

**Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*,
da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A₂
e crotapotina em monocamadas de células
endoteliais em cultura**

MÁRCIO HIDEKI MATSUBARA

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**São Paulo
2009**

**Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*,
da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A₂
e crotapotina em monocamadas de células
endoteliais em cultura**

MÁRCIO HIDEKI MATSUBARA

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Catarina F. P. Teixeira

**São Paulo
2009**

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

© reprodução total

Matsubara, Márcio Hideki.

Efeitos do veneno isolado da serpente *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A₂ e crotapotina, em células endoteliais em cultura / Márcio Hideki Matsubara. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Estudo de toxinas isoladas do veneno de serpentes em modelos *in vitro*.

Versão do título para o inglês: Effects of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, crotoxin and their subunits phospholipase A₂ and crotapotin on endothelial cells *in vitro*.

Descritores: 1. Venenos 2. Serpentes 3. *Crotalus durissus terrificus* 4. Fosfolipase A₂ 5. Ciclooxygenases 6. Células endoteliais I. Teixeira, Catarina Fátima Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB30/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Márcio Hideki Matsubara.

Título da Dissertação: Efeitos do veneno isolado da serpente *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A₂ e crotapotina, em células endoteliais em cultura.

Orientador(a): Catarina de Fátima Pereira Teixeira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

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

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

À minha mãe,

Aparecida Matsubara

Pela compreensão e apoio para tudo aquilo que eu quis realizar. Sou privilegiado!
Apenas pelo fato de saber que você está sempre comigo, não importando o resultado.

Devo tudo a você! Por isso este trabalho também é seu...

Te amo muito!

À minha companheira,

Leilane Lima

Pela paciência, amor e compreensão. Você foi minha companheira durante esta jornada, acompanhou cada momento, cada conquista. Outra pessoa talvez não entenderia tão bem o que preciso para ser feliz...

Te amo muito!

À minha orientadora,

Catarina

Não consigo imaginar este trabalho de outra forma a não ser esta. Acredito que eu tenha amadurecido muito durante este período. E devo tudo a você, ao seu profissionalismo, ética e dedicação. Os valores que aprendi trabalhando ao seu lado, fazem de mim o que sou hoje.

Agradeço por tudo!

Pela orientação, carinho, incentivo, preocupação, proteção, amizade e principalmente por ter acreditado em mim e no meu trabalho...

Muito obrigado!

Às minhas irmãs,

Patrícia e Elaine

Obrigado pela torcida e apoio durante esta jornada, saibam que vocês me inspiraram a buscar aquilo que sempre quis, fazer pesquisa...

AGRADECIMENTOS

Ao longo desta jornada reconheço que contei com a colaboração de muitas pessoas que, de forma direta ou indireta, ajudaram-me em vários momentos para a realização deste trabalho. Assim, agradeço muito:

Ao Prof. Dr. **Andreimar Martins Soares**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, pela disponibilidade, atenção e doação das toxinas crotálicas utilizadas neste estudo.

Ao Dr. **Bruno Lomonte**, do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica, Costa Rica, pela linhagem de células endoteliais, gentilmente cedidas para este estudo.

À Dra. **Isabelle Tanjoni**, do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, que também me ajudou com o fornecimento das células endoteliais.

À minha amiga e “parceira” Dra. **Vanessa Moreira**, pela colaboração intelectual neste trabalho através dos nossos “*brainstorms*”, que geraram bons resultados e futuros projetos. Aprendi muito com você e ainda, de bônus, ganhei uma grande e querida amiga. Obrigado!

Ao **Sérgio Lima**, que é meu companheiro de fluxo laminar, passei mais tempo com você naquela sala, do que com minha namorada. MUITÍSSIMO obrigado pelo companheirismo dentro e fora do laboratório.

Ao **Elbio Leiguez**, pela nossa amizade cultivada desde os tempos da faculdade... Sem você, cara, talvez eu nem estivesse aqui hoje... Pode contar comigo sempre!

À **Sílvia Zamunér**, que durante meus passos iniciais, foi quem me ensinou e ajudou muito! Obrigado!

Aos amigos do laboratório **Pollyana, Marlos, Cristina, Neide, Renata e Jean**, sempre dispostos a ajudar e melhorar nosso “cotidiano laboratorial”, com bom-humor e profissionalismo.

Aos funcionários do laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, **Sr. Antônio, Binha, Joana, Sônia, Elisa, Valquíria, Zelma e Wanda** (*in memoriam*) pela amizade, carinho e serviços prestados.

À **Bianca Casasco**, pela ajuda com experimentos que, infelizmente, não puderam fazer parte deste trabalho, mas futuramente, ajudarão a complementá-lo. E também pela simpatia e amizade.

Ao **Eduardo Tamura**, que também ajudou muito este trabalho com suas perspectivas que, num futuro breve, favorecerão a realização de novos trabalhos.

Ao Prof. Dr. e amigo **Eduardo Purgatto**, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela ajuda com as análises densitométricas e eventuais “cervejinhas” após o expediente.

À minha orientadora da época da faculdade, **Prof. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos**, do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que me apresentou à pesquisa e me ensinou toda ciência por trás da cultura de células. Sou muito grato aos seus ensinamentos e amizade até hoje existentes.

À equipe da secretaria de Pós-graduação em Biotecnologia, **Fábria, Marcos e Eliane**, pela eficiência e simpatia, toda vez que precisei, muito obrigado!

Às funcionárias da Biblioteca do ICB-USP, **Maria José de Jesus Carvalho e Maria do Socorro Bezerra Rocha**.

Ao **Instituto Butantan**, à **Universidade de São Paulo** e seus funcionários pela disponibilidade, atenção e oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 06/52792-4).

“A dúvida é o princípio da sabedoria”.

(Aristóteles)

RESUMO

MATSUBARA, M. H. **Efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, da crotoxina e de suas subunidades fosfolipase A₂ e crotapotina em monocamadas de células endoteliais em cultura.** 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* e seus componentes desencadeiam importantes efeitos biológicos que envolvem direta e/ou indiretamente, componentes do sistema circulatório. Contudo, não há estudos específicos na literatura sobre os efeitos do veneno crotálico ou de suas toxinas, em células endoteliais. As células endoteliais constituem a camada de revestimento interna dos vasos sanguíneos, denominada endotélio. Este tecido é metabolicamente ativo, com função protetora do sistema cardiovascular e desempenha papel central na regulação da função circulatória, através do controle da coagulação, permeabilidade e do tônus vascular. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), do seu componente majoritário, a crotoxina (CTX) e de suas subunidades, fosfolipase A₂ (CB) e crotapotina (CA), sobre células endoteliais, em cultura, quanto à: *i*) viabilidade e proliferação celular; *ii*) integridade das monocamadas; *iii*) produção de óxido nítrico, de prostaciclina e mecanismos envolvidos neste efeito. Os resultados obtidos demonstram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* afetou a viabilidade e a integridade de células endoteliais em cultura, de modo tempo-dependente e apenas na maior concentração, sugerindo sua baixa toxicidade sobre as células endoteliais. A subunidade CB, mas não a CTX nem a crotapotina, reproduziu os efeitos causados pelo VCdt. Em concentrações não citotóxicas, tanto o veneno quanto as toxinas não alteraram a proliferação celular nem a produção basal de óxido nítrico pelas células endoteliais. Por outro lado, o veneno e a subunidade CB, mas não a CTX nem a CA causaram aumento significativo da produção de prostaciclina, via COX-1 e COX-2, sendo que a expressão protéica da isoforma COX-2 foi induzida por estes agentes. Além disso, foi demonstrado que a fosfolipase citosólica é relevante para o aumento da produção de prostaciclina, induzido pela CB. Adicionalmente, foi demonstrado que a atividade catalítica da subunidade CB é essencial para os efeitos descritos. Isto reforça a sugestão de que a subunidade fosfolipásica, isoladamente, possa contribuir para os efeitos do veneno total no endotélio. Nesse sentido, se houver alguma fração desta enzima na sua forma livre, no veneno total, sugere-se que ela contribua, de modo significativo, para os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no endotélio.

Palavras-chave: Veneno de serpentes; *Crotalus durissus terrificus*; Crotoxina; Crotapotina; Fosfolipase A₂; Células endoteliais; Prostaciclina; Ciclooxigenases.

ABSTRACT

MATSUBARA, M. H. **Effects of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, crotoxin and its subunits phospholipase A₂ and crotopotin on endothelial cells *in vitro*.** 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Crotalus durissus terrificus snake venom (CdtV) and their components induces systemic effects, which interfere with blood vessel system. Endothelial cells (EC) are central elements for haemostasis, regulating blood vessel-wall permeability, blood fluidity and adhesion properties of circulating leukocytes. However, there is no available data on the effects of this venom and its components on endothelial cells. In this study, the effects of CdtV, crotoxin (CTX) which is formed by two distinct subunits named crotopotin (CA) and phospholipase A₂ (CB), on endothelial cells *in vitro* were investigated, analyzing EC viability and proliferation, EC monolayers integrity, release of both nitric oxide and prostacyclin (PGI₂). CdtV, at the highest concentration, time-dependently decreased the viability of EC and the integrity of cell monolayers. The CB subunit, but not CTX nor CA, reproduced the effects caused by crude venom. In contrast, neither EC proliferation nor release of oxide nitric were affected by non-cytotoxic concentrations of CdtV or isolated toxins. However, at the same experimental condition, both CdtV and CB increased the prostacyclin release by endothelium through activation of COX-1 and -2 enzyme systems. Moreover, these toxins up-regulated protein expression of COX-2 isoform, but did not alter constitutive expression of COX-1. On the other hand, neither CTX nor CA affected basal production of PGI₂. Inhibition of cytosolic PLA₂ (cPLA₂) by AACOCF₃ significantly reduced PGI₂ increments caused by both CdtV and CB implying that cPLA₂ cooperates for the synthesis of PGI₂ induced by them. Inhibition of the catalytic activity of CB abrogated its ability to induce the release of PGI₂, thus suggesting the importance of the phospholipase A₂ enzyme activity for this effect. These findings provide evidence that CdtV and CB can directly activate EC and up-regulate cyclooxygenase pathways for production of prostacyclin, an important mediator of vasodilation and inflammation. Moreover, CB through its catalytic activity may significantly contribute for the stimulatory effect of CdtV in EC. Therefore, these findings indicate novel regulatory mechanisms for both CdtV and venom secretory PLA₂ in endothelial cells.

Keywords: Snake venoms; *Crotalus durissus terrificus*; Crotoxin; Crotaopotin; Phospholipase A₂; Endothelial cells; Prostacyclin; Cyclooxygenases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Avaliação da atividade metabólica de células endoteliais ao longo do tempo.....	47
Figura 2	Efeito do VCdt e da CTX sobre a viabilidade de células endoteliais em cultura.....	49
Figura 3	Efeito da subunidade CB e CA na viabilidade de células endoteliais em cultura.....	51
Figura 4	Efeito do VCdt e da CTX na atividade metabólica de células endoteliais em cultura.....	53
Figura 5	Efeito da subunidade CB e CA na atividade metabólica de células endoteliais em cultura.....	55
Figura 6	Efeito do VCdt e da CTX na integridade de monocamadas de células endoteliais em cultura.....	57
Figura 7	Efeito da subunidade CB e CA na integridade de monocamadas de células endoteliais em cultura.....	59
Figura 8	Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na proliferação de células endoteliais em cultura.....	61
Figura 9	Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na produção de óxido nítrico em células endoteliais em cultura.....	63
Figura 10	Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura.....	65
Figura 11	Participação da atividade catalítica da subunidade CB no seu efeito estimulatório sobre a produção de prostaciclina em células endoteliais em cultura.....	67
Figura 12	Efeito dos inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pelo VCdt.....	69
Figura 13	Efeito dos inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pela subunidade CB.....	71
Figura 14	Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-1 em células endoteliais em cultura.....	73
Figura 15	Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-2 em células endoteliais em cultura.....	75

Figura 16	Efeito do AACOCF₃ e BEL na produção de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pelo VCdt.....	77
Figura 17	Efeito do AACOCF₃ e BEL na produção de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pela subunidade CB.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formação da monocamada de células endoteliais ao longo do tempo.....	46
-----------------	---	-----------

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AACOCF₃	Araquidonil trifluormetil cetona
BEL	bromoeno lactona
CA	componente ácido ou crotoxina ácida (crotapotina)
CB	componente básico ou crotoxina básica (fosfolipase A ₂)
CEs	células endoteliais
cFLA₂	fosfolipase A ₂ citosólica
COX	ciclooxigenase
CTX	crotoxina
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilenodiamina tetra-acético
EIA	ensaio imunoenzimático
E.P.M.	erro padrão médio
FLA₂	fosfolipase A ₂
iFLA₂	fosfolipase A ₂ independente de cálcio
IL	interleucina
LDH	“lactate dehydrogenase” (lactato desidrogenase)
MAPK	proteína cinase ativada por mitógenos
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium
NO	“nitric oxide” (óxido nítrico)
PGI₂	prostaciclina
PPAR	“peroxisome proliferator-activated receptor” (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma)
SFB	soro fetal bovino
sFLA₂	fosfolipase A ₂ secretada
VCdt	veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
VCl3	triclureto de vanádio
VSA	valeril salicilato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Toxinas do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	24
1.2 Fosfolipase A ₂ (FLA ₂).....	27
1.3 Considerações gerais sobre o endotélio.....	29
1.4 Óxido Nítrico (NO).....	31
1.5 Prostaciclina (PGI ₂).....	33
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Veneno e toxinas isoladas da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	37
3.2 Células endoteliais (CEs).....	37
3.2.1 Cultura de células endoteliais.....	37
3.2.2 Subcultura de células endoteliais e preparação das amostras.....	38
3.3 Ensaio para a avaliação da integridade das monocamadas de células endoteliais.....	39
3.4 Ensaio para determinação da viabilidade celular: análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH).....	39
3.5 Ensaio para determinação da atividade metabólica: redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT).....	40
3.6 Determinação da proliferação celular.....	40
3.7 Determinação da concentração de óxido nítrico.....	41
3.8 Determinação da concentração de PGI ₂ por ensaio imunoenzimático específico (EIA).....	41
3.9 Análise por <i>Western Blotting</i>	42
3.10 Tratamento com inibidores específicos.....	43
3.11 Análise estatística.....	44
4 RESULTADOS	45
4.1 Avaliação da formação de monocamadas em função do número inicial de células.....	45

4.2 Efeito do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (VCdt) e da crotoxina (CTX) sobre a viabilidade de células endoteliais em cultura.....	48
4.3 Efeito da fosfolipase A₂ (CB) e da crotapotina (CA) sobre a viabilidade de células endoteliais em cultura.....	50
4.4 Efeito do VCdt e da CTX sobre a atividade metabólica de células endoteliais em cultura.....	52
4.5 Efeito da subunidade CB e CA sobre a atividade metabólica de células endoteliais em cultura.....	54
4.6 Efeito do VCdt e da CTX sobre a integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura.....	56
4.7 Efeito da subunidade CB e CA sobre a integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura.....	58
4.8 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na proliferação de células endoteliais em cultura.....	60
4.9 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA sobre a produção de óxido nítrico (NO) por células endoteliais em cultura.....	62
4.10 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura.....	64
4.11 Participação da atividade catalítica da subunidade CB na produção de prostaciclina por células endoteliais em cultura.....	66
4.12 Efeito dos inibidores das COXs na produção de prostaciclina induzida pelo veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> em células endoteliais em cultura.....	68
4.13 Efeito dos inibidores das COXs na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais em cultura.....	70
4.14 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-1 em células endoteliais em cultura.....	72
4.15 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-2 em células endoteliais em cultura.....	74
4.16 Efeito do AACOCF₃ e do BEL na produção de prostaciclina induzida pelo VCdt em células endoteliais em cultura.....	76

4.17 Efeito do AACOCF₃ e do BEL na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais em cultura.....	78
5 DISCUSSÃO.....	80
6 CONCLUSÕES.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

A fauna ofídica, de interesse médico no Brasil, está representada por três famílias: Viperidae, a qual pertencem os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*, a família Elapidae, representada pelo gênero *Micrurus* e a família Colubridae, representada pelas serpentes do gênero *Philodryas* e *Clélia* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

O gênero *Crotalus* inclui as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis, causadoras de aproximadamente 7,7% dos acidentes ofídicos no Brasil, destacando-se das demais, por causarem acidentes com o maior índice de letalidade (1,87%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). No Brasil, as cascavéis são representadas, predominantemente, pela serpente *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e algumas áreas de Mato Grosso, Rondônia e Pará. Os envenenamentos causados por essas serpentes são caracterizados por três atividades de importância clínica: neurotóxica, miotóxica e coagulante (ROSENFELD, 1971).

O quadro clínico do acidente crotálico caracteriza-se por manifestações sistêmicas, visto que os sintomas locais são pouco expressivos, com pouca ou ausência de dor, edema discreto e, raramente, eritema (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003).

No que se refere às manifestações sistêmicas, o quadro neuromuscular aparece precocemente, caracterizando-se por ptose palpebral, diplopia, oftalmoplegia e flacidez da musculatura da face - *facies neurotóxica* - (ROSENFELD, 1971). Ainda, ocorrem manifestações miotóxicas, evidenciadas por mialgia intensa e rabdomiólise generalizada, que levam ao aumento das enzimas musculares no soro e à mioglobinúria (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 1985; 1987; 2003; CUPO *et al.*, 1990). Esses efeitos, associados a fatores como a desidratação e hipotensão arterial, contribuem para a instalação de insuficiência renal aguda (ROSENFELD, 1971; PINHO *et al.*, 2000). Nesse sentido, estudos efetuados em modelos experimentais *in vitro*, sugerem que o veneno crotálico pode agir diretamente sobre os túbulos renais e glomérulos, causando lesões, ou indiretamente, pela liberação de mediadores a partir das células epiteliais, que podem promover nefrotoxicidade (MONTEIRO *et al.*, 2001). As alterações da coagulação sanguínea são relevantes e foram observadas em 50% dos pacientes atendidos no hospital Vital Brazil, no período de 1974 a 1990 (JORGE e RIBEIRO, 1992). Nestes, foram observados incoagulabilidade sanguínea ou aumento no tempo de coagulação, resultante do consumo de fibrinogênio, promovido por uma enzima trombina-símile, presente no veneno (AZEVEDO-MARQUES *et al.*, 2003).

As ações biológicas causadas pelo veneno da cascavel sul-americana são atribuídas às ações de várias toxinas: crotamina, convulxina, giroxina e crotoxina, sendo que esta última representa cerca de 65% do veneno total. Além desses componentes, o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), contém peptídeos e enzimas como a L-aminoxidase, enzima trombina-símile, fosfodiesterases, atividade de calicreína do tipo tissular e NAD-hidrolase, que desencadeiam importantes efeitos bioquímicos, farmacológicos e imunológicos (BERCOVICI, 1987). Nesse sentido, foi demonstrado que o veneno crotálico inibe funções de macrófagos, a migração celular para o foco inflamatório, edema de pata em camundongos, a síntese de imunoglobulina G (IgG), além de induzir efeitos microbicida e analgésico (GIORGI *et al.*, 1993; SOUSA-e-SILVA *et al.*, 1996; CARDOSO e MOTA, 1997; NUNES *et al.*, 2007; PICOLO *et al.*, 2000; BRIGATTE *et al.*, 2001; SAMPAIO *et al.*, 2001). De um modo geral, as atividades biológicas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, observadas em modelos experimentais e no envenenamento são de caráter predominantemente sistêmico. Neste contexto, chama a atenção o fato de não existirem na literatura, estudos específicos sobre as atividades do VCdt e de seus componentes sobre células endoteliais.

As células endoteliais constituem a camada de revestimento interna dos vasos sanguíneos, conhecida também como endotélio. O endotélio é um tecido metabolicamente ativo, com função protetora do sistema cardiovascular, que possui papel fundamental na manutenção da função circulatória, através do controle de parâmetros fisiológicos como a coagulação, a permeabilidade e o tônus vascular. Desse modo, a investigação da influência do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre o endotélio, reveste-se de importância e favorece à compreensão das ações fisiopatológicas desse agente. Ainda, a melhor compreensão das atividades da crotoxina, o componente majoritário do veneno crotálico, e a definição da estrutura mínima de sua molécula, necessária para as suas atividades biológicas e/ou tóxicas no endotélio, poderão estender suas aplicações como ferramentas úteis para o estudo de mecanismos e funções celulares específicas.

1.1 Toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

A crotamina é um polipeptídeo básico, composto de 42 aminoácidos unidos por 3 pontes dissulfídicas e massa molecular de 4.8 kDa (MOURA-GONÇALVES e ARANTES, 1956). Esta toxina pertence à família das SBPM (*Small Basic Polypeptide Myotoxins*), que possuem a capacidade de penetração intracelular, através de mecanismos independentes de

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

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

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

um único gene (BREITHAUPT *et al.*, 1974; BOUCHIER *et al.*, 1991). A subunidade CB, pertence ao grupo das β -neurotoxinas e é responsável pela atividade enzimática da crotoxina (RÜBSAMEN *et al.*, 1971; AIRD *et al.*, 1986). Esta subunidade possui massa molecular de 14 kDa e consiste em uma cadeia polipeptídica de 123 aminoácidos, que formam estruturas globulares, unidas por sete pontes dissulfeto (FRAENKEL-CONRAT *et al.*, 1980; AIRD *et al.*, 1986). A CB é classificada como uma miotoxina com estrutura de fosfolipase A₂, com propriedade neurotóxica (LOMONTE *et al.*, 2003).

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

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

soro (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986; SALVINI *et al.*, 2001). Além destas atividades, a fração CB ainda exerce efeitos anticoagulante, bactericida e edematogênico (VERHEIJ *et al.*, 1980; KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986). Algumas destas ações, como a miotoxicidade e a atividade anticoagulante, são dependentes da atividade enzimática da subunidade CB (SOARES *et al.*, 2001). Por sua vez, a subunidade não-enzimática da crotoxina, a subunidade CA, é capaz de inibir a resposta edematogênica em ratos (LANDUCCI *et al.*, 1995, 2000).

Em adição, foi demonstrado que a CTX, quando injetada pela via subcutânea, induz neutrofilia pronunciada, aumento do nível de corticosterona e das citocinas IL-6 e IL-10, e diminuição de linfócitos e monócitos circulantes (CARDOSO *et al.*, 2001). Ainda, a crotoxina inibe o crescimento de células tumorais humanas e murinas *in vitro*. Este efeito foi atribuído à subunidade CB e à sua ligação específica a receptores transmembrana, envolvidos na sinalização do crescimento celular (NEWMAN *et al.*, 1993; CORIN *et al.*, 1993; RUDD *et al.*, 1994; DONATO *et al.*, 1996). No entanto, os mecanismos envolvidos nesses efeitos ainda não foram esclarecidos, e estudos adicionais são necessários para o melhor entendimento das ações causadas por esta fosfolipase A₂.

1.2 Fosfolipase A₂ (FLA₂)

As fosfolipasas A₂ são enzimas abundantes na natureza e estão presentes em altas concentrações nos venenos de serpentes, abelhas, vespas e no suco pancreático de mamíferos (HARRIS, 1991). Estas enzimas são encontradas em quase todos os venenos de serpentes e apresentam um grande espectro de atividades biológicas que incluem ação hemolítica indireta, neurotóxica, cardiotoxica, anticoagulante, edematogênica e miotóxica (KINI e EVANS, 1989).

As FLA₂s ou fosfatidil-acil-hidrolases, compreendem uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de fosfolipídeos. A reação de hidrólise é dependente de íons cálcio, sendo a unidade catalítica formada pelos aminoácidos His 48, Asp 99 e uma molécula de água (YU *et al.*, 1990; DENNIS *et al.*, 1994). Os produtos, gerados da catálise por estas enzimas, são ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico (AA), precursor de eicosanóides, que atuam como segundos mensageiros de processos fisiológicos e fisiopatológicos (DENNIS *et al.*, 1994) e lisofosfolipídeos, como o liso-PAF (SMITH *et al.*, 2000). As FLA₂s foram classificadas em cinco grupos, que incluem as FLA₂s secretadas (sFLA₂) e as fosfolipasas A₂ intracelulares, como as citosólicas (cFLA₂), as FLA₂s

independentes de Ca^+ (iFLA₂s), as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e as FLA₂s lisossomais (MURAKAMI, *et al.*, 1997; SCHALOSKE e DENNIS, 2006). Por outro lado, os avanços da biologia molecular e celular conduziram à identificação de diversas isoenzimas fosfolipase A₂. Atualmente, as FLA₂s estão subdivididas em 14 subgrupos (I-XIV) (BALSINDE *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2003), com base em critérios como a localização celular, a seqüência de aminoácidos, o peso molecular, a presença de pontes dissulfeto intramoleculares e a dependência de cálcio para a atividade enzimática (SIX e DENNIS, 2000; BALSINDE *et al.*, 2002).

As fosfolipases A₂ secretadas, encontradas em venenos de serpentes Crotalidae e Viperidae, assim como àquelas do fluido sinovial humano e de plaquetas, estão incluídas no grupo II. A sFLA₂ da crotoxina apresenta seqüência de aminoácidos homóloga à de fosfolipases presentes no veneno de outras víperas (FRAENKEL-CONRAT *et al.*, 1980) e da FLA₂ pancreática de mamíferos. Estas enzimas estão classificadas no subgrupo IIA (SIX e DENNIS, 2000).

As fosfolipases secretadas compreendem o grupo de enzimas mais amplamente estudado. Alguns de seus efeitos na função celular são dependentes da liberação de derivados do ácido araquidônico e de lisofosfolipídeos (RIZZO *et al.*, 2000). Outros efeitos são dependentes da ligação da enzima a receptores específicos de membranas, atualmente descritos como do tipo M (muscular) e N (neuronal). Os receptores do tipo N foram os primeiros a serem identificados e estão presentes em grandes quantidades em membranas do cérebro de ratos, sendo compostos de, pelo menos, dois sítios de ligação. Tais receptores ligam-se com alta afinidade a uma variedade de FLA₂s neurotóxicas, inclusive à crotoxina, sugerindo que este tipo de receptor seja crucial para efeito neurotóxico destas fosfolipases. Os receptores do tipo M foram identificados em músculo esquelético de coelhos. Este tipo de receptor foi clonado e seqüenciado de várias espécies animais, incluindo a humana e possui uma organização estrutural semelhante a dos receptores para lectinas, localizados em células endoteliais (LAMBEAU e LAZDUNSKI, 1999). Nesse sentido, foi demonstrado que o complexo CTX, exerce atividade tóxica apenas em células musculares esqueléticas, mas não em células endoteliais. No entanto, a subunidade CB, isoladamente, induz efeitos tóxicos em células endoteliais *in vitro*, porém, os mecanismos deste efeito não foram esclarecidos (LOMONTE *et al.*, 1999). Na literatura há muita informação disponível sobre os efeitos da sFLA₂ crotálica, em diversos tipos celulares, como em macrófagos, linfócitos, plaquetas e células neoplásicas (DONATO *et al.*, 1996; MOUNIER *et al.*, 1996; SAMPAIO *et al.*, 2005, ZAMBELLI *et al.*, 2008). Apesar destes efeitos envolverem direta e/ou indiretamente

componentes do sistema circulatório, chama a atenção o fato de não existirem na literatura, estudos específicos sobre os efeitos da sFLA₂ do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em células endoteliais.

1.3 Considerações gerais sobre o endotélio

O endotélio vascular é constituído por uma monocamada de células - células endoteliais (CEs) - que revestem o lúmen dos vasos e separam o sangue dos tecidos. A sua integridade funcional e estrutural é fundamental para a manutenção da homeostasia e da função circulatória (NEREM *et al.*, 1993).

As células endoteliais, de modo geral, são alongadas, poligonais e dotadas de ampla superfície. O núcleo é alongado, acompanhando o maior eixo da célula. Estas células apresentam grande número de vesículas pinocíticas na membrana e no citoplasma, sistema vesículo-canalicular denso e escassez relativa de organelas. O citoesqueleto contém microfilamentos e filamentos intermediários, que parecem ser responsáveis pela contratilidade celular. Observa-se, ainda, a presença de microtúbulos dispostos em feixes, embebidos em matriz amorfa e envoltos por membrana, denominados de grânulos Weibel-Palade. Estes grânulos constituem o sítio de síntese do fator de Von Willebrand, importante para adesão de plaquetas à matriz extracelular e um marcador de células endoteliais. Além disso, as células endoteliais formam complexos juncionais com as células vizinhas. Tais junções desempenham papel fundamental na regulação da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos. Do ponto de vista funcional, estas interações são classificadas em junções comunicantes, aderentes e ocludentes. O tipo e número das junções variam ao longo da rede vascular. Desta forma, tais junções são numerosas e bem organizadas em grandes vasos e quase ausentes nas vênulas pós-capilares, local em que o extravasamento plasmático e as trocas de constituintes do plasma e o meio extravascular necessitam ser particularmente eficientes (SIMIONESCU e SIMIONESCU, 1988).

Como outras células epiteliais, as células endoteliais são polarizadas. A parte luminal está continuamente exposta às células circulantes e aos componentes plasmáticos. A porção oposta, abluminal, está em contato com a matriz extracelular e tecidos adjacentes. A superfície abluminal, por meio de integrinas, liga-se à lâmina basal. Esta é constituída por vários tipos de colágenos (tipo IV, V e VIII), laminina, sulfato de heparan e de condroitina, proteoglicanos, entactina, nidogênio e sialoglicoproteínas, associados à fibronectina. Dado o

alto teor de colágeno, a lâmina basal pode ser digerida por colagenases. Esta camada comporta-se como uma barreira que impede a passagem de elementos figurados do sangue, de complexos imunes e de várias outras macromoléculas e atua como suporte da célula endotelial, contribuindo para a estabilidade estrutural do endotélio e manutenção da luz vascular. Além disso, a interação das células endoteliais com os componentes da membrana basal modula a diferenciação destas células durante a embriogênese e regula a sua polaridade. A superfície luminal das células endoteliais, por sua vez, é superposta por uma lâmina fixa, rica em ácido siálico, oligossacarídeos, glicoproteínas, proteoglicanos e sulfato de heparan, que parece atuar como sítio de reconhecimento de moléculas para transporte ativo e outra superfície, móvel, que contém proteínas plasmáticas, adsorvidas à membrana celular (SIMIONESCU e SIMIONESCU, 1991).

Tanto as células sanguíneas circulantes quanto a superfície endotelial possuem sítios aniônicos que se repelem. O endotélio intacto não é trombogênico, não atrai as células sanguíneas. No entanto, as estruturas subendoteliais, principalmente colágeno e microfibrilas, são trombogênicos e, em situações de injúria do endotélio, plaquetas aderem aos sítios de lesão e umas às outras e liberam fatores coagulantes. Assim, células endoteliais são capazes de migrarem e proliferarem rapidamente, para cobrirem estruturas subendoteliais expostas, em processo de defesa contra o desenvolvimento de injúria vascular (para revisão vide VANE *et al.*, 1987).

O endotélio, além de sua função como membrana semipermeável, é um tecido metabolicamente ativo. Por sua capacidade de sintetizar e secretar inúmeras substâncias, exerce várias funções fisiológicas: a) no metabolismo de substâncias vasoativas, por conter enzimas que transformam angiotensina I (AGI) em angiotensina II (AGII) e inativam a noradrenalina, serotonina e bradicinina; b) na hemostasia, por meio da produção de substâncias coagulantes (fator de Von Willebrand; inibidor de plasminogênio), e anticoagulantes, como a prostaciclina (PGI₂) e ativador de plasminogênio, além de conter antitrombina III e trombomodulina, na superfície de membrana e expressar receptores para trombina e fibrinogênio; c) na modulação do tônus vascular, por sua capacidade de produzir e liberar fatores relaxantes da musculatura lisa dos vasos, como o óxido nítrico (NO), a PGI₂ e fatores de contração do músculo liso, como as endotelinas e AG II e d) como produtor de várias substâncias endógenas, com papel fisiológico relevante, como os antígenos dos grupos A e B, fibronectina, proteoglicanos, interleucinas, eicosanóides, colágenos do tipo IV, V e VIII, nidogênio e laminina (MONCADA *et al.*, 1988; CIRINO, 1998; YANAGISAWA *et al.*, 1988, para revisões vide LOESCH, 2005; THUILLEZ e RICHARD, 2005). Por outro lado, as

células endoteliais sofrem alterações de estrutura, função e propriedades metabólicas, em resposta a fatores de crescimento, substâncias vasoativas e citocinas, que variam de acordo com o órgão em que se localizam (VANE *et al.*, 1987). Dessa forma, o endotélio ativado afeta o crescimento do músculo liso, por sua capacidade de gerar diversos fatores de crescimento, que induzem espessamento da parede dos vasos e favorecem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (THUILLEZ e RICHARD, 2005). Ainda, a literatura mostra que o tipo e o estado de interação entre as células endoteliais e a matriz extracelular determinam diferentes programas genéticos nessas células, como a diferenciação, crescimento e a apoptose (HUANG e INGBER, 2000).

As células endoteliais desempenham papel central em processos fisiopatológicos, como a inflamação. Em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios, tais células expressam moléculas de adesão E e P-selectinas, ICAM-1 e VCAM (ZIMMERMAN *et al.*, 1992; NEWMAN, 1996), que favorecem a migração de leucócitos para o espaço subendotelial. Além disso, essas células são capazes de liberar diversos mediadores inflamatórios, que iniciam e/ou amplificam o processo (KADL e LEITINGER, 2005; POBER e SESSA, 2007).

Dentre os mediadores produzidos pelo endotélio estão o óxido nítrico e a prostaciclina. Estes são considerados os fatores de proteção mais importantes do sistema cardiovascular descritos até o presente; quando liberados em condições fisiológicas, atuam de forma sinérgica, para inibirem a ativação de plaquetas, prevenindo a trombose ou, ainda, no controle do tônus vascular. Por outro lado, o desequilíbrio na concentração destes mediadores podem contribuir para processos fisiopatológicos, como a inflamação.

1.4 Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é um gás que se difunde, rapidamente, através de membranas celulares e atua como um mediador de várias funções fisiológicas, como a vasodilatação (PALMER *et al.*, 1987) e a neurotransmissão (DOWNEN *et al.*, 1999), além de apresentar atividade tumoricida (HIBBS *et al.*, 1988) e/ou microbicida (MAUEL *et al.*, 1991). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por uma reação catalisada por pelo menos três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), originando quantidades estequiométricas de NO e L-citrulina.

As enzimas óxido nítrico sintases foram classificadas em duas categorias. A primeira delas compreende as isoformas constitutivas do tipo I e III (NOS I e NOS III) e a segunda, a isoforma induzível, é denominada iNOS ou do tipo II (NOS II) (MONCADA, 1992; HOGABOAM *et al.*, 1997). As NOS constitutivas estão presentes, principalmente, em células endoteliais (eNOS) e neuronais (nNOS) e são dependentes de cálcio e calmodulina. Estas isoformas produzem óxido nítrico em pequena quantidade. A iNOS é detectada em macrófagos, neutrófilos, hepatócitos, linfócitos T, células endoteliais e plaquetas, sendo dependente de baixas concentrações de cálcio e ativada por determinadas citocinas como a IL-1, TNF- α , interferon- γ (INF- γ) e endotoxinas, além de produzir uma grande quantidade de NO quando ativada (para revisão vide BRUCKDORFER, 2005).

A eNOS está estrategicamente ancorada à membrana das células endoteliais, o que favorece a formação de NO próximo à camada muscular do vaso sanguíneo e às células sanguíneas circulantes (MICHEL *et al.*, 1993). O NO, produzido pela atividade da eNOS, difunde-se rapidamente para a célula muscular, causando relaxamento muscular e, no lúmen vascular, inibe a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos à parede dos vasos (MONCADA *et al.*, 1991). O sistema GC-GMPc parece ter uma importância central para a ação fisiológica do NO (SNYDER e BREDT, 1992). Uma vez presente na célula muscular ou em plaquetas, o NO interage com o ferro, do grupamento hemínico da enzima guanilato ciclase, tornando-a ativa (GCa). Esta reação acarreta a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), que atua como segundo mensageiro das ações do NO no músculo e também em plaquetas (WOLIN, 2000). Ainda, o NO produzido pela eNOS induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD), na camada muscular do vaso, diminuindo a concentração de íons superóxido, que são radicais reativos e lesivos. Adicionalmente, foi demonstrado que o NO inibe a expressão de moléculas de adesão, como a VCAM-1, E-selectina e P-selectina, por inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , IL-6 e IL-8, e/ou diretamente, por interferir no fator de transcrição NF- κ B, estabilizando a proteína inibitória I κ B- α (DE CATERINA *et al.*, 1995; HICKEY *et al.*, 1997; PENG *et al.*, 1995).

De outra parte, as evidências indicam que o NO, resultante da ativação da iNOS, pode exercer ação citotóxica, promovendo a destruição de microorganismos, parasitas e células tumorais. Este fato ocorre porque em processos infecciosos, células ativadas, como os macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, secretam, simultaneamente, o NO e intermediários reativos do oxigênio. Estas moléculas podem interagir entre si, formando o

ânion peroxinitrito (ONOO^-), mais tóxico que os seus precursores (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1996; ROHN *et al.*, 1999). Na presença da placa aterosclerótica, os macrófagos ativados produzem O_2^- , expressam iNOS e produzem NO. Desta forma, são produzidos ONOO^- e OH^- , comprometendo a integridade tecidual e favorecendo a ativação da coagulação e a obstrução da luz vascular (WOLIN, 2000).

1.5 Prostaciclina (PGI_2)

Em mamíferos, a prostaciclina é sintetizada, principalmente, pelas células endoteliais e exerce um importante papel fisiológico. Este mediador vascular é um ácido graxo insaturado, de 20 carbonos, com um anel ciclopentano, que pertence à família das prostaglandinas. O processo de síntese da prostaciclina inicia-se com a liberação de ácido araquidônico (AA), a partir das membranas celulares, por ação da fosfolipase A_2 . Uma vez liberado, o ácido araquidônico torna-se substrato das enzimas ciclooxigenases (COX). Estas enzimas exercem duas atividades enzimáticas principais: uma ação oxigenase, que origina a prostaglandina G_2 (PGG_2) e outra peroxidase, que forma a PGH_2 , a partir da PGG_2 . A prostaglandina H_2 é o substrato para as sintases de prostanóides, como a prostaciclina sintase (PGIS), membro da superfamília P450, cuja atividade leva à formação da prostaciclina (MIYATA *et al.*, 1994; MITCHELL *et al.*, 2007). As COXs apresentam, pelo menos, duas isoformas bem conhecidas, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente, enquanto a COX-2 é induzida em locais de inflamação, embora também seja expressa constitutivamente (WU, 2005). Em células endoteliais, em condições fisiológicas, a isoforma predominante é a COX-1. A expressão constitutiva da prostaciclina sintase ocorre principalmente no endotélio e na musculatura lisa vascular, embora haja evidências de sua indução em células do miométrio uterino (KORITA *et al.*, 2002).

Até o presente, foram descritos dois tipos de receptores para a prostaciclina: i) o receptor IP, de superfície celular e ii) o receptor PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*). Os receptores IP são acoplados à proteína G, possuem sete domínios transmembrana e estão distribuídos em diversos tecidos. A ativação dos receptores IP leva à ativação da adenilato ciclase, que resulta na formação de AMP cíclico. Este, por sua vez, fosforila a proteína cinase A (PKA), que leva à diminuição de cálcio nas células-alvo, como as plaquetas e células da musculatura lisa de vasos sanguíneos, com conseqüente inibição da

agregação plaquetária e na vasodilação, respectivamente. O receptor PPAR é um fator de transcrição, que pertence à superfamília de receptores nucleares. Quando ativado, tem a capacidade de modular a expressão de genes, por meio da ligação a elementos responsáveis (PPRE), localizados na região promotora dos genes que estão sob seu comando transcricional. Essa ligação depende da associação do PPAR com outro fator protéico, o ácido 9-*cis* retinóico (RXR). Estudos recentes indicam que os agonistas do PPAR estão envolvidos na resolução do processo inflamatório, via controle negativo do NF- κ B, antagonizando este fator de transcrição, responsável pela ativação da expressão de genes pró-inflamatórios. Dentre os genes pró-inflamatórios, regulados negativamente pelo PPAR, estão o SR-A, que codifica a proteína de superfície celular, associada a eventos de adesão celular e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (ISSEMANN *et al.*, 1990; GEARING *et al.*, 1993; KLIEWER *et al.*, 1992; FRUCHART *et al.*, 1999, MORAES *et al.*, 2005).

As células endoteliais possuem COX-1 e PGIS em grande quantidade. Portanto, nestas células, quando a fosfolipase A₂ é ativada, a prostaciclina é o metabólito predominante da oxidação do ácido araquidônico. Este mediador vascular exerce efeitos locais e transitórios, pois ao ser liberado pelo endotélio, possui dois alvos celulares primários, as plaquetas, na porção luminal do vaso e as células musculares lisas, no subendotélio. Estes alvos celulares possuem ambos os receptores para a PGI₂. Este prostanóide é um potente inibidor da agregação plaquetária, razão pela qual exerce uma importante ação antitrombótica, além de causar relaxamento da musculatura lisa dos vasos sanguíneos, acarretando a vasodilatação. Estas ações fisiológicas da PGI₂ são fundamentais para a regulação das propriedades adesivas do endotélio e a manutenção do tônus vascular (KELTON e BLAJCHMAN, 1980; VANE e CORIN, 2003; MITCHELL *et al.*, 2007). Em condições fisiopatológicas, a prostaciclina contribui para processos inflamatórios, por exercer ação vasodilatadora e potencializar o aumento da permeabilidade vascular, causado por outros mediadores e induzir hiperalgesia (VANE *et al.*, 1990; VANE e BOTTING, 1995; para revisão vide SIMMONS *et al.*, 2004). Em contrapartida, a deficiência de PGI₂ tem implicações na patogênese de doenças vasculares periféricas, e desta forma, o desenvolvimento de análogos deste prostanóide poderia permitir um tratamento mais eficaz para essas patologias. Ainda, há relatos na literatura sobre os efeitos benéficos da infusão de prostaciclina em pacientes com doenças vasculares (GRYGLEWSKI *et al.*, 1979). Após a síntese e liberação, a PGI₂ é rapidamente convertida, por processos não-enzimáticos, em um metabólito inativo, a 6-ceto prostaglandina F_{1 α} (PGF_{1 α}). Por esse motivo, a aplicação deste potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária na terapêutica têm seu uso restrito pela instabilidade química de sua molécula.

Atualmente, a pesquisa clínica, voltada para a terapêutica de doenças vasculares periféricas, como a doença de Raynaud, o vasoespasmo ou a isquemia severa, dedica-se ao desenvolvimento de análogos estáveis da PGI₂ e à busca de indutores da produção da prostaciclina (MITCHELL *et al.*, 2007).

Em síntese, tanto a prostaciclina quanto o óxido nítrico são considerados os hormônios cardioprotetores mais importantes já descritos e, conseqüentemente, a presença de um endotélio funcional é crítica para a manutenção da hemostasia. Em condições fisiológicas, o endotélio libera substâncias que modulam o tônus vascular, a proliferação, a adesão leucocitária, a coagulação, e ainda atua como uma barreira física no transporte de moléculas, através de seus complexos juncionais. Portanto, em condições de disfunção ou lesão do endotélio, há repercussão sobre a estrutura vascular, tecido adjacente e, por fim, sobre o sistema cardiovascular.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo avaliar e caracterizar as atividades do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), do seu componente majoritário, a crotoxina (CTX) e de suas subunidades fosfolipase A₂ (CB) e crotapotina (CA) em células endoteliais.

- A partir de estudos *in vitro* foram avaliados os efeitos do veneno e das toxinas em células endoteliais, quanto à:

- a) viabilidade e metabolismo das células endoteliais;
- b) integridade das monocamadas;
- c) proliferação celular;
- d) produção de óxido nítrico e de prostaciclina;
- e) expressão de COX-1 e COX-2;
- f) participação da atividade catalítica nestes eventos;
- g) participação das fosfolipases A₂ intracelulares nestes eventos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Veneno e toxinas isoladas da serpente *Crotalus durissus terrificus*

O veneno bruto, extraído de exemplares adultos de serpentes *Crotalus durissus terrificus* e as suas frações crotóxina (CTX), fosfolipase A₂ (CB) e crotapotina (CA), isoladas e purificadas de acordo com SLOTTA e FRAENKEL-CONRAT (1938), HENDON e FRAENKEL-CONRAT (1971) e SOARES *et al.* (2001), foram utilizados. A homogeneidade das frações foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970). O veneno foi fornecido pelo laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo. As toxinas foram cedidas pelo Dr. Andreimar Martins Soares, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto. As partidas de veneno e toxinas foram liofilizadas e mantidas a -20 °C até o momento da sua utilização.

3.2 Células endoteliais (CEs)

Células endoteliais murinas da linhagem tEnd (*thymic endothelium*), transformadas pelo oncogene *middle T* de polyoma vírus, foram utilizadas (BUSSOLINO *et al.*, 1991). As células utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruno Lomonte, do Instituto Clodomiro Picado, da Universidade da Costa Rica, Costa Rica.

3.2.1 Cultura de células endoteliais

As células endoteliais foram cultivadas em frascos de poliestireno de 25 cm², contendo 5 mL de meio de cultura RPMI-1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, gentamicina (40 µg/mL) e L-glutamina (2 mM). A cultura foi mantida em incubadora (37 °C), sob atmosfera de 5% CO₂, até as células atingirem confluência. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e as células foram subcultivadas quando a densidade celular do frasco de cultivo foi superior a 80%. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado e as células lavadas com

2 mL de tampão fosfato em solução salina (PBS), sem cálcio ou magnésio, a pH 7.2. Em seguida, 2 mL de uma solução de tripsina 0.05%/EDTA 0.02% foram adicionados ao frasco de cultura, que retornou à estufa de cultura (5% de CO₂/37 °C), por um período de até 5 minutos. Decorrido este tempo, as células foram observadas ao microscópio de luz invertida, para a verificação do destacamento das mesmas e então transferidas para um tubo cônico de 50 mL, contendo RPMI-SFB10% e centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos para a neutralização da tripsina. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL meio de cultura RPMI-SFB10%. Ao término desse processo, as CEs foram semeadas em frascos de cultivo de 75 cm², contendo 15 mL de meio de cultura RPMI-SFB10% e incubadas em estufa de cultura até que as células atingissem confluência. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e as células foram novamente subcultivadas quando a densidade celular no frasco de cultivo foi máxima.

3.2.2 Subcultura de células endoteliais e preparação das amostras

A partir do segundo subcultivo das células endoteliais, 1×10^4 células/poço foram semeadas em microplacas de cultura de 96 poços e incubadas a 37 °C, em 5% de CO₂, por 48 horas. Para tanto, as células foram destacadas dos frascos de cultivo (75 cm²), com uma solução de tripsina 0.05%/EDTA 0.02% e processadas conforme item 3.2.1. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células endoteliais ressuspendidas em meio RPMI-SFB10%, em volume fixo (1 mL). Feito isso, uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi diluída em 90 µL de azul de tripan (0.1%), para a contagem do número total de células ao microscópio de luz e determinação da viabilidade celular (>95%), pela técnica de exclusão do corante. A partir desses parâmetros, foram feitas diluições apropriadas para a aplicação das CEs nas microplacas. Após a formação da monocamada confluenta (48 horas), foram realizadas incubações com concentrações crescentes do VCdt ou CTX (1, 10 e 100 µg/mL) ou CB ou CA (correspondente molar de 0.04, 0.4 e 4 µM, respectivamente) ou meio de cultura RPMI apenas (controle negativo), por períodos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas.

3.3 Ensaio para a avaliação da integridade das monocamadas de células endoteliais

A integridade das monocamadas celulares foi avaliada pela medida do descolamento das monocamadas pelo ensaio do cristal violeta. Após cada período de incubação, descritos no item 3.2.2, o sobrenadante foi retirado e as monocamadas lavadas (duas vezes) com tampão fosfato em solução salina (PBS). Em seguida, foram adicionados 90 μL de meio de cultura RPMI a cada poço da microplaca e, logo após, acrescentados 10 μL de uma solução de cristal violeta (0.5%) em ácido acético (30%). Decorridos 10 minutos, as microplacas foram lavadas com PBS (duas vezes) e colocadas para secar. A seguir, 100 μL de metanol absoluto foram adicionados aos poços e a leitura da densidade óptica (D.O.), feita em espectrofotômetro (Labsystem Multiscan®) no comprimento de onda de 620 nm. A perda da integridade das monocamadas foi definida como a diminuição da D.O., observada na monocamada submetida à ação do veneno ou das toxinas, em relação à monocamada incubada apenas com meio de cultura RPMI (controle) e representada como porcentagem (%) de células aderidas.

3.4 Ensaio para determinação da viabilidade celular: análise da atividade da lactato desidrogenase (LDH)

A atividade enzimática da LDH, presente no meio de cultura, foi definida como parâmetro da viabilidade celular. Após cada período de incubação (descritos no item 3.2.2), as microplacas de cultura foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. A seguir, 30 μL desse sobrenadante foram adicionados a outra microplaca de 96 poços, acompanhados da adição de 170 μL do substrato, em tampão fosfato, contendo: NaCl 200 mM, NADH 0.2 mM e piruvato 1.6 mM/poço. De 0 a 10 minutos após essa reação, efetuou-se a leitura da D.O., a 340 nm, em espectrofotômetro (Labsystem Multiscan®). Os resultados foram extrapolados pelo decréscimo da D.O., resultante da oxidação do NADH, na presença de piruvato, em relação ao tempo zero e expressos em mmoles de NADH/minuto.

3.5 Ensaio para determinação da atividade metabólica: redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT)

A atividade metabólica das células endoteliais foi avaliada pelo método da redução do sal de tetrazolium e formação do produto solúvel formazan (MOSMANN, 1983). Após cada período de incubação, descritos no item 3.2.2, as microplacas foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos e o sobrenadante de cada amostra foi descartado. A seguir, foram acrescentados, a cada poço, 90 µL de meio de cultura RPMI e 10 µL de MTT (5 mg/mL) em solução tamponada. Então, as CEs foram incubadas a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂, por 4 horas. Para dissolver os cristais de formazan, oriundos da redução do sal de tetrazolium pelas células viáveis, foram adicionados 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). Após 30 minutos de agitação das microplacas, efetuou-se a determinação da D.O. (540 nm) em espectrofotômetro (Labsystem Multiscan®). A redução da atividade metabólica foi definida como a porcentagem de diminuição da D.O, observada na monocamada submetida à ação dos agentes, em relação à monocamada controle.

3.6 Determinação da proliferação celular

Para esta análise, 3×10^4 células/400 mL de meio de cultura RPMI/SFB10% foram semeadas em microplacas de 24 poços e colocadas em estufa de cultura (5% de CO₂/37 °C). Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado. Em seguida, as células foram incubadas com o veneno ou as toxinas, em concentrações não citotóxicas (definidas a partir dos estudos anteriores) ou meio de cultura RPMI apenas (controle), em estufa de cultura (5% de CO₂/37 °C) por 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi retirado e 200 µL de tripsina 0.05%/EDTA 0,02% foram adicionados aos poços e a microplaca retornou à estufa de cultura por um período de até 5 minutos. A seguir, foram adicionados 400 µL de meio de cultura RPMI/SFB10% aos poços, para neutralização da atividade da tripsina. A suspensão celular, assim obtida, foi adicionada a microtubos, que foram centrifugados a 200 x g, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 100 µL de meio de cultura RPMI. A contagem do número total de células foi feita em câmara de Neubauer, ao microscópio de luz. A proliferação celular foi expressa em número total de células/poço.

3.7 Determinação da concentração de óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico, nos sobrenadantes das culturas de células endoteliais, foi determinada de acordo com o método de Archer (1993), que se baseia na reação de quimioluminescência entre o NO e o ozônio (fase gasosa). Neste método, o nitrato, presente nas amostras é reduzido a NO, via formação de nitrito, e detectado em fase gasosa.

Após o período de incubação com o veneno ou as toxinas, em concentrações não-citotóxicas (definidas a partir dos estudos anteriores) ou meio de cultura RPMI apenas (controle negativo), as microplacas foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes coletados. Aliquotas, contendo 10 µL de cada amostra foram aplicadas ao sistema analisador de óxido nítrico NOA^{TM280} (Sievers, USA), para reação com uma solução redutora (VCl3 0,8% em HCl 1N) e detecção do NO resultante. A partir dos registros obtidos por esse sistema, as concentrações de NO foram calculadas por extrapolação de curvas-padrão de NaNO₂, utilizando-se o software Bag Program (versão 2.2, Sievers, USA), que está acoplado ao sistema NOA.

3.8 Determinação da concentração de PGI₂ por ensaio imunoenzimático específico (EIA)

A produção de PGI₂ foi determinada através da medida do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina F_{1α}. A análise foi feita por ensaio imunoenzimático específico (EIA), utilizando-se um kit comercial. Após a incubação das células com o veneno ou as toxinas, em concentrações não-citotóxicas (definidas a partir dos estudos anteriores) ou meio de cultura RPMI apenas (controle negativo), as microplacas foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos e os sobrenadantes coletados. Aliquotas, contendo 50 µL de cada amostra, foram adicionadas a microplacas de 96 poços e incubadas com igual volume do prostanóide conjugado à acetilcolinesterase e antisoro específico de coelho. Após a adição do substrato, a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (Labsystem Multiscan®), a 405 nm e as concentrações foram estimadas a partir da curva padrão específica, em concentrações representadas em pg/mL.

3.9 Análise por *Western Blotting*

A expressão protéica de COX-1 e COX-2 foi realizada pela técnica de *Western Blotting*. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas ou não, com os agentes em estudo pelo período de 6 horas. Após centrifugação a 200 x g, por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e às células remanescentes, foram adicionados 100 µL de tampão de amostra (LAEMMLI, 1970) (SDS 20%; glicerina; β-mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6.8; Azul de bromofenol a 0,1%) e aquecidas a 100 °C, por 10 minutos.

A seguir, 14 µL de cada amostra foram aplicadas ao gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE), para a separação das proteínas, por eletroforese. Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 150 V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas, em sistema tamponado, para uma membrana de nitrocelulose, com uma voltagem de 100 V, durante 90 minutos, a 4 °C. Os sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foram bloqueados por uma solução contendo leite desnatado a 5%, em tampão de lavagem (10% Tween-20, pH 7.4), durante 1 hora. A seguir, para a detecção da COX-1 e COX-2, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-COX-1 ou anti-COX-2 (diluição 1:1000 v/v e 1:1500 v/v, respectivamente), durante 1 hora. Em seguida, foi adicionado um segundo anticorpo, conjugado à peroxidase, para a detecção das COX-1 e -2 (anti-IgG de camundongo, 1:1500 v/v e anti-IgG de coelho, 1:1500 v/v), durante 1 hora. Para o controle do *Western blotting*, as membranas foram incubadas também com anticorpo monoclonal anti-β-actina, na diluição de 1:1500 v/v e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, na diluição de 1:1500 v/v.

As bandas imunorreativas para as isoformas da COX-1 e COX-2 foram reveladas por quimiluminescência, com solução de luminol e, em seguida, reveladas em filme fotográfico, em câmara escura. As densidades das bandas foram determinadas em Densitômetro GS 800 (Bio Rad Laboratories, USA), utilizando o programa de análise *Quantity One*® (Bio Rad Laboratories, USA) e normalizadas a partir das densidades das bandas de β-actina.

3.10 Tratamento com inibidores específicos

Para avaliar a participação das ciclooxigenases e das fosfolipases A₂ citosólica (cFLA₂) e independente de Ca⁺ (iFLA₂), na produção de prostaciclina pelas células endoteliais, foram realizadas pré-incubações com os diferentes inibidores, descritos abaixo, antes da adição do VCdt (10 µg/mL) ou da subunidade CB (0.4 µM). Após o período de incubação com os agentes estimulatórios, a produção de PGI₂ foi determinada como descrito no item 3.8. As concentrações utilizadas para as intervenções farmacológicas basearam-se na literatura, demonstrando a eficiência de cada fármaco.

Abaixo estão indicadas as condições de incubação das células com os diferentes compostos utilizados, previamente à adição do veneno ou da toxina:

- Indometacina (10 µM), por 1 hora - inibidor das COX-1 e 2 (SEOK *et al.*, 2006);
- Valeril salicilato (VSA) (500 µM), por 1 hora - inibidor da COX-1 (BHATTACHARYYA *et al.*, 1995);
- Etoricoxibe (10 µM), por 1 hora - inibidor da COX-2 (RABAUSCH *et al.*, 2004);
- Araquidonil trifluormetil cetona (AACOCF₃) (10 µM), por 1 hora - inibidor da cFLA₂ (HOULISTON *et al.*, 2001);
- Bromoenol lactona (BEL) (1 µM), por 1 hora - inibidor da iFLA₂ (MICHIELS *et al.*, 2002).

-Após os períodos de incubação prévia, os compostos acima descritos, foram mantidos no meio de incubação com as toxinas;

-Veículos de cada fármaco foram incubados, em volumes equivalentes, nas mesmas condições;

- A ausência de toxicidade de cada fármaco ou de seu veículo sobre as células endoteliais, no período total de incubação utilizado, foi confirmada previamente pelo ensaio do MTT (conforme item 3.5).

3.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média e analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, nas comparações múltiplas. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Para a análise estatística dos resultados expressos em porcentagem, os mesmos foram submetidos a uma transformação matemática, através da equação: $y = \arcsin \sqrt{p}$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da formação de monocamadas em função do número inicial de células

As condições ideais para a formação de monocamadas de células endoteliais foram padronizados. Para tanto, as CEs da linhagem tEnd, foram semeadas em microplacas de 96 poços, em concentrações crescentes, entre de 1×10^3 e 5×10^5 células/poço e incubadas por 24 a 96 horas, em meio de cultura RPMI/SFB10%. A formação das monocamadas foi avaliada por observação microscópica.

A Tabela 1 mostra que 1×10^3 ou 2.5×10^3 células/poço não originaram monocamadas confluentes, quando incubadas por até 96 horas. Neste caso, a densidade celular foi insuficiente para que houvesse a formação do complexo juncional entre células vizinhas. A partir da concentração de 5×10^3 células/poço, foi possível verificar a formação de uma monocamada confluyente após 72 horas de cultivo, com as células estabelecendo interações de maneira definida e uniforme. Porém, o tempo de cultivo, nesta concentração, é contraproducente para o desenvolvimento ideal dos ensaios, além de ser necessária a troca do meio de cultura a cada 48 horas, o que pode favorecer contaminações.

Quando a cultura foi feita a partir de 1×10^4 células/poço, foi possível verificar o mesmo padrão de confluência das monocamadas, em apenas 48 horas, sendo que concentrações celulares maiores não alteraram este padrão. Portanto, esta foi considerada a concentração celular mínima, necessária para iniciar a formação de uma monocamada confluyente, em um espaço de tempo relativamente curto e de maneira segura. No que diz respeito à morfologia, a observação microscópica mostrou que as células endoteliais exibem uma forma poligonal ou oval, com um citoplasma escuro ao redor do núcleo central; a região periférica do citoplasma apresenta-se mais clara e o contorno da célula é bem definido. Na confluência, as células endoteliais formaram uma monocamada bastante evidente.

Paralelamente, foi avaliada a atividade metabólica das culturas celulares. As células apresentaram-se viáveis, em todos os períodos de tempo analisados e em todas as concentrações utilizadas. A Figura 1 mostra que não houve alteração na atividade metabólica, em culturas iniciadas com a concentração de 1×10^3 células/poço, em todos os períodos de tempo analisados. Nas concentrações de 5×10^3 e 1×10^4 , ocorreu um aumento da atividade metabólica ao longo do tempo. Entretanto, a partir da concentração de 5×10^4 , verificou-se uma atividade metabólica aumentada, já na 24ª hora, sem modificações importantes nos

períodos subsequentes.

Portanto, a partir dos resultados apresentados na Tabela 1 e Figura 1, adotou-se o número de 1×10^4 células/poço e o tempo de cultivo de 48 horas, para realização dos estudos subsequentes.

Tabela 1. Formação da monocamada de células endoteliais ao longo do tempo.

tempo de incubação (h)	24	48	72	96
concentração (células/poço)				
1×10^3	+	+	+	+
$2,5 \times 10^3$	+	+	++	++
5×10^3	++	++	+++	+++
1×10^4	++	+++	+++	+++
$2,5 \times 10^4$	++	+++	+++	+++
5×10^4	+++	+++	+++	+++
1×10^5	+++	+++	+++	+++
$2,5 \times 10^5$	+++	+++	+++	+++
5×10^5	+++	+++	+++	+++

As células endoteliais foram cultivadas em microplacas de 96 poços, a partir das concentrações indicadas acima, pelos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A formação das monocamadas foi avaliada por observação microscópica. +células espalhadas; ++células em monocamada não confluentes; +++células em monocamada confluentes.

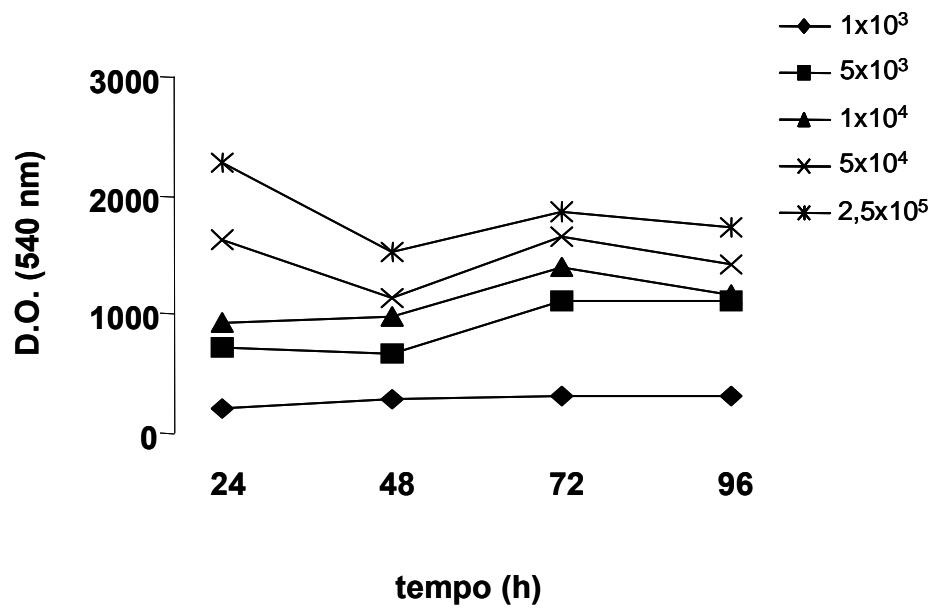


Figura 1. Avaliação da atividade metabólica de células endoteliais ao longo do tempo. As células endoteliais foram cultivadas em microplacas de 96 poços, a partir de concentrações crescentes, por períodos de tempo de 24 a 96 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio do MTT, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata.

4.2 Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e da crotoxina (CTX) sobre a viabilidade de células endoteliais em cultura

Para este estudo, monocamadas de células endoteliais, formadas a partir de 1×10^4 células/poço, foram incubadas com concentrações crescentes de VCdt ou CTX ou RPMI apenas (controle negativo), por diferentes períodos de tempo. A lactato desidrogenase, liberada no sobrenadante celular, é indicador de efeito tóxico sobre membranas celulares e, portanto, foi utilizada como parâmetro de viabilidade.

A Figura 2 mostra que os sobrenadantes das monocamadas controles apresentaram uma atividade de LDH de 0.002 ± 0.0008 , 0.004 ± 0.0003 e 0.006 ± 0.0008 mmol de NAD^+ /min, após 1, 3 e 6 horas de cultivo, respectivamente e na 12^a e 24^a hora, a atividade foi de 0.024 ± 0.008 e 0.023 ± 0.002 mmol de NAD^+ /min, respectivamente. A adição do veneno às monocamadas celulares, na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, causou um aumento significativo da atividade da LDH, em relação ao controle, que foi da ordem de 511, 270, 441 e 150%, na 3^a, 6^a, 12^a e 24^a hora, respectivamente. Na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o veneno acarretou um aumento de 256% na atividade da LDH após 24 horas de incubação, que foi significativo em relação ao controle. A menor concentração do veneno não afetou a viabilidade celular, pois não modificou a atividade basal da lactato desidrogenase, nos tempos de incubação avaliados. A adição da CTX às células endoteliais, nas concentrações de 1, 10 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, não modificou a viabilidade das células, em relação ao controle (RPMI), em nenhum dos períodos de tempo avaliados.

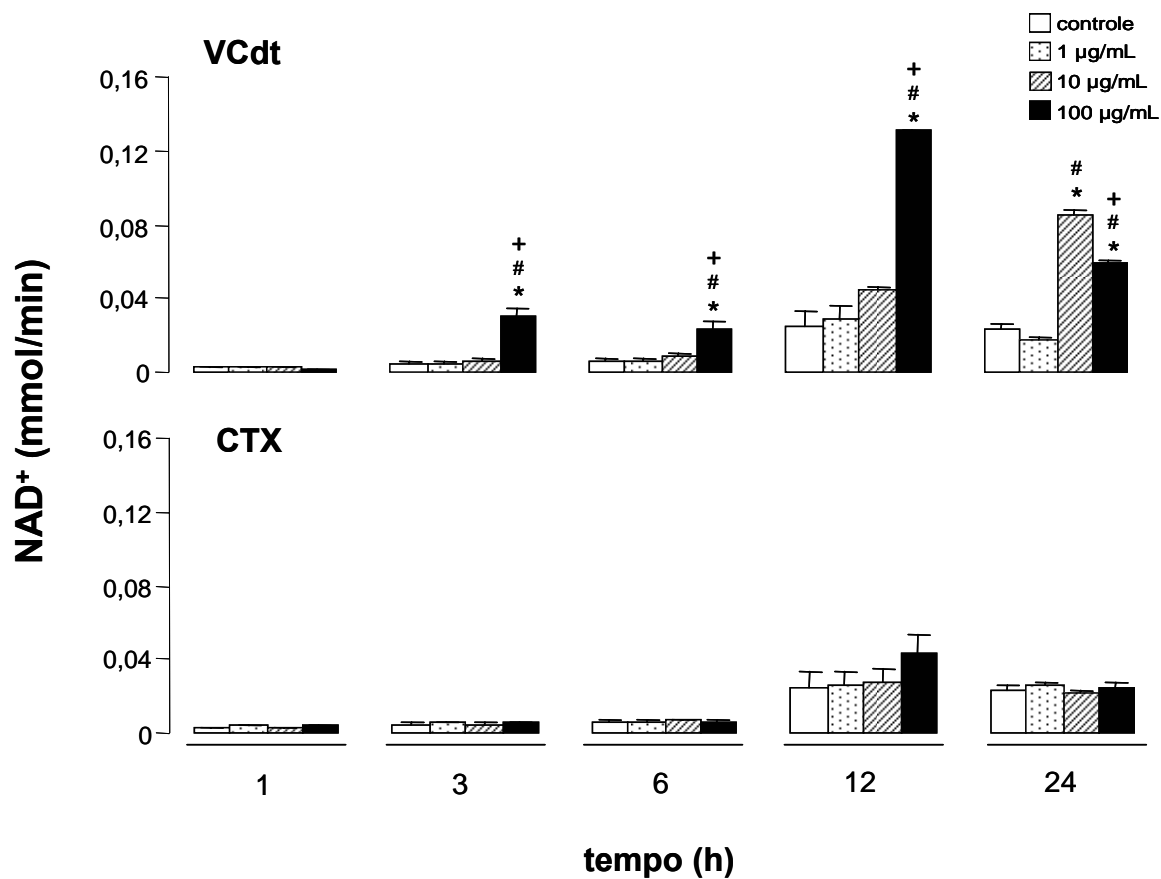


Figura 2. Efeito do VCdt e da CTX sobre a viabilidade de células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou a CTX (1, 10 ou 100 µg/mL) ou RPMI (controle), por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da atividade da LDH, como descrito em Materiais e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3-5 experimentos independentes, realizados em triplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação à concentração de 1 µg/mL; +p < 0,05 em relação à concentração de 10 µg/mL (ANOVA).

4.3 Efeito da fosfolipase A₂ (CB) e da crotapotina (CA) sobre a viabilidade de células endoteliais em cultura

As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com concentrações crescentes de CB ou CA ou RPMI apenas (controle negativo), por diferentes períodos de tempo. A viabilidade celular foi determinada pela atividade da LDH, nos sobrenadantes das culturas.

A Figura 3 mostra que os sobrenadantes das monocamadas controles apresentaram uma atividade de LDH de 0.004 ± 0.0001 , 0.006 ± 0.0003 e 0.01 ± 0.001 mmol de NAD^+ /min após 1, 3 e 6 horas de cultivo, respectivamente, e na 12^a e 24^a hora, a atividade foi de 0.019 ± 0.001 e 0.071 ± 0.008 mmol de NAD^+ /min, respectivamente. A adição da fosfolipase A₂ às monocamadas celulares, na concentração de 4 μM , causou um aumento significativo da atividade da LDH, em relação ao controle, desde a 1^a hora de incubação, que foi da ordem de 190, 605, 644, 467 e 75%, na 1^a, 3^a, 6^a, 12^a e 24^a hora, respectivamente. Nas concentrações menores, a subunidade CB não modificou a atividade basal da lactato desidrogenase, nos tempos de incubação avaliados. A adição da crotapotina às monocamadas de células endoteliais, nas concentrações de 0.04, 0.4 ou 4 μM , não modificou a viabilidade das células, em relação ao controle (RPMI), em nenhum dos períodos de tempo avaliados.

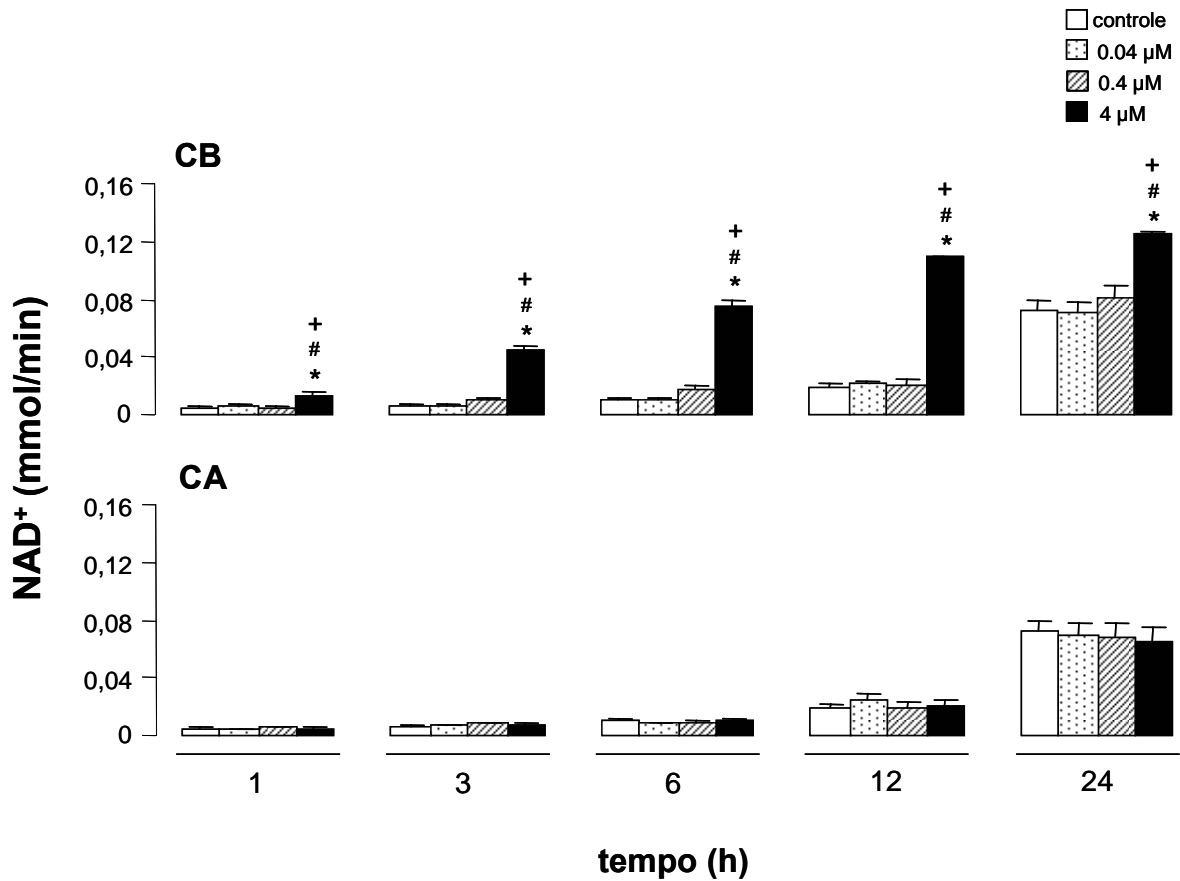


Figura 3. Efeito da subunidade CB e CA na viabilidade de células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com CB ou CA (0.04, 0.4 ou 4 μM) ou RPMI (controle negativo) por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas, a 37 $^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 . A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio da atividade da LDH, como descrito em Materiais e Métodos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 3-5 experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação à concentração de 0.04 μM ; + $p < 0,05$ em relação à concentração de 0.4 μM (ANOVA).

4.4 Efeito do VCdt e da CTX sobre a atividade metabólica de células endoteliais em cultura

Para este estudo, as monocamadas de células endoteliais foram incubadas com concentrações crescentes de VCdt ou CTX ou RPMI apenas (controle negativo), por diferentes períodos de tempo e a atividade oxidativa mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT.

A Figura 4 mostra que as monocamadas controles, incubadas apenas com RPMI, apresentaram-se metabolicamente ativas, ao longo das 24 horas de incubação, com valor médio de absorbância de 1.667 ± 0.14 , a 540 nm, que foi tomado como 100% de atividade metabólica. A adição do VCdt às células endoteliais, na menor concentração, não causou alteração significativa na atividade metabólica destas células, em relação ao controle, em nenhum dos períodos de tempo avaliados. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, o veneno não afetou a atividade metabólica das células até a 12^a hora de incubação. No entanto, após a 24^a hora de incubação, o veneno causou redução da atividade metabólica celular, em torno de 17%, que foi significativa em relação ao controle. Na maior concentração, o veneno causou uma redução significativa da atividade metabólica celular, em relação ao controle, a partir da 1^a hora de incubação, que foi máxima em 24 horas. A adição do CTX às células endoteliais, em todas as concentrações utilizadas, não modificou a atividade metabólica das células, em relação ao controle, em nenhum dos períodos de tempo avaliados.

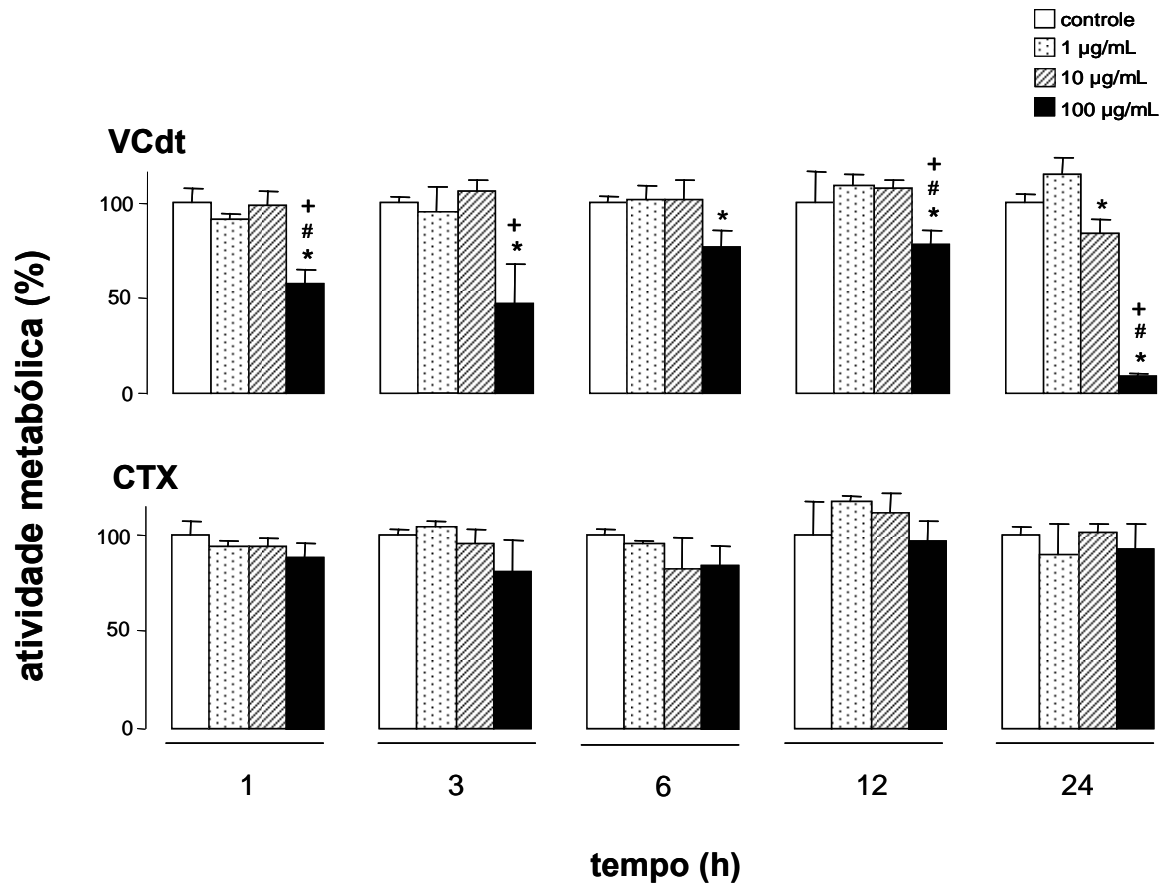


Figura 4. Efeito do VCdt e da CTX na atividade metabólica de células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou a CTX (1, 10 ou 100 µg/mL) ou RPMI (controle) por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A atividade metabólica foi determinada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito em Materiais e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3-5 experimentos independentes, realizados em triplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação à concentração de 1 µg/mL; +p < 0,05 em relação à concentração de 10 µg/mL (ANOVA).

4.5 Efeito da subunidade CB e CA sobre a atividade metabólica de células endoteliais em cultura

As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com concentrações crescentes de CB ou CA ou RPMI apenas (controle negativo), por diferentes períodos de tempo e a atividade oxidativa mitocondrial foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT.

A Figura 5 mostra que as monocamadas controles, incubadas apenas com RPMI, apresentaram-se metabolicamente ativas, ao longo de 24 horas de incubação, com valor médio de absorbância de 1.384 ± 0.09 , a 540 nm, que foi tomado como 100% de atividade metabólica. A adição da fosfolipase A₂ às células endoteliais, nas concentrações de 0.04 e 0.4 μM , não causou alteração significativa da atividade metabólica destas células, em relação ao controle, em nenhum dos períodos de tempo avaliados. Entretanto, na maior concentração, a CB causou uma redução significativa da atividade metabólica, em relação ao controle, a partir da 1^a hora de incubação e máxima nas 12 horas. Após 24 horas de incubação, a subunidade CB, na maior concentração, não alterou a atividade metabólica, em relação ao controle. A adição da crotapotina às células endoteliais, em todas as concentrações de estudo, não alterou a atividade oxidativa mitocondrial em relação ao controle, nos períodos de tempos avaliados.

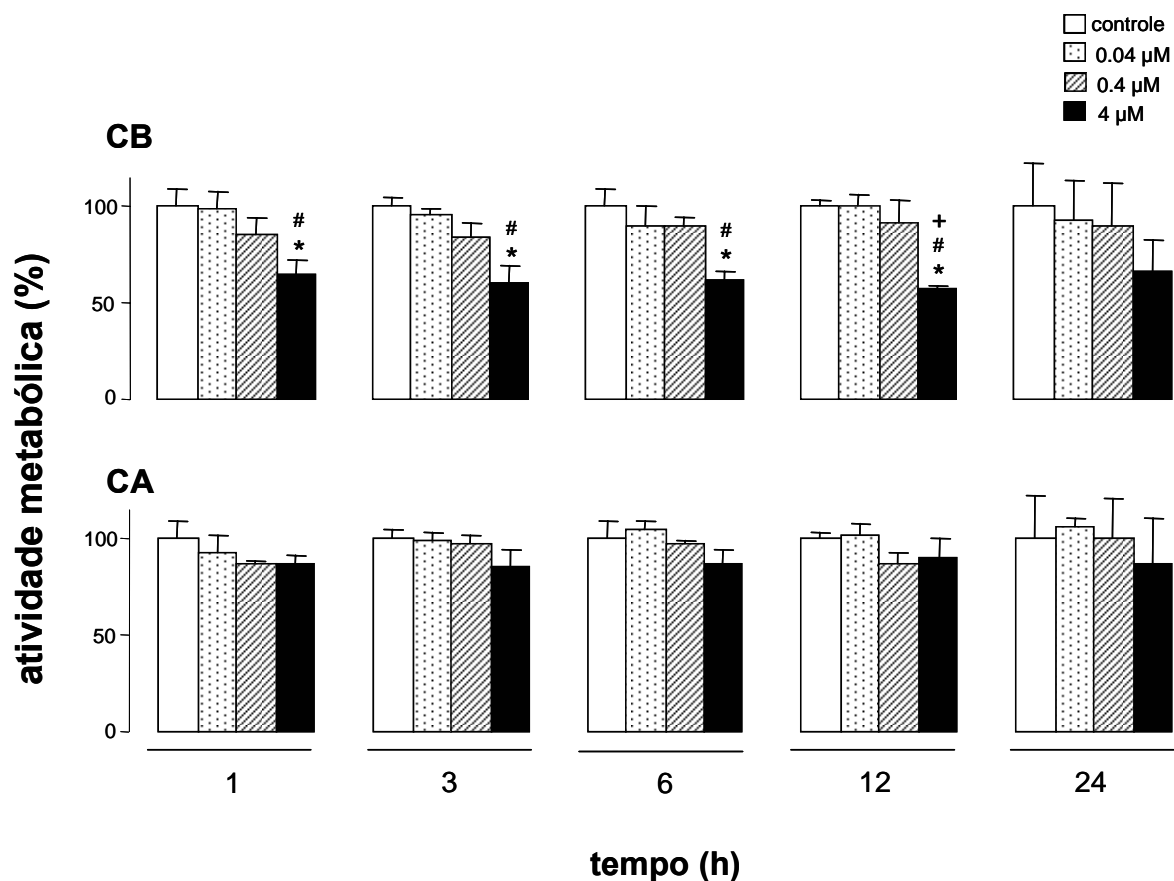


Figura 5. Efeito da subunidade CB e CA na atividade metabólica de células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com subunidade CB ou CA (0.04, 0.4 ou 4 µM) ou RPMI (controle negativo) por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A atividade metabólica foi determinada pelo ensaio de redução do MTT, como descrito em Materiais e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3-5 experimentos independentes, realizados em triplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação à concentração de 0.04 µM; +p < 0,05 em relação à concentração de 0.4 µM (ANOVA).

4.6 Efeito do VCdt e da CTX sobre a integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura

Para este estudo, as monocamadas de células endoteliais foram incubadas com concentrações crescentes de VCdt ou CTX ou RPMI (controle negativo), por diferentes períodos de tempo e determinou-se a integridade das monocamadas pela medida do descolamento celular do suporte de adesão, efetuando-se a coloração das células aderidas com cristal violeta.

A Figura 6 demonstra que as monocamadas de células endoteliais controles apresentaram valores médios de absorvância de 0.254 ± 0.02 , a 620 nm, entre 1 e 24 horas de cultivo; estes valores foram tomados como 100% de integridade. A adição do VCdt às células endoteliais, nas concentrações de 1 ou 10 $\mu\text{g/mL}$, não alterou a integridade das monocamadas celulares, em relação ao controle, em nenhum dos períodos de tempo avaliados. Entretanto, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, o veneno causou o descolamento das células, do seu substrato de adesão, que foi significativo em relação ao controle, entre 12 e 24 horas de incubação, com percentuais de descolamento de 55 e 84%, respectivamente. A adição da CTX às células endoteliais, em todas as concentrações de estudo, não afetou a integridade das monocamadas, em relação ao controle, em nenhum dos períodos de tempo avaliados.

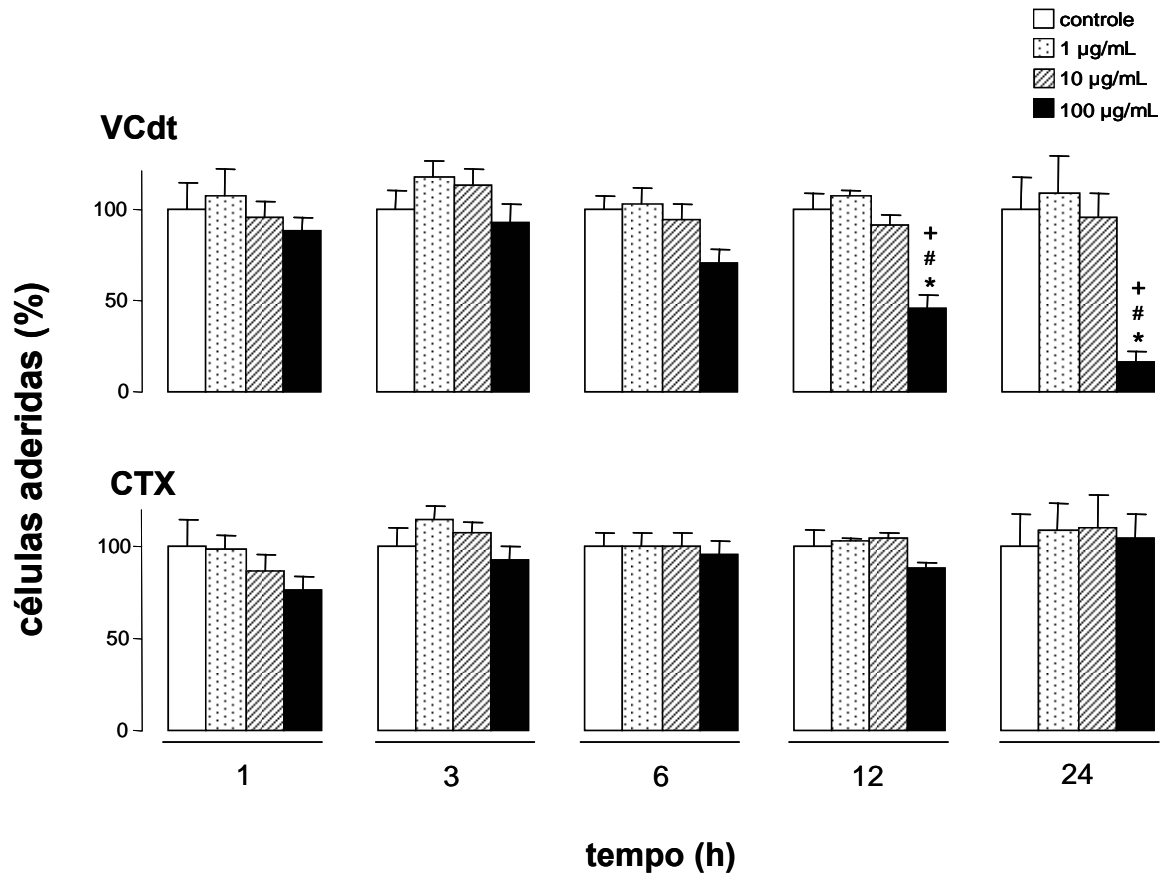


Figura 6. Efeito do VCdt e da CTX na integridade de monocamadas de células endoteliais em cultura.

As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou CTX (1, 10 ou 100 µg/mL) ou RPMI (controle) por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A integridade das monocamadas celulares foi avaliada pela coloração com o cristal violeta, como descrito em Materiais e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3-5 experimentos independentes, realizados em triplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação à concentração de 1 µg/mL; +p < 0,05 em relação à concentração de 10 µg/mL (ANOVA).

4.7 Efeito da subunidade CB e CA sobre a integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura

As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com concentrações crescentes de CB ou CA ou RPMI apenas (controle negativo), por diferentes períodos de tempo e determinou-se a integridade das monocamadas pela medida do descolamento celular a partir do suporte de adesão.

A Figura 7 demonstra que as monocamadas de células endoteliais controles apresentaram valores médios de absorvância de 0.232 ± 0.01 , a 620 nm, entre 1 e 24 horas de cultivo; estes valores foram tomados como 100% de integridade. A adição da fosfolipase A₂ às células endoteliais, nas concentrações de 0.04 ou 0.4 μM , não alterou a integridade das monocamadas celulares, em relação ao controle, em nenhum dos períodos de tempo avaliados. Entretanto, na concentração de 4 μM , a CB causou o descolamento das células, a partir do substrato de adesão, que foi significativo em relação ao controle, entre 12 e 24 horas de incubação, com percentuais de descolamento de 28 e 42%, respectivamente. A adição da crotapotina às células endoteliais, em todas as concentrações de estudo, não afetou a integridade das monocamadas, em relação ao controle, em nenhum dos períodos de tempo avaliados.

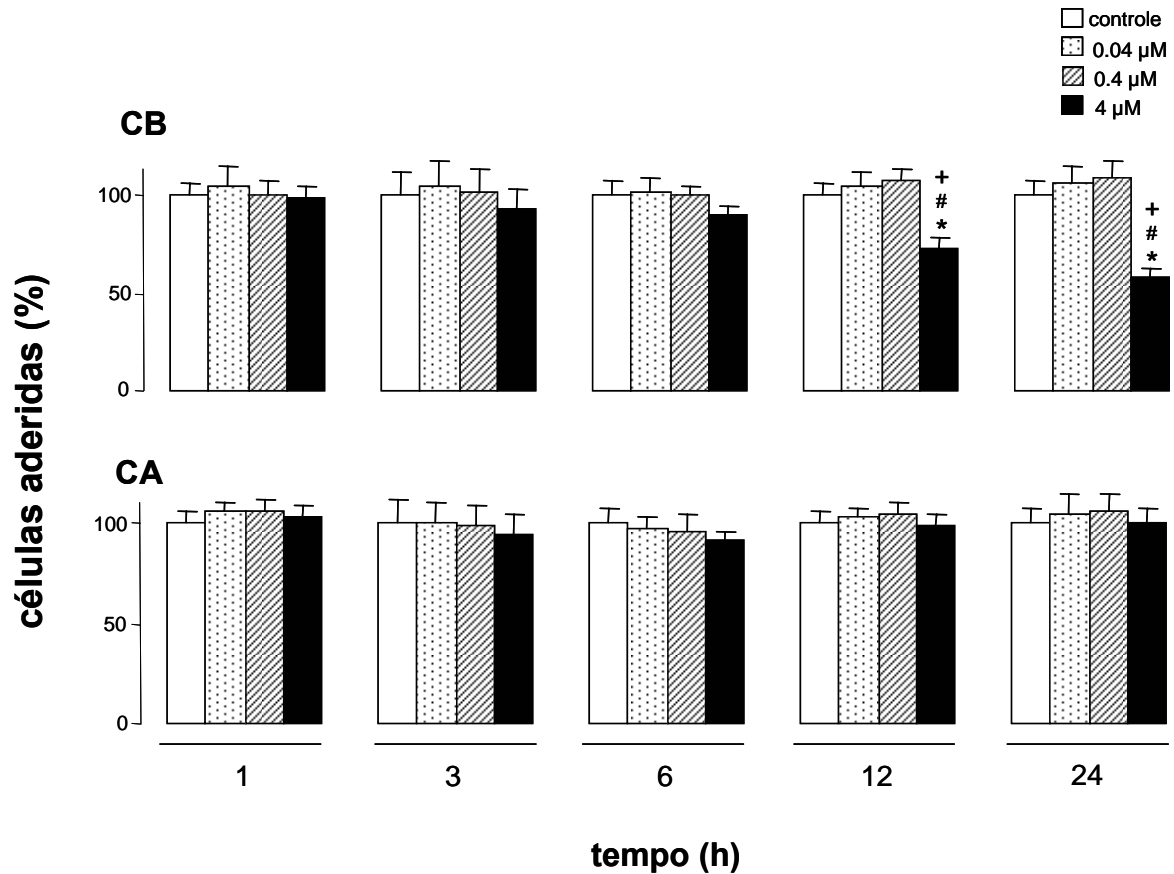


Figura 7. Efeito da subunidade CB e CA na integridade de monocamadas de células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB ou CA (0.04, 0.4 ou 4 µM) ou RPMI (controle negativo) por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A integridade das monocamadas celulares foi avaliada pela coloração com o cristal violeta, como descrito em Materiais e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3-5 experimentos independentes, realizados em triplicata. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação à concentração de 0.04 µM; +p < 0,05 em relação à concentração de 0.4 µM (ANOVA).

4.8 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na proliferação de células endoteliais em cultura

Para este estudo, as monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou CTX (10 µg/mL) ou CB ou CA (0.4 µM) ou RPMI apenas (controle negativo), pelo período de 48 horas. Esta concentração foi definida a partir dos dados anteriores, relacionados aos efeitos do VCdt e da subunidade CB, na viabilidade e/ou integridade das monocamadas celulares. A proliferação foi determinada pela contagem do número total de células em câmara de Neubauer.

A Figura 8 mostra que as monocamadas controles apresentaram uma média de $18.5 \times 10^4 \pm 3.8$ células/poço, após 48 horas de incubação. A adição do veneno ou da crotoxina ou de suas subunidades CB ou CA às monocamadas não afetou a proliferação das células endoteliais em cultura, em relação ao controle, na presente condição experimental.

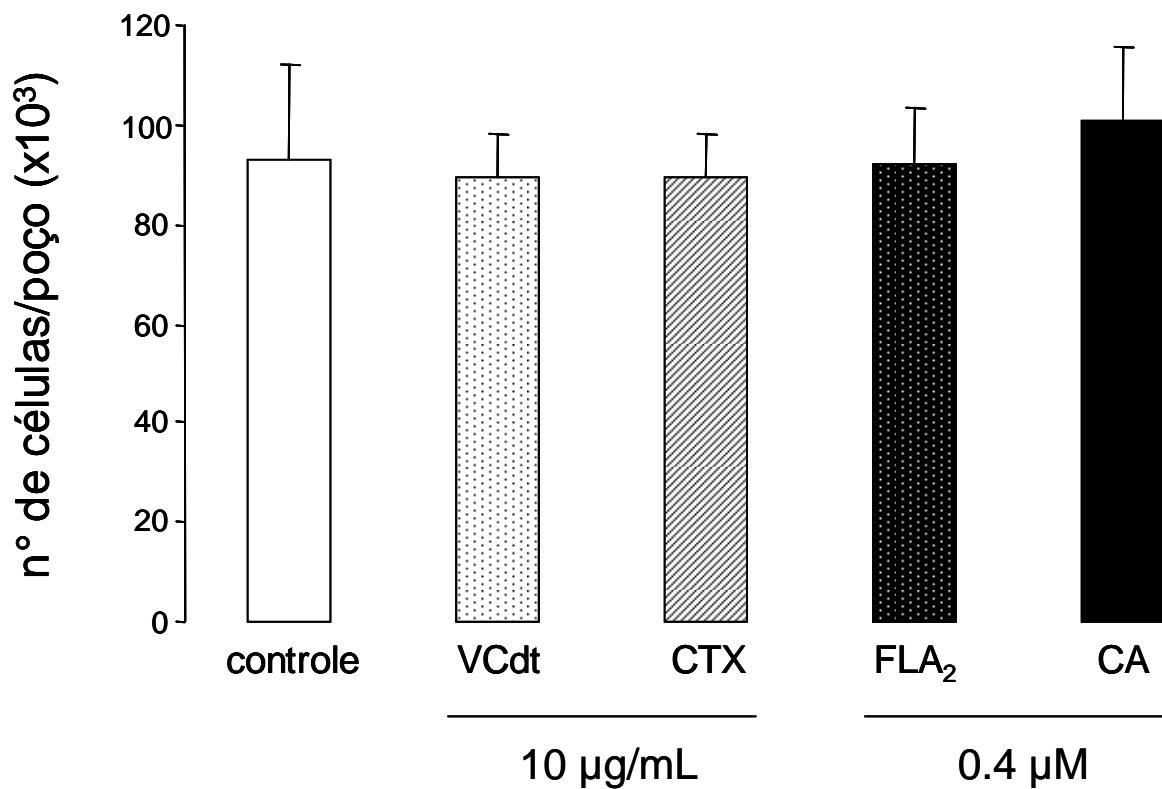


Figura 8. Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na proliferação de células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou CTX (10 µg/mL) ou CB ou CA (0.4 µM) ou RPMI (controle negativo) por 48 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A proliferação celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata (ANOVA).

4.9 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA sobre a produção de óxido nítrico (NO) por células endoteliais em cultura

Para este estudo, monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou a CTX (10 µg/mL) ou CB ou CA (0.4 µM) ou RPMI apenas (controle negativo), pelo período de 6 horas. Esta concentração e tempo de incubação foram definidos a partir dos dados anteriores, demonstrando que o VCdt e a subunidade CB, em concentrações e/ou períodos de incubação maiores, causaram perda da viabilidade e/ou da integridade das monocamadas celulares. A produção de NO foi avaliada pela reação de quimioluminescência entre o NO (fase gasosa) e o ozônio através do sistema NOA^{TM280}.

A Figura 9 mostra que as monocamadas controles apresentaram uma liberação basal de óxido nítrico de 350.5 ± 27.7 µM, a 550 nm, após 6 horas de incubação. A adição do veneno ou da crotoxina ou de suas subunidades CB ou CA às monocamadas, não afetou a produção basal de óxido nítrico, em relação ao controle, no período de tempo avaliado.

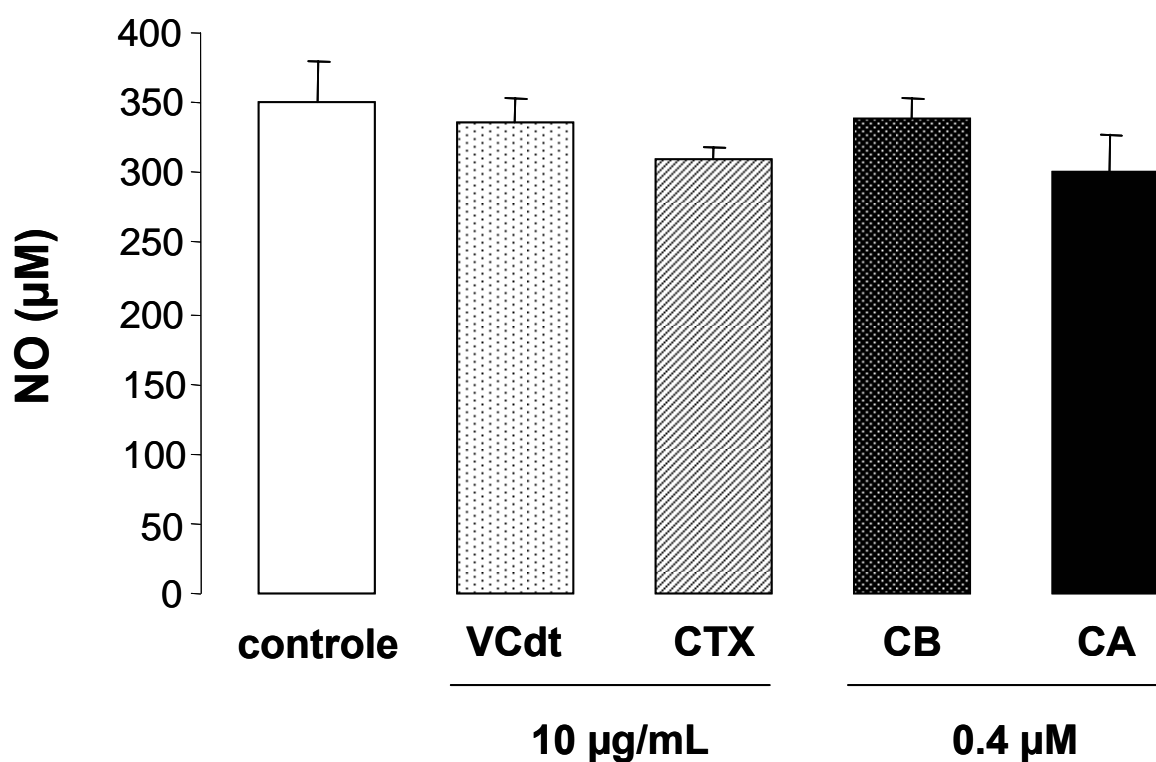


Figura 9. Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na produção de óxido nítrico em células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou CTX (10 µg/mL) ou CB ou CA (0.4 µM) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de NO foi determinada por quimioluminescência, como descrito em Materiais e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 4 experimentos independentes, realizados em triplicata.

4.10 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura

Para este estudo, as monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou a CTX (10 µg/mL) ou CB ou CA (0.4 µM) ou RPMI apenas (controle negativo), pelo período de 6 horas. Esta concentração e tempo de incubação foram definidos a partir dos dados anteriores, demonstrando que o VCdt e a subunidade CB, em concentrações e/ou períodos de incubação maiores, causaram perda da viabilidade e/ou da integridade das monocamadas celulares. A liberação de prostaciclina foi avaliada pela quantificação do seu metabólito estável, a 6-ceto prostaglandina F_{1α}, por ensaio imunoenzimático (EIA).

A Figura 10 mostra que as monocamadas controles apresentaram uma liberação basal de 178.86 ± 44.3 pg/mL de 6-ceto PGF_{1α}, após 6 horas de incubação. A adição do veneno bruto e da fosfolipase A₂, às monocamadas, causou um aumento significativo da liberação desse metabólito, em 120% e 81%, respectivamente, se comparado ao controle. A adição da CTX e da subunidade CA às células endoteliais, na concentração de 0.4 µM, não afetou a liberação basal de 6-ceto PGF_{1α}, em relação ao controle, no período de tempo avaliado.

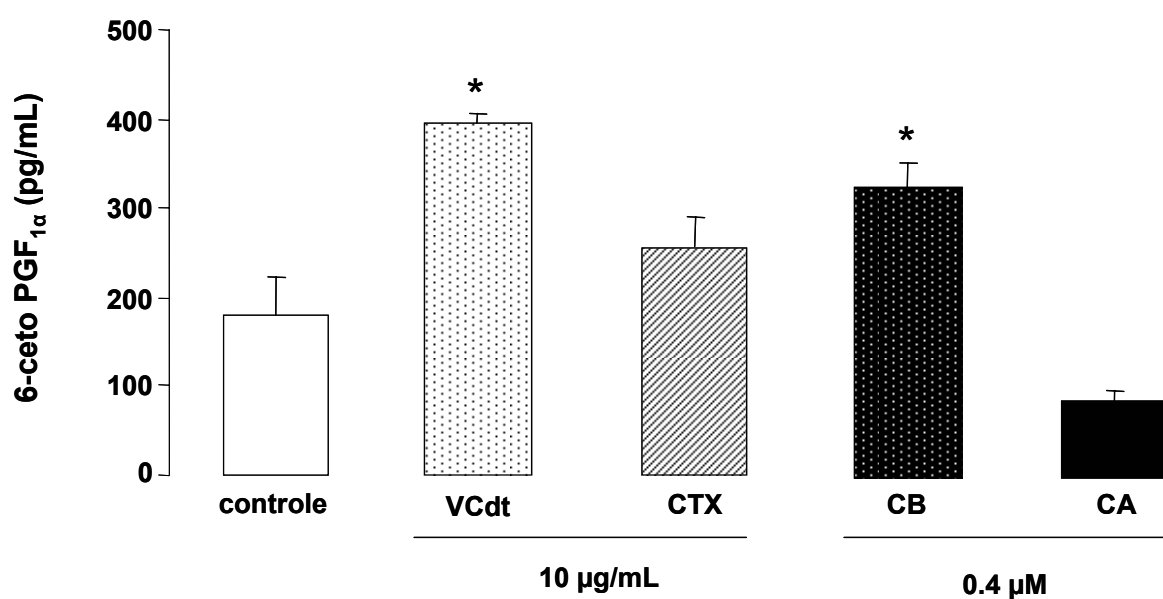


Figura 10. Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB e CA na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou CTX (10 µg/mL) ou CB ou CA (0.4 µM) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle (ANOVA).

4.11 Participação da atividade catalítica da subunidade CB na produção de prostaciclina por células endoteliais em cultura

Para analisar a participação do sítio catalítico da subunidade CB, na produção de PGI₂, estimulada por esta enzima, as células endoteliais foram estimuladas com a subunidade CB enzimaticamente inativa (0.4 μM), através de sua incubação com o brometo de 4-bromofenacil, de acordo com o método de SOARES *et al.*, (2001).

A figura 11 mostra que as monocamadas controles (não estimuladas) apresentaram uma liberação basal de 6-ceto PGF_{1α} de 178.86 ± 44.3 pg/mL, após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com a subunidade CB ativa (controle estimulado). Quando as células foram incubadas com a CB inativa, pelo período de 6 horas, houve uma diminuição significativa da liberação de PGI₂, em relação ao controle estimulado, que foi da ordem de 56%.

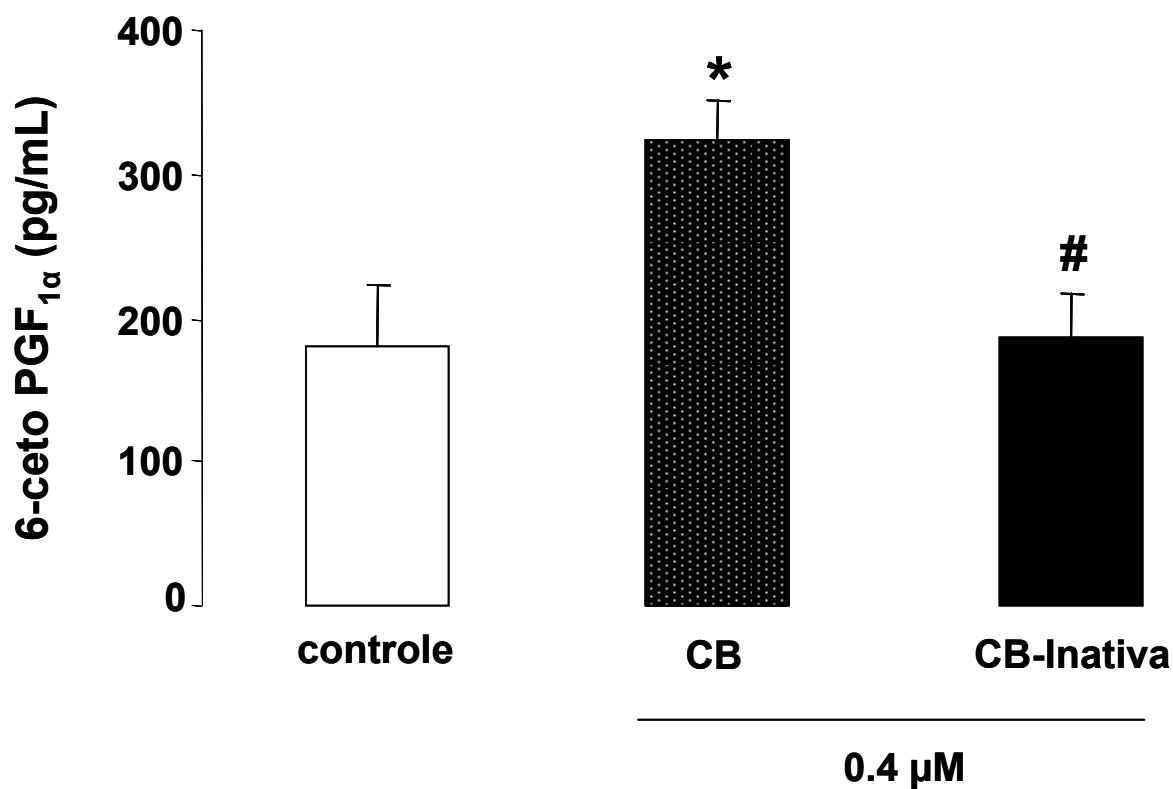


Figura 11. Participação da atividade catalítica da subunidade CB no seu efeito estimulatório sobre a produção de prostaciclina em células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB (0.4 μ M) ou RPMI (controle negativo) ou a subunidade CB cataliticamente inativada pelo brometo de 4-bromofenacil, (0.4 μ M) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle; # $p < 0,05$ em relação a subunidade CB (ANOVA).

4.12 Efeito dos inibidores das COXs na produção de prostaciclina induzida pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais

Para analisar a participação das isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e 2) na produção de PGI₂, induzida pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus*, as células endoteliais foram pré-incubadas (1 hora) com inibidores específicos, ou não, das ciclooxigenases ou com seus veículos (dados não mostrados) e estimuladas com o VCdt (10 µg/mL) por 6 horas.

A figura 12 mostra que as monocamadas controles (não estimuladas) apresentaram uma liberação basal de 6-ceto PGF_{1α} de 102.96 ± 9.49 pg/mL, após 6 horas de incubação. Esta concentração do prostanóide foi significativamente aumentada após a incubação das células com o veneno bruto (controle estimulado). Quando as células foram pré-incubadas com a indometacina, inibidor não-seletivo das ciclooxigenases, por 1 hora e estimuladas com o VCdt, por 6 horas, houve uma diminuição significativa da liberação de PGI₂, em torno de 72%, em relação ao controle estimulado. A incubação das células com o VCdt, na presença do valeril salicilato, inibidor seletivo da COX-1, também causou uma diminuição significativa na produção de prostaciclina, com percentual de 54%, em relação ao controle estimulado. A incubação com o etoricoxibe, inibidor seletivo da COX-2, diminuiu significativamente a produção de PGI₂, induzida pelo VCdt, na ordem de 58%, se comparado ao controle estimulado. O pré-tratamento das CEs, com o Tris/HCl e o DMSO, veículos da indometacina, valeril salicilato e do etoricoxibe, em condições semelhantes, não afetou a liberação de PGI₂, induzida pelo VCdt (dados não mostrados).

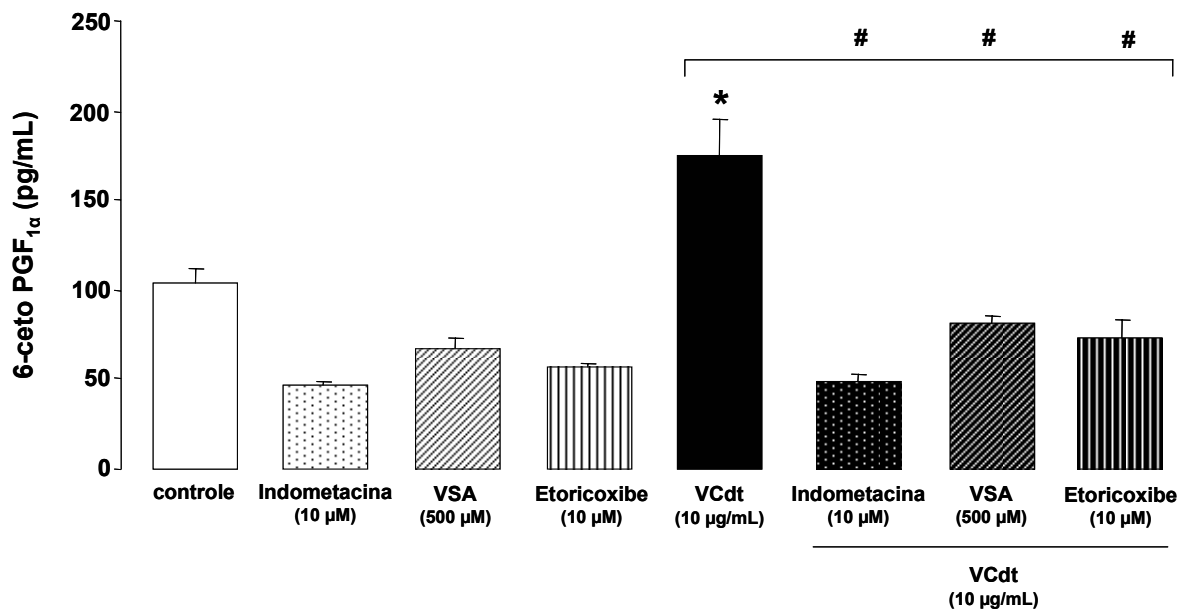


Figura 12. Efeito dos inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pelo VCdt. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt (10 μg/mL) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A indometacina (10 μM) ou valeril salicilato (500 μM) ou etoricoxibe (10 μM) ou seus veículos em volumes equivalentes, foram incubados com as células endoteliais, 1 hora antes da adição do VCdt. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação ao VCdt (ANOVA).

4.13 Efeito dos inibidores das COXs na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais

Para analisar a participação das isoformas das ciclooxigenases (COX-1 e 2) na produção de PGI₂, induzida pela subunidade CB, as células endoteliais foram pré-incubadas (1 hora) com inibidores específicos ou não, das ciclooxigenases ou com seus veículos (dados não mostrados) e estimuladas com a subunidade CB (0.4 µM) por 6 horas.

A figura 13 mostra que as monocamadas controles (não estimuladas) apresentaram uma liberação basal de 6-ceto PGF_{1α} de 102.96 ± 9.49 pg/mL, após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células, por 6 horas, com a subunidade CB (controle estimulado). Quando as células foram pré-incubadas com a indometacina, inibidor não-seletivo das ciclooxigenases (1 e 2), 1 hora antes da estimulação com a subunidade CB, houve uma diminuição significativa da liberação de PGI₂, em torno de 78%, em relação ao controle estimulado. A pré-incubação, das células com o valeril salicilato, inibidor seletivo da COX-1, também causou uma diminuição significativa na produção de prostaciclina, induzida pela fosfolipase A₂, com percentuais de 42%, em relação ao controle estimulado. Do mesmo modo, o etoricoxibe, inibidor seletivo da COX-2, diminuiu significativamente a produção de PGI₂, induzida pela fosfolipase A₂, em torno de 61%, se comparado ao controle estimulado. O pré-tratamento das CEs, com o Tris/HCl e o DMSO, veículos da indometacina, valeril salicilato e do etoricoxibe, em condições semelhantes, não afetou a liberação de PGI₂, induzida pela subunidade CB (dados não mostrados).

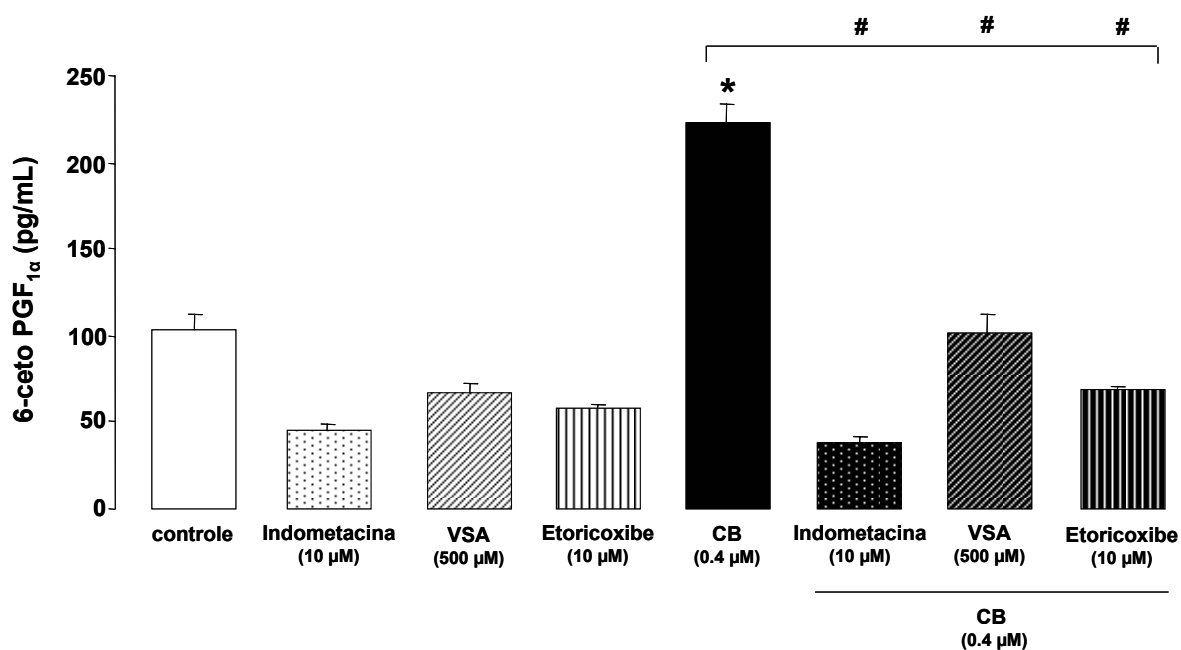


Figura 13. Efeito dos inibidores das ciclooxigenases na liberação de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pela subunidade CB. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB (0.4 μM) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. A indometacina (10 μM) ou valeril salicilato (500 μM) ou etoricoxibe (10 μM) ou seus veículos, em volumes equivalentes, foram incubados com as células endoteliais, 1 hora antes da adição de CB. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação a subunidade CB (ANOVA).

4.14 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-1 em células endoteliais em cultura

A expressão da COX-1 foi analisada em células endoteliais em cultura, após 6 horas da incubação com o VCdt ou a CTX (10 µg/mL) ou CB ou CB-inativa ou CA (0.4 µM) ou RPMI apenas (controle negativo).

A Figura 14 mostra as bandas imunorreativas para COX-1, obtidas a partir do precipitado celular após incubação com os agentes em teste. As bandas protéicas correspondentes à COX-1 foram detectadas tanto em precipitados controles, quanto naqueles incubados com o veneno e as toxinas. A análise densitométrica demonstrou que a intensidade das bandas de COX-1 não foram modificadas, significativamente, após a incubação das células com o veneno ou as toxinas, em relação aos controles, no período de tempo analisado.

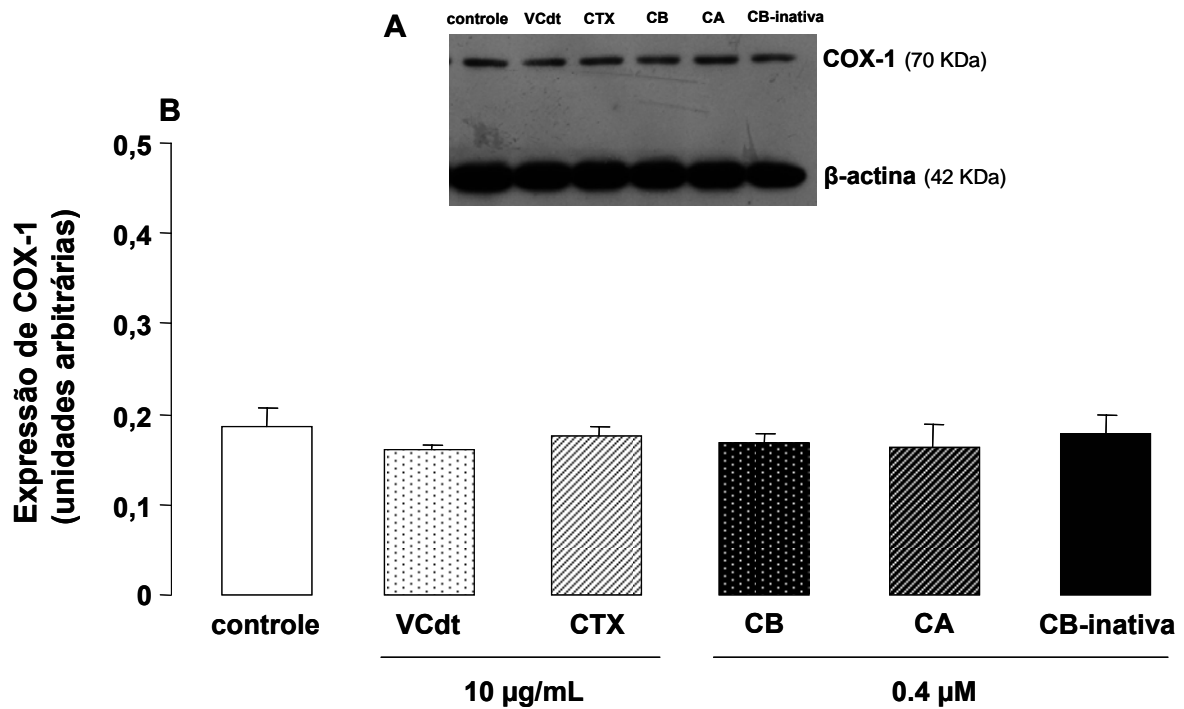


Figura 14. Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-1 em células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou CTX (10 µg/mL) ou CB ou CA ou CB cataliticamente inativada pelo brometo de 4-bromofenacil (0,4 µM) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram lisadas e analisadas por *Western blotting*, como descrito em Material e Métodos. **(A)**: *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (1:1000) e anticorpo monoclonal anti-β-actina (1:1500). **(B)**: Quantificação por densitometria das bandas de COX-1, normalizadas a partir das bandas de β-actina. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata (ANOVA).

4.15 Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-2 em células endoteliais em cultura

A expressão da COX-2 foi analisada em células endoteliais em cultura, após 6 horas da incubação com o VCdt ou a CTX (10 µg/mL) ou CB ou CB-inativa ou CA (0.4 µM) ou RPMI apenas (controle negativo).

A Figura 15 mostra as bandas imunorreativas para COX-2, obtidas a partir do precipitado celular após incubação com os agentes em teste. As bandas protéicas correspondentes à COX-2, foram detectadas em todos os precipitados celulares analisados. Porém, a análise densitométrica demonstra que a intensidade das bandas imunorreativas para COX-2, reveladas em precipitados incubados com o VCdt e a subunidade CB, foram significativamente maiores em comparação ao controle ou à CTX ou à CA ou à CB-inativa.

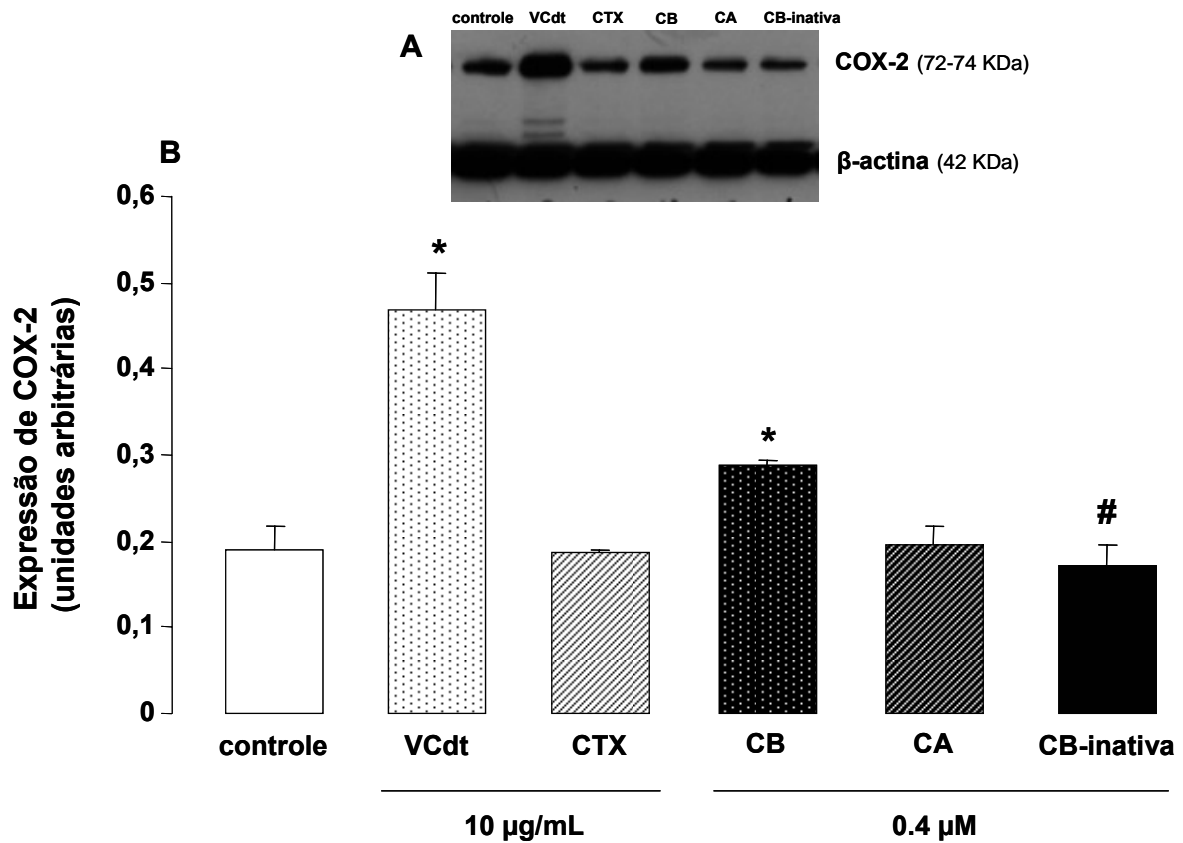


Figura 15. Efeito do VCdt, da CTX e de suas subunidades CB ou CB-inativa e CA na expressão de COX-2 em células endoteliais em cultura. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt ou CTX (10 μ g/mL) ou CB ou CA ou CB cataliticamente inativada pelo brometo de 4-bromofenacil (0.4 μ M) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram lisadas e analisadas por *Western blotting*, como descrito em Material e Métodos. **(A)**: *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-COX-2 (1:1500) e anticorpo monoclonal anti- β -actina (1:1500). **(B)**: Quantificação por densitometria das bandas de COX-2, normalizadas a partir das bandas de β -actina. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. * p < 0,05 em relação ao controle; # p <0,05 em relação a subunidade CB (ANOVA).

4.16 Efeito do AACOCF₃ e do BEL na produção de prostaciclina induzida pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais

Para analisar a participação das cFLA₂ e iFLA₂ na liberação de prostaciclina, induzida pelo VCdt, as células endoteliais foram pré-incubadas (1 hora) com inibidores específicos de fosfolipases A₂ intracelulares ou com seus respectivos veículos e estimuladas com o VCdt (10 µg/mL) por 6 horas. As concentrações dos inibidores AACOCF₃ (10 µM) e Bel (1 µM), utilizadas neste estudo, foram baseadas na literatura.

A figura 16 mostra que as monocamadas celulares incubadas com o meio de cultura ou os inibidores apenas ou seus respectivos veículos (controles não estimulados), apresentaram uma liberação basal de 6-ceto PGF_{1α} de 103.54 ± 10.2 pg/mL após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com o VCdt (controle estimulado). Quando as monocamadas foram pré-incubadas (1 hora) com o composto AACOCF₃, inibidor de FLA₂ citosólica ou com BEL, inibidor da FLA₂ independente de Ca⁺, e estimuladas com o VCdt, pelo período de 6 horas, não houve alteração significativa na produção de PGI₂, pelas células endoteliais em cultura, em relação ao controle estimulado. O pré-tratamento das CEs, com o DMSO, veículo do AACOCF₃ e do BEL, em condições semelhantes, não afetou a liberação de PGI₂, induzida pelo VCdt (dados não mostrados).

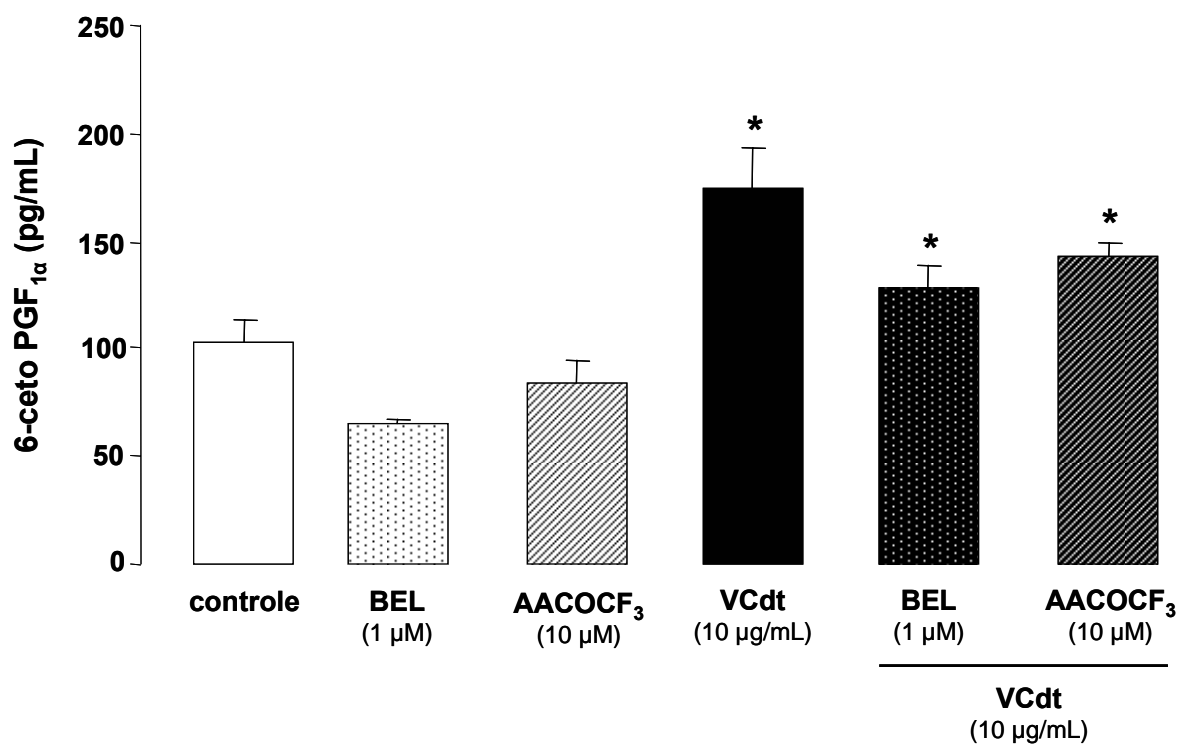


Figura 16. Efeito do AACOCF₃ e BEL na produção de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pelo VCdt. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com o VCdt (10 μg/mL) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. O AACOCF₃ (10 μM) ou BEL (1 μM) ou seus veículos, em volumes equivalentes, foram incubados com as células endoteliais, 1 hora antes da adição do VCdt. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p<0,05 em relação ao controle (ANOVA).

4.17 Efeito do AACOCF₃ e do BEL na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB em células endoteliais

Para analisar a participação das cFLA₂ e iFLA₂ na liberação de prostaciclina, induzida pela subunidade CB, as células endoteliais foram pré-incubadas (1 hora) com inibidores específicos de fosfolipases A₂ intracelulares ou com seus respectivos veículos e estimuladas com a CB (0.4 μM) por 6 horas. As concentrações dos inibidores AACOCF₃ (10 μM) e Bel (1 μM), utilizadas neste estudo, foram baseadas na literatura.

A figura 17 mostra que as monocamadas celulares incubadas com o meio de cultura ou os inibidores apenas ou seus respectivos veículos (controles não estimulados), apresentaram uma liberação basal de 6-ceto PGF_{1α} de 31.42 ± 2.8 pg/mL após 6 horas de incubação. Esta concentração de prostaciclina foi significativamente aumentada após a incubação das células com a subunidade CB (controle estimulado). Quando as monocamadas foram pré-incubadas (1 hora) com o composto BEL, inibidor da FLA₂ independente de Ca⁺, e estimuladas com CB, pelo período de 6 horas, não houve alteração significativa da produção de PGI₂, em relação ao controle estimulado. Por outro lado, a incubação, por 6 horas, das células endoteliais com a subunidade CB, na presença do AACOCF₃, inibidor de FLA₂ citosólica, resultou em diminuição significativa da liberação de prostaciclina, em torno de 26%, se comparado ao controle estimulado. O pré-tratamento das CEs, com o DMSO, veículo do AACOCF₃ e do BEL, em condições semelhantes, não afetou a liberação de PGI₂, induzida pela subunidade CB (dados não mostrados).

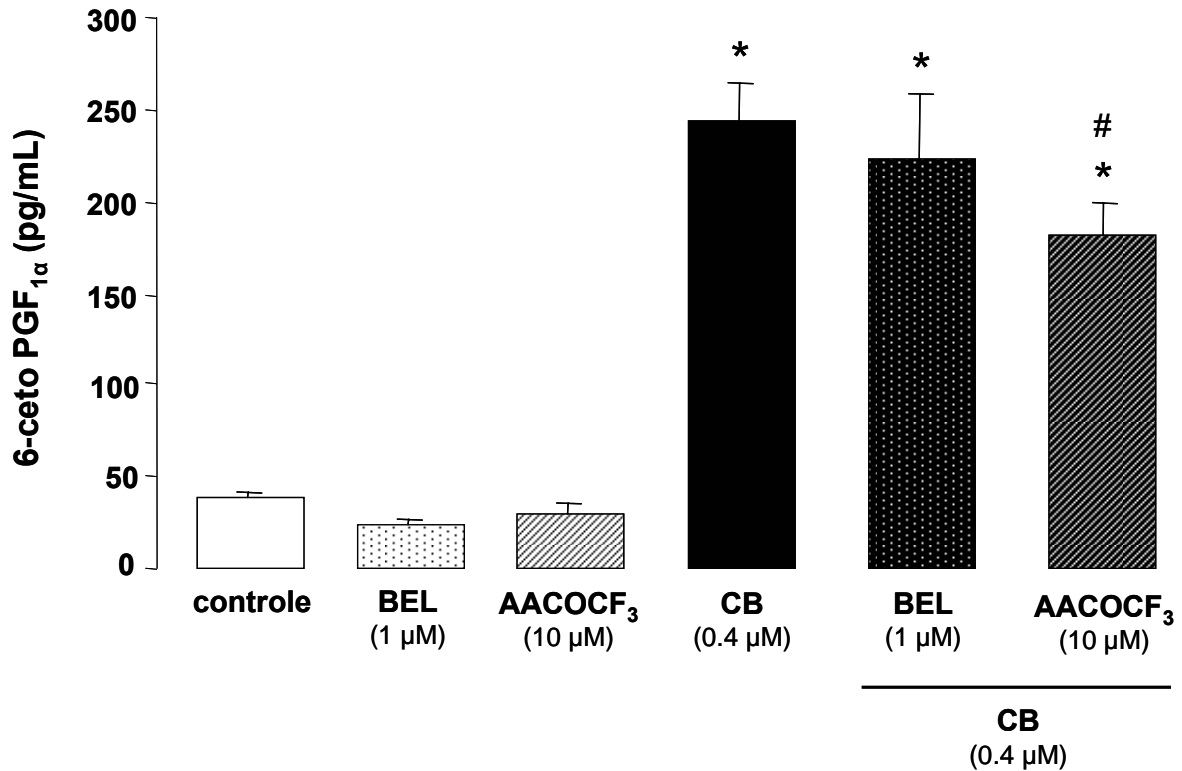


Figura 17. Efeito do AACOCF₃ e BEL na produção de prostaciclina por células endoteliais em cultura, induzida pela subunidade CB. As monocamadas de células endoteliais foram incubadas com a subunidade CB (0.4 μM) ou RPMI (controle negativo) por 6 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. O AACOCF₃ (10 μM) ou BEL (1 μM), foram incubados com as células endoteliais, 1 hora antes da adição de CB. A concentração de 6-ceto prostaglandina F_{1α} foi determinada por EIA, como descrito em Material e Métodos. Cada valor representa a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p < 0,05 em relação ao controle; #p < 0,05 em relação a subunidade CB (ANOVA).

5 DISCUSSÃO

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* e seus componentes desencadeiam efeitos biológicos importantes que envolvem direta e/ou indiretamente componentes do sistema circulatório. Contudo, não há estudos específicos na literatura sobre os efeitos do veneno crotálico ou de suas toxinas em células endoteliais.

No presente estudo avaliamos, inicialmente, os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), do seu componente majoritário, a crotoxina (CTX) e suas subunidades, fosfolipase A₂ (CB) e crotapotina (CA), sobre a integridade e a viabilidade de células endoteliais em cultura. Para tanto, foram realizados estudos preliminares, com o intuito de estabelecer as condições ideais para a obtenção de monocamadas confluentes de células endoteliais da linhagem tEnd. Os resultados deste estudo permitiram determinar o número de células inicial (1×10^4 células/poço) e o tempo de cultivo (48 horas), adequados para a obtenção de monocamadas, em microplacas de 96 poços, de modo a mimetizarem o endotélio, em condições mais próximas ao seu ambiente fisiológico. A confluência de células endoteliais, em monocamadas, é um aspecto crítico, do ponto de vista funcional, pois as junções interendoteliais desempenham um papel importante na regulação da permeabilidade e da integridade vascular. Assim, foi possível definir um protocolo de cultivo padrão, para os ensaios realizados no presente estudo.

Os efeitos do VCdt sobre o endotélio foram avaliados em função de sua concentração e do tempo de incubação. Os resultados obtidos mostraram que o veneno afetou a integridade das monocamadas de células endoteliais, entre a 12^a até a 24^a hora de incubação, apenas na maior concentração. Estes dados indicam que o veneno é pouco ativo sobre os constituintes envolvidos na conexão da célula endotelial com os receptores adesivos da matriz extracelular, se comparado a toxinas de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, que causam alterações do endotélio em concentrações e períodos de tempo menores (COLLARES-BUZATO *et al.*, 2002; TANJONI *et al.*, 2005). Por outro lado, na mesma concentração, o VCdt reduziu a viabilidade e o metabolismo das células endoteliais, já nas primeiras três horas de incubação, sendo que estes efeitos perduraram até a 24^a hora. É válido ressaltar que em concentração dez vezes menor, este veneno também foi citotóxico, porém, em períodos de incubação mais tardios. Os dados obtidos sugerem que a diminuição do ancoramento do endotélio ao substrato de adesão, causado pelo VCdt, esteja relacionado, ao menos em parte, à redução da viabilidade das células endoteliais. Estudos sobre as ações do veneno de cascavéis sul-americanas em parâmetros fisiológicos do endotélio não são encontrados na literatura. Os

dados disponíveis referem-se, principalmente, às ações do VCdt sobre células renais e neoplásicas, sobre as quais este veneno exerce efeito tóxico (RUDD *et al.*, 1994; YAMASAKI *et al.*, 2008). De outra parte, os venenos de serpentes da América Central, do mesmo gênero, como a *Crotalus atrox*, não induzem os efeitos neurotóxicos, característicos do envenenamento por *Crotalus durissus terrificus*. O veneno daquela espécie contém toxinas hemorrágicas, com potente atividade proteolítica, que afetam células endoteliais *in vitro* (OWNBY *et al.*, 1978), à semelhança dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, da mesma família (KAWANO *et al.*, 2002).

Em seguida, investigou-se a possibilidade da toxina majoritária do veneno de Cdt, a crotoxina, reproduzir os efeitos do veneno sobre o endotélio, ora evidenciados. Os resultados obtidos mostraram que a CTX não afetou os parâmetros de viabilidade nem a integridade das células endoteliais, nas condições experimentais empregadas neste estudo. Desse modo, é possível sugerir que o complexo CTX não seja responsável pelas ações do VCdt, acima citadas, no endotélio. Estes dados estão de acordo com o estudo de LOMONTE *et al.* (1999), que descreveram que a CTX não exerce efeito tóxico em células endoteliais, mas afeta células do músculo esquelético. Por outro lado, ARAÚJO *et al.* (1992) verificaram que esta toxina induziu a liberação de lactato desidrogenase quando incubada com córtex cerebral de ratos. Ainda, há evidências do efeito deletério da CTX em linhagens de células tumorais humanas (RUDD *et al.*, 1994; YAN *et al.*, 2007).

Considerando que a CTX é composta pelas subunidades CB e CA e que as mesmas, quando dissociadas, exercem efeitos distintos dos observados em sua forma complexada (KOUYOUMDJIAN *et al.*, 1986; BON *et al.*, 1989; LOMONTE *et al.*, 1989), foram avaliados, a seguir, os efeitos isolados dessas subunidades, sobre os mesmos parâmetros do endotélio. Os resultados obtidos demonstraram que a fração CB reduziu os parâmetros de viabilidade e a integridade das CEs, apenas na maior concentração, à semelhança do veneno bruto. Entretanto, a subunidade CA não causou efeitos citotóxicos, nem a perda da integridade das monocamadas celulares, em nenhum dos períodos de tempo ou concentrações estudadas. Os dados sugerem que a subunidade CB, mas não a CA, contribua para as alterações dos parâmetros fisiológicos das células endoteliais, causadas pelo veneno de *Crotalus durissus terrificus*, na presente condição experimental. O efeito dessa subunidade pode decorrer de sua ação enzimática, de fosfolipase A₂ que, ao hidrolisar fosfolipídios da membrana das células endoteliais, pode causar alterações em sua estrutura e, conseqüentemente, afetar a sua viabilidade (KINI e EVANS, 1989).

Em apoio a esta hipótese, a literatura mostra que a subunidade CB, da crotoxina,

quando isolada, atua de modo inespecífico sobre membranas biológicas, de um modo geral. Uma vez associada à crotapotina, a subunidade CB é direcionada a reconhecer sítios específicos de membranas neuronais pós-sinápticas e de células do músculo esquelético, alvos primários para o efeito neurotóxico e miotóxico, exercido por esta fosfolipase A₂ (RADVANYI *et al.*, 1982; BON *et al.*, 1989; MONTECUCCO *et al.*, 2008). Estas informações podem, adicionalmente, explicar o fato da CTX não ter exercido ações citotóxicas sobre o endotélio, na presente condição experimental, de forma que o impedimento da atividade enzimática inespecífica da fração CB, pela crotapotina, preveniu o desencadeamento dos efeitos tóxicos sobre o endotélio. Ainda, os resultados aqui obtidos concordam com dados de Lomonte *et al.* (1999), mostrando que a fração CB, ao contrário da fração CA ou da CTX, exerce efeito tóxico em células endoteliais.

Os dados do presente estudo, relacionados à proliferação celular, mostraram que, em concentrações não citotóxicas, nenhum dos agentes estudados foi capaz de alterar a proliferação das células endoteliais, na presente condição experimental. Diferentemente de nossos dados, há diversos estudos na literatura que descrevem o efeito inibitório do VCdt e de seus componentes, sobre a proliferação de diversos tipos celulares (CORIN *et al.*, 1993; NEWMAN *et al.*, 1993; RUDD *et al.*, 1994; DONATO *et al.*, 1996; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004). No entanto, estudos futuros, com a utilização de indutores da proliferação celular, como por exemplo, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), permitirão avaliar, de modo mais preciso, a influência do VCdt e de seus componentes sobre a proliferação de células endoteliais.

Como mencionado, o endotélio é um tecido metabolicamente ativo, com a capacidade de produzir inúmeras substâncias fisiologicamente ativas. Dentre estas substâncias, está o óxido nítrico (NO), um gás que se difunde rapidamente através de membranas celulares e atua como mediador de várias funções fisiológicas, como a vasodilatação (PALMER *et al.*, 1987) e a neurotransmissão (DOWNEN *et al.*, 1999). Além disso, o óxido nítrico, resultante da ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), pode exercer ação tóxica e promover a destruição de microorganismos e células tumorais. Quando interage com reativos de oxigênio, o óxido nítrico forma o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), mais tóxico que os seus precursores (HIBBS *et al.*, 1988; MAUEL *et al.*, 1991; BECKMAN e KOPPENOL, 1996; ISCHIROPOULOS *et al.*, 1996; ROHN *et al.*, 1999). Com base nessas informações, avaliamos a produção de NO, por monocamadas de CEs, na vigência de ação do VCdt, da CTX e de suas subunidades. Os dados obtidos mostraram que, em concentrações não citotóxicas, o veneno e as toxinas de *Crotalus durissus terrificus*, não alteram a produção

basal de óxido nítrico, pelas células endoteliais em cultura. Ao contrário de nossos dados, o veneno crotálico induziu aumento da liberação de óxido nítrico, em macrófagos murinos isolados (SAMPAIO *et al.*, 2001, 2003). Isto sugere que, dependendo do tipo celular envolvido, a produção de NO, na presença dos componentes do veneno crotálico, é regulada de modo distinto.

Outro mediador relevante, produzido pelas células endoteliais, é a prostaciclina (PGI₂), o principal metabólito do ácido araquidônico (AA), sintetizado pela via das ciclooxigenases (COXs) no endotélio. Este mediador exerce um importante papel fisiológico, por suas ações vasodilatadora e inibitória da agregação plaquetária. Nesse sentido, a prostaciclina é fundamental para a regulação das propriedades adesivas do endotélio, atuando de modo a impedir a adesão de células sanguíneas, circulantes, a este tecido (para revisão vide VANE e BOTTING, 1995; VANE *et al.*, 1990; VANE e CORIN, 2003; SIMMONS *et al.*, 2004).

Com base nas informações acima, foram avaliados os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, do seu componente majoritário e de suas subunidades, quanto à produção de prostaciclina, por monocamadas de células endoteliais. Os dados obtidos mostraram que, em concentração não citotóxica, o VCdt e a subunidade CB, mas não a CTX nem a CA, causaram aumento da liberação de PGI₂, na 6ª hora de incubação. Esta é a primeira demonstração da produção de PGI₂, induzida por um veneno crotálico, em células endoteliais. O efeito estimulatório de outros venenos viperídicos, do gênero *Bothrops*, sobre a produção de PGI₂, foi demonstrado anteriormente (MODESTO *et al.*, 2005; SCHATNER *et al.*, 2005). O reflexo do aumento da produção de PGI₂, ora evidenciado, no envenenamento por *Crotalus durissus terrificus*, não foi esclarecido. Porém, uma vez que o VCdt, por exacerbar o consumo de fibrinogênio, leva à incoagulabilidade sanguínea e que a prostaciclina inibe a agregação plaquetária, é possível sugerir que o aumento da liberação deste mediador favoreça o estado de incoagulabilidade, verificado no envenenamento por esta serpente. De outra parte, a ativação autócrina dos receptores PPARs pela prostaciclina, produzida pelas células endoteliais, pode levar à uma regulação negativa dos fatores de transcrição, envolvidos na expressão gênica de fatores inflamatórios, como no caso da iNOS (MORAES *et al.*, 2005). Este fato poderia explicar a ausência de efeitos do veneno e da subunidade CB na produção de óxido nítrico, verificada em células endoteliais na presente condição experimental. Em apoio aos dados obtidos com a subunidade CB, a literatura mostra que uma sFLA₂, isolada do veneno da serpente *Crotalus atrox*, é capaz de induzir a síntese de PGI₂ em células endoteliais (HOULISTON e WHEELER-JONES, 2001).

A literatura mostra que as ações de muitas sFLA₂s de venenos podem ser desencadeadas por mecanismos independentes de suas atividades enzimáticas específicas (KINI e EVANS, 1989). Outras regiões estruturais dessas enzimas podem ligar-se a aceptores de membrana das células alvo e desencadear os efeitos farmacológicos ou tóxicos, característicos de cada fosfolipase A₂ (LOMONTE *et al.*, 2003). No caso da CB, a atividade enzimática parece ser fundamental para seus efeitos neurotóxicos e miotóxicos (MARLAS e BON, 1982; GOPALAKRISHNAKONE *et al.*, 1984; BON *et al.*, 1989). Foi demonstrado, inclusive, que as diferentes regiões que compõem seu sítio catalítico estão envolvidas, de modo distinto, nos efeitos exercidos por esta enzima. Por exemplo, modificações do resíduo de histidina, presente no sítio catalítico da subunidade CB, diminuíram suas atividades miotóxica e anticoagulante; o resíduo de lisina, por sua vez, mostrou-se importante para os efeitos bactericida e edematogênico (SOARES *et al.*, 2001). Por outro lado, há evidências de que sítios específicos da região C-terminal da sua estrutura, também são importantes para as suas ações farmacológicas (CURIN-SERBEC *et al.*, 1994; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008). Provavelmente, alguns efeitos farmacológicos devem-se a combinações de ambos os mecanismos, enzimático e não enzimático (KINI e EVANS, 1995). Neste contexto, com o intuito detalhar os efeitos da subunidade CB na produção de prostaciclina, foi avaliada a participação da sua atividade catalítica neste evento. Para tanto, a subunidade CB teve sua atividade enzimática inativada pelo brometo de 4-bromofenacil. Nesta condição, a subunidade fosfolipásica da CTX não induziu aumento dos níveis de prostaciclina, produzida pelas células endoteliais, evidenciando, assim, que a atividade catalítica da subunidade CB é essencial para este efeito.

Como mencionado na introdução, o ácido araquidônico, gerado a partir da hidrólise de fosfolipídeos de membrana celular pelas fosfolipases A₂, é prontamente metabolizado por diferentes complexos enzimáticos, que incluem as ciclooxigenases (COXs). A metabolização do AA por este sistema, leva à produção das prostaglandinas via ação de enzimas sintases. A COX-1 e -2 apresentam similaridades quanto aos mecanismos catalíticos e cinéticos (BAKHLE, 1999; SMITH *et al.*, 2000). Porém, duas diferenças entre essas isoenzimas determinam importantes conseqüências biológicas e farmacológicas: *i*) o sítio ativo da COX-2 é maior e possui maior plasticidade que o da COX-1; esta diferença pode ser explorada para o desenvolvimento de inibidores específicos para a COX-2. *ii*) somente a COX-1 exibe um alosterismo negativo para baixas concentrações de AA; esta diferença confere maior eficiência para a COX-2, no processamento enzimático do ácido araquidônico recém-liberado. A localização intracelular é outra diferença importante entre essas isoformas: ambas estão

presentes na membrana de retículo endoplasmático, mas a COX-2, também é encontrada, em altas concentrações, na membrana nuclear (OTTO e SMITH, 1994; MORITA *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 2000).

Com base nas informações acima, o próximo passo foi avaliar o efeito de inibidores das ciclooxigenases, na produção de prostaciclina induzida pela subunidade CB e também pelo VCdt, em células endoteliais. Os resultados demonstram que a indometacina (inibidor não seletivo das COXs), o valeril salicilato (inibidor seletivo da COX-1) e o etoricoxibe (inibidor seletivo da COX-2), diminuíram a produção de prostaciclina induzida pelo veneno e pela subunidade CB, evidenciando, assim, a participação de ambas as isoformas das COXs na produção deste prostanóide. Portanto, é possível sugerir que o VCdt e a subunidade CB favoreçam tanto a atividade da isoforma constitutiva (COX-1) quanto da induzível (COX-2), pelo aumento da oferta do substrato ácido araquidônico. Curiosamente, no caso da CB, o efeito do inibidor da COX-2 (etoricoxibe) foi significativamente maior do que o causado pelo inibidor da COX-1 (valeril salicilato), indicando que a atividade da COX-2 é mais importante para o efeito exercido. Contudo, uma vez que a COX-2 possui maior capacidade de assimilação de substrato que a COX-1 (OTTO e SMITH 1995) e que a subunidade CB, por apresentar alta atividade enzimática, deve fornecer grandes quantidades de ácido araquidônico, a preponderância da COX-2, para produção de PGI₂, era esperada. Assim, é provável que o veneno bruto e a subunidade CB ativem mecanismos intracelulares distintos, para ocasionar o mesmo efeito em células endoteliais, na presente condição experimental.

A partir dos dados obtidos com as intervenções farmacológicas, investigou-se o efeito do veneno e das toxinas crotálicas, quanto à expressão protéica das ciclooxigenases pelo endotélio. Os resultados demonstraram que apenas o VCdt e a subunidade CB, mas não a CTX nem a subunidade CA, induziram aumento da expressão protéica de COX-2. Por outro lado, os níveis protéicos de COX-1 não foram alterados pelo veneno ou as toxinas isoladamente. Estes dados reforçam àqueles obtidos com os inibidores e indicam que a expressão protéica de COX-2, induzida pelo VCdt e a CB, deve contribuir significativamente para o aumento da síntese de prostaciclina. Adicionalmente, foi verificado que a atividade catalítica da subunidade CB é essencial para o efeito desencadeado, uma vez que a CB inativa não induziu aumento da expressão de COX-2, na presente condição experimental.

A existência de uma interação funcional entre fosfolipases A₂ secretadas e intracelulares (cFLA₂ e iFLA₂), através de *feedback* positivo, na resposta celular a diversos mediadores e agentes inflamatórios, está bem descrita (THOMMENSEN *et al.*, 1998; ANTHONSEN *et al.*, 2001; CHAKRABORTI, 2003; BALSINDE *et al.*, 1998). Portanto,

avaliou-se a participação das FLA₂ intracelulares nos efeitos estimulatórios da subunidade CB e do VCdt, na produção de PGI₂, a partir das intervenções farmacológicas com os compostos AACOCF₃ (inibidor da FLA₂ citosólica) e BEL (inibidor da FLA₂ independente de Ca⁺). Os dados obtidos mostram que o AACOCF₃ ou o BEL não alteraram a produção de PGI₂, induzida pelo veneno bruto. Por outro lado, o composto AACOCF₃ reduziu significativamente a produção de PGI₂, estimulada pela subunidade CB, sendo que o BEL não modificou este parâmetro. Este resultado sugere que a FLA₂ citosólica é relevante para a produção da prostaciclina, induzida pela subunidade CB, em células endoteliais. Os dados indicam ainda, a capacidade de uma FLA₂ secretada de veneno de serpente em ativar uma FLA₂ citosólica de mamífero. Estes resultados estão de acordo com a literatura, pois demonstra que as cFLA₂s, especialmente a cFLA₂α, do grupo IV e as sFLA₂s dos grupos IIA, IID, V e X, são as principais isoformas envolvidas na liberação de AA e formação de prostaglandinas, em resposta a estímulos exógenos (MURAKAMI *et al.*, 1998; 2000; SHINOHARA *et al.*, 1999). Além disso, foi demonstrado que FLA₂s secretadas induzem a fosforilação de FLA₂s citosólicas para aumento da síntese de prostaciclina em células endoteliais. Este evento ocorreu via ativação das MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*) p42/44 e p38 (HOULISTON e WHEELER-JONES, 2001). Contudo, os mecanismos de sinalização intracelulares, envolvidos na ativação da FLA₂ citosólica, pela subunidade CB, necessita de estudos mais detalhados. A atividade da iFLA₂, por outro lado, tem sido relacionada, principalmente, ao fornecimento de AA para a remodelagem e manutenção de membranas celulares (MURAKAMI *et al.*, 1998; 2000; BALSINDE *et al.*, 1995). Portanto, a ausência de efeito do composto BEL, sobre os parâmetros ora avaliados, tem subsídios.

Atualmente, a pesquisa clínica, envolvida na terapêutica de doenças vasculares periféricas, está voltada para o desenvolvimento de análogos da PGI₂, dada à instabilidade química desse prostanóide (SZCZEKLIK *et al.*, 1981; VANE e CORIN, 2003). Dessa forma, a observação de que a CB estimula a produção deste mediador, sem ocasionar efeitos tóxicos sobre as CEs, sugere que esta fosfolipase A₂ possa ser utilizada, futuramente, como protótipo para desenvolvimento de novos fármacos com propriedades estimulatórias para síntese deste prostanóide.

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo demonstram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* afetou parâmetros de viabilidade e a integridade de células endoteliais em cultura, de modo tempo-dependente e apenas na maior concentração, sugerindo sua baixa toxicidade sobre as células endoteliais. A subunidade CB, mas não a CTX nem a crotapotina, reproduziu os efeitos causados pelo VCdt. Em concentrações não citotóxicas,

tanto o veneno quanto as toxinas não alteraram a proliferação celular ou a produção basal de óxido nítrico pelas células endoteliais em cultura. Por outro lado, nestas mesmas condições, o VCdt e a subunidade CB, mas não a CTX nem a CA, causaram aumento significativo da produção de prostaciclina, via COX-1 e COX-2, sendo que a expressão protéica da isoforma COX-2 foi induzida por estes agentes. Além disso, foi demonstrado que a fosfolipase citosólica é relevante para o aumento da produção de prostaciclina, induzido pela CB, sendo que a atividade catalítica desta subunidade é essencial para estes efeitos. Estes dados sugerem que a subunidade fosfolipásica, isoladamente, possa contribuir para os efeitos do veneno total no endotélio. Nesse sentido, se houver alguma fração desta enzima na sua forma livre, no veneno total, sugere-se que ela seja responsável ou contribua, de modo significativo, para os efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no endotélio.

Os dados aqui apresentados são inéditos ao demonstrarem e compararem algumas atividades do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e de suas toxinas em células endoteliais. Além disso, estes dados permitem o melhor conhecimento dos mecanismos de ação de uma sFLA₂ de veneno da família Viperidae do grupo IIA. Em última análise, o detalhamento das ações das toxinas crotálicas, no tecido endotelial, evidenciou que a subunidade CB tem potencial para constituir uma ferramenta útil para o estudo de mecanismos e funções celulares específicas e/ou um protótipo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos aplicáveis em doenças vasculares e/ou inflamatórias.

6 CONCLUSÕES

- 1** O veneno de *Crotalus durissus terrificus* e a subunidade CB, mas não a CTX nem a subunidade CA, afetam a viabilidade, o metabolismo e a integridade das monocamadas de células endoteliais em cultura, apenas na maior concentração;
- 2** Em concentrações não citotóxicas, o VCdt, a CTX e as subunidades CA e CB não alteram a proliferação ou a produção basal de óxido nítrico pelas células endoteliais;
- 3** Em concentrações não citotóxicas, o VCdt e a subunidade CB, mas não a CTX nem a subunidade CA, induzem aumento da produção de prostaciclina pelas células endoteliais;
- 4** As vias enzimáticas das COX-1 e COX-2 participam da produção de prostaciclina, induzida pelo VCdt e a subunidade CB em células endoteliais;
- 5** O VCdt e a subunidade CB, mas não a CTX nem a subunidade CA, induzem a expressão protéica de COX-2 pelas células endoteliais;
- 6** A atividade catalítica da subunidade CB é importante para seu o efeito estimulatório da produção de prostaciclina e na expressão de COX-2, em células endoteliais;
- 7** As fosfolipases A₂ citosólicas e independentes de cálcio não contribuem para o efeito estimulatório do VCdt sobre a produção de prostaciclina por células endoteliais;
- 8** A fosfolipase A₂ citosólica, mas não a independente de cálcio, contribui para o efeito estimulatório da subunidade CB sobre a produção de prostaciclina por células endoteliais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AIRD, S. D.; KAISER, II; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 249, n. 2, p. 296-300, 1986.

ANTHONSEN, M. W.; SOLHAUG, A.; JOHANSEN, B. Functional coupling between secretory and cytosolic phospholipase A (2) modulates tumor necrosis factor-alpha-and interleukin-1 beta-induced NF-kappa B activation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 32, p. 30527-30536, 2001.

ARAÚJO, D. A.; BEIRÃO, P. S.; GOMEZ, M. V.; The effect of crotoxin on the release of acetylcholine and lactate dehydrogenase from rat brain cortical slices. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 25, n. 7, p. 707-711, 1992.

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **FASEB J.**, v. 7, n. 2, p. 349-360, 1993.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, n. 4, p. 633-636, 1985.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, H.; CUPO, P. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1163-1168, 1987.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE C. M. S.; HADDA JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier/Fapesp, 2003. p. 91-107.

BAKHLE, Y. S. Structure of COX-1 and COX-2 enzymes and their interaction with inhibitors. **Drugs Today**, v. 35, n. 4-5, p. 237-250, 1999.

* De acordo com:

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

BALSINDE, J.; BIANCO, I. D.; ACKERMANN, E. J.; CONDE-FRIEBOES, K.; DENNIS, E. A. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, p. 8527-8531, 1995.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; DENNIS, E. A. Functional coupling between secretory phospholipase A(2) and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A(2). **Proc. Natl. Acad. U. S. A.**, v. 95, n.14, p. 7951-7956, 1998.

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

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta. Physiol. Lat. Am.**, v. 11, p. 224-230, 1961.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, n. 5, p. c1424-1437, 1996. Part 1.

BERCOVICI, D. A. Systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, n. 3, p. 69-78, 1987.

BHATTACHARYYA, D. K.; LECOMTE, M.; DUNN, J.; MORGANS, D. J.; SMITH, W. L. Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valerylsalicylic acid. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 317, n. 1, p. 19-24, 1995.

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

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

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

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

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

BRIGATTE, P.; HOFFMANN, F. A.; BERNARDI, M. M.; GIORGI, R.; FERNANDES, I.; TAKEHARA, H. A.; BARROS, S. B.; ALMEIDA, M. G.; CURY, Y. Tolerance to the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice is mediated by pharmacodynamic mechanisms. **Toxicon**, v. 39, n. 9, p. 1399-1410, 2001.

BROWN, W. J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. **Traffic**, v. 4, n.4, p. 214-221, 2003.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol. Aspects Med.**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005.

BUSSOLINO, F.; DE ROSSI, M.; SICA, A.; COLOTTA, F.; WANG, J. M.; BOCCHIETTO, E.; PADURA, I. M.; BOSIA, A.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J. Immunol.**, v. 147, n. 7, p. 2122-2129, 1991.

CARDOSO, D. F.; LOPES-FERREIRA, M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S.; FARSKY, S. H. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators Inflamm.**, v. 10, n. 3, p. 125-133, 2001.

CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon**, v. 35, n. 4, p. 607-612, 1997.

CAUGHEY, G. E.; CLELAND, L. G.; PENGLIS, P. S.; GAMBLE, J. R.; JAMES, M. J. Roles of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. **J. Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2831-2838, 2001.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A₂ isoforms: a perspectiva. **Cell Signal.**, v. 15, p. 637-665, 2003. Review.

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation: Extracellular and intracellular phospholipase A₂, inducible and constitutive cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 55, n. 2, p. 105-111, 1998.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 91-95, 2003.

COLLARES-BUZATO, C. B.; DE PAULA, L. E.; SUEUR, L.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Impairment of the cell-to-matrix adhesion and cytotoxicity induced by *Bothrops moojeni* snake venom in cultured renal tubular epithelia. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 181, n. 2, p. 124-132, 2002.

CORIN, R. E.; VISKATIS, L. J.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. A. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells *in vitro*. **Invest. New Drugs**, v. 11, n. 1, p. 11-5, 1993.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Acute myocardial infarction-like enzyme profile in human victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 3, p. 447-451, 1990.

CURIN-SERBEC, V.; DÉLOT, E.; FAURE, G.; SALIOU, B.; GUBENSEK, F.; BON, C.; CHOUMET, V. Antipeptide antibodies directed to the C-terminal part of ammodytoxin A react with the PLA₂ subunit of crotoxin and neutralize its pharmacological activity. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1337-1348, 1994.

DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; PENG, H. B.; THANNICKAL, V. J.; RAJAVASHISTH, T. B.; GIMBRONE, M. A. J. R.; SHIN, W. S.; LIAO, J. K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n. 1, p. 60-68, 1995.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994. Review.

DONATO, N. J.; MARTIN, C. A.; PEREZ, M.; NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A₂ toxin. A novel growth inhibitory mechanism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, n. 11, p. 1535-1543, 1996.

DOWNEN, M.; ZHAO, M. L.; LEE, P.; WEIDENHEIN, K. M.; DICKSON, D. W.; LEE, S. C. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 58, n. 1, p. 12-21, 1999.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, p. 229-234, 1987.

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

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 223, p. 161- 164, 1994.

FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T. W.; HSIANG, M. Biological activities of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B. In: EAKER, D.; WADSTROM. (Ed.). **Natural Toxins**. Oxford: Pergamon, 1980. p. 561-567.

FRANCISCHETTI, I. M.; SALIOU, B.; LEDUC, M.; CARLINI, C. R.; HATMI, M., RANDON, J., FAILI, A.; BON, C. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus dirissus terrificus* venom specifically binds to platelets. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1217-1228, 1997.

FRUCHART, J. C.; DURIEZ, P.; STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators regulate genes governing lipoprotein metabolism, vascular inflammation and atherosclerosis. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 10, n. 3, p. 245-257, 1999.

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

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

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D. W.; HAWGOOD, B. J.; ELDER, H. Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 85-98, 1984.

GRYGLEWSKI, R. J. Prostacyclin as a circulatory hormone. **Biochem. Pharmacol.**, v. 28, n. 21, p. 3161-3166, 1979.

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 80-92, 2008.

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

HARRIS, L. K.; FRANSON, R. C. [1-14C] oleate-labeled autoclaved yeast: a membranous substrate for measuring phospholipase A₂ activity *in vitro*. **Anal. Biochem.**, v. 193, p. 191-196, 1991.

HAYASHI, M. A.; NASCIMENTO, F. D.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. Cytotoxic effects of crotoxin are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 508-517, 2008.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 68, p. 1560-1563, 1971.

HERNANDEZ-OLIVEIRA, S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biochemical, pharmacological and structural characterization of a new PLA₂ from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. **Protein J.**, v. 24, n. 4, p. 233-242, 2005.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 157, n. 1, p. 87-94, 1988.

HICKEY, M. J.; SHARKEY, K. A.; SIHOTA, E. G.; REINHARDT, P. H.; MACMICKING, J. D.; NATHAN, C.; KUBES, P. Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. **FASEB J.**, v. 11, n. 12, p. 955-964, 1997.

HOGABOAM, C. M.; CHENSUE, S. W.; STEINHAUSER, M. L.; HUFFNAGLE, G. B.; LUKACS, N. W.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Alteration of the cytokine phenotype in an experimental lung granuloma model by inhibiting nitric oxide. **J. Immunol.**, v. 159, n. 11, p. 5585-5593, 1997.

HOULISTON, R. A.; WHEELER-JONES, C. P. sPLA(2) cooperates with cPLA(2)alpha to regulate prostacyclin synthesis in human endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 287, n. 4, p. 881-887, 2001.

HUANG, S.; INGBER, D. E. Shape-dependent control of cell growth, differentiation, and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. **Exp. Cell. Res.**, v. 261, n. 1, p. 91-103, 2000.

ISCHIROPOULOS, H.; NELSON, J.; DURAN, D.; AL-MEHDI, A. - Reactions of nitric oxide and peroxyxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, n. 3, p. 373-381, 1996.

ISSEMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 645-50, 1990.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 347-354, 1992.

KADL, A.; LEITINGER, N. The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 7, n. 11-12, p. 1744-1754, 2005.

KAWANO, J.; ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. Vascular endothelial cell injury induced by *Bothrops jararaca* venom; non-significance of hemorrhagic metalloproteinase. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1553-1562, 2002.

KELTON, J. G.; BLAJCHMAN, M. A. Prostaglandin I₂ (prostacyclin). **Can. Med. Assoc. J.**, v. 122, n. 2, p. 175-179, 1980.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon**, v. 33, n. 12, p. 1585-1590, 1995.

KLIEWER, S. A.; UMESONO, K.; NOONAN, D. J.; HEYMAN, R. A.; EVANS, R. M. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 771-774, 1992.

KORITA, D.; SAGAWA, N.; ITOH, H.; YURA, S.; YOSHIDA, M.; KAKUI, K.; TAKEMURA, M.; YOKOYAMA, C.; TANABE, T.; FUJII, S. Cyclic mechanical stretch augments prostacyclin production in cultured human uterine myometrial cells from pregnant women: possible involvement of up-regulation of prostacyclin synthase expression. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 11, p. 5209-5219, 2002.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHSON, M. A. Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, n. 6, p. 576-561, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, n. 4, p. 162-701, 1999.

LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LANDUCCI, E. C.; TOYAMA, M.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Effect of crotapotin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 199-208, 2000.

LOESCH, A. Localisation of endothelin-1 and its receptors in vascular tissue as seen at the electron microscopic level. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 3, n. 4, p. 381-392, 2005.

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

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUFINI, S.; CHO, W.; GIGLIO, J. R.; OHNO, M.; DANIELE, J. J.; GEOGHEGAN, P.; GUTIERREZ, J. M. Comparative study of the cytolytic

activity of myotoxic phospholipases A₂ on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. **Toxicon**, **37**: 145-158, 1999.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, 2003.

MARLAS, G.; BON, C. Relationship between the pharmacological action of crotoxin and its phospholipase activity. **Eur. J. Biochem.**, v. 125, n. 1, p. 157-165, 1982.

MARLAS, G. Isolation and characterization of the alpha and beta subunits of the platelet-activation glycoprotein from the venom of *Crotalus durissus cascavella*. **Biochimie**, v. 67, n. 12, p. 1231-1239, 1985

MARTINS, A. M.; MONTEIRO, H. S.; JUNIOR, E. O.; MENEZES, D. B.; FONTELES M. C.; Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1441-1450, 1998.

MAUEL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **J. Leukoc. Biol.**, v. 49, n. 1, p. 73-82, 1991.

MICHEL, T.; LI, G. K.; BUSCONI, L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 13, p. 6252-6256, 1993.

MICHIELS, C.; RENARD, P.; BOUAZIZ, N.; HECK, N.; ELIAERS, F.; NINANE, N.; QUARCK, R.; HOLVOET, P.; RAES, M. Identification of the phospholipase A(2) isoforms that contribute to arachidonic acid release in hypoxic endothelial cells: limits of phospholipase A(2) inhibitors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 2, p. 321-332, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional De Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, D.F.: Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1999.

MITCHELL, J. A.; ALI, F.; BAILEY, L.; MORENO, L.; HARRINGTON, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. **Exp. Physiol.**, v. 93, n. 1, p. 141-147, 2007.

MIYATA, A.; HARA, S.; YOKOYAMA, C.; INOUE, H.; ULLRICH, V.; TANABE, T. Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 200, n. 3, p. 1728-1734, 1994.

MODESTO, J. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; NEVES-FERREIRA, A. G.; FRITZEN, M.; OLIVA, M. L.; HO, P. L.; PERALES, J.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. **Biol. Chem.**, v. 386, n. 6, p. 589-600, 2005.

MONCADA, S. Nitric oxide gas: mediator, modulator and pathophysiologic entity. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 120, n. 2, p. 187-191, 1992.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. L.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S.; RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, n. 13, p. 2495-2501, 1988.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A(2) myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell Mol. Life Sci.**, 2008.

MONTEIRO, H. S.; DA SILVA, I. M.; MARTINS, A. M.; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 10, p. 1347-1352, 2001.

MORAES, L. A.; PIQUERAS, L.; BISHOP-BAILEY, D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v. 110, n. 3, p. 371-385, 2005.

MORITA, I.; SCHINDLER, M.; REIGER, M. K.; OTTO, J. C.; HORI, T.; DeWITT, D. L., SMITH, W. L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase- 1 and -2. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 10902-10908, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOUNIER, C.; FRANKEN, P. A.; VERHEIJ, H. M.; BON, C. The anticoagulant effect of the human secretory phospholipase A₂ on blood plasma and on a cell-free system is due to a

phospholipid-independent mechanism of action involving the inhibition of factor Va. **Eur. J. Biochem.**, v. 237, n. 3, p. 778-785, 1996.

MOURA-GONÇALVES, J.; ARANTES, E. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. Determinação quantitativa da crotamina no veneno de cascavel brasileira. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 28, p. 369-372, 1956.

MOUSSATCHÉ, H.; DUARTE-VIEIRA, G. Mecanismo da contração produzido pelo veneno de cascavel (*Crotalus terrificus terrificus*). **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 25, p. 249-254, 1953.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; INOUE, K.; KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A₂. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 225-283, 1997. Review.

MURAKAMI, M.; SHIMBARA, S.; KAMBE, T.; KUWATA, H.; WINSTEAD, M. V.; TISCHFIELD, J. A.; KUDO, I. The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂s in regulating arachidonic acid release. Type IIA and type V secretory phospholipase A₂ are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 23, p. 14411-14423, 1998.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; KUWATA, H.; KUDO, I. Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A₂s. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 159-166, 2000.

NASCIMENTO, F. D.; HAYASHI, M. A.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; TERSARIOL, I. L.; KERKIS, I. Crotamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 29, p. 21349-21360, 2007.

NEREM, R. M.; HARRISON, D. G.; TAYLOR, W. R.; ALEXANDER, R. W. Hemodynamics and vascular endothelial biology. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 21, n. 1, p. S6-10, 1993.

NEWMAN, P. J. Perspectives Series: Cell adhesion in vascular biology. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 3-8, 1996.

NEWMAN, R. A.; VIDAL, J. C.; VISKATIS, L. J.; JOHNSON, J.; ETCHEVERRY, M. A. VRTC-310 a novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. **Invest. New Drugs**, v. 11, n. 2-3, p. 151-159, 1993.

NUNES, F. P.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1090-1098, 2007.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, n. 4, p. 363-370, 2005.

OLIVEIRA, D. G.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; BERIAM, L. O.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of basic PLA₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **J. Protein. Chem.**, v. 21, n. 3, p. 161-168, 2002.

OTTO, J. C.; SMITH, W. L. Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. **Cell Signal.**, v. 12, p. 139-156, 1994. Review.

OTTO, J. C.; SMITH, W. L. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. **J. Lipid Mediat. Cell Signal.**, v. 12, n. 2-3, p. 139-156, 1995.

OWNBY, C. L.; BJARNASON, J.; TU, A. T. Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. **Am. J. Pathol.**, v. 93, n. 1, p. 201-218, 1978.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PENG, H. B.; LIBBY, P.; LIAO, J. K. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 23, p. 14214-14219, 1995.

PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, n. 1-2, p. 55-62, 2000.

PINHO, F. M.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J. Bras. Nefrol.**, v. 22, p. 162-168, 2000.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007.

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 19, p. 875-887, 1981.

RABAUSCH, K.; BRETSCHEIDER, E.; SARBIA, M.; MEYER-KIRCHRATH, J.; CENSAREK, P.; PAPE, R.; FISCHER, J. W.; SCHRÖR, K.; WEBER, A. A. Regulation of thrombomodulin expression in human vascular smooth muscle cells by COX-2-derived prostaglandins. **Circ. Res.**, v. 96, n. 1, p. 1-6, 2004.

RADVANYI, F. R.; BON, C. Catalytic activity and reactivity with p-bromophenacyl bromide of the phospholipase subunit of crotoxin. Influence of dimerization and association with the noncatalytic subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 21, p. 12616-12623, 1982.

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

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

ROHN, T. T., NELSON, L. K.; SIPES, K. M.; SWAIN, S. D.; JUTILA, K. L. and QUINN, M. T. Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 65, n. 1, p. 59-70; 1999.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites 111 south america. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 345-384.

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

RUDD, C. J.; VISKATIS, L. J.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. A.; *In vitro* comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. **Invest. New Drugs**, v. 12, n. 3, p. 183-184, 1994.

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

SAMPAIO, S. C.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 551-558, 2001.

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

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

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

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; VENTURA, J. D. E. S.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; POZNER, R. G.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The snake venom metalloproteases berythraactivase and jararhagin activate endothelial cells. **Biol. Chem.**, v. 386, n. 4, p. 369-374, 2005.

SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 18, n. 3, p. 235-247, 1980.

SEOK, S. M.; PARK, D. H.; KIM, Y. C.; MOON, C. H.; JUNG, Y. S.; BAIK, E. J.; MOON, C. K.; LEE, S. H. COX-2 is associated with cadmium-induced ICAM-1 expression in cerebrovascular endothelial cells. **Toxicol. Lett.**, v. 165, n. 3, p. 212-220, 2006.

SHINOHARA, H.; BALBOA, M. A.; JOHNSON, C. A.; BALSINDE, J.; DENNIS, E. A. Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A₂s. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 12263-12268, 1999.

SIMIONESCU, M.; SIMIONESCU, N. Endothelial transport macromolecules: transcytosis and endocytosis. **Cell. Biol. Rev.**, v. 25, n. 1, p. 1-78, 1991.

SIMIONESCU, N.; SIMIONESCU, M. The cardiovascular system., In: WEISS, L. (Ed.). **Cell and Tissue Biology**. Germany: Urban and Schwarzenberg, 1988. p. 353-400.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000. Review.

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

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

SNYDER, S. H.; BREDET, D. S. Biological roles of nitric oxide. **Sci. Am.**, v. 266, n. 5, p. 68-77, 1992.

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

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

SZCZEKLIK, A.; GRYGLEWSKI, R. J. Treatment of vascular disease with prostacyclin. In: LEWIS, P. J.; O'GRADY, J. (Ed.). **Clinical Pharmacology**. New York: Raven Press, 1981. p. 159-167.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a

specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

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

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

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

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

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. **Am. J. Cardiol.**, v. 75, n. 3, p. 3A-10A, 1995.

VANE, J. R.; GRYGLEWSKI, R. L. BOTTING, R. M. The endothelial cell as a metabolic and endocrine organ. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 8, p. 491-496, 1987.

VANE, J.; CORIN, R. E. Prostacyclin: a vascular mediator. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 26, n. 6, p. 571-578, 2003.

VERHEIJ, H. M.; BOFFA, M. C.; ROTHEN, C.; BRYCKAERT, M. C.; VERGER, R.; DE HAAS, G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A₂. **Eur. J. Biochem.**, v. 112, n. 1, p. 25-32, 1980.

VITAL-BRAZIL, O. Pharmacology of crystalline crotoxin - II Neuromuscular blocking action. **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 981-999, 1966.

WOLIN, M. S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 20, n. 6, p. 1430-1442, 2000.

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

YAMASAKI, S. C.; VILLARROEL, J. S.; BARONE, J. M.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; SILVEIRA, P. F. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 445-454, 2008.

YAN, C. H.; YANG, Y. P.; QIN, Z. H.; GU, Z. L.; REID, P.; LIANG, Z. Q. Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 28, n. 4, p. 540-548, 2007.

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

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

ZAMBELLI, V. O.; SAMPAIO, S. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; GRECO, K.; BRITTO, L. R.; ALVES, A. S.; ZYCHAR, B. C.; GONÇALVES, L. R.; SPADACCI-MORENA, D. D.; OTTON, R.; DELLA-CASA, M. S.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-1367, 2008.

ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, M. S.; McINTYRE, M. T. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunol. Today**, v. 13, 3, p. 93-100, 1992.