladora;
- Aminas vasoativas, como histamina e serotonina;
- Neuropeptídeos, com ação similar às aminas vasoativas e os eicosanóides.

1.2.2- CITOCINAS ENVOLVIDAS NO ENVENENAMENTO

As citocinas pró-inflamatórias possuem um papel fundamental na regulação da inflamação. Assim, conhecer o perfil das citocinas liberadas durante o envenenamento botrópico pode nos levar a uma modulação desta resposta no sentido de minimizar os efeitos locais causados pelo envenenamento. Esta modulação da resposta inflamatória poderia então ser utilizada visando o tratamento do envenenamento, uma vez que o soro antiofídico não se mostra totalmente eficiente na neutralização destes efeitos.

Dados da literatura sobre a detecção de citocinas em soro de pacientes acidentados por *Bothrops* são bastante escassos, entretanto Barravieira e colaboradores (1995), analisando 8 pacientes acidentados, detectou a presença de IL-6 em 6 pacientes (com níveis variando de 7 a 116pg/mL de soro) e de IL-8 em um único paciente (2088 pg/mL). O soro foi avaliado também para a presença do TNF- α e IL-1 β , porém estas duas citocinas não foram encontradas. Ainda, Avila-Aguero e colaboradores (2001) através de estudos clínicos com pacientes acometidos com veneno de *B.asper* relataram níveis séricos aumentados de IL-6, IL-8 e TNF- α , mas não de IL-1 nas primeiras horas após o acidente. Níveis aumentados de INF- γ , IL-6 e

TNF- α , assim como LTB₄ e TXA₂ forma encontrados em exsudatos inflamatórios de camundongos induzidos pelo veneno bruto de *B.asper*, onde, no entanto, níveis de IL-1 não foram detectados. Considera-se que a produção de INF- γ está relacionada com a expressão de mediadores do óxido nítrico, com conseqüente produção de NO, por leucócitos que migraram a cavidade peritoneal após tratamento com veneno bruto de *B.asper* e o qual outras citocinas e mediadores eicosanóides estão associados com o recrutamento leucocitário (ZAMUNER *et al.*, 2001, 2005).

1.3- RECONHECIMENTO CELULAR

Reconhecimento é um evento central em uma ampla gama de fenômenos biológicos e corresponde à primeira etapa de numerosos processos dependentes de interações célula-célula ou células-moléculas solúveis. Esse fenômeno está presente em diversas situações como defesa imunitária, infecção bacteriana e migração celular.

A alta seletividade requerida para o reconhecimento é proporcionada por interações estereoquímicas específicas entre moléculas complementares, onde umas trazem informação biológica e outras decodificam tal informação. Essa complementariedade, que tem como modelo a interação do tipo chave-fechadura (GILBERT & GREENBERG, 1984), foi originalmente formulada por Emil Fischer, em 1897, referindo-se à complementariedade específica entre enzimas e substratos (isto é, moléculas em solução). O modelo chave-fechadura foi estendido por Paul Erlich (1900) e Frank Lille (1914) às interações de células com moléculas solúveis e com outras células, respectivamente. A natureza das moléculas envolvidas no reconhecimento celular começou a ser desvendada nos últimos 30 anos, acumulando-se evidências de que muitas delas correspondam a carboidratos e lectinas (NICOLSON, 1974; BROWN & HUNT, 1978; GOLDSTEIN & HAYES, 1978; SHARON & LIS, 1989).

As observações mais precoces sobre o papel de carboidratos no reconhecimento celular foram feitas na Austrália, através da demonstração de que a presença de resíduos de ácido siálico na superfície da membrana eritrocitária é um requerimento absoluto para a ligação do vírus da influenza, uma vez que o tratamento prévio das células com neuraminidase aboliu a reação de ligação (BURNET, 1951). A partir da década de 1970, ficou bem estabelecido que a maioria das células têm sua superfície recoberta de carboidratos, na forma de glicoproteínas,

glicolípídeos e polissacarídeos (COOK, 1986). Concomitantemente, tornou-se evidente o enorme potencial dos carboidratos para codificar informação biológica (SHARON & LIS, 1989). Realmente, uma grande diversidade de estruturas de carboidratos tem sido detectada em associação com glicoconjugados solúveis ou ligada a superfícies. Há fortes indicações de que essa diversidade seja biologicamente significativa, pois, em muitas situações, carboidratos modificam as atividades de proteínas às quais estão associados e também servem como marcadores de diferenciação celular, desenvolvimento e estados patológicos (HAKOMORI, 1984; FUKUDA, 1985; FEIZI, 1985; MURAMATSU, 1988; RADEMACHER *et al.*, 1988).

A idéia de que carboidratos de superfície pudessem desempenhar um papel importante no reconhecimento celular fez com que as lectinas, conhecidas há mais de 100 anos por sua propriedade de ligação específica com carboidratos, fossem consideradas candidatas à decodificadoras da informação biológica contida nos açúcares. Tal hipótese foi explorada a partir do final da década de 70 (ASHWELL & MORELL, 1974; HARRISON & CHESTERTON, 1980; BRANDLEY & SCHNAAR, 1986; SHARON & LIS, 1989; MALY *et al.*, 1996; TOURA *et al.*, 1999; DENNIS *et al.*, 1999) sob estímulo de um quadro de conhecimento acumulado bastante favorável. Demonstrara-se que lectinas não estão confinadas a plantas, mas são ubíquas na natureza e encontradas frequentemente em superfícies celulares, podendo mediar a incorporação celular e o tráfico intracelular de glicoproteínas. Além disso, observaram-se que a expressão de lectinas, coincidente com estados fisiológicos distintos ou com alterações patológicas das células ou dos tecidos. Observara-se também que a seletividade de ligação das lectinas a açúcares é muito mais refinada do que se assumiu originalmente e constatara-se que interações proteína-carboidrato satisfazem exigências esperadas de um sistema de reconhecimento celular, como velocidade e reversibilidade.

A hipótese de que lectinas correspondam a moléculas que desempenhem importante papel em fenômenos diversos de reconhecimento celular foi confirmada e ampliada nos últimos 30 anos, motivando intenso investimento de esforços nas pesquisas em lectinologia na participação da interação proteína-carboidrato.

1.4- LECTINAS

No final do século XIX, já se tinha conhecimento da ocorrência dessas proteínas na natureza, que possuem a habilidade de aglutinar eritrócitos. Tais proteínas foram referidas como hemaglutininas ou fitoaglutininas por serem originalmente encontradas em extratos de plantas. O trabalho pioneiro de Walter J. T. Morgan e Winifred M. Watkins do Instituto Lister em Londres (1950) mostrou a primeira evidência da presença de açúcares em superfície de células e seu potencial papel como marcador de identidade, concluindo que os açúcares α -N-acetil-D-galactosamina e α -L-fucose são determinantes no que diz respeito a especificidade do grupo sanguíneo A e H(O), respectivamente, um tema aceitável na glicobiologia moderna. Levando em conta os ligantes para açúcares de superfície, que são as lectinas endógenas e que reconhecem esses açúcares, foi identificado, o primeiro receptor hepático asialoglicoproteína descrita posteriormente (SHARON & LIS, 2004)

Provavelmente, o primeiro registro da literatura sobre a presença de atividade de lectina em animais foi feito por Flexner e Noguchi em 1902. Eles demonstraram que o veneno de serpente *Crotalus durissus* era capaz de promover a aglutinação de eritrócitos humanos (citado em KILPATRICK, 2002). A investigação científica sobre lectinas de mamíferos que reconhecem β -galactosídeos teve início em meados da década de 70 com a descrição da “eletrolectin” uma lectina de peixe elétrico específica para lactose (TEICHBERG *et al.*, 1975).

Há uma grande diversidade estrutural de glicoconjugados nos seres vivos, a qual pode estar associada a uma grande diversidade biológica, pois estas glicoestruturas podem codificar várias informações biológicas as quais podem ser decodificadas por lectinas (SHARON & LIS 1989; LIS & SHARON 1998; vide Figura 1).

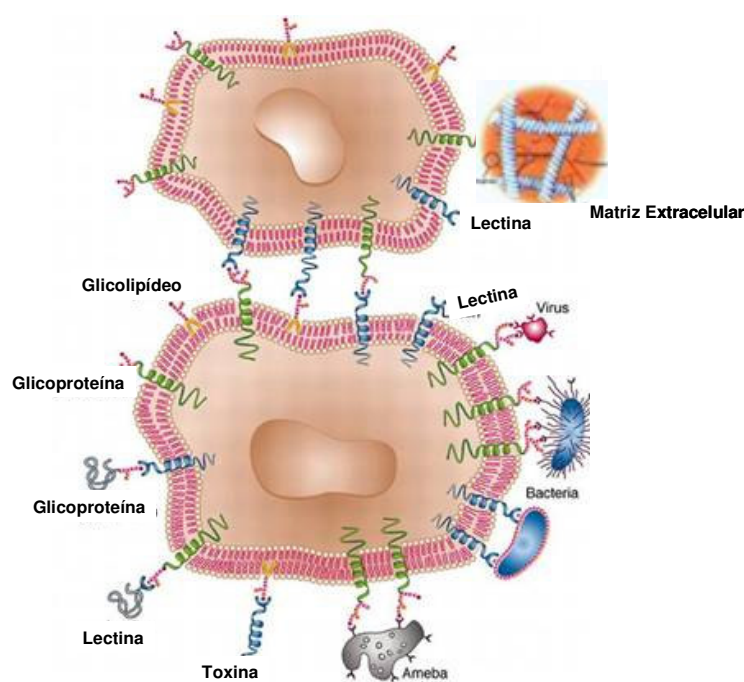


Figura 1. Interações lectinas-carboidratos. Lectinas mediam interações célula-célula e/ou célula-matriz extracelular através do reconhecimento específico de glicoconjugados. A interação lectina-carboidrato pode promover a ligação de moléculas bioativas em componentes celulares. As lectinas podem participar de vários eventos biológicos como: infecção microbiana; defesa de plantas; síntese de glicoproteínas; imunidade inata e resposta inflamatória; ativação, proliferação e crescimento celulares; apoptose; embriogênese e fertilização. Baseado no diagrama original de BioCarbAB (Lund, Sweden-SHARON & LIS, 2004).

Portanto, o reconhecimento de carboidratos por lectinas é um fenômeno bioquímico associado a vários processos fisiopatológicos como fertilização, embriogênese, migração, proliferação e diferenciação celulares, defesa imunológica, infecção por microorganismos e câncer (SHARON & LIS, 1986; LIS & SHARON 1989; LIS & SHARON 1998; SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LIU & RABINOVICH, 2005).

As superfícies das células de vertebrados são compostas de glicocálix, uma camada de glicoconjugados composta por glicoproteínas, glicolípidos e

glicoaminoglicanos (VARKI *et al.*, 1999). Devido a esta complexidade e variabilidade estrutural, essas glicanas podem codificar informações que são decodificadas através de seu reconhecimento por lectinas. Geralmente, as lectinas são moléculas multivalentes podendo estabelecer pontes entre células e matriz extracelular, através do reconhecimento concomitante de glicanas contidas em ambas as estruturas (LIS & SHARON, 1993).

A capacidade das lectinas de se ligar aos açúcares é atribuível a uma porção limitada da molécula, correspondendo tipicamente a um domínio globular de reconhecimento de carboidrato (CRD) (ABREU *et al.*, 2006). Os CRDs de muitas lectinas relacionam-se entre si, quanto a seqüência de aminoácidos, o que faz com que muitas lectinas conhecidas possam ser agrupadas em famílias (WEIS & DRICKAMER, 1996). Uma das famílias de lectinas animais mais estudada é a tipo-S, sendo que, inicialmente, os membros dessa família foram caracterizados como lectinas que reconhecem β -galactosídeos de modo dependente do estado de oxidação de grupos sulfidrílicos presentes em cisteínas livres e independente de íons cálcio. (COOPER & BARONDES, 1999). Na atualidade, as lectinas tipo-S são designadas galectinas e a propriedade lectínica dessas proteínas não é, necessariamente, dependente de grupos sulfidrílicos (KILPATRICK, 2002). O grande número de lectinas identificadas e a grande variabilidade em sua estrutura, propriedades e distribuição refletem uma ampla gama de adaptações das lectinas aos mais diferentes fenômenos biológicos. Alguns tipos de lectinas interagem preferencialmente com células tumorais, o que indica que essas células diferem das células normais correspondentes quanto ao padrão de glicosilação da superfície celular. Foi mostrado também que as células tumorais carregam, em sua superfície, lectinas que não são encontradas em células normais e que estão envolvidas na formação de metástases. As lectinas estão relacionadas à interação de vários tipos celulares em diferentes processos fisiológicos que envolvem adesão célula-célula, como, por exemplo, na interação do espermatozóide com o óvulo, na germinação do grão de pólen (CARVALHO *et al.*, 2001). A especificidade de lectinas por certos carboidratos tem permitido seu uso na investigação para detectar células com carboidratos superficiais, glicoproteínas, imunoglobulinas e para identificar células cancerígenas (SINGH *et al.*, 1999).

Vários dados da literatura demonstram a participação das lectinas em vários eventos biológicos incluindo o processo inflamatório, o qual está envolvido tanto na resposta imunológica como em doenças degenerativas e auto-imunes (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2001, RABINOVICH *et al.*, 2002, CARVALHO *et al.*, 2002). Lectinas de diversas fontes da natureza (animais e vegetais) foram estudadas para seu aspecto funcional na inflamação, na qual essas proteínas podem exercer atividades pró-inflamatórias (BENTO *et al.*, 1993; ALENCAR *et al.*, 2003, 2005; RUBSTEIN *et al.*, 2004; TOLEDO *et al.*, 2008) ou anti-inflamatórias (RABINOVICH *et al.*, 1999; MOTA *et al.*, 2006; NAPIMOGA *et al.*, 2007), dependendo da dose ou via de administração. Esses efeitos foram avaliados quanto a ativação ou inibição de migração neutrofílica via interação entre o CRD dessas lectinas e os resíduos de carboidrato presentes na membrana de células inflamatórias ou por mecanismo indireto dependente de ativação de macrófagos por lectinas.

Diversas lectinas de veneno de serpente são descritas e a maioria pertence ao grupo tipo-C (Ca^{2+} - dependente) de proteínas ligantes de sacarídeos. Basicamente, existem dois tipos de lectinas no veneno de serpente. A primeira é formada por heterodímeros $\alpha\beta$ ligados por ponte dissulfeto com dois polipeptídeos homólogos com aproximadamente 14kDa e atividade de aglutinação eritrócitos, ligação a carboidratos e muitos efeitos patológicos diferentes, presentes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* (CASTRO *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2003). O segundo tipo (Lectina-símile) tem alto peso molecular (50.000-100.000). Elas correspondem a multímeros $\alpha\beta$ ligados por ponte dissulfeto, que são associados a dois ou quatro heterodímeros, como os encontrados na Convulxina, que apresenta outro importante efeito biológico, a agregação plaquetária, mas não induz alta aglutinação de eritrócitos (TOYAMA *et al.*, 2001). A primeira lectina isolada de serpente foi obtida do veneno de *Bothrops atrox* e parcialmente caracterizada (GARTNER *et al.*, 1980; GARTNER & OGILVIE, 1984). Esta lectina foi denominada Trombolectina e suas características bioquímicas e biológicas são: I) lectina β -galactosídea; II) proteína homodimérica ligada por ponte dissulfeto com monômeros de peso molecular em torno de 15kDa; III) proteína não glicosilada; IV) ponto isoelétrico heterogêneo (pI 6,4 ou entre 9,5-9,7); V) lectina ligante de cálcio; VI) atividade de hemaglutinação dependente da presença de cálcio e inibida por agentes redutores, EDTA, açúcares e aquecimento. Entretanto, a seqüência N-terminal de aminoácidos e a seqüência de peptídeos internos da Trombolectina não foi descrita até o momento. Desde a sua

descrição inicial, as lectinas de veneno de serpente foram isoladas de diversos gêneros, incluindo *Agkistrodon* (GARTNER & OGILVIE, 1984, KOMORI *et al.*, 1999) *Bitis* (NIKAI *et al.*, 1995), *Bothrops* (GARTNER *et al.*, 1980, LOMONTE *et al.*, 1990, CARVALHO *et al.*, 2002, GUIMARÃES-GOMES *et al.*, 2004, OZEKI *et al.*, 1994, HAVT *et al.*, 2005, PANUNTO *et al.*, 2006), *Bungarus* (ZHA *et al.*, 2001), *Crotalus* (GARTNER & OGILVIE, 1984), *Dendroaspis* (OLGILVIE *et al.*, 1986), *Lachesis* (GOMES-LEIVA & ARAGÓNS-ORTIZ, 1986, OLGILVIE *et al.*, 1986) e *Trimeresurus* (NIKAI *et al.*, 2000).

Muitos efeitos biológicos de lectinas de veneno de serpente foram relatados, tais como aglutinação de eritrócitos *in vitro*, atividade mitogênica sobre linfócitos, agregação plaquetária e indução de edema, liberação de cálcio do estoque interno de células, inibição da proliferação de células, indução de inflamação e citotoxicidade (LOMONTE *et al.*, 1990, MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000; HAVT *et al.*, 2005; PANUNTO *et al.*, 2006).

Recentemente, foi realizado o isolamento e a caracterização parcial da estrutura e dos aspectos funcionais de uma nova lectina da peçonha da serpente *Bothrops atrox*, denominada Galatrox (MENDONÇA-FRAQUEIRO, 2007). De modo interessante, essa proteína apresenta alta similaridade quando comparada sua seqüência de aminoácidos da região N-terminal, e de regiões internas, com a de outras lectinas do gênero *Bothrops*. Entretanto, a Galatrox apresenta diferenças funcionais em relação com a lectina desse gênero com a incapacidade de promover a agregação plaquetária.

Contudo, poucos estudos têm sido relatados sobre os aspectos funcionais e/ou estruturais de lectinas derivadas de peçonhas do gênero botrópico. Considerando que essa proteína é um componente de uma coleção de moléculas biologicamente ativas e evolutivamente selecionadas de uma espécie de serpente ainda pouco explorada, este projeto tem como objetivo a investigação do impacto da Galatrox no processo inflamatório de mamíferos. Finalmente, este trabalho poderá gerar informações relevantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e ferramentas de investigação científica relacionadas ao reconhecimento de carboidratos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho propõe investigar papel da Galatrox, uma lectina ligante de galactose isolada do veneno de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório agudo.

Para tanto, as seguintes atividades foram realizadas:

√ Purificação de uma lectina ligante de lactose presente na peçonha de *Bothrops atrox*;

√ Estudo de ligação da Galatrox a componentes da matriz extracelular e a neutrófilos humanos;

√ Avaliação da atividade indutora de migração leucocitária por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*;

√ Avaliação da capacidade quimiotática para neutrófilos humanos;

√ Análise da capacidade de liberação de mediadores inflamatórios a partir de lavados peritoneais (*in vivo*) e em sobrenadante de cultura de esplenócitos tratados com Galatrox;

√ Determinação de envolvimento do domínio de reconhecimento de carboidratos da Galatrox nessas atividades biológicas por meio de ensaios de inibição com açúcares específicos.

√ Imunização, obtenção e purificação de imunoglobulinas policlonais anti-Galatrox, com monitorização dos procedimentos por ELISA e *western-blot*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Peçonha

Peçonha bruta liofilizada de *Bothrops atrox* adquirido do SANMARU LTDA (Registro junto ao IBAMA nº 182238).

3.2- Animais

Camundongos machos da linhagem Balb/C com peso de 18-22g foram fornecidos pelo Biotério de animais isogênicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições livres de germes patogênicos específicos (*Specific Pathogenic Free*) no biotério de animais de experimentação da FCFRP-USP. O presente projeto possui o consentimento e aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - protocolo nº07.1.1495.53.2).

3.3- Amostras de sangue humano para obtenção de suspensões de neutrófilos e ensaios de atividade de hemaglutinante

Amostras de sangue doadas pelo Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto, foram coletadas de pacientes saudáveis de ambos os sexos e com idades variando entre 19 e 40 anos. Os processos para obtenção de hemácias lavadas e purificação de neutrófilos são descritos nos itens 3.7 e 3.9, respectivamente (protocolo CEP/FCFRP nº118 e Protocolo Ministério da Saúde CAAE nº 0002.0.212.000-08).

3.4- Purificação de lectina ligante de lactose derivada da peçonha de *B. atrox* (Galatrox)

3.4.1. Preparação da amostra de peçonha bruta de *B. atrox*

A peçonha bruta de *B. atrox* (250mg) foi suspenso em 3mL de tampão fosfato (PBS - 0,01M, 0,85% NaCl, pH 7,4). A suspensão foi centrifugada em Centrífuga Excelsa Baby I (mod. 206 Fanem) a 600g por 10 min a 25°C para remover materiais insolúveis. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo método de Microbiureto (ITZHAKI & GILL, 1964), conforme item 3.6, e os resultados foram obtidos pela leitura de absorbância em 310nm e expressos em mg de proteína por mL.

3.4.2. Cromatografia de afinidade em agarose-lactose

O procedimento de purificação da Galatrox foi realizado como descrito por MENDONÇA-FRANQUEIRO (2007). Resumidamente, a solução de peçonha bruta (62 mg proteína/mL) foi aplicada (3mL) em coluna (10cm x 1cm) com 5mL de resina agarose-lactose (Sigma, St. Louis, USA), previamente equilibrada com tampão PBS. O procedimento cromatográfico foi monitorado pela leitura de absorbância em 280 nm (Espectrofotômetro Beckman DU-640) e por SDS-PAGE. O material não retido na coluna (Lac-nR) foi eluído com o tampão de equilíbrio e coletado em frações de 2,0 mL, até a obtenção de valores de densidade ótica superiores a 0,01. O material retido (LacR) à coluna foi eluído com PBS contendo lactose (50mM) e coletado em frações de 500µL cada. As frações cromatográficas que apresentaram valores de absorbância (280 nm) acima de 0,01, foram reunidas em um único grupo (LacR) e concentradas em sistema Amicon (Millipore, USA) com membrana de exclusão de 3kDa até um volume máximo de 3mL.

3.4.3. Filtração em gel de Sephadex G-25

A coluna Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK-PD-10: 10 x 1cm) foi equilibrada com um volume cinco vezes superior ao seu volume com PBS e usada para remover a lactose das amostras de Galatrox. O grupo LacR, depois de concentrado, foi aplicado a essa coluna e eluído com o mesmo tampão (PBS). Foram coletadas amostras de 500µL. O procedimento cromatográfico foi monitorado pela leitura de absorbância em 280nm (Espectrofotômetro Beckman DU-640) e por SDS-PAGE (metodologia 3.5). Preparações de Galatrox purificada foram armazenadas em câmara fria a 4°C por até 2 semanas para realização dos ensaios. A concentração protéica foi determinada pelo método do Microbiureto (metodologia 3.6)

3.4.4. Avaliação do grau de homogeneidade da fração Lac-R

A pureza da lectina isolada do veneno de *B.atrox*, foi avaliada por meio de CLAE em coluna de fase reversa ODP 50 (4,6 x 150mm) (Shodex). A coluna foi equilibrada com a fase móvel A (TFA 0,1%) e seguiu-se um gradiente de 0-80% da fase móvel B (acetoneitrila 70%) em 70 minutos com um fluxo de 0,6mL/min. A amostra de Galatrox (0,23mg/mL) foi solubilizada em tampão TFA 0,1%, sendo aplicado 500µL. A monitorização foi feita pelo detector SPD-10AV em 280nm.

3.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Todas as etapas cromatográficas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente desnaturante SDS e na presença ou ausência de agente redutor β -mercaptoetanol, segundo a técnica descrita por LAEMMLI (1970). Para a preparação do gel foi utilizado acrilamida/bis-acrilamida na proporção de 30:0,8% e preparado um gel de empilhamento a 5% pH 6,8, contendo 0,125M de Tris-HCl (pH 6,8) e 0,1% de SDS e um gel de separação a 13,5% pH 8,8 e 0,1% de SDS. As amostras foram dissolvidas no tampão de amostra contendo SDS (0,2g), azul de bromofenol (0,0001g), Tris- HCl (1,25 pH 6,8 05,M), glicerol (1,0 mL) e água, q.s.p 10mL, sendo que a redução foi realizada com o acréscimo de β -mercaptoetanol. As amostras foram levadas ao banho-maria (100°C) por 5 minutos.

O tempo de corrida foi de 4 horas ou até que as amostras atingissem 1,5cm do final do gel em 10mA e 100V (Electroforesis Power Supply EPS 601 – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). A coloração dos géis foi feita com *Coomassie Brilliant Blue G 250* 0,2% em H₂O/MeOH 1:1 (v/v) por 30min e descorados com trocas sucessivas de ácido acético glacial a 7% (v/v).

3.6- Determinação da concentração protéica de amostras: ensaio de microbiureto

A quantificação protéica das amostras foi realizada por método do biureto. A reta padrão obtida com soroalbumina bovina ($E^{1,0 \text{ mg/mL}}$ no comprimento de onda de 280nm tem valor igual 6,66) e a dosagem das amostras foram realizadas exatamente como descrito por ITZHAKI & GILL, 1964.

3.7- Atividade hemaglutinante

O procedimento de purificação da lectina Galatrox foi monitorizado pela avaliação da atividade de hemaglutinação (CARVALHO *et al.*, 2002). Brevemente, separa-se o material celular sanguíneo do soro por centrifugação (centrífuga Excelsa Baby modelo I, Fanem) à 2000 rpm por 10 minutos. Após a retirada do sobrenadante, o acumulado celular (*pelet*) foi então ressuspenso em PBS e repetido o procedimento de centrifugação por mais duas vezes. Após a última etapa da lavagem, o *pelet* foi submetido à etapa de tripsinização por meio da incubação dessas células com uma solução de tripsina (0,025%), por

1h a 37°C. Em seguida, as hemácias foram lavadas com PBS (centrifugação por 10 minutos à 2000rpm) por três vezes. A partir dessa etapa, 50µL dessa solução foram solubilizados em 950µL de PBS, obtendo-se a solução final de hemácia a ser tratada com a lectina. O ensaio foi realizado pela incubação (à 37°C por 30 minutos) de 50µL da solução final de hemácias com 50µL de Galatrox (40µg/mL), em placas de fundo em V, e também na presença de EDTA 5mM, sacarose 20mM, Glicose 20mM e lactose 20mM para a confirmação do caráter lectínico da Galatrox segundo MENDONÇA-FRANQUEIRO 2007. O tratamento da solução final de hemácia com PBS foi realizado como controle negativo. A avaliação qualitativa da hemaglutinação foi realizada pela observação da formação de aglutinados de hemácia.

3.8- Produção de imunoglobulinas de camundongos anti-Galatrox

3.8.1- Imunização de animais e obtenção de anticorpos policlonais anti-Galatrox

50 µg da proteína (Galatrox) isolada, diluídos em 150 µL de PBS estéril, foram emulsificados com 150 µL de adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA) e injetados por via intraperitoneal em camundongos Balb/C, machos, pesando de 18-22 gramas. Após quinze dias, foi feita uma segunda imunização com 50 µg da proteína (Galatrox) emulsificada com adjuvante incompleto de Freund, via intraperitoneal nos mesmos animais. Posteriormente, foram realizadas outras duas imunizações intraperitoneais a cada 15 dias.

Em cada etapa foi colhido sangue total (por punção orbital e anteriormente a cada imunização) para obtenção dos soros pré-ímmunes e soros ímmunes, a fim de testar a eficiência da imunização por ELISA.

Passados 7 dias após a última imunização, os camundongos foram anestesiados (via intraperitoneal com 2,2,2-Tribromoetanol 2,5% (p/v) - ARCOS, New Jersey, USA, em dose de 1mL/100g de peso corpóreo) para coleta total de sangue por punção cardíaca. O soro foi separado do coágulo por centrifugação a 1500g, por 10 minutos, aliqotado e armazenado a -20°C para posterior purificação.

3.8.2. Purificação das imunoglobulinas anti-Galatrox dos soros dos camundongos imunizados com essa lectina

As preparações purificadas de anticorpos anti-Galatrox foram obtidas por cromatografia de afinidade ao antígeno (Galatrox) com o uso de resina Affigel 15 (Bio-Rad). Esta resina é composta por ésteres de N-hidroxisuccinimida e é recomendada para o acoplamento de proteínas ácidas ($pI < 6.4$), como a Galatrox. 1mg de Galatrox foi incubado por 1h a temperatura 10°C sob agitação, em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 7,4, com 1mL de resina AffiGel 15 (Bio-Rad) em coluna cromatográfica clássica. Em seguida, a resina com a lectina imobilizada foi lavada e equilibrada com tampão PBS estéril.

Para a purificação de anticorpos anti-Galatrox, amostras de soros-ímenes (1 mL), diluídas com PBS estéril (1:2), foram aplicadas na coluna. Após lavagens com PBS, para remoção de material não-ligante a Galatrox imobilizada, o material ligante à esta lectina foi eluído com tampão glicina 0,2 M pH 2,8. As frações do material ligante, que contnha os anticorpos anti-Galatrox, tiveram o pH imediatamente neutralizado para pH 7,4 por adição de solução de fosfato dibásico de potássio 0,1M pH 9,5. O procedimento cromatográfico foi monitorado por espectofotometria por absorvância a 280 nm. e as frações foram analisadas por ELISA.

3.8.3. Detecção de anticorpos anti-Galatrox por ELISA

Placas de microtitulação de polipropileno, com 96 poços, foram sensibilizadas com Galatrox, 1 µg em 50 µL de PBS por poço, *overnight*, a 4°C. Sequencialmente, lavam-se os poços com PBS, 3 vezes por 10 minutos cada, e bloqueia-se a placa com PBS gelatina 3% (Amresco, Ohio, USA) por 2h em repouso a 37°C. Foram, então, repetidas as etapas de lavagem com PBS Tween 20 0,05% (Acros Organic, Bélgica). Os anticorpos purificados ou soros ímenes anti-galatrox (anticorpos primários) diluídos em PBS Tween 20 0,05% gelatina 1%, foram distribuídos nos poços (50 µL) e a placa de ELISA foi incubada por 1 hora a 37°C. Os soros pré-ímenes ou poços sem anticorpos primários foram utilizados como controles negativos. Após etapas de lavagens, foi adicionado aos poços 50 µL do anticorpo secundário, anticorpo de coelho anti Ig-G de camundongo conjugado com peroxidase diluído na proporção de 1:9000 (v/v) em PBS Tween 20 0,05% gelatina 1% e foi feita incubação por 1 hora. Após lavagens, as imunoreações foram reveladas com o uso de solução reveladora para peroxidase contendo o TMB (tetrametilbenzidina, Organon Teknika, Boxtel, NL). Após 10 minutos de incubação com a solução reveladora, esta reação foi finalizada pela adição de 50 µL por poço

de solução de ácido sulfúrico 2 N. Foram feitas, então, leituras de absorvância em 450 nm em espectrofotômetro (Spectramax Plus – Molecular Devices).

3.8.4- Western Blot

As preparações de Galatrox foram submetidas a reação de *Western Blot* para ensaios de imunodeteção dessa lectina com anticorpos anti-Galatrox. A lectina foi submetida à SDS-PAGE, em condições redutoras e não-redutoras. Foram usados géis de poliacrilamida (13%) e tampão convencional de corrida, contendo Tris-Glicina e 0,1% SDS. Em seguida as proteínas foram eletrotransferidas do gel para membrana de nitrocelulose (0,22µm; Hybond – Amersham Biosciences, Alemanha) por 1h a 100V (350mA) em tampão Tris-Glicina contendo 10% metanol. A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração das membranas com o corante Ponceau S para proteínas. A etapa de bloqueio foi realizada pela incubação das membranas com solução de PBS contendo 5% de leite bovino desnatado, por 1-2 horas sob branda agitação.

Seqüencialmente, a membrana foi incubada com anticorpos primários de camundongos (anti-Galatrox) diluído em PBS (1µg/mL), contendo BSA 1%, por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi submetida à três lavagens com PBS/Tween-20 0,05% por 10 minutos cada, sobre agitação. Após as etapas de lavagens, incubou-se a membrana com 40ng/mL de IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (HRPO: Horseradish Peroxidase Conjugated – Jackson ImmunoResearch- USA) por uma hora. Três etapas de lavagens foram repetidas. A imunorreatividade para os antígenos e seus respectivos anticorpos específicos foi detectada usando o kit ECL Western Blot (Amersham Biosciences, Alemanha) e filme fotográfico (Hyperfilm™ ECL™ – Amersham Biosciences, Alemanha).

3.9- Indução de migração de neutrófilos humanos *in vitro*

A quimiotaxia de neutrófilos humanos foi avaliada conforme metodologia descrita por BIGNOLD *et al.* (1988). Tal procedimento foi realizado em microcâmara de Boyden modificada (microcâmara de 48 poços - Neuroprobe, Cabin John, MD, USA). Foram utilizadas suspensões de neutrófilos humanos isolados a partir do sangue periférico de voluntários sadios. Brevemente, 5,0 mL de sangue

heparinizado foram distribuídos cuidadosamente em tubo plástico de 15 ml, contendo 4,5 mL do meio de separação “Monopoly Resolving Medium” (Flow laboratories, Rockville, MD). Em seguida, o tubo foi submetido à centrifugação (350g, 40 minutos, 25°C) e a faixa do gradiente do meio de separação onde se localizam os neutrófilos foi gentilmente coletada e submetida a lavagens (duas vezes) em solução Hanks (200g, por 10 minutos a 25°C). Finalmente, a suspensão de neutrófilos purificados foi ressuspensa em Hanks na concentração final de 1×10^6 /mL.

A amostra de Galatrox foi então diluída em solução de Hanks em diferentes concentrações (2, 4, 8, 16, 32µg/mL) com, ou sem, a presença de açúcar inibidor (lactose 20mM) ou inespecífico (sacarose 20 mM) e distribuída na câmara inferior (28 µL/poço). Em seguida, neutrófilos purificados foram distribuídos na câmara superior (50µL/poço). A migração randômica (controle negativo) foi medida usando solução de Hanks na câmara inferior. Os neutrófilos contados foram aqueles que migraram através de poros de um filtro de policarbonato de 5 µm (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) durante o período de 1 hora de incubação a 37°C em ar atmosférico umedecido e acrescido de CO₂ (5%). Cinco campos são contados por ensaio e cada amostra foi realizada em triplicata. Os dados são reportados como número médio de neutrófilos por campo.

3.10- Ligação à superfície de neutrófilos humanos por citometria de fluxo

Inicialmente, a conjugação da Galatrox ao reagente FITC foi realizada através da incubação de 10µL da solução do reagente (partindo de uma solução 1mg FITC/mL de tampão carbonato/bicarbonato 0,1M, pH 9,0) com 0,5mg Galatrox dissolvida em 1mL do mesmo tampão. Após 1 hora de incubação no escuro, a amostra de Galatrox + FITC foi submetida à uma cromatografia em coluna Sephadex G-25 com objetivo de eliminar o excesso de FITC que não se ligou à lectina.

Neutrófilos humanos purificados, como descrito no item 3.9, foram incubados com diferentes concentrações de Galatrox (2, 4, 8, 16, 32µg/mL) conjugada a FITC (Gal-FITC), por 30 minutos em gelo (4°C) e lavadas (por duas vezes) com solução estéril de PBS. Tratamentos de Gal-FITC previamente incubadas com lactose (20mM) ou sacarose (20mM), por 30 minutos a 4°C, foram realizados com objetivo de avaliação do papel do domínio de reconhecimento de carboidrato na interação desse lectina com neutrófilos humanos. Posteriormente, as células foram analisadas

por citometria de fluxo utilizando um FACSCalibur equipado com laser de argônio a 488nm (BD Biosciences). Foram feitas as leituras para 10000 eventos.

3.11- Medida do “burst” oxidativo por quimioluminescência dependente de luminol de neutrófilos humanos primados e não primados.

Determinação do “burst” foi avaliado com base na metodologia descrita por CHEUNG *et al.*, (1983). Os neutrófilos humanos (1×10^6 células/mL) foram suspensos em tampão Hanks e primados, ou não, por 10 minutos à 37°C com fMLP (10^{-6} M). Ambos grupos de neutrófilos (primados e não primados) foram tratados com diferentes concentrações de Galatrox (1,25, 5, 20, 80µg/mL) logo anteriormente à leitura. Além disso, os neutrófilos foram tratados com Galatrox (20µg/mL) na presença de lactose (20mM) para avaliação da participação do caráter lectínico dessa proteína no processo de *burst*. O metabolismo oxidativo dos neutrófilos tratados com Galatrox foi avaliado pela produção de quimioluminescência (QL) com o uso da sonda luminol (10^{-4} mol/L - 5-amino-2-3-dihidro-1,4-ftalazinediona – Sigma) e auxílio de um luminômetro (Auto Lumat LB 953 - EG&G Berthold (Bad Wildbad, Germany). O registro foi feito em c.p.m. (contagens de fótons por minuto) em duplicata. Como controle destes ensaios, foi medida a produção espontânea de quimioluminescência de neutrófilos primados ou não e na ausência de estímulos (controle negativo). O PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate* – 0,1µg/mL - Sigma) conhecido com um potente ativador da NADPHoxidase foi utilizado com controle positivo de indução do “burst”. Os resultados foram expressos como o valor da área integrada sob a curva do perfil de QL registrado no período de leitura de 20 minutos.

3.12- Ensaio de indução de migração de leucócitos *in vivo*. Cavidade peritoneal de camundongos

Camundongos Balb/C adultos, machos e pesando 20-23g, foram mantidos em repouso por no mínimo 2 dias antes de serem utilizados em experimentos. Foram testadas diferentes concentrações de Galatrox (6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/animal) por diferentes tempos (4, 12, 24, 72 horas). Carragenina foi utilizada como controle positivo (500 µg/animal) e PBS livre de LPS como controle negativo. Cada amostra foi testada em grupos de cinco animais, previamente preparadas por filtração em membranas de 0,22 µm (Millipore, Corporation, Bedford, MA, USA). Os animais

foram injetados com as amostras-teste e, após o tempo correspondente, anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical. Lavagem da cavidade peritoneal com três mililitros de PBS contendo EDTA (1mM) foi realizada e o material analisado por contagem global em câmara de Neubauer e diferencial de células através de esfregaços (preparados por centrifugação de 50 μ L do lavado em citospin) corados com pancrômico de Rosenfeld, além de posterior dosagem de citocinas do sobrenadante (lavado centrifugado a 1500rpm à 4°C por 10 minutos) armazenado a -80°C.

3.13- Avaliação da produção de mediadores inflamatórios no sobrenadante de células de baço de camundongo tratadas com Galatrox

3.13.1- Obtenção de sobrenadantes de células do baço estimuladas com Galatrox

Camundongos machos adultos Balb/c foram sacrificados em câmara de CO₂, os baços removidos cirurgicamente e os esplenócitos coletados em placas de petri estéreis. Em seguida, as células do baço foram submetidas a lavagens (centrifugação a 180g, por 10 min a 10°C) e finalmente ressuspendidas (concentração final 10⁷/mL) em RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco). As células foram distribuídas em placas de 12 poços na concentração de 5x10⁶/mL e estimuladas com Galatrox (3, 10, 30 e 100 μ g/mL, previamente tratada em coluna de polimixina para retirada de LPS da amostra) por 48 horas. LPS (1 μ g/mL) e meio RPMI + FBS 10% foram os controles positivos e negativo, respectivamente. As placas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o material dos poços foram submetidos a centrifugação (180g, por 10 minutos à 10°C), no qual os sobrenadantes foram colhidos e mantidos a -80°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios.

3.13.2- Detecção de citocinas pelo Ensaio Imuno-Enzimático (ELISA)

Empregando o método de ELISA, foi feita a quantificação das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-10, INF- γ e TNF- α (BD OptEIA™, BD Biosciences Pharmingen, San Diego). Os anticorpos de captura foram diluídos em tampão de ligação carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5 e adicionados 100 μ L/poço, na concentração indicada pelo fabricante. Após incubação das placas durante uma noite a 4°C, as mesmas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS + Tween-20 0,05%). Após as sucessivas lavagens, foram adicionados 200 μ L/poço de tampão de bloqueio (PBS + FBS 10%) seguido de incubação à temperatura ambiente por no mínimo duas horas. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados 3 vezes com tampão de lavagem, e então adicionados 100 μ L/poço das amostras do sobrenadante de cultura de células de baço ou lavado peritoneal. Depois de repetido o processo de lavagem das placas, foram adicionados 100 μ L/poço dos anticorpos de detecção biotinilados, diluídos em tampão de bloqueio por 2 horas, nas concentrações indicadas pelo fabricante. Após a incubação foi repetido novo ciclo de lavagem, e feita a amplificação das reações pela adição de 100 μ L/poço de solução revelante v/v (TMB/peróxido de hidrogênio, BD OptEIA) seguido de incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. As reações foram bloqueadas adicionando 50 μ L/poço de solução de parada (BD OptEIA). A densidade ótica (D.O.) será avaliada em leitor de microplacas com filtro de 450nm (Metertech Inc., modelo 960) e a concentração de cada citocina calculada a partir de sua respectiva curva-padrão.

3.14- Dosagem de NO dos sobrenadantes do lavado peritoneal e cultura de esplenócitos

O óxido nítrico (NO) decompõe-se espontaneamente em nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻) fora do ambiente fisiológico. Este é um método indireto de dosagem de NO, pois o que se detecta é a produção de NO₂⁻ pelos macrófagos. É um método colorimétrico é baseado na reação de Greiss (GREEN *et al.*, 1981). Brevemente, 100 μ L das amostras de cada lavado foram pipetadas em cada poço. Em seguida, foram adicionados a cada poço mais 100 μ L da solução de Greiss (v/v iguais das soluções de NEED 0,1% e sulfanilamida 1% em 5% de ácido fosfórico). Após 5 minutos, a leitura da placa foi realizada com filtro calibrado para leitura a 540nm. Uma curva padrão feita a partir da diluição seriada partindo de uma solução de

200 μ M NaNO₂, a partir de onde a concentração de liberação de NO nas amostras teste.

3.15- Ensaio de ligação à componentes de matriz extracelular

Os poços de microplaca de poliestireno (MaxiSorp FluroNunc, Roskilde, Denmark) utilizados nos experimentos foram recobertos com 5 μ g/poço de laminina, fibronectina (Sigma) ou BSA (controle negativo) em tampão PBS no volume final de 50 μ L e incubados à 4°C por 16 horas. Após incubação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS, 200 μ L, contendo Tween-20 0,05%(v/v) (tampão de lavagem) para remover o excesso de substrato não ligada à placa. As interações inespecíficas foram bloqueadas por 1 horas, a 37°C com BSA 1% (p/v), diluída em tampão de lavagem. Os poços foram incubados com diferentes concentrações (2, 4, 8, 16 e 32 μ g/mL) do complexo Gal-FITC (de acordo com metodologia 3.10) em volume final de 50 μ L em tampão PBS. Após 3 lavagens com tampão de lavagem, foi realizada a detecção em leitor Power Wave X (Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, USA) em leitura de fluorescência em comprimento de onda de emissão de 585/20nm.

3.16- Análise estatística

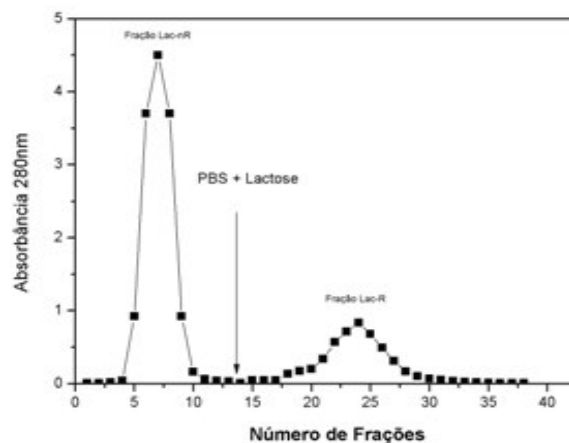
A análise estatística utilizada para comparação entre os grupos controle e tratados foi a de variância variada (ANOVA) *one-way*, seguido do pós-teste de Turkey, através do programa GraphPad Prism (versão 4 Prism, GraphPad, USA).

4. RESULTADOS

4.1- Obtenção e confirmação do caráter lectínico da Galatrox, uma lectina que reconhece β -galactosídeos

A Galatrox foi purificada a partir da peçonha bruta de *Bothrops atrox*, segundo MENDONÇA-FRAQUEIRO, 2007. O primeiro passo de isolamento consiste em uma cromatografia de afinidade em uma coluna de agarose-lactose cujo perfil cromatográfico está ilustrado na Figura 2A. O primeiro pico do cromatograma corresponde à fração Lac-nR (fração não retida na coluna) e o segundo à fração Lac-R (fração retida na coluna) que corresponde à Galatrox. Um pool das frações Lac-R foi obtido e concentrado até volume de 2mL e concentração final de 7,035mg/mL (6,72% do total de proteína aplicado na coluna - Tabela 1). O passo cromatográfico seguinte consiste em um procedimento conhecido como “desalting” em uma coluna Sephadex G-25 para separar a lactose da Galatrox (Figura 2B). O cromatograma ilustra um perfil onde o pico único obtido refere-se à Galatrox depletada da lactose (Galatrox Lac -). Ao final desse processo, foram obtidos um total de 0,6mg de Galatrox isolada. Assim, por meio desses procedimentos cromatográficos foi possível obter 0,6mg de Galatrox a partir de 250mg da peçonha bruta, representando um rendimento de 0,3% (Tabela 1). Para a confirmação do caráter lectínico da Galatrox, o ensaio de hemaglutinação teve resultado positivo para a toxina (40 μ g/mL), sendo observado a formação de aglutinados de hemácia. Porém, quando incubado com EDTA e lactose houve uma drástica redução da atividade, mas não sendo observado o mesmo para o tratamento com sacarose e glicose (dados não apresentados).

A)



B)

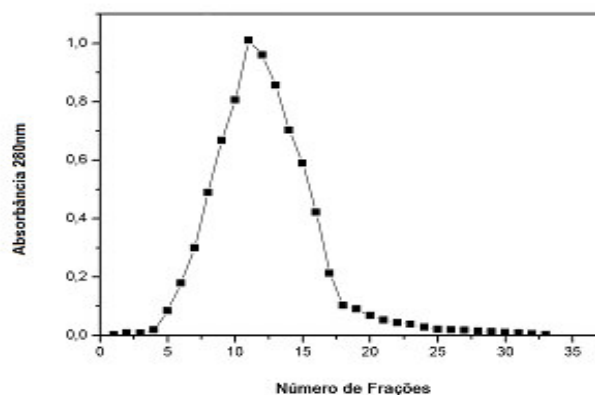


Figura 2 – Perfil cromatográfico relativo à primeira etapa de purificação da Galatrox em coluna de agarose-lactose a partir da peçonha bruta de *B. atrox*. A) A peçonha bruta de *B. atrox*, 250mg pesados, foi suspenso em tampão PBS, pH 7,4 à temperatura ambiente e aplicado à coluna Lactose-Agarose (10cm x 1cm), previamente equilibrada com tampão PBS, em fluxo 0,5mL/minuto. Frações coletadas: 500 μ L/tubo. O material adsorvido foi eluído com PBS-lactose 0,05M, pH 7,4 à temperatura ambiente, colhido em frações de 500 μ L/tubo. O pool das frações foi concentrado em sistema Amicon (Millipore, USA) com membrana de 3kDa até um volume final de 2mL. Frações monitoradas por densidade óptica à 280nm. B) Perfil cromatográfico em gel de Sephadex G-25 da Galatrox. 2mL do pool concentrado obtido no passo cromatográfico anterior (concentração 7,535mg/mL) foram aplicados e frações (500 μ L/tubo) foram coletadas e monitoradas por densidade óptica a 280nm. O pico do cromatograma é referente à Galatrox isolada da lactose.

Tabela 1 – Taxa de recuperação da Galatrox obtida a partir da peçonha bruta de *B. atrox* pelos procedimentos de purificação.

Amostra	mg proteína	%
Peçonha Bruta (250mg pesados)	194,35	100
Material Não- Retido (Lac-nR- Agarose-Lactose)	173,34	89,1
Material Retido (LacR- Agarose-Lactose)	13,07	6,72
Galatrox (Sephadex G-25)	0,6	0,3

* O conteúdo protéico em todos os processos acima descritos foi determinado pelo método de microbiureto

4.2- Avaliação do grau de pureza da amostra de Galatrox

Amostras de Galatrox foram submetidas à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa ODP 50 (Shodex) (Figura 3A). Nessa etapa foi aplicado 0,2mg de Galatrox, resultante do processo cromatográfico da purificação anterior, obtendo-se um cromatograma que apresenta um pico de maior intensidade de absorbância e homogêneo referindo-se à Galatrox.

A análise eletroforética confirmou o grau de pureza da amostra, encontrando-se homogênea e apresentando uma banda protéica única de 14 e 28 kDa sob condições redutoras e não, respectivamente (Figura 3B).

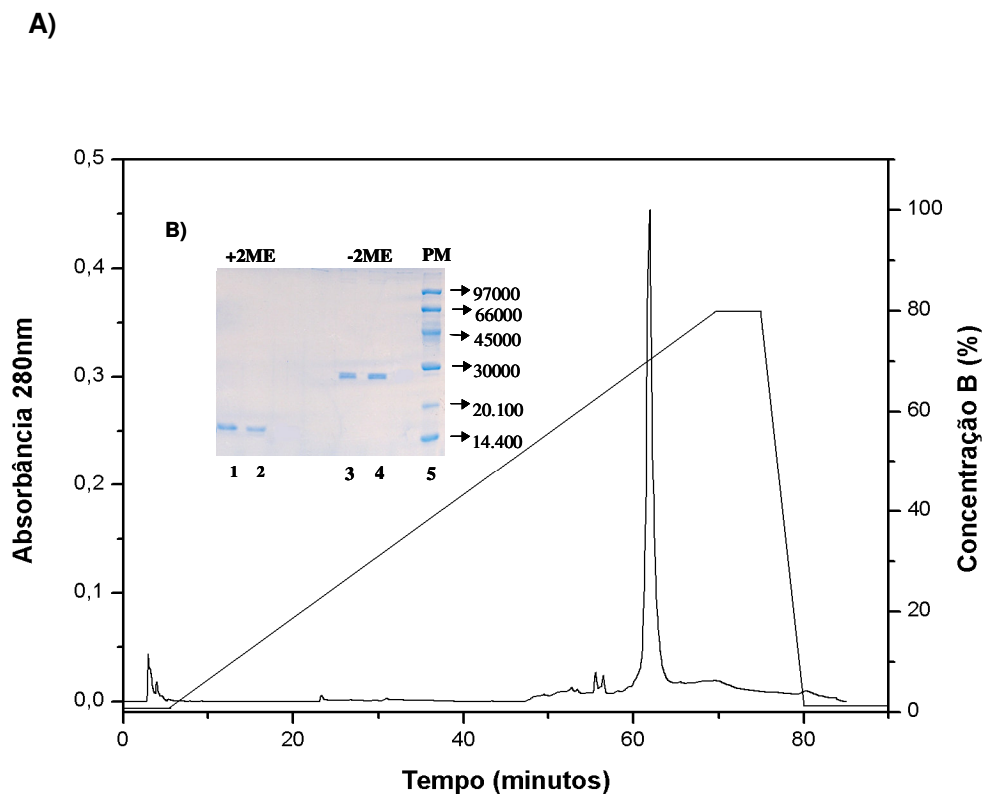


Figura 3. Avaliação do grau de pureza da Galatrox por CLAE e SDS-PAGE. A) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de fase reversa ODP 50 (4,6 x 150mm) (Shodex). A coluna foi equilibrada nos solventes de corrida (solvente A: TFA 0,1%; solvente B: acetonitrila 60%) e a eluição seguiu com gradiente de concentração de 0 - 80% do solvente B, com um fluxo de 0,8mL/min durante 70 minutos e a cromatografia foi monitorada em 280nm. Foram aplicados 0,1mg de Galatrox em um volume de 0,5mL. B) Análise eletroforética da Galatrox (20µg/pista) feita em SDS-PAGE 12% na presença (pistas 1 e 2 / +2ME) ou ausência de β-mercaptoetanol (pistas 3 e 4 / - 2ME). Pista 5-padrão de pesos moleculares (Massa Molecular): lisozima (14 400Da); inibidor de tripsina (20 100Da); anidrase carbônica (31 000Da); ovoalbumina (45 000Da); BSA (66 000Da) e fosforilase b (97 000Da). O gel foi corado para proteína com Coomassie Brilliant Blue G-250 e descorados com ácido acético glacial a 7% (v/v).

4.3- Produção de imunoglobulinas de camundongos anti-Galatrox

O procedimento de imunização de camundongos com Galatrox promoveu a geração de anticorpos específicos para Galatrox. Este procedimento foi monitorizado pela reação de ELISA e os resultados indicaram a eficiência do procedimento de hiperimunização, pois a imunodeteção da Galatrox imobilizada foi significativamente elevada com o uso de soro anti-Galatrox, em relação aos soros controles pré-ímmunes, a cada etapa de imunização (total de procedimentos: 4) em todos os soros dos 5 animais imunizados (Figura 4A). Como indicado na Figura 4B, o *pool* de soros ímmunes, derivado dos 05 animais imunizados, mostrou reatividade até a diluição 1:32000. Além disso, a imunorreatividade desse *pool* mostrou estar intimamente correlacionado ao procedimento de imunização com essa lectina, pois o *pool* de soros pré-ímmunes apresentou absorvância irrelevante mesmo em diluições mais baixas. Em seguida, o *pool* dos soros ímmunes de camundongos foi purificado por afinidade ao antígeno utilizando coluna de AffiGel 15 com Galatrox previamente imobilizada. O perfil cromatográfico dessa purificação está ilustrado na Figura 5, sendo que de um total de 2,0 mL do *pool* de soro-ímmune foi possível obter aproximadamente 1 mg de anticorpo purificado e específico para Galatrox. De modo interessante, o anticorpo anti-Galatrox foi capaz de reconhecer esta lectina em condições nativas (ensaio de ELISA), este anticorpo foi também capaz de interagir com essa lectina em condições dissociantes e redutoras, como indicado pelos resultados de *Western Blotting* (Figura 6). Além disso, esse anticorpo é capaz de reconhecer as formas monomérica e dimérica da Galatrox. Este anticorpo purificado por afinidade, poderá ser usado na execução de experimentos de localização tecidual desta lectina em animais desafiados com esta lectina, ensaio de imunoprecipitação para determinação de receptor(es) neutrofílicos para esta lectina e ensaios de inibição de atividades biológicas da galatrox.

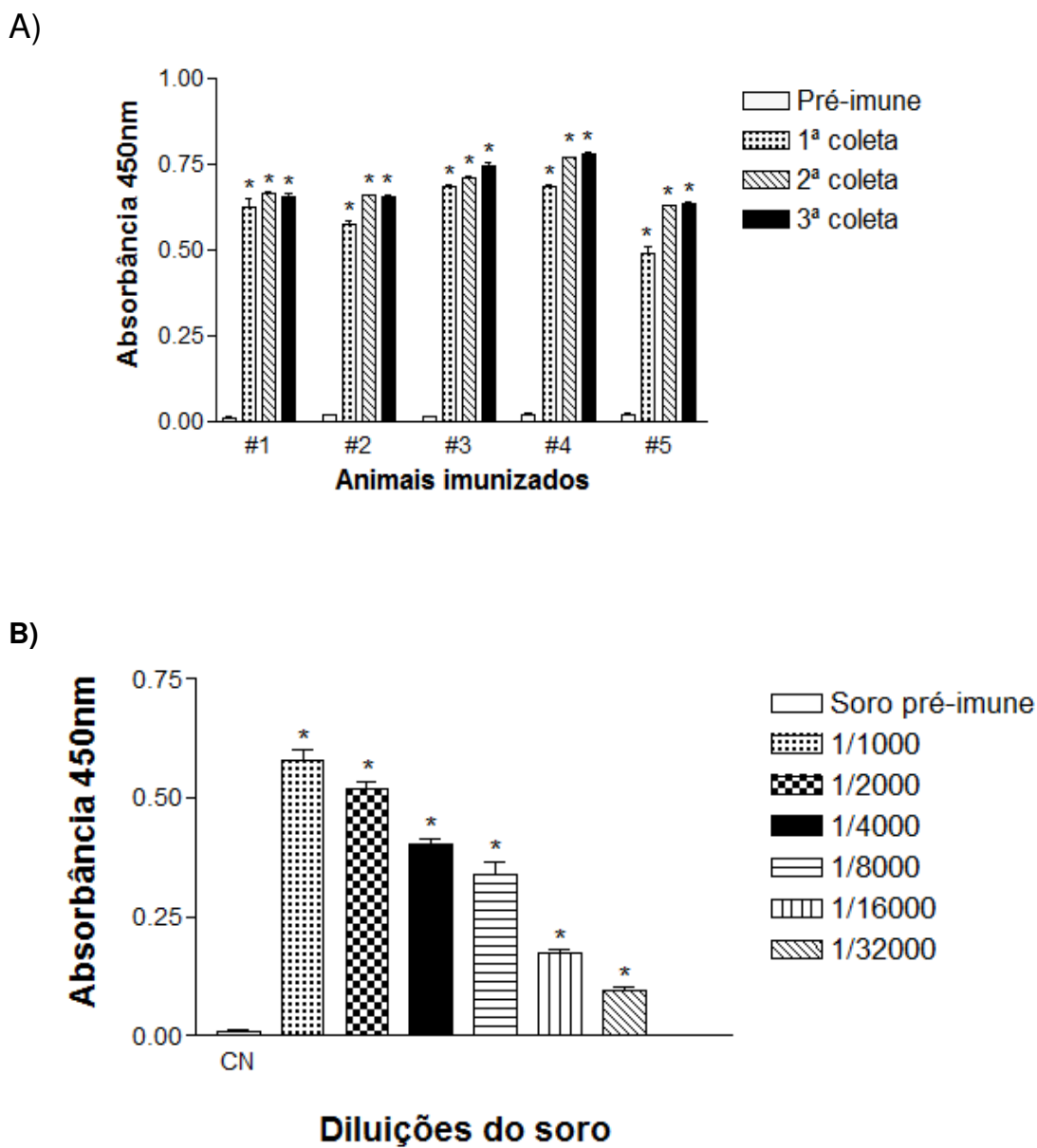


Figura 4. Produção de soro de camundongo anti-Galatrox. Camundongos machos da linhagem Balb/C foram imunizados com 50 μ g de galatrox em quatro imunizações (total de 200 μ g por animal). Os soros dos animais foram coletados antes (soro pré-imune) e após o procedimento de cada imunização (soro imune). A detecção de anticorpos anti-Galatrox nesses soros foi determinada pela reação de ELISA. Os resultados foram expressos em média das absorbâncias (450nm) \pm Erro Padrão da Média (EPM) (* $p < 0,05$ comparados ao controle negativo). A) Perfil da produção de anticorpo anti-Galatrox por animal nas etapas de imunização. Amostras de soro não diluídas. B) Análise da reatividade do pool dos soros anti-Galatrox dos cinco animais em diferentes diluições. CN (controle negativo representando o soro pré imune). * $p < 0,05$ quando comparados com CN.

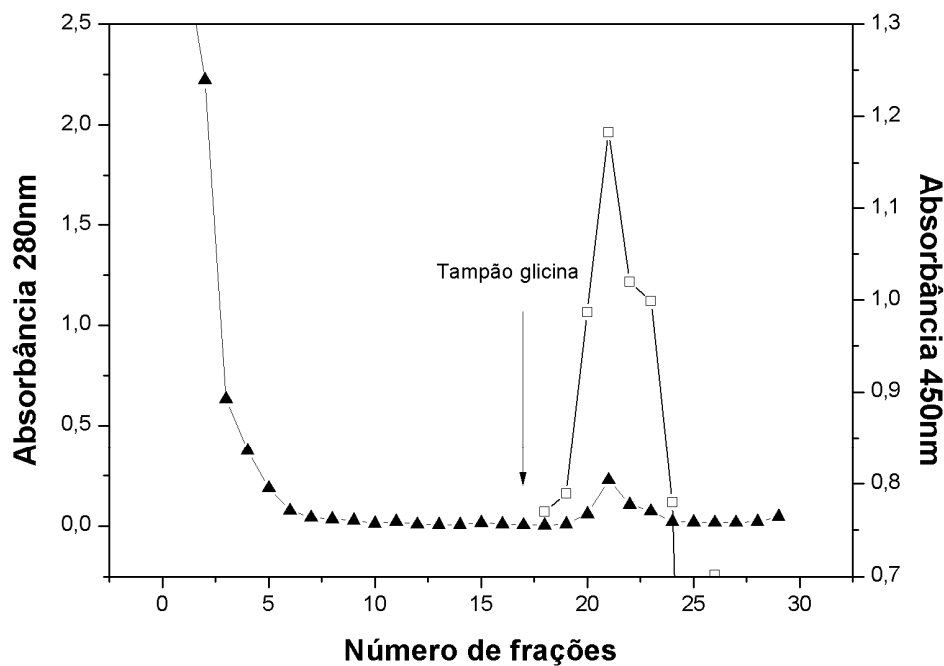


Figura 5. Purificação das imunoglobulinas anti-Galatrox dos soros dos camundongos hiperimunizados em coluna de AffGel 15 acoplada com essa lectina. O pool do soro de camundongo anti-Galatrox foi aplicado a uma colunas Affgel 15 previamente conjugada com galatrox e equilibrada com PBS. A eluição ocorreu com tampão glicina 0,2M pH 2,8. O material eluido foi coletado em tubo já contendo 1mL de tampão fosfato dibásico de potássio (pH 9,5) com objetivo de manter um pH da solução de anticorpo equilibrado em pH por volta de 7,4, após a eluição. A detecção do perfil cromatográfico foi realizado por leitura a 280nm (▲) e por ELISA (□).

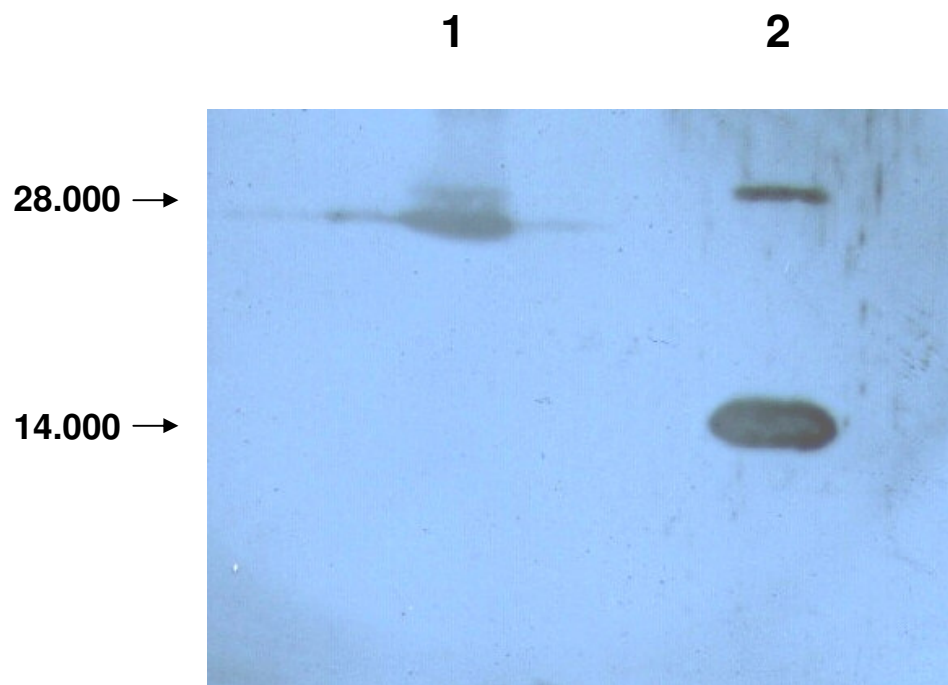


Figura 6- Imunodeteção da Galatrox com o uso do anticorpo anti-Galatrox purificado em condições redutoras ou não, por *Western Blotting*. Preparações de Galatrox (15 μ g por poço) foi submetida a corrida eletroforética (SDS-PAGE-gel 13%), na presença ou ausência de β -Mercaptoetanol. Em seguida, foi realizada a eletrotransferência do material resolvido pela eletroforese para membrana de nitrocelulose. Foram realizadas incubações com anticorpo anti-Galatrox (10 μ g em solução TBS Tween 20 0,05% + BSA 0,05), seguida de lavagens, e adição de 40ng/mL de IgG de coelho anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase por 1 hora. A etapa de revelação foi feita com Kit ECL Western Blotting e filme fotográfico. Pista 1: Galatrox (15 μ g) sem agente redutor (β -Mercaptoetanol). Pista 2: Galatrox (15 μ g) com agente redutor. Os números a esquerda da figura indicam a massa molecular aparente das bandas protéicas.

4.4- Galatrox liga-se à superfície de neutrófilos de modo dependente da sua atividade lectínica

Com a finalidade de avaliar uma possível interação entre Galatrox e neutrófilos, submeteram-se essas células ao tratamento com diferentes concentrações da lectina conjugada à FITC (2, 4, 8, 16, 32 μ g/mL) e na presença de lactose (açúcar inibidor) ou sacarose (açúcar controle) (Gal-FITC 8 μ g/mL + lactose, ou sacarose) objetivando-se avaliar a participação do domínio de reconhecimento de carboidrato nessa função.

A Figura 7A indica as porcentagens de neutrófilos positivamente marcados com diferentes concentrações de Gal-FITC. As células tratadas com 2 μ g/mL de Gal-FITC apresentaram 12,49% \pm 0,45 de marcação positiva dessa lectina à superfície neutrofílica. Já o tratamento na concentração de 4 μ g/mL apresentou um aumento substancial de células positivas, com valor médio de 68,46% \pm 0,1750, sendo as concentrações de 8,16 e 32 μ g/mL tendo os maiores valores de ligação chegando a um possível platô (respectivamente 91,47% \pm 0,5650, 92,66% \pm 0,29 e 94,47% \pm 0,27) com relação à interação Galatrox-neutrófilo. De modo interessante, a lactose (carboidrato ligante de Galatrox - 20 mM) inibiu em 51,02% a interação de Galatrox (8 μ g/mL) à superfícies de neutrófilos. Porém, a sacarose (carboidrato não ligante de Galatrox - 20mM), não provocou redução detectável da interação Galatrox-neutrófilo.

A avaliação da intensidade da fluorescência dos neutrófilos tratados com as diferentes concentrações de Gal-FITC, também demonstrou ser concentração dependente (Figura 7B-C). O tratamento de maior valor da mediana de intensidade de fluorescência foi na concentração de 32 μ g/mL (56,66 \pm 6,24). Entretanto, a curva de intensidade de fluorescência das maiores concentrações de Gal-FITC testadas (8 a 32 μ g/mL), diferentemente da curva de porcentagem de positividade (Figura 7A), não indicou a saturação dos sítios de ligação dessa lectina nos neutrófilos (Figura 7B-C). A lactose (20mM) foi capaz de inibir em cerca de 51% a intensidade de fluorescência de células tratadas (8 μ g/mL), enquanto que a sacarose na mesma concentração não provocou qualquer diferença no valor da mediana de intensidade de fluorescência no tratamento de neutrófilos com 8 μ g/mL de Gal-FITC (Figura 7B-C).

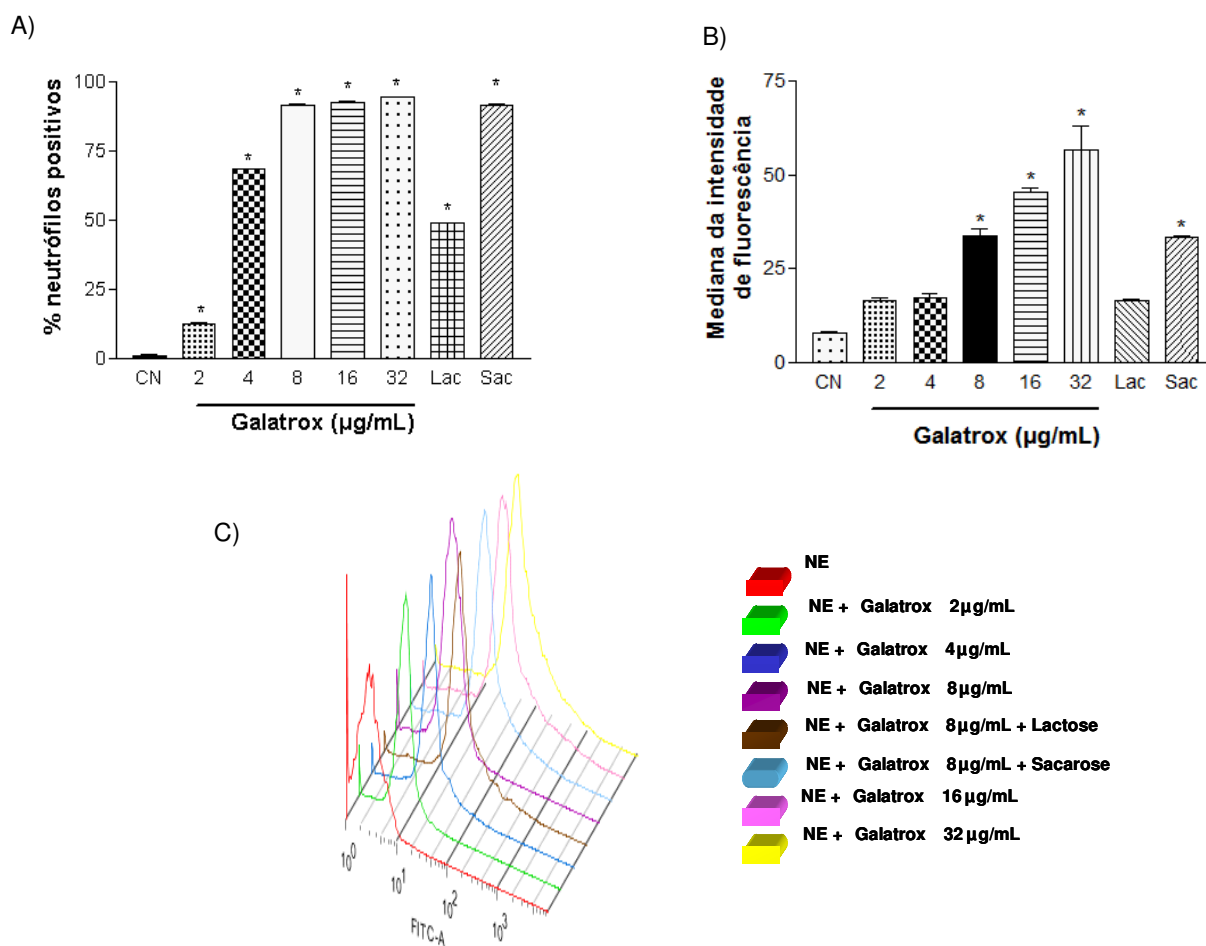


Figura 7- A Galatrox liga-se à superfície de neutrófilos humanos de modo carboidrato dependente. Neutrófilos humanos purificados (1×10^6 neutrófilos/tubo) foram incubados com diferentes concentrações de Galatrox conjugada à FITC (2, 4, 8, 16, 32µg/mL) e na presença ou não de 20 mM de lactose ou sacarose (Gal-FITC 8µg/mL + lactose e Gal-FITC 8µg/mL + sacarose) por 30 minutos à 4°C. Em seguida, foi realizada a análise em citometria de fluxo de 10000 eventos. Painel A) O gráfico representa a porcentagem de células marcadas pelo complexo Gal-FITC (células positivas). Painel B) Avaliação da mediana de intensidade de fluorescência em relação às células positivas. Painel C) “Overlay” dos histogramas (número de neutrófilos positivos x intensidade de fluorescência) dos grupos de tratamento. Os resultados foram expressos pela média das porcentagens de positividade ou das medianas da intensidade de fluorescência \pm EPM. CN (controle negativo), Lac (amostra tratada com lactose 20mM), Sac (amostra tratada com sacarose 20mM) * $P < 0,05$ comparados ao controle negativo.

4.5- Galatrox é capaz de induzir o “burst” oxidativo, preferencialmente, em neutrófilos humanos primados.

Para o presente experimento, neutrófilos humanos purificados primados ou não primados, com fMLP, foram tratados com concentrações diferentes de Galatrox (1,25; 5; 20 e 80µg/mL). O objetivo foi avaliar uma possível indução direta ou indireta (dependente do processo de *priming* desses leucócitos) pela Galatrox da produção de radicais intermediários do oxigênio através da explosão oxidativa dessas células. De acordo com a Figura 8, na concentração de 20µg/mL (concentração com maior atividade) a lectina apresenta uma baixa atividade de indução direta de tal efeito, em neutrófilos não primados, quando comparados ao tratamento com PMA. Estes tratamentos apresentaram um valor médio da área integrada de QL cerca de 8 vezes maior que o controle negativo, porém cerca de 4,5 vezes menor que o controle com PMA (Figura 8). Em relação à avaliação da atividade de *burst* em neutrófilos primados com fMLP, a Galatrox, na mesma concentração de 20µg/mL que representa o tratamento mais eficiente no respectivo ensaio, apresentou um potencial de indução indireta maior que em neutrófilos não primados. O valor da atividade, que quando comparado ao controle de neutrófilos primados sem tratamento, foi de cerca de 3 vezes maior, apresentou diferença estatística significativa ($2,1560 \times 10^9 \pm 8 \times 10^7$ c.p.m. em neutrófilos primados contra $6,6965 \times 10^8 \pm 1,55 \times 10^8$ c.p.m. em neutrófilos não primados onde $p < 0,05$ (Figura 8). Ainda pertinente ao ensaio com neutrófilos primados, a avaliação do caráter lectínico foi avaliada com tratamentos contendo lactose e sacarose. Ambos tratamentos (contendo concentrações de 20µg/mL de Galatrox) apresentaram uma significativa redução da indução de *burst* por estas células alcançando valores próximos ao controle negativo (Figura 8).

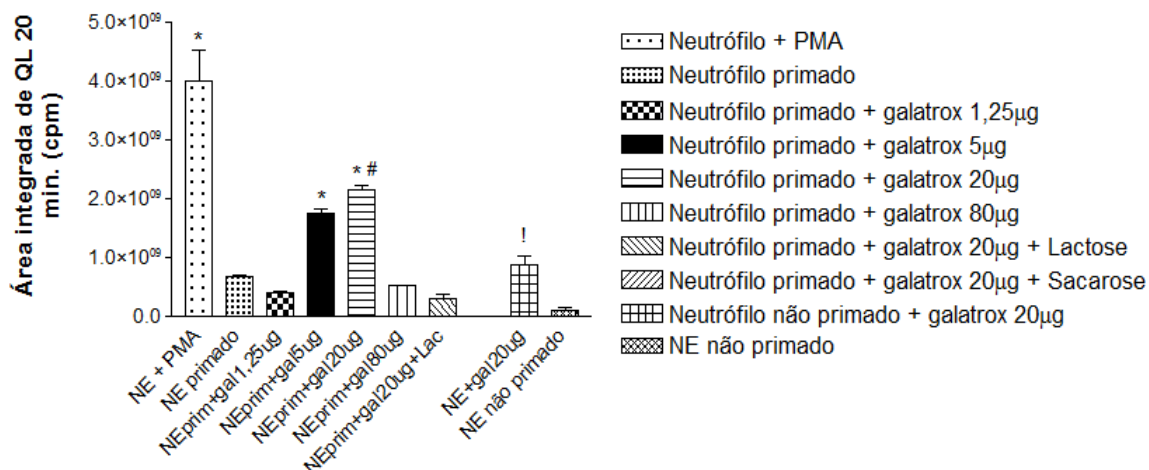


Figura 8- Indução da Galatrox na produção de radicais intermediários do oxigênio em neutrófilos primados e não primados. Neutrófilos humanos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) primados ou não primados, com fMLP (10^{-6} M) foram tratados com diferentes concentrações de Galatrox e submetidos a análise de metabolismo oxidativo através de ensaio de quimioluminescência amplificada por luminol. O valor representativo do ensaio com neutrófilos não primados foi representado pelo tratamento de maior potencial (Galatrox $20\mu\text{g}/\text{mL}$). PMA foi utilizado como controle positivo e solução de neutrófilos primados e não primados em meio Hanks como controle negativo para os respectivos ensaios. O perfil de produção de quimioluminescência (QL) está representado em contagens fótons por minuto (cpm). Os resultados foram expressos a partir do valor médio das áreas integradas de quimioluminescência no período de 20 minutos \pm EPM ($n=2$). * $P<0,05$ quando comparado ao controle negativo para neutrófilos primados. ! $P<0,05$ quando comparado ao controle negativo para neutrófilos não primados. # $P<0,05$ quando comparado ao tratamento Galatrox $20\mu\text{g}/\text{mL}$ com neutrófilos não primados.

4.6- Galatrox induz migração de neutrófilos humanos *in vitro*

O ensaio, que tem como objetivo avaliar o potencial da Galatrox de induzir migração de neutrófilos frente a uma membrana de policarbonato, foi realizado com diferentes concentrações da lectina (2, 4, 8, 16 e 32 μ g/mL). Além disso, a análise do envolvimento do domínio de reconhecimento de carboidrato dessa lectina sobre sua potencial atividade quimiotática foi feita pelo uso de lactose (carboidrato ligante) e sacarose (carboidrato não ligante). O perfil obtido, na Figura 9, ilustra que a concentração de 32 μ g/mL apresenta maior atividade quimiotática (41,57 \pm 3,42 neutrófilos por campo). As demais concentrações exibiram um perfil com pequena diferença significativa ($P>0,005$) em relação ao controle negativo (solução Hanks). A atividade quimiotática da Galatrox (32 μ g/mL) na presença de lactose (20mM) foi reduzida a 13,37 \pm 1,08 neutrófilos por campo, demonstrando uma inibição de 68% (Figura 9). Entretanto, a atividade quimiotática da galatrox (32 μ g/mL) não sofreu alteração significativa pela presença de sacarose (20mM).

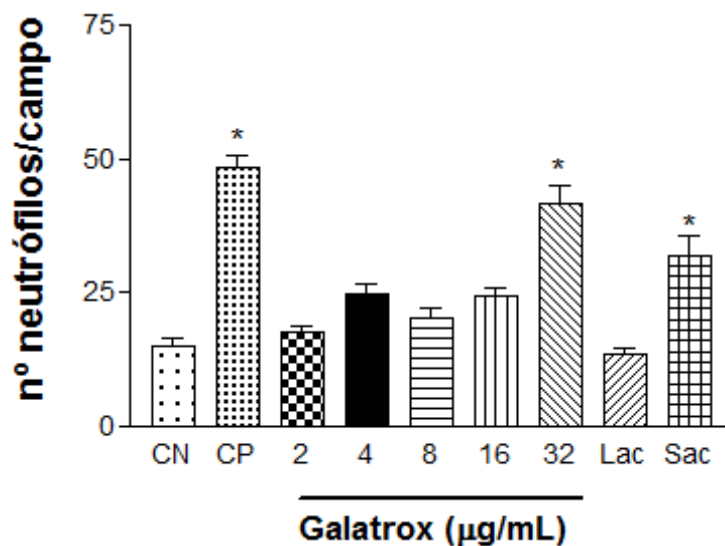


Figura 9- Avaliação do potencial de atividade indutora da neutrófilos humanos da Galatrox, *in vitro*. Neutrófilos humanos foram purificados a uma concentração 10^6 neutrófilos/mL em meio Hanks para avaliação de quimiotaxia através de membrana de policarbonato com o uso de uma câmara de Boyden modificada de 48 poços. A Galatrox foi testada em diferentes concentrações (2 a 32 µg/mL) as quais foram distribuídas em poços da câmara inferior (28µl/poço). Os neutrófilos purificados foram dispensados na câmara superior (10^6 neutrófilos/mL - 50µl/poço). A solução de Hanks foi utilizada como diluente das amostras e dos neutrófilos. O fMLP (1 µM) e a solução de Hanks foram usados como controle positivo (CP) e negativo (CN), respectivamente. Foi testada a atividade quimiotática da Galatrox (32 µg/mL) na presença de lactose (Lac - 20mM) ou de sacarose (Sac- 20 mM). Os resultados foram expressos em número médio de neutrófilos/campo (\pm EPM) em triplicata. *P<0,05 quando comparados com o controle negativo. Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.7- Galatrox induz migração de neutrófilos *in vivo*

4.7.1- A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por Galatrox foi dose dependente

A atividade indutora de migração de neutrófilos *in vivo* da Galatrox foi avaliada por meio da contagem global e diferencial de leucócitos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C. A Figura 10A ilustra uma curva dose-resposta da contagem de leucócitos totais, a qual foi obtida pelo uso de diferentes doses de Galatrox (6,25; 12,5; 25; 50; 100 μ g/animal), sendo que a partir da dose de 50 μ g/animal ($2,05 \times 10^6 \pm 0,101$ leucócitos/mL) essa curva atingiu um platô com valores semelhantes ao do controle positivo (carragenina $2,03 \times 10^6 \pm 0,215$ leucócitos/mL- Figura 10A). O gráfico representativo da contagem diferencial para células mononucleares (Figura 10B) ilustra praticamente uma ausência de variação do número absoluto de dessas células na cavidade peritoneal, nos diferentes tratamentos com Galatrox, quando comparada ao valor do controle negativo ($0,5 \times 10^6 \pm 0,007$ mononucleares/mL). A Figura 10C mostra que essa lectina foi capaz de induzir a migração *in vivo* de neutrófilos de maneira dose-dependente, sendo a dose de 50 μ g/animal a menor que atingiu o platô da curva de recrutamento neutrofilico ($1,21 \times 10^6 \pm 0,049$ de neutrófilos/mL).

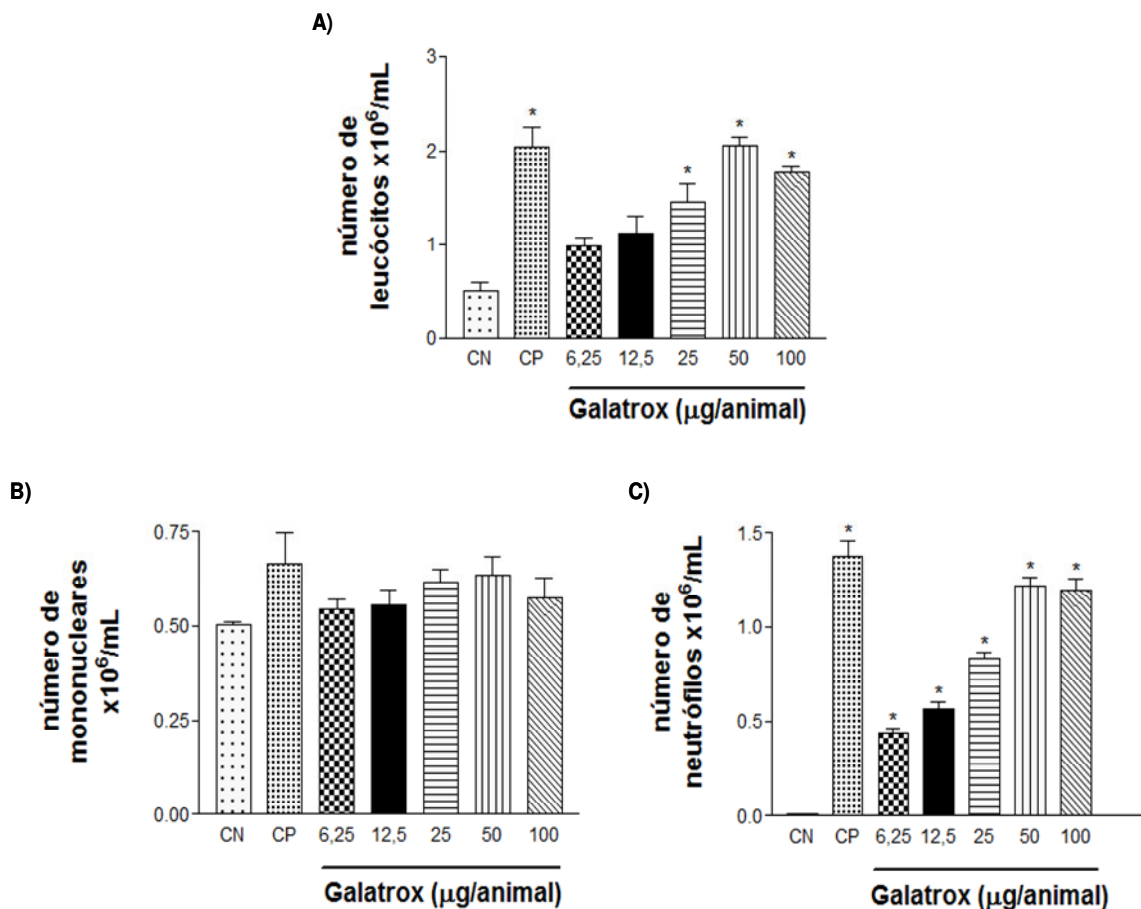


Figura 10- Análise da atividade indutora de migração leucocitária “*in vivo*” promovida por diferentes concentrações de Galatrox. Camundongos Balb/C adultos, machos, foram desafiados com diferentes concentrações de Galatrox (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$) em um volume aplicado intraperitoneal de 0,25mL. A coleta do lavado peritoneal se deu 4 horas após o desafio com os tratamentos. Carragenina foi utilizada como controle positivo (CP - 500 $\mu\text{g}/\text{animal}$) e PBS como controle negativo (CN). Cada amostra foi testada em grupos de 5 animais, previamente esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 μm . Os animais foram injetados com as amostras-teste e após 4 horas eles foram sacrificados por deslocamento cervical e as células de suas cavidades peritoneais foram coletadas por lavagem com PBS contendo EDTA (1mM). Três mililitros de lavado foram coletados para contagem global em câmara de Neubauer e diferencial de células através de esfregaços corados com pancrômico de Rosenfeld. A) Perfil contagem global: os resultados foram expressos em número de leucócitos $\times 10^6/\text{mL}$ ($\pm\text{EPM}$). (B) Perfil contagem diferencial mononucleares: os resultados foram expressos em número de mononucleares $\times 10^6/\text{mL}$ ($\pm\text{EPM}$). (C) Perfil contagem diferencial neutrófilos: os resultados foram expressos em número de neutrófilos $\times 10^6/\text{mL}$ ($\pm\text{EPM}$). * $P < 0,05$ quando comparados com o controle negativo. Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.7.2- O recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos induzida por Galatrox foi tempo dependente

A partir da avaliação da atividade quimiotática de diferentes concentrações de Galatrox (Figura 10) a de 50µg/animal foi selecionada para os ensaios de análise temporal (4; 12; 24; 72horas) da atividade de recrutamento de leucócitos induzida pela Galatrox.

A Figura 11A apresenta o perfil da migração global dos grupos desafiados com Galatrox (50µg/animal) e do grupo controle (PBS). O gráfico indica que o pico de migração leucocitária ocorreu após 4 horas dos desafios ($1,21 \times 10^6 \pm 0,324$ leucócitos) e que nos tempos posteriores foi detectada uma diminuição progressiva da contagem global de leucócito até valores próximos ao controle negativo como indicada no tempo de 72 horas (Figura 11A).

A Figura 11B ilustra o perfil de recrutamento de células mononucleares presente na cavidade peritoneal após os tratamentos com Galatrox. As cavidades tratadas com Galatrox (50µg/animal) em todos os períodos analisados (4-72 horas) apresentaram números absolutos de mononucleares que não apresentam diferença estatística ($P > 0,05$) quando comparado aos valores do controle negativo nos períodos correspondentes. O perfil de migração de neutrófilos (Figura 11C) indicou que a Galatrox (50µg/animal) foi mais efetiva em promover a migração neutrofílica no tempo de 4 horas ($0,98 \times 10^6 \pm 0,0481$ neutrófilos/mL) e em 72 horas ($0,011 \times 10^6 \pm 0,003$ neutrófilos/mL) o número de neutrófilo atingiu valores semelhantes ao do controle negativo ($0,008 \times 10^6 \pm 0,002$ neutrófilos/mL). Além disso, o perfil descende da curva de indução de migração de neutrófilos (Figura 11C) foi também ilustrado na curva de leucócitos totais (Figura 11A).

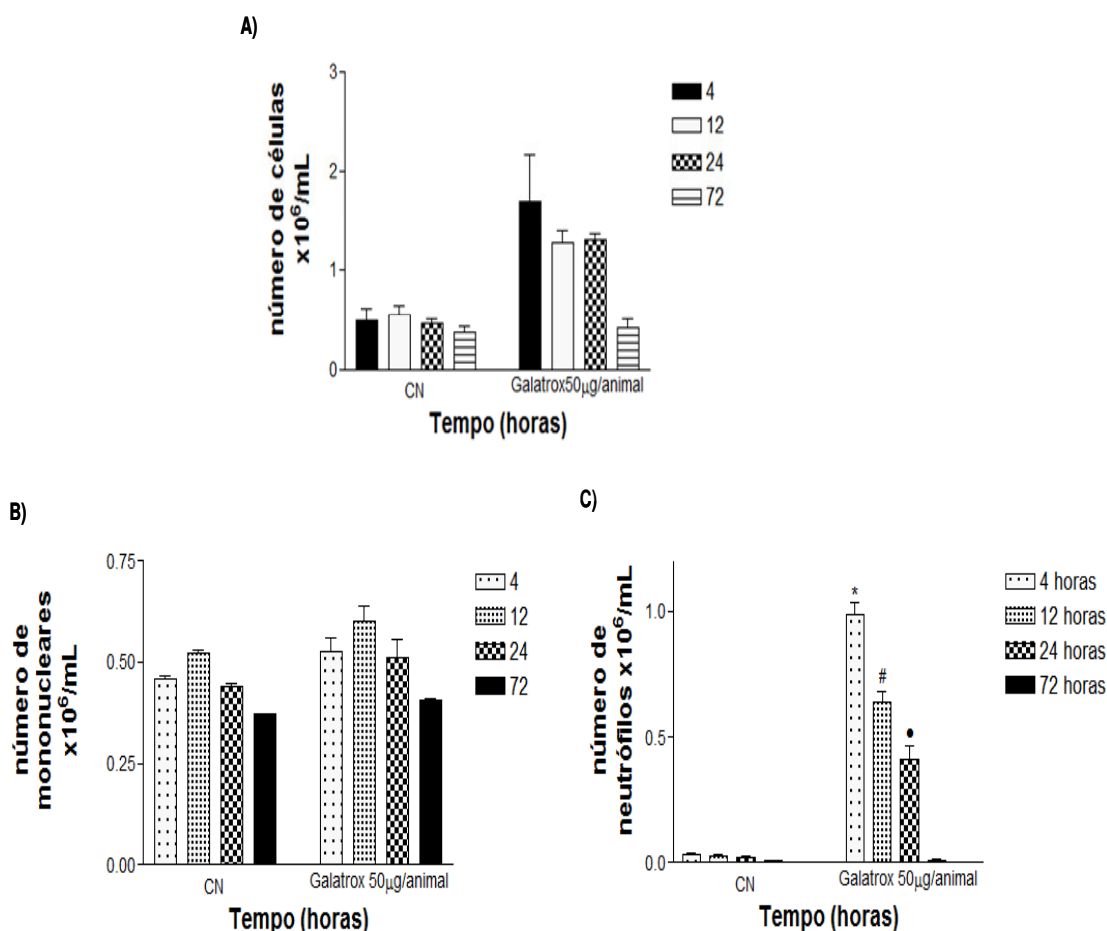


Figura 11- Análise temporal *in vivo* da atividade quimiotática para neutrófilos promovida pela Galatrox. Camundongos Balb/C adultos, machos, foram desafiados por via intraperitoneal (50µg/animal) e a coleta do lavado foi feita em diferentes tempos (4, 12, 24, 72 horas). Solução de PBS foi usada como controle negativo (CN). Os animais foram injetados com as amostras-teste e após os períodos correspondentes foram sacrificados por deslocamento cervical e as células de suas cavidades peritoneais foram coletadas por lavagem com PBS contendo EDTA (1mM). Três mililitros de lavado foram coletados para contagem global em câmara de Neubauer e diferencial de células através de esfregaços corados com pancrômico de Rosenfeld. A) Perfil contagem global: os resultados foram expressos em número de leucócitos x10⁶/mL (±EPM). Controle Negativo (CN): PBS. B) Perfil contagem diferencial mononucleares: os resultados foram expressos em número de mononucleares (±EPM). Controle Negativo (CN): PBS. (C) Perfil contagem diferencial neutrófilos: os resultados foram expressos em número de neutrófilos (±EPM). Controle Negativo (CN): PBS. Cada amostra foi testada em grupos de 5 animais. *, #, • (p<0,05 quando comparados com o controle negativo para 4, 12, 24 horas respectivamente. Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.8- Avaliação do perfil de liberação de citocinas a partir do sobrenadante do lavado peritoneal

O sobrenadante de lavado peritoneal nos experimentos *in vivo* de dose e tempo resposta, foi avaliado para produção das citocinas IL-1 α , IL-6 e TNF- α , IL-10 e do mediador inflamatório NO.

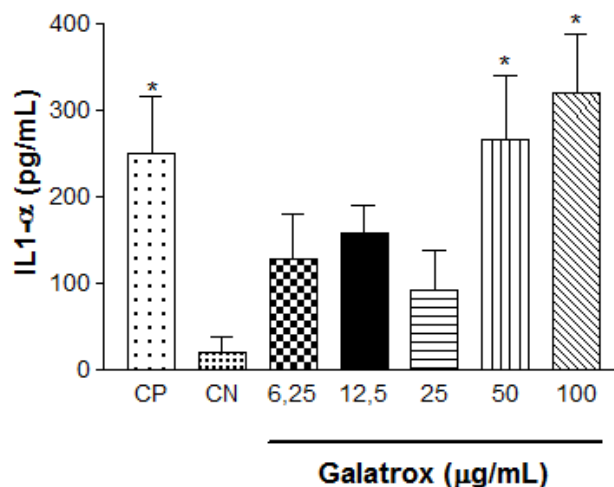
4.8.1- Galatrox induz *in vivo* a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6 de modo dose-dependente.

A figura 12 A ilustra a produção de IL-1 α a partir do lavado peritoneal de animais desafiados com diferentes doses de Galatrox. As doses de 50 e 100 μ g/animal apresentaram valores com diferença estatisticamente significativa quando comparados com controle negativo (50 μ g/animal: 266,77 \pm 73,95pg IL-1 α /mL; 100 μ g/animal: 319,19 \pm 68,35 pg IL-1 α /mL), porém sem diferença entre os mesmos. A liberação de IL-6 (figura 12 B) apresentou um perfil dose-dependente, de forma diretamente proporcional, na qual a dose de 100 μ g/animal apresentou o maior valor (1491,46 \pm 176,21 pg IL-6/mL). O mesmo sobrenadante não apresentou detecção de TNF- α , NO e IL-10 (dados não apresentados).

4.8.2- Galatrox apresenta perfil cinético de liberação de citocinas inflamatórias de forma aguda

A lectina, quando avaliada seu potencial de liberação de citocinas inflamatórias, apresentou um perfil clássico de fase aguda de inflamação. As figuras 13 A e B ilustram a cinética de produção de IL-1 α e IL-6, respectivamente, nos referentes tempos de tratamentos. Após 4 horas do tratamento, obteve-se o maior valor para ambas citocinas (455,14 \pm 65,86 pg IL-1 α /mL), sendo a liberação de IL-6 quantitativamente maior (1622,67 \pm 341,27 pg IL-6/mL).

A)



B)

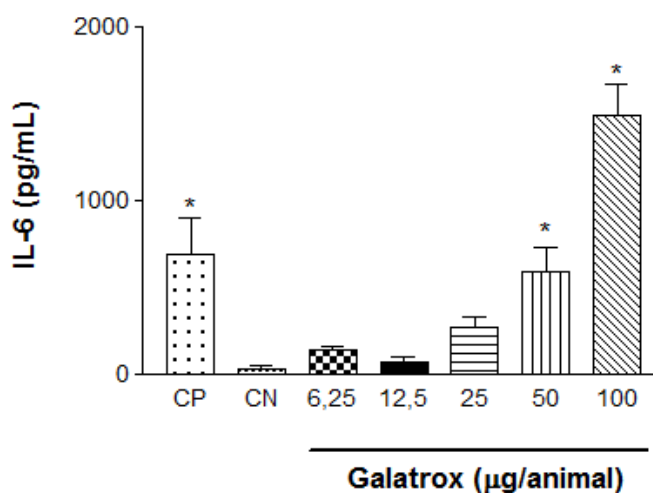


Figura 12 – Detecção de IL-1 α e IL-6 no lavado peritoneal de camundongos tratados com diferentes concentrações de Galatrox. Sobrenadante de lavado peritoneal obtido em ensaio pelo modelo de peritonite induzida *in vivo* com camundongos Balb/c com diferentes doses de Galatrox (6,25, 12,5, 50 e 100 μ g/animal). O sobrenadante foi obtido após centrifugação do lavado a 1500rpm à 4°C por 10 minutos. As citocinas foram avaliadas quantitativamente pela técnica de ELISA. Figura A) IL-1 α e figura B) IL-6. Controle positivo (CP): tratamento com carragenina 500 μ g/animal. Controle negativo (CN): tratamento com PBS. O ensaio foi realizado com n=5 e os valores foram expressos em pg/mL \pm EPM de cada respectiva citocina, e é representativo de dois experimentos independentes. *P<0,05 quando comparado com controle negativo.

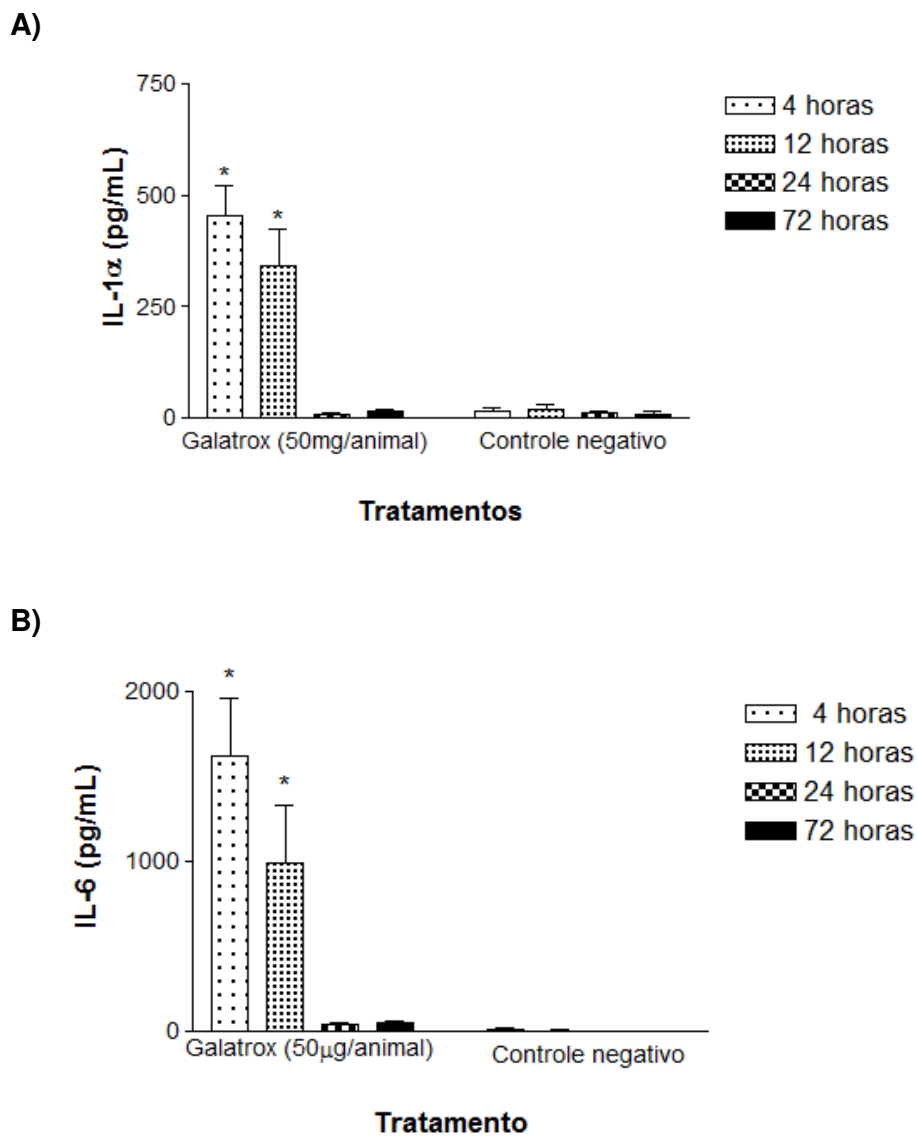


Figura 13- Detecção de IL-1 α e IL-6 no lavado peritoneal de camundongos tratados com Galatrox por diferentes períodos tempo. Sobrenadante de lavado peritoneal obtido em ensaio pelo modelo de peritonite induzida *in vivo* com camundongos Balb/c com diferentes tempos (4, 12, 24 e 72 horas) de coleta após estimulação com Galatrox (50 μ g/animal). O sobrenadante foi obtido após centrifugação do lavado a 1500rpm à 4°C por 10 minutos. As citocinas foram avaliadas quantitativamente pela técnica de ELISA Figura A) IL-1 α e Figura B) IL-6. Controle positivo (CP): tratamento com carragenina 500 μ g/animal. Controle negativo (CN): tratamento com PBS. O ensaio foi realizado com n=5 e os valores foram expressos em pg/mL \pm EPM de cada respectiva citocina, e é representativo de dois experimentos independentes. *P<0,05 quando comparado com controle negativo.

4.9- Indução da produção de INF- γ e TNF- α por células do baço

Sobrenadante de cultura de esplenócitos tratados com diferentes concentrações de Galatrox foram avaliados quanto a produção de mediadores envolvidos na resposta imune: IL-1 α , IL-10, INF- γ , TNF- α e NO. Na Figura 14 A, observa-se um perfil de indução da produção de INF- γ após 48 horas onde nos tratamentos 3, 10 e 30 μ g/mL com Galatrox tem-se uma maior produção dessa citocina com valores muito próximos (758,86 \pm 205,59; 723,90 \pm 186,58; 737,32 \pm 159,78).

A Figura 14 B ilustra o comportamento de produção de TNF- α pelas respectivas células. O perfil avaliado apresenta uma curva em sino onde, após 48 de incubação com várias concentrações da lectina, a concentração de 10 μ g/mL (184,83 \pm 19,14 pg/mL) apresentou um maior potencial de produção dessa citocina.

O lavado não apresentou liberação dos mediadores IL-1 α , IL-10, e NO (dados não apresentados)

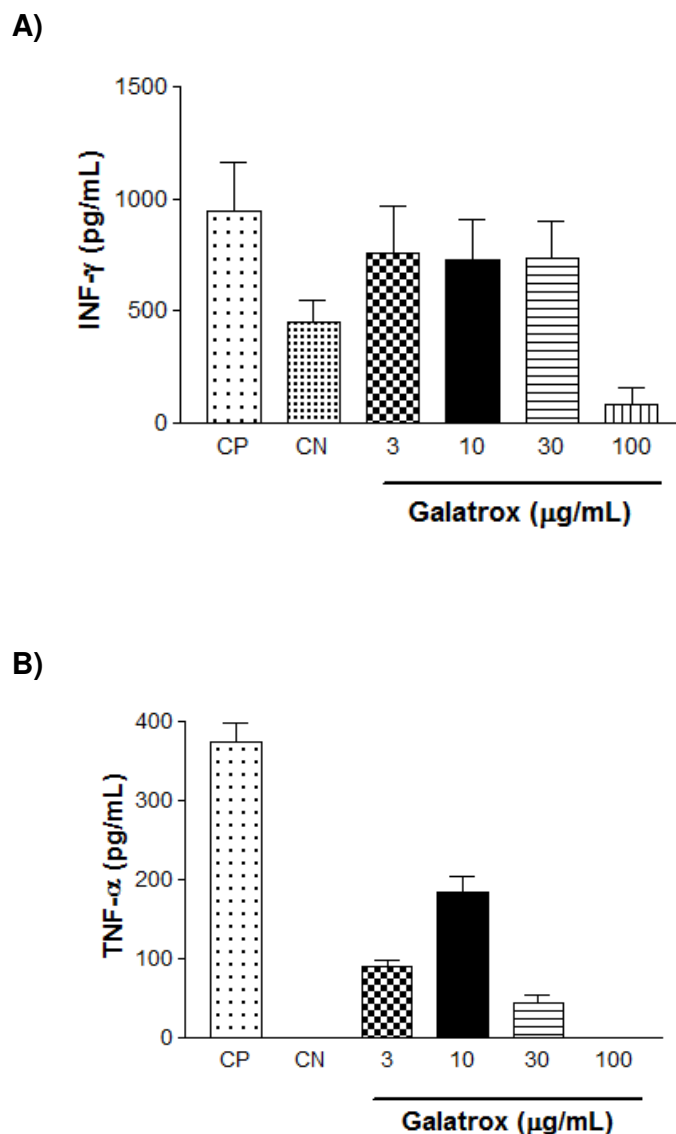


Figura 14- Detecção de INF- γ e TNF- α no sobrenadante de cultura de células do baço tratadas com diferentes concentrações de Galatrox. Células do baço de camundongos Balb/c (5×10^6 células por poço) foram isoladas e cultivadas em placas de 12 poços, tratadas com diferentes concentração de Galatrox (3, 10, 30, 100 μ g/mL) e incubadas em estufa 37°C em ambiente 5% CO₂. Após 48 horas de tratamento, o sobrenadante de células foi colhido e avaliado a produção dos mediadores IL-1 α , IL-10, INF- γ , TNF- α e NO. As figuras 14 A e B representam a dosagem de INF- γ e TNF- α , respectivamente, por ELISA. O ensaio foi realizado em duplicata e os valores foram expressos em pg/mL \pm EPM de cada respectiva citocina.

4.10- Interação Galatrox-componente da matriz extracelular

O complexo Gal-FITC foi capaz de se ligar a receptor laminina de forma dose-dependente, apresentando interação mínima a partir do tratamento na concentração de 4 μ g/mL (148,75 \pm 10 unidades relativa de fluorescência) (sendo o valor $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo para tal concentração). Porém, a Galatrox não apresentou qualquer interação com a fibronectina em nenhuma das concentrações (Figura 15).

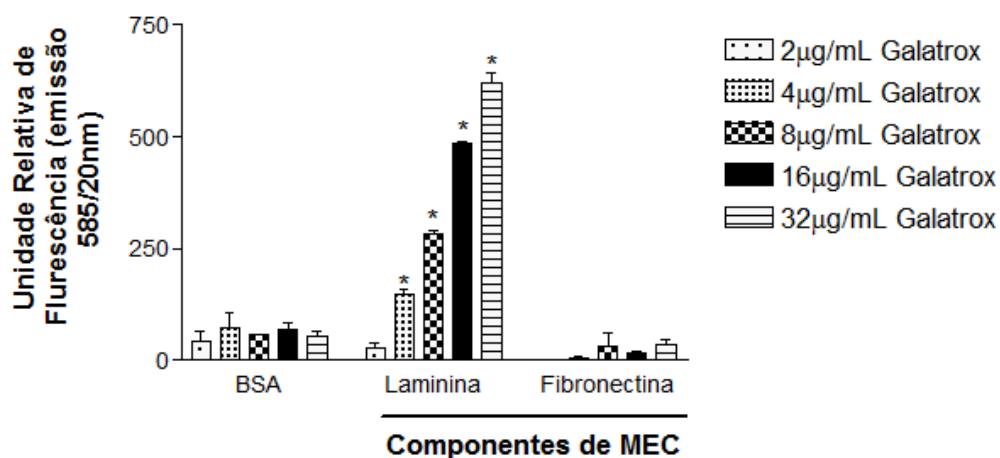


Figura 15- Interação Galatrox-componentes da matriz extracelular. 5 μ g de lamina ou fibronectina foram imobilizadas em microplaca de poliestireno e sua interação com complexo Gal-FITC foi avaliada com auxílio de leitor de fluorescência em leitura de densidade óptica de 585/20nm. Como controle negativo foi feita atividade com BSA. Os resultados foram expressos em valor de unidade de fluorescência relativa (\pm EPM). * $p < 0,05$ quando comparados com o controle negativo (BSA).

5. DISCUSSÃO

5.1- Purificação e confirmação do caráter lectínico da Galatrox

No presente estudo foi realizado o isolamento e a avaliação funcional da galatrox quanto à propriedade de ligar-se a superfície de neutrófilos e a componentes da matriz extracelular e sua ação pró-inflamatória. Além disso, foram realizadas a produção e a purificação de anticorpos policlonais contra essa lectina. O procedimento cromatográfico utilizado para obtenção de preparações homogêneas da Galatrox foi em metodologia descrita por MENDONÇA-FRANQUEIRO (2007). Tal metodologia foi baseada em dados da literatura (GARTNER, *et al.*, 1980, LOMONTE *et al.*, 1990; KOMORI *et al.*, 1999; GUIMARÃES-GOMES *et al.*, 2004, PANUNTO *et al.*, 2006), mas com algumas modificações.

As preparações de Galatrox para uso foram obtidas por meio de um processo composto de dois passos cromatográficos, como descrito por MENDONÇA-FRANQUEIRO (2007) :1) purificação em colunas de afinidade de agarose-lactose, 2) dessalinização, para remoção da lactose, em colunas de exclusão molecular Sephadex G-25. Porém, no presente trabalho, a porcentagem de recuperação da Galatrox foi de 0,3% da proteína em relação ao total de proteína do veneno bruto, diferentemente do valor obtido por MENDONÇA-FRANQUEIRO (2007) onde conseguiu uma recuperação de 1,09% (mg). Esta menor recuperação é provavelmente devido ao lote de peçonha de *B.atrox* ser diferente.

A análise eletroforética de amostras de Galatrox, em condições dissociantes e/ou redutoras, indicaram a presença de bandas protéicas únicas de 28.000 e 14.000, respectivamente. Estes dados sugerem um elevado grau de homogeneidade das preparações de Galatrox o qual foi confirmado por CLAE com o uso de resina de fase reversa. Esses conjuntos de resultados confirmam os achados descritos por MENDONÇA-FRANQUEIRO 2007 e mostraram a reprodutibilidade dos procedimentos cromatográficos aplicados na purificação da Galatrox.

Ensaio de hemaglutinação realizados com as amostras de Galatrox purificadas (dados não mostrados) confirmaram que essa proteína é uma lectina do tipo C ligante de lactose como descrito previamente por GARTNER *et al.*, (1980) e MENDONÇA-FRANQUEIRO (2007).

5.2- Anticorpo anti-Galatrox

O procedimento de hiperimunização de camundongos com galatrox promoveu a produção de soros-ímmes contendo altos níveis de IgG específica para essa lectina. Esses anticorpos foram purificados por afinidade e reconheceram a galatrox em condições nativas (ELISA), dissociantes e/ou redutoras (Western-blot). Ainda nessa linha, foi demonstrado, que os anticorpos da classe IgG anti-galatrox são capazes de detectar tanto a forma dimérica quanto a monomérica dessa lectina. Esse conjunto de resultados sugerem que o(s) epítipo(s) reconhecido(s) pelos anticorpos anti-Galatrox sejam lineares e/ou conformacionais como demonstrado para outros anticorpos (NEZLIN, 1994). Além disso, a galatrox apresentou um forte caráter imunogênico diferentemente de outros componentes protéicos de peçonhas de serpente (STEPHANO *et al.*, 2005).

5.3- Galatrox interage com glicoconjugados de neutrófilos

Neutrófilos humanos incubados com Galatrox-FITC apresentaram um padrão de marcação onde os tratamentos com as doses de 8 à 32 μ g/mL apresentaram uma maior porcentagem de células positivas (marcadas com Galatrox-FITC) além de responderem à uma curva dose-dependente com relação ao valor da mediana da intensidade de fluorescência emitida pelas células marcadas. Assim, essa marcação sugere que essas células possuam ligante(s) para essa lectina.

A interação entre neutrófilos humanos e Galatrox foi deslocada em quase 50% quando as células foram incubadas com D-lactose, indicando que a Galatrox através de seu sítio lectínico possa reconhecer em neutrófilos, glicoconjugado(s) contendo resíduos de lactose. Apesar desses resultados serem pioneiros para lectinas de serpentes, achados semelhantes foram descritos para outras lectinas animais como a galectina-3 (NIEMINEN *et al.*, 2005), galectina-1 (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003) e galectina-8 (NISHI *et al.*, 2003).

A ativação de leucócitos induzida por atraentes envolve acoplamento de receptores de superfície a proteínas ligantes ao nucleotídeo guanina (proteínas G) sensíveis a toxina pertusis e contendo 7 domínios transmembrana (THELEN *et al.*, 1988; OMANN *et al.*, 1992; STRADER *et al.*, 1994; BEN-BARUCH *et al.*, 1995). Esses receptores acoplados a proteína G possuem diferentes padrões de glicosilação. Todos os receptores clonados até hoje apresentam pelo menos uma sequência de consenso para N-glicosilação no domínio extracelular. A glicosilação

geralmente está localizada nas extremidades do amino terminal da proteína (BEN-BARUCH *et al.*, 1995), que corresponde ao sítio de interação com os atraentes de neutrófilos, como descrito para a IL-8 (WU *et al.*, 1996; LEHMANN *et al.*, 2008). Assim, tais receptores poderiam ser alvo de reconhecimento pela Galatrox.

5.4- Indução de liberação de espécies reativas do oxigênio em neutrófilos humanos

Durante o processo de fagocitose agentes invasores, neutrófilos aumentam seu consumo de oxigênio molecular, um evento conhecido *burst* oxidativo. Este evento resulta na produção de EROs. Sabe-se que o aumento de espécies de oxigênio é devido a atividade da NADPH oxidase, uma enzima transmembrana que cataliza a produção de radical superóxido a partir de oxigênio e NADPH (FREITAS *et al.*, 2010). Os resultados de quimioluminescência amplificada com luminol, indicaram que a Galatrox induz fracamente a explosão respiratória em neutrófilos humanos não primados quando comparado ao controle com neutrófilos tratados com PMA. Outra lectina, a ArtinM (isolada da *Artocarpus integrifolia*) foi capaz de induzir diretamente o *burst* oxidativo em neutrófilos em uma maior intensidade (TOLEDO *et al.*, 2009).

O processo de *priming* é um evento crucial com objetivo de otimizar a resposta neutrofílica, aumentando, por exemplo, seu potencial fagócito e microbicida. Um dos principais eventos do *priming* dessas células consiste, além do efeito direto de polarização celular, deformabilidade e expressão do complexo integrina-selectina, em acelerar a geração de espécies reativas intermediárias de oxigênio e desgranulação de grânulos contendo agentes pró-inflamatórios em resposta a um estímulo subsequente. O mecanismo do processo de *priming* de neutrófilos é complexo e pode envolver a mobilização de cálcio, fosforilação de proteína e a mobilização de grânulos acompanhada pelo aumento da exposição de receptores na superfície celular (WATSON *et al.*, 1998; hallet *et al.*, 1995; almkvist *et al.*, 2001)

Algumas lectinas da família das galectinas são responsáveis por apresentarem o efeito de indução de liberação de espécies reativas do oxigênio em neutrófilos quando essas células são primadas com fMLP. Foi proposto por ALMKVIST e colaboradores, em 2002, que o efeito *priming* do fMLP em neutrófilos pode provocar a oferta de proteínas ligantes de Galectina-1 na superfície da célula que estão envolvidas na explosão respiratória mediada por esta lectina. Além disso,

o autor ainda propõe que proteínas ligantes de galectina-1 podem ter sido derivadas de organelas de mobilização rápida como as vesículas secretórias e/ou grânulos de gelatinase, pois o tempo de *priming* foi de 5 e 15 minutos. Ainda, a Galectina-3 também é capaz de promover explosão respiratória apenas em neutrófilos primados com fMLP (ALMKVIST *et al.*, 2001). A Galatrox apresentou um padrão de forma dose depende de indução de *burst* quando tratadas neutrófilos primados por fMLP. Na concentração de 20µg/mL, a Galatrox promoveu a produção de EROs consideravelmente maior que a mesma concentração em neutrófilos não primados. Ainda, o respectivo tratamento com a amostra previamente incubada com lactose reduziu a valores próximos ao controle negativo, inibindo a capacidade de explosão oxidativa pelos neutrófilos. Levando em consideração os resultados obtidos com outras lectinas apresentadas acima, o processo de *priming*, pelo fMLP, de neutrófilos humanos tem a capacidade de expressar receptores de membrana de caráter que possuem uma interação com a Galatrox de forma açúcar-dependente.

5.5- Galatrox e recrutamento neutrofilico *in vitro*

Macrófagos ativados produzem uma lectina ligante de β -galactose, MNCF (“Macrophage-derived neutrophil Chemoattractant Factor”) (DIAS-BARUFFI *et al.*, 1993), diversas citocinas e mediadores inflamatórios. Alguns desses produtos recrutam neutrófilos. Essa atividade é biologicamente coerente com as necessidades de um tecido, onde macrófagos residentes são estimulados e desempenham papel de “células de alerta” (KAZMIEROWSHI *et al.*, 1977).

Galatrox induz migração de neutrófilos humanos *in vitro* em câmara de Boyden modificada (microcâmara de 48 poços) obedecendo à uma curva dose-resposta (Figura 10). A mesma atividade já foi descrita para outras lectinas quimiotáticas como a lectina vegetal KM+ (SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994) e MNCF-r (DIAS-BARUFFI *et al.*, 1995b).

A hipótese de que o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) das Galatrox esteja envolvido na atividade indutora de migração (DIAS-BARUFFI *et al.*; 1995; DIAS-BARUFFI *et al.*, 1998) é reforçada pelo ensaio de migração “*in vitro*” de neutrófilos humanos utilizando Galatrox previamente tratadas com glicanas (lactose e sacarose). A atividade de quimiotaxia para neutrófilos humanos foi inibida, preferencialmente, na presença de lactose, enquanto o tratamento com sacarose não obteve um perfil de inibição. Resultados obtidos por Moreno (2002)

demonstraram que a atividade quimiotática induzida pelo mediador MNCf-r em neutrófilos está associado ao reconhecimento de componentes glicosilados na superfície destas células, e que a sinalização celular envolve a participação da proteína G. Nessa linha, vários dados da literatura tem demonstrado que o CRD de várias lectinas derivadas de animais está envolvido nos diferentes eventos biológicos dessas moléculas (ABDU-ALLAH *et al.*, 2008; GOURDINE *et al.*, 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2008).

5.6- Avaliação do potencial quimioatrativo da Galatrox *in vivo*

A atividade pró-inflamatória proporcionada por lectinas vem sendo amplamente estudada. Sua capacidade de ativação de neutrófilos por meio da interação à receptores de membrana e a adesão à laminina presente na matriz extracelular, está intimamente ligada no evento da passagem dessas células através da membrana basal até os sítios de inflamação (WOO *et al.*, 1990, KUWABARA & LIU, 1996; AMANTEA *et al.*, 2009).

Assim, o presente trabalho é pioneiro quanto à demonstração experimental de que uma lectina purificada de peçonha da serpente *Bothrops atrox* (Galatrox) é capaz de induzir migração de neutrófilos *in vivo* para a cavidade peritoneal. A condição ótima de indução de migração de neutrófilos *in vivo* foi atingida desafiando os animais com a dose de 50µg/camundongo por 4 horas (Figuras 11 e 12). Esses resultados sugerem que a Galatrox apresenta um caráter pró-inflamatório agudo como descrito para lectinas de origem animal (DIAS-BARUFFI *et al.* 1995; MATSUMOTO *et al.*, 2008; NIEMINEN *et al.*, 2008) e vegetal (SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994; COELHO *et al.*, 2006).

Diferentemente da Galatrox, outra lectina animal, a galectina-1, não induz a migração de neutrófilos tanto *in vivo* como *in vitro* (LA *et al.*, 2003; COOPER *et al.*, 2008). Além disso, a galectin-1 é capaz de inibir o recrutamento de neutrófilo em modelos de peritonite aguda induzida por IL-8, sendo que este efeito inibidor associadso a inibição do rolamento e adesão dessas células ao endotélio ativado (LA *et al.*, 2003; COOPER *et al.*, 2008). Ainda nessa linha, a lectina MNCf é capaz de mediar a migração de neutrófilos por meio da interação com componentes da matriz extracelular, como a laminina (TOLEDO *et al.*, 2007). Assim, como a Galatrox foi capaz de interagir com a superfície de neutrófilos (Figura 7), induzir migração de neutrófilos *in vitro* (Figura 9) e com bases nos dados de literatura acima, sugerimos

que a Galatrox possa promover o recrutamento de neutrófilos por um mecanismo direto que pode estar associado a regulação positiva da interação neutrófilo-endotélio, neutrófilo-matriz extracelular como demonstrado para a lectina animal MNCF (DIAS-BARUFFI *et al.* 1995; TOLEDO *et al.*, 2007; TOLEDO *et al.*, 2008).

5.7- Galatrox induz *in vivo* e *in vitro* a liberação de citocinas pró-inflamatórias

As citocinas são importantes na sinalização entre as células, à medida que a reação inflamatória se desenvolve. Nas etapas iniciais, citocinas como IL-1 e IL-6 podem ser liberadas das células do tecido em que está ocorrendo a reação inflamatória. Os linfócitos e as células mononucleares que chegam ao sítio da inflamação podem se tornar ativados pelo antígeno e, então, podem liberar suas próprias citocinas (IL-1, TNF, IL-4, IL-10, INF- γ e outras), que aumentam ainda mais a migração celular pelas suas ações sobre o endotélio local.

IL-1 α é uma citocina presente na fase aguda do processo inflamatório e pode ser liberada por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células imunes como macrófagos e mastócitos, além de células da glia como células de Schwann, microglia e astrócitos (WATKINS *et al.*, 1995; COPRAY *et al.*, 2001; SOMMER & KRESS, 2004; THACKER *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a liberação de IL-1 α pode ser detectada em camundongos tratados com Galatrox em modelo de peritonite a partir do respectivo sobrenadante do lavado celular. No entanto, em cultura *in vitro* de células de baço, a lectina não foi capaz de induzir a liberação dessa citocina nas respectivas doses e tempo de tratamento. Estudos relacionados a resposta inflamatória com peçonha de *Bothrops asper* relatam que tanto em achados clínicos, com pessoas envolvidas em acidentes com a respectiva espécie de serpente, como ensaios em animais experimentais (indução de edema de pata em camundongo), a presença de IL-1 no soro é inexistente (revisado por TEIXEIRA *et al.*, 2009). Assim, o perfil apresentado pela Galatrox nos dois experimentos sugere a liberação de IL-1 α seja devido ao envolvimento de células locais do sítio de inflamação e/ou macrófagos residentes, uma vez que a não detecção dessa citocina em cultura de células do baço possa ser devido a baixos níveis dessas células especializadas na expressão de IL-1 α .

TNF- α é uma das principais citocinas pró-inflamatórias que medeiam diversas respostas e produzidas principalmente por macrófagos ativados. Assim como a IL-1, o TNF- α apresenta-se em níveis basais quando avaliados soros de humanos acometidos a acidentes com a espécie *Bothrops asper* e animais experimentais induzidos com peçonha dessa espécie (AVILA-AGÜERO *et al.*, 2001; LOMONTE *et al.*, 2009). A Galatrox apresentou um perfil de produção dessa citocina quando tratadas com células do baço, sendo a concentração de 10 μ g/mL de maior liberação. No entanto, o experimento *in vivo* não apresentou liberação da citocina (Figura 14). BARROS e colaboradores (1998) evidenciaram a liberação de TNF- α em camundongos tratados com a peçonha bruta de *B. atrox* em ensaio *in vivo* no qual o valor máximo foi obtido após 18 horas da injeção intraperitoneal. No entanto, o sobrenadante de células do baço tratados com a peçonha não apresentou o envolvimento dessa citocina.

O IFN- γ é uma citocina produzida principalmente por células T e células *Natural Killer* (MAEYER & MAEYER-GUIGNARD, 1998), entretanto a produção também pode ser detectada por macrófagos murinos após a estimulação combinada com IL-12 e IL-8 (MUNDER *et al.*, 1998). O tratamento de células do baço com a Galatrox apresentou uma liberação de IFN- γ na qual, devido a presença majoritária de Linfócitos T (em seus clones Th1 e Th2) no tecido esplênico seja um indicativo de uma resposta imune específica preferencialmente Th1. Ainda, a respectiva citocina produzida por essa população de linfócito atua também como regulador negativo da resposta Th2, possivelmente justificado nesse trabalho pela não detecção de IL-10 (liberada por linfócitos Th2) no material analisado. ZAMUNER e colaboradores (2005) avaliaram a produção de IFN- γ em exudatos de camundongos tratados com veneno bruto de *Bothrops asper* como sendo uma resposta tardia. A peçonha bruta de *Bothrops atrox* induziu, *in vivo*, a liberação de INF- γ com valores máximos em 4 horas após a injeção intraperitoneal e prolongando até 12 horas, enquanto que quando utilizada no tratamento de esplenócitos, a peçonha não apresentou a potencial de liberação dessa citocina (BARROS *et al.*, 1998). Com base nesse conjunto de resultados sugere-se que a Galatrox pode participar da resposta inflamatória aguda por promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

5.8- Galatrox interage seletivamente com a laminina, um importante componente glicosilado da matriz extracelular.

Considera-se que um bom indutor de migração de leucócitos deva atender aos requisitos de ligar-se a proteoglicanas do endotélio, disparar a adesão de leucócitos e estimular a migração de células por haptotaxia e/ou quimiotaxia (HUBER *et al.*, 1991; TANAKA *et al.*, 1993, Rot 1992 já enviada por e-mail, Rot 1993). Laminina e fibronectina são glicoproteínas que compõe a matriz extracelular de tecidos. A laminina em especial tem sua estrutura glicídica composta por resíduos poli-lactosamínicos. GANIKO em 2005 demonstrou que o gradiente haptotático da lectina vegetal KM+ para o recrutamento de neutrófilos é viabilizado pela ligação da lectina a laminina, cujas glicanas são reconhecidas pela lectina na membrana basal do endotélio.

Ensaio de ligação *in vitro* da Galatrox com componetes da MEC, comprovou a especificidade da Galatrox à laminina (um dos principais componentes da MEC; MARTIN *et al.*, 1988), e não à fibronectina, de forma dose-dependente. Assim, o estabelecimento de interação Galatrox-laminina poderia auxiliar na formação, *in vitro* e/ou *in vivo*, de um possível gradiente haptotático dessa lectina. Ainda, a interação entre a laminina e a Galatrox pode confirmar a capacidade do domínio de reconhecimento de carboidrato dessa lectina de reconhecer resíduos de lactose. Uma vez que a interação Galatrox-Laminina foi inibida por esse açúcar (Figura 15) e por ser laminina é uma glicoproteína rica em polilactosaminas (Do et al, 1990)

Os resultados obtidos neste trabalho reúnem evidencias de que a Galatrox apresenta uma atividade modulatória pró-inflamatória, estando intimamente relacionada na migração de neutrófilo para o foco inflamatório por meio da interação direta com glicoconjugados da superfície desse leucócito e presentes na matriz extracelular, sugerindo que sua ação quimioatraente se faça por um mecanismo haptotático, com descrito para a IL-8 (ROT, 1993). Entretanto, a Galatrox foi capaz de induzir a produção de mediadores inflamatórios, como IL-1 e TNF, que poderiam participar da migração de neutrófilos para o foco inflamatório. Estudos futuros deverão ser realizados para avaliar a participação dessas citocinas sobre a atividade quimioatraente para neutrófilos induzida pela Galatrox.

Assim, produção de anticorpos anti-Galatrox proporcionam uma importante ferramenta que poderá contribuir para a amplificação e aprofundamentos dos estudos moleculares e funcionais da interação Galatrox-neutrófilo através de seu receptor de membrana. O caráter inflamatório da Galatrox vai de encontro à achados por outros autores por outras lectinas, dando justificativas para a continuidade dos

experimentos com objetivo de comprovar o mecanismo e função no processo inflamatório que a lectina exerce.

6. CONCLUSÃO

O projeto propôs investigar o papel da Galatrox, uma lectina ligante de lactose isolada da peçonha de *Bothrops atrox*, no processo inflamatório e a produção de anticorpos anti-Galatrox. Os resultados obtidos nas condições experimentais utilizadas nos permitiram concluir que:

√ A obtenção e avaliação de preparações homogêneas de Galatrox através de processos cromatográficos e SDS-PAGE proporcionaram o isolamento de uma lectina dimérica, com massa molar aparente de 28 kDa e recuperação protéica de 0,3% (p/p em relação a peçonha bruta). A avaliação do caráter lectínico por ensaio de hemaglutinação confirmou essa lectina liga-se especificamente à lactose.

√ A imunização de camundongos permitiu a produção de anticorpos policlonais anti-Galatrox da classe IgG, capazes de detectar tanto a forma dimérica quanto a monomérica dessa lectina.

√ A Galatrox interage com a superfície de neutrófilos e esta interação foi inibida por lactose não por sacarose.

√ A lectina induziu o *burst* oxidativo em neutrófilos humanos primados com fMLP e foi pouco eficiente em promover este efeito em neutrófilos não-primados. Na presença de lactose, a Galatrox teve seu efeito oxidativo diminuído em neutrófilos primados.

√ Em experimento *in vitro*, a lectina apresentou um perfil dose-dependente de indução de migração de neutrófilos humanos. A atividade quimioatraente da galatrox para neutrófilos foi inibida pela lactose.

√ A Galatrox a induziu migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos do modo dose e tempo dependente. Nos lavados dessas cavidades foram detectadas as citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-6. Entretanto, as presenças de TNF- α e NO não foram demonstradas.

√ A Galatrox induziu a liberação de INF- γ e TNF- α para o sobrenadante de cultura de células do baço de camundongos tratadas com Galatrox. No entanto, IL-1 α , IL-6, IL-10 e NO não foram detectadas.

√ A Galatrox interage com laminina, uma importante glicoproteína da matrix extracelular, de modo dependente do reconhecimento de carboidratos. Entretanto, essa lectina não interage com fibronectina, um outro componente da matriz extracelular.

7. REFERÊNCIAS

- ABDU-ALLAH, H.H., TAMANAKA, T., YU, J., ZHUOYUAN, L., SADAGOPAN, M., ADACHI, T., TSUBATA, T., KELM, S., ISHIDA, H., KISO, M. Design, synthesis, and structure-affinity relationships of novel series of sialosides as CD22-specific inhibitors. **J. Med. Chem.** v.51, p.6665-6681, 2008.
- ALENCAR, N.M., ASSREUY, A.M., ALENCAR, V.B., MELO, S.C., RAMOS, M.V., CAVADA, B.S., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** v.35, p.1674-1681, 2003.
- ALENCAR, V.B., ASSREUY, A.M., ALENCAR, N.M., MEIRELES, A.V., MOTA, M.R., ARAGÃO, K.S., CAJAZEIRAS, J.B., NAGANO, C.S., BRITO, G.A., SILVA, L.I., PINTO, V.P., SAMPAIO, A.H., DEBRAY, H., CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in-vivo* and *in-vitro* neutrophil migration. **J. Pharm. Pharmacol.** v.57, p.375-81, 2005.
- ALMKVIST, J., FALDT, J., DAHLGREN, C., LEFFLER, H., KARLSSON, A. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-Leu-Phe. **Infection and immunity.** v. 69, p. 832-7, 2001.
- ALMKVIST, J., DAHLGREN, C., LEFFLER, H., KARLSSON, A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. **Journal of immunology.** v. 168, p. 4034-41, 2002.
- AMANTEA, D., NAPPI, G., BERNARDI, G., BAGETTA, G., CORASANITI, M.T. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. **FEBS J.** v.276, p.13-26, 2009.
- AMINOFF, D., MORGAN, W.T.J., WATKINS, W.M. The isolation and properties of the human blood-group a substance. **Biochem J.** v.46, p.426-438, 1950.
- ASHWELL, G., MORELL, A.G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. **Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.** v.41, p.99-128, 1974.
- AUGER, M.J. ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: LEWIS, C.E., MCGEE, J.O. **The Natural Immune System the macrophage**, IRL Press, p. 3-74, 1992.
- AVILA-AGÜERO, M.L., PARÍS, M.M., HU, S., PETERSON, P.K., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., FAINGEZICHT, I. Snakebite Study Group. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. **Pediatr. Emerg. Care.**, v. 17, p. 425-9, 2001.
- BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American journal of medical genetics.** v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.
- BARONDES, S.H., CASTRONOVO, V., COOPER, D.N., CUMMINGS, R.D., DRICKAMER, K., FEIZI, T., GITT, M.A., HIRABAYASHI, J., HUGHES, C., KASAI, K., LEFFER, H., LIU, F.T., LOTAN, R., MECURIO, A.M., MONSINY, M., PILLAI, S., BIENENSTOCK, J. BEFUS, A.D., DENBURG, J.A. Mast cell heterogeneity: basic questions and clinical implications. In: BIENENSTOCK, J. BEFUS, A.D., DENBURG, J.A. Mast cell differentiation and heterogeneity. **Raven Press, Inc.** p. 379-402, 1986.

- BARROS, S.F., FRIEDLANSKAIA, I. PETRICEVICH, V.L., KIPINI, T.L. local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Med. Inflamm.**, v. 7, p. 339-46, 1998.
- BETTELLI, E., OUKKA, M., KUCHROO, V.K. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat. Immunol.** Vol. 8, p. 345–350, 2007.
- BEN-BARUCH, A., MICHIEL, D.F., OPPENHEIM, J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **J. Biol. Chem.** v. 270, p.11703-11710, 1995.
- BIENESTOCK, J., BEFUS, A.D., DENBURG, J.A. Mast cell heterogeneity: basic questions and clinical implications. In: BEFUS, A.D., BIENESTOCK, J., DENBURG, J.A. Mast cell differentiation and heterogeneity. **Raven Press, Inc.** p.379-402.
- BIGNOLD, L.P. Kinetics of chemo-attraction of polymorphonuclear leukocytes towards N-formyl peptide studied with a novel polycarbonate (Nucleopore) membrane in the Boyden chamber. **Experientia.** v.44, p. 518-s21, 1988.
- BRANDLEY, B.K., SCHNAAR, R.L. Cell-surface carbohydrates in cell recognition and response. **J. Leukoc. Biol.** v.40, p.97-111, 1986.
- BRANDES, M.E., MAI, U.E., OHURA, K., WAHI, S.M. Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophil mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. **J. immunol.** V. 147, p.1600-1606, 1991.
- BRASILEIRO-FILHO, G. Patologia Geral. Ed. Guanabara Koogan, vol. 2, p.111, 1993.
- BROWN, J.C., HUNT, A. Lectins. **Int. Rev. Cyto.**, v. 52, p.277-349, 1978.
- BURNET, F.M. Mucoproteins in relation to virus action. **Physiol.** v.31, p.131-150, 1951.
- CABRAL, G.A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life sciences.**, v. 77, p. 1699-710, 2005.
- CARDOSO, J.L.C. Ofídios – *Bothrops* (jararaca, cruzeira). In: NICOLELA, A., BARROS, E., TORRES J.B. **Acidentes com animais peçonhentos – Consulta rápida.** Ministério da Saúde, p. 47, 1997.
- CARVALHO, H. F; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula.** São Paulo: Manole, 2001.
- CARVALHO, D.D.; MARANGONI, S., NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **J. Protein Chem.** v. 21, p. 43-50, 2002.
- CASTRO, H.C., LEMOS, M.G., BOM, C., ZINGALI, R.B. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. **Toxicon.** v. 41, nº 4, p. 525-528, 2003.
- CHEUNG, K., ARCHIBALD, A.C., ROBINSON, M.F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **Journ. Immunol**, v.130, p.2324-2329, 1983.
- COELHO, M.B., DeSOUZA, I.A., FREIRE, M.G.M., MARANGONI, S., ANTUNES, E., MACEDO, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon.** v.48, p.529-535, 2006

- COFFMAN, R.L. Origins of the TH1-TH2 model: a personal perspective. **Nat. Immunol.** Vol. 7, p.539–541, 2006.
- COLLINS, T. Acute and Chronic Inflammation. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins – Pathologic Basis of Disease**. 6th edition, Saunders, p. 50-87, 1999.
- COOK, G.M. Cell surface carbohydrate: molecules in search of a family? **J. Cell. Sci.** v.4, p.45-70, 1986.
- COOPER, D.N., BARONDES, S.H., God must love galectinas; the made so many of them. **Glycobiology**. v. 9, n. 10, p. 979-84, 1999.
- COOPER, D., NORLING, L.V., PERRETTI, M. Novel insights into the inhibitory effects of Galectin-1 on neutrophil recruitment under flow. **J. Leukoc. Biol.** v.83, p.1459-1466, 2008.
- COPRAY, J.C., MANTINGH, I., BROUWER, N., BIBER, K., KÜST, B.M., LIEM, R.S., HUITINGA, I., TILDERS, F.J., VAN DAM, A.M., BODDEKE, H.W. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. **J. Neuroimmunol.**, v.2, p. 203-11, 2001.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robins pathologic basis of diseases**. 6th edition, USA-Saunders Company, p. 69-75, 1999.
- DE TOLEDO, K.A., BERNARDES, E.S., BARUFFI, M.D, ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil induced by mouse MNCF: interactions with matrix glycoproteins probably contribute to overcoming the anti-inflammatory action of dexamethasone. **Inflamm. Res.** Vol. 56, p. 368-376, 2007.
- DENNIS, J.W., GRANOVSKY, M., WARREN, C.E. Protein glycosylation in development and disease. **Bioessays**, v.21, p. 412-421, 1999.
- DEUEL, T.F., SENIOR, R.M., CHANG, D., GRIFFIN, G.L., HEINRIKSON, R.L. KAISER, E.T. Platelet factor 4 is chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil-chemotactic-factor. **Mediators inflamm.** v. 4, p. 52-53, 1981.
- DIAS-BARUFFI, M., ROQUE-BARREIRA, M.C., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Biological characterization of purified macrophage-derived neutrophil chemotactic factor. **Mediators Inflamm.** v.4, p.263-269, 1995.
- DIAS-BARUFFI, M., PEREIRA-DA-SILVA, G., JAMUR, M.C., ROQUE-BARREIRA, M.C. Heparin potentiates in vivo neutrophil migration induced by IL-8. **Glycoconj. J.** v.15, p.523-526, 1998.
- DIAS-BARUFFI, M., ZHU, H., MOON-JAE, C.H.O., KARMAKAR, S., MCEVER, R.P., CUMMINGS, R.D. Galectin-1 induction of Adapararesis in Human leukocytes. **Glycobiology**. v. 11, p. 889, 2001.
- DIAS-BARUFFI, M., ZHU, H., CHO, M., KARMAKAR, S., MCEVER, R. P., CUMMINGS, R. D. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.41282-41293, 2003.
- DOHERTY, D.E., HASLETT, C., TONNESEN, M.G., HENSON, P.M. Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate a adherence to human endothelium. **J. immunol.** v.138, p. 1762-1771, 1987.

- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47, 2002.
- 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 USA**. Vol. 87, p.401-404, 1990.
- FARSKY, S.H. BORELLI, P. FOCK, R.A. PROTO, S.Z. FERREIRA JR, J.M.C. MELLO, S.B.V. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on the leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. **Inflamm. Res.**, v. 53, p. 442-52, 2004.
- FEGHALI, C.A., WRIGHT, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front. Biosci.**, v. 2, p. 12-26, 1997.
- FEILI-HARIRI, M., FALKNER, D.H., MOREL, P.A. Polarization of naïve T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations implications for immunotherapy. **J. Leukocyte Biol.**, v. 78, p. 656-64, 2005.
- FEIZI, T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. **Nature**, v.314, p.53-57, 1985.
- FOXMAN, E.F., CAMPBELL, J.J., BUTCHER, E.C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 1349-1360, 1997.
- FRANÇA, F.O.S. **Associação de venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão do Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan/SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais.** Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1997.
- FREITAS, M., PORTO, G., LIMA, J.L., FERNANDES, E. Zinc activates neutrophils' oxidative burst. **Biomaterials**, v.1, p.31-41, 2010.
- FUKUDA, M.N., DELL, A., OATES, J.E., WU, P., KLOCK, J.C., FUKUDA, M. Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. The presence of a series of linear poly-N-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells. **J. Biol. Chem.** v.260, p.1067-82, 1985.
- GANIKO, L., MARTINS, A.R., FREYMÜLLER, E., MORTARA, R.A., ROQUE-BARREIRA, M.C. Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1721p.152-163, 2005
- GARTNER, T. K., STOCKER, K., WILLIAMS, K. C. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Lett.** v.117, p.13-16, 1980.
- GARTNER, T. K., OGILVIE, M. L. Isolation and characterization of three Ca²⁺-dependent β -galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochem. J.**, v. 224, p.301-307, 1984.
- GILBERT, S.F., GREENBERG, J.P. Intellectual traditions in the life sciences. II. Stereocomplementarity. **Perspect. Biol. Med.** v.28, p.18-34, 1984.
- GOLDSTEIN, I.J., HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** v.35, p.127-340, 1978.

- GÓMEZ-LEIVA, M.A., ARAGÓN-ORTIZ, F. Purification and some properties of hemagglutinating protein mutina from bushmaster *Lachesis muta* snake venom. **Rev. Biol. Trop.** v. 34, p. 49-53, 1986.
- GOURDINE, J.P., CIOCI, G., MIGUET, L., UNVERZAGT, C., SILVA, D.V., VARROT, A., GAUTIER, C., SMITH-RAVIN, E.J., IMBERTY, A. High affinity interaction between a bivalve C-type lectin and a biantennary complex-type N-glycan revealed by crystallography and microcalorimetry. **J. Biol. Chem.** v.283, p.30112-30120, 2008.
- GUIMARÃES-GOMES, V., OLIVEIRA-CARVALHO, A. L., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M., DUTRA, D. L. S., PUJOL-LUZ, M., CASTRO, H. C.; HO, P. L., ZINGALI, R. B. Cloning, characterization and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 432, p.1-11, 2004.
- HAKOMORI, S. Tumor-associated carbohydrate antigens. **Annu Rev Immunol**, v.2, p.103-26, 1984.
- HALLET, M.B. & LLOYDS, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say "amber" but not "green". **Immunol.**, v. 16, p.211-18, 1995.
- HARRISON F.L., CHESTERTON C.J. Erythroid developmental agglutinin is a protein lectin mediating specific cell-cell adhesion between differentiating rabbit erythroblasts. **Nature.** v.286, p.502-504, 1980.
- HATI, R., MITRA, P., SARKER, S., BHATTACHARYYA, K.K. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 29, p. 1-19, 1999.
- HAVT, A., TOYAMA, M. H., NASCIMENTO, N. R. F., TOYAMA, D. O., NOBRE, A. C. L., MARTINS, A. M. C., BARBOSA, P. S. F., NOVELLO, J. C., BOSCHERO, A. C., CARNEIRO, E M. A novel c-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire.** v. 37, p. 130-141, 2005.
- HUBER, A.R., KUNKEL, S.L., TODD, R.F., WEISS, J.S. Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. **Science.** v. 254, p.99-102, 1991.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.** v.9, p.401-410, 1964.
- KAY, A.B. Studies on eosinophil leukocyte migration. I. Eosinophil and Neutrophil accumulation following Antigen-Antibody reactins in Guinea-Pig skin. **Clin. Exp. Immunol.** v. 6, p. 75-86, 1970.
- KAZMIEROWSKI, J.A., GALLIN, J.I., REYNOLDS, H.Y. Mechanism for the inflammatory response in primate lungs. Demonstration and partial characterization of an alveolar macrophage-derived chemotactic factor with preferential activity for polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.** v.59, p.273-281, 1977.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

- KOMORI, Y., NIKAI, T., TOHKAI, T., SUGIHARA, H. Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p. piscivorus* (eastern cottonmouth). **Toxicon**, v. 37, p.1053–1064, 1999.
- KOWAL-VERN, A., WLANGA, J.M., SHAPR-PUCCI, M., HOPPENSTEADT, D., GAMELLI, R.L. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endothelin-1, and C1 esterase inhibitor. **J. Burn Care Rehabil.**, v. 18, p. 99-103, 1997.
- KUWABARA, I., LIU, F.T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **J. Immunol.**, v.156, p.3939-3944, 1996.
- KUMAR, V., ABBAS, A.K., ROBINS, N.F. COTRAN, R.S. Patologia-Bases patológicas das doenças. Ed. Elsevier, vol. 7, p.49-79, 2005.
- LA, M., CAO, T.V., CERCHIARO, G., CHILTON, K., HIRABAYASHI, J., KASAI, K., OLIANI, S.M., CHERNAJOVSKY, Y., PERRETTI, M. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. **Am. J. Pathol.** v.163, p.1505-1515, 2003.
- LAEMMELI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE W.H., DU X.Y., LU Q.M., CLEMETSON K.J., ZHANG Y. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. **Thromb. Haemost.** v. 90, p. 662-671, 2003.
- LEHMANN, D.M., SENEVIRATNE, A.M., SMRCKA, A.V. Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. **Mol. Pharmacol.** v.73, p.410-48, 2008.
- LIS, H. & SHARON, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. **Eur. J. Biochem.** v. 218, p. 1-27, 1993.
- LIS, H., SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chem Rev.** v.98, p.637-674, 1998.
- LIU, F.T., Regulatory roles of galectins in the immune response. **Allergy Immunology**. v. 136, p. 385-400, 2004.
- LIU, F.T., RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat. Ver. Cancer.** v. 5, p. 29-41, 2005.
- LÖFGREN, R., SERRANDER, L., FORSBERG, M., WILSSON, A., WASTESON, A., STENDAHL, O. CR3, FcγRIIA and FcγRIIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular Ca²⁺, phospholipase D and tyrosine phosphorylation. **Biochim Biophys Acta.** v. 13, n. 1, p. 1452, 1999.
- LOMONTE, B., GUTIERREZ, J.M., FURTADO, M. F., OTERO, R., ROSSO, J.P., VARGAS, O., CARMONA, E, ROVIRA, M. E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon.** v. 28, p. 1137-1146, 1990.
- MACAGNO, A., NAPOLITANI, G., LANZAVECCHIA, A. SALLUSTO, F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. **Trends Immunol.**, v. 28, p. 227-33, 2007.

- MAEYER, E., MAEYER-GUIGNARD, J. Interferons. In: THOMSON, A. **The cytokine handbook**. Academic Press, 1998.
- MAJNO, G., JORIS, I. Inflammation: The actors and their language. In: **Cells, tissues and disease**. Principles of general pathology. 2nd edition. Oxford University Press, p. 307-382, 2004.
- MALE, D. Introduction to the immune system. In: MALE, D., BROSTOFF, J., ROTH, D. B., ROITT, I. Immunology. **Elsevier**. Seventh edition, p. 3-18, 2006.
- MALY, P., THALL, A., PETRYNIAK, B., ROGERS, C.E., SMITH, P.L., MARKS, R.M., KELLY, R.J., GERSTEN, K.M., CHENG, G., SAUNDERS, T.L., CAMPER, S.A., CAMPHAUSEN, R.T., SULLIVAN, F.X., ISOGAI, Y., HINDSGAUL, O., VON ANDRIAN, U.H., LOWE, J.B. The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. **Cell**. v.86, p.643-653, 1996.
- MARCINKIEWICZ, C., LOBB; R. R., MARCINKIEWICZ, M. M., DANIEL, J. L., SMITH, J. B., DANGELMAIER, C., WEINREB, P. H., BEACHAM, D. A., NIEWIAEROWISKI, S. Isolation and characterization of EMS16, a C-type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alpha2beta1 integrin. **Biochemistry**. v. 39, p. 9859-9867, 2000.
- MARTIN, G.R., TIMPL, R., KUHN, K. Basement membrane proteins: molecular structure and function. **Adv. Protein Chem.** v.39, p.1-50,1988.
- MATSUMOTO, M., SHIGETA, A., MIYASAKA, M., HIRATA, T. CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil rolling in a context-dependent manner. **J. Immunol.** v.181, p.3628-3635, 2008.
- MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P. Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de lectina do veneno de *Bothrops atrox*. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.
- MOILANEN, E., KIRKKOLA, A.L., KANKAANRANTA, H., NIEMINEN, M.M., VAPAATALO. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ in isolated human polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation**. Vol. 17, p. 705-714, 1993.
- MORENO, A.N. A lectina MNCF: cinética da localização em macrófagos, papel na atividade de neutrófilos e mastócitos e mimetização de seu efeito pela lectina vegetal KM+. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2002.
- 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, p. 1402-10, 1998.
- MUNDER, M., MALLO, M., EICHMANN, K. MODOLELL, M. Murine macrophages secrete Interferon γ upon combined stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 2103-08, 1998.

- MURAMATSU, T. Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. **J. Cell. Biochem.** v.3, p.1-14, 1988.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 319-26, 1987.
- NEZLIM, R. Capítulo 1, p. 3-47. In: VA OSS, C.J., VAN REGENMORTEL, M.H.V. **Immunochemistry**, editor Marcel Dekker, Inc, 1st edition, (ISBN. 0-8247-9123-1), 1994.
- NIEMINEN, J., ST-PIERRE, C., SATO, S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. **J. Leukoc. Biol.** v.78, p.1127-35, 2005.
- NIEMINEN, J., ST-PIERRE, C., BHAUMIK, P., POIRIER, F., SATO, S. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. **J. Immunol.** v.180, p.2466-2473, 2008.
- NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. **Int. Rev. Cytol.** v. 39, p.89-190, 1974.
- NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; OHKURA, M.; OHIZUMI, Y.; SUGIHARA, H. Primary structure of the lectin from the venom of *Bitis arietans* (puff-adder). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, p. 1620-1622, 1995.
- NIKAI, T., KATO, S., KOMORI, Y., SUGIHARA, H. Amino acid sequence and biological properties of the lectin from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu). **Toxicon.** v.38, p. 707-711, 2000.
- NIRO, G.A., SMEDILE, A., ANDRIULLI, A., RIZZETTO, M., GERIN, J.L., CASEY, J.L. The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. **Hepatology**, v. 25, p. 728-34, 1997.
- NISHI, N., SHOJI, H., SEKI, M., ITOH, A., MIYANAKA, H., YUUBE, K., HIRASHIMA, M., NAKAMURA, T. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alphaM. **Glycobiology.** v.13, p. 755-763, 2003.
- OGILVIE ML, DOCKTER ME, WENZ L, GARTNER TK. Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. **J. Biochem.** v. 100, p. 1425-1431, 1986.
- OMANN, G.M., HARTEK, J.M., HASSAN, N., MANSFIELD, P.J., SUCHARD, S.J., NEUBIG, R.R. A threshold level of coupled G-proteins is required to transduce neutrophil responses. **J. Immunol.**, v. 149, p.2172-2178, 1992.
- OZEKI, Y., MATSUI, T., HAMAKO, J., SUZUKI, M., FUJIMURA, Y., YOSHIDA, E., NISHIDA, A. S., TITANI, K. C-type galactoside binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys. Aichi.** v. 308, p. 306-310, 1994.
- PANUNTO, P.C., DA SILVA, M. A., LINARDI, A., BUZIN, M. P., MELO, S. E., MELLO, S. M., PRADO-FRANCESCHI, J., HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon.** v. 47, p.21-31, 2006.
- POIRIER, F., RAZ, A. **Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins.** *Cell.* v.76, p.597-598, 1994a.

- RABINOVICH, G.A., RUBINSTEIN, N., TOSCANO, M.A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1572, p.274-284, 2002. Review.
- RADEMACHER, T.W., PAREKH, R.B., DWEK, R.A. Glycobiology. **Annu Rev Biochem**, v. 57, p.785-838, 1988.
- RANKIN, J.A., Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clinical issues**, v. 15, p.3-17, 2004.
- RAPPOLEE, D.A., WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v.1, p. 47-55, 1988.
- RAVEL, R.** Laboratório clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais. **Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. cap.23, p.323-342, 6ª edição, 1997.**
- REINER, S.L. Development in motion: helper T cells at work. **Cell.**, v. 129, p. 33-36, 2007.
- REIS E SOUSA, C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. **Semin. Immunol.** v. 1, p. 27-34, 2004.
- RETH, M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. **Nat. Immunol.**, v. 3, p. 1129, 2002.
- ROITT, I.M., BROSTOFF, J. MALE, D.K. **Imunologia.** 5ª edição, editora Manole, p.61-69, 1999.
- ROITT, I. M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. *Imunologia*, Ed. Manole, vol.6, p. 14, 2003.
- ROT, A. Neutrophil attraction/ activation protein-1 (Interleukin-8) to resident dermal cells. **Eur. Immunol.**, v.23, p.303-306, 1992.
- ROT, A. Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. **Eur. J. Immunol.**, v. 1, p. 303-6, 1993.
- SAADI, S. WRENSHALL, L.E., PLATT, J.L. Regional manifestations and control of the immune system. **Faseb J.** v. 16, p. 849-56, 2002.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., DIAS-BARUFFI, M., THOMAZ, S.M., BELTRAMINI, L.M., ROQUE--BARREIRA, M.C.. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **Journ. Immunol.**, v.153, p.1798-1807, 1994.
- SAUER, H., WARTENBERG, M. HESCHELER, J. Reactive oxygen species as intracellular messenger during cell growth and differentiation. **Cell Physiol. Biochem.** v. 11, p. 173-86, 2001.
- SEGAL, A.W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol.** Review. v.23, p.197-223, 2005.
- SENO, T., INOUE, N. GAO, D., OKUDA, M., SUMI, Y., MATSUI, K. Involvement of NADH/NADPH oxidase in human platelet ROS production. **Throm. Res.**, v. 103, p. 399-409, 2001.
- SHARON, N., LIS, H. Lectin biochemistry. New way of protein maturation. **Nature.** v. 323, p.203-4, 1986.

- SHARON, N., LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.
- SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, p.53R-62R, 2004.
- SINGH, R. B.; NIAZ, M. A.; RASTOGI, S. S. Effect of hydrosoluble coenzyme Q10 on blood pressure and insulin resistance in hypertensive patients with coronary heart disease. **J. Hum. Hypertens.**, v. 13, p. 203-208, 1999.
- SNYDERMAN, R., GOETZL, E.J. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. **Science**. V.213, p. 830-837, 1981.
- SOMMER, C., KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neurosci. Lett.**, v. 361, p. 184-7, 2004.
- SPRINGER, T.A., Adhesion receptors of the immune system. Nature. London. v. 346, p. 425-34, 1990.**
- SPRINGER, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.** v. 57, p. 827-872, 1995.
- STEINMAN, L. A brief history of TH-17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat. Med.** Vol. 13, p.139–145, 2007.
- STEPHANO, M.A., GUIDOLIN, R., HIGASHI, H.G., TAMBOURGI, D.V., SANT'ANNA, O.A. The improvement of the therapeutic anti-Lachesis muta serum production in horses. **Toxicon**, v.45, p. 467-473, 2005.
- STOOLMAN, L.M., Adhesion molecules controlling lymphocyte migration. The Journal of cell biology, v. 56, p. 907-10, 1989.**
- STRADER, C.D., FONG, T.M., TOTA, M.R., UNDERWOOD, D., DIXON, R.A. Structure and function of G protein-coupled receptors. **Annu. Rev. Biochem.**, v.63, p.101-132, 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. Vol. 162, p.2334-2340, 1999.**
- TANAKA, Y., ADDAMS, D.H., SHAW, S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. Immunol. Today, v.14, p.111-115, 1993.**
- TAPPER, H. The secretion of performed granules by macrophages and neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, p. 613-20, 1996.
- TEDGUI, A., MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanism in the vascular wall. **Circ. Res.** v. 88, p. 877-887, 2006.
- TEICHBERG, V.I., SILMAN, I., BEITSCH, D. D., RESHEFF, G. A β -d-galactoside binding protein from electric organ of *Electrophorus electricus*. **Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.** v. 72, p.1383-1387, 1975.
- TEIXEIRA, C., CURY, Y., MOREIRA, V., PICOLOB, G., CHAVES, F. Inflammation induced by Bothrops asper venom. **Toxicon**. 2009 Dec 1;54(7):988-97. Review.

- THACKER, M.A., CLARK, A.K., MARCHAND, F., MCMAHON, S.B. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. **Anesth. Analg.**, v. 3, p. 838-47, 2007.
- THELEN, M., PEVERI, P., KERNEN, P., VON TSCHARNER, V., WALZ, A., BAGGIOLINI, M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte-derived peptide agonist. **FASEB J.** v.2, p.2702-2706, 1988.
- TOLEDO, K.A., PEREIRA, F.L., MAMBOLE, A., LESAVRE, P., ROQUE-BARREIRA, M.C., HALBWACHS-MECARELLI, L. The macrophage-derived neutrophil chemotactic factor, MNCF: a lectin with TNF-alpha-like activities on neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 4, p.764-9, 2008.
- TOLEDO, K.A., SCWARTZ, C., OLIVEIRA, A.F., CONRADO, M.C., BERNARDES, E.S., FERNANDES, L.C., ROQUE-BARREIRA, M.C., PEREIRA-DA-SILVA, G., MORENO, A.N. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunol. Lett.**, v. 123, p. 14-20, 2009.
- TOURA, I., KAWANO, T., AKUTSU, Y., NAKAYAMA, TAKENORI, T. O., TANIGUCHI, M. Cutting Edge: Inhibition of Experimental Tumor Metastasis by Dendritic Cells Pulsed with -Galactosylceramide1. **J. Immunol.** v.163, p.2387-2391, 1999.
- TOYAMA, M.H., CARNEIRO, E.M., MARANGONI, S., AMARAL, M.E.C., VELLOSO, L.A., BOSCHERO, A.C. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J. Protein Chem.** v. 20, p. 585-591, 2001.
- VAN DEN BERG, C., VAN AMSTERDAM, J.G., BISSCHOP, A., PIET, J.J., WEMER, J., DE WILDT, D.J. Septic shock: no correlation between plasma levels of nitric oxide metabolites and hypotension or lethality. **Eur. J. Pharmacol.** v. 4, p. 379-82, 1994.
- VAN EEDEN, S.F., KITAGAWA, Y., SATO, Y., HOGG, J.C. Polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow and acute lung injury. **Chest.** V.116, p.43S-46S, 1999.
- VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J., FREEZE, H., HART, G., MARTH, J. **Essentials of Glycobiology, 1st Ed.**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., Boston. 1999.
- VERUSKA, B.M., ALENCAR, WEIS, W.I. & DRICKAMER, K. **Structural basis of lectin-carbohydrate recognition.** Annu. Rev. Biochem. v.65, p. 441-473, 1996.
- WATKINS, L.R., MAIER, S.F., GOEHLER, L.E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**, v.3, p. 289-302. 1995.
- WATSON, F., EDWARDS, S.W. Stimulation of primed neutrophils by soluble immune complexes: priming leads to enhanced intracellular Ca²⁺ elevations, activation of phospholipase D, and activation of the NADPH oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 3, p. 819-26, 1998.
- WEIS, W.I., DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, v.65, p.441-473, 1996.

- WILKINSON, P.C. & ALLAN, R.B. Chemotaxis of neutrophil leukocyte towards substratum-bound protein attractants. **Exp. Cell. Res.** V. 65, 725-736, 1987.
- WOO, H.J., SHAW, L.M., MESSIER, J.M., MERCURIO, A.M. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). **J. Biol. Chem.**, v.265, p.7097-7099, 1990.
- WORTHEN, G.S., AVDO, N., VAKAJLOVICH, S., TOBIAS, P.S. Neutrophil adherence induced by lipopolysaccharide in vitro. Role of plasma component interactions with lipopolysaccharide. **J. Clin. Invest.** v. 170, p. 1231-1241, 1992.
- WU, L., RUFFING, N., SHI, X., NEWMAN, W., SOLER, D., MACKAY, C.R., QIN, S. Discrete steps in binding and signaling of interleukin-8 with its receptor. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.31202-09, 1996.
- YAMAMOTO, H., NISHI, N., SHOJI, H., ITOH, A., LU, L.H., HIRASHIMA, M., NAKAMURA, T. Induction of cell adhesion by galectin-8 and its target molecules in Jurkat T-cells. **J. Biochem.** v.143, p.311-324, 2008.
- YANG, S., HARDAWAY, M. SUN, G. RIES, W.L. KEY, L.L. JR. Superoxide generation and tyrosine kinase. **Biochem. Cell Biol.**, v. 78, p. 554-61, 2000.
- ZAGO, M.A., FALCÃO, R.P., PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática.** Atheneu. São Paulo, p.1077-1081, 2004.
- ZAMUNER, S.R., GUTIERREZ, J.M., MUSCARÁ, M.N., TEIXEIRA, S.A., TEIXEIRA, C.F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, v. 39, p. 1505-13, 2001.
- ZAMUNER, S.R., ZULIANI, J.P., FERNANDES, C.M., GUTIÉRREZ, J.M., DE FÁTIMA PEREIRA TEIXEIRA, C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 7, p. 806-13, 2005.
- ZHA HG, LEE WH, ZHANG Y. Cloning of cDNAs encoding C-type lectins from Elapidae snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*. **Toxicon**. v. 39, p. 1887-1892, 2001.
- ZINKL, J.G. The leukocytes. **Vet. Clin. North AM. Small Anim. Pract.** Review. v. 2, p. 237-263, 1981.