

SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE
PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

EDILENE DE SOUZA COSTA

**Modulação Envolvida na Ação Estimulatória da CTX sobre a
Atividade Secretória de Macrófagos Peritoneais Co-Cultivados
com Células Tumorais da Linhagem LLC WRC 256**

Monografia apresentada ao Programa de
Aprimoramento Profissional/SES, elaborada no
Instituto Butantan – Laboratório de Fisiopatologia
Área: Fisiopatologia

Orientador:
Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni
Pesquisador Científico V, Laboratório de
Fisiopatologia – Instituto Butantan

São Paulo

2013

RESUMO DO PROJETO

Dados da Literatura têm demonstrado que a crotóxina (CTX), toxina majoritária do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* apresenta ação supressora sobre a resposta imune e sobre o crescimento tumoral, além de acarretar inibição dos eventos da resposta inflamatória, modulando a funcionalidade de macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata. Estudos recentes vêm mostrando a importância dos macrófagos, tanto na gênese tumoral, como nos diversos eventos-chave tanto do crescimento como da metástase de tumores, apresentando ação dual, uma vez que desempenham atividades que podem prevenir o estabelecimento e o espraiamento de células tumorais e, simultaneamente, podem elicitar funções que favorecem o crescimento e disseminação tumoral. Recentemente, nosso grupo demonstrou que macrófagos pré-tratados com CTX apresenta ação antiproliferativa, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da produção de óxido nítrico (NO). Além desses mediadores, em contato com as células tumorais, os macrófagos liberam diferentes mediadores, tais como as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , e mediadores lipídicos derivado da via das lipoxigenases, tais a lipoxina A₄ (LXA₄), e seu análogo 15-epi-LXA₄ (ATL) secretados pelos macrófagos, considerados também importantes para a supressão da proliferação da célula tumoral. Deste modo, o objetivo deste trabalho é ampliar a caracterização da mediação envolvida com o efeito da CTX sobre a capacidade secretória de macrófagos co-cultivados com as células tumorais da linhagem LLC WRC 256, correspondentes ao tumor de Walker 256. Para tanto, foram avaliados os seguintes objetivos específicos: 1) determinação da concentração de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da LXA₄/ ou ATL liberados no sobrenadante da co-cultura de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos, previamente incubados com CTX ou apenas meio de cultura (controle), e células LLC WRC 256; 2) a participação dos ALX/FPRL1, ligantes da LXA₄ e análogos, na ação modulatória da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos previamente incubados com a CTX e co-cultivados com as células tumorais. Os resultados obtidos demonstraram que a CTX estimulou a secreção da IL-1 β e a geração da LXA₄ e 15-epi-LXA₄, o que pode contribuir, em conjunto com a liberação de H_2O_2 e a produção de óxido nítrico, para a supressão da proliferação das células tumorais. As ações estimulatórias da CTX sobre esses mediadores são bloqueadas com a utilização do Boc2, sugerindo que os receptores FPRL/ALX, ligantes da LXA₄ e 15-epi-LXA₄ são fundamentais para a ação estimulatória da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos, importante para a inibição da proliferação das células tumorais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me mostrar que sou protegida, guiada e iluminada pelas suas bênçãos e pela Sua presença ao longo da minha existência, por me mostrar um caminho quando parece não haver mais saída, pela sua misericórdia e bondade, obrigada por dar vida a minha alma.

A Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni, por quem eu me espelho ao longo da minha carreira, por me mostrar o mundo acadêmico com tanto entusiasmo, por me proporcionar com sua orientação, amizade, competência e sempre solícita. Obrigada por mais essa conquista em minha vida. Você é uma alma maravilhosa que sempre me ajudou e me aceitou do jeito que eu sou. Você é daquelas pessoas raras que sempre está pronta para ajudar ao próximo e sem olhar a quem. Como é bom poder agradecer você, minha orientadora eterna, obrigada por acreditar em mim, esteja onde eu estiver sempre pensarei no sua orientação e apoio em todos os momentos. Hoje agradeço ao Senhor por ter colocado você em meu caminho. Que Deus te ilumine hoje e sempre, pois não tenho dúvida da pessoa iluminada, alegre e bondosa que você é.

Ao Meu amor eterno, Tanaka, que sempre me apoiou e que esteve todo tempo ao meu lado, sem você eu não conseguiria vencer mais essa batalha em minha vida, aliás, eu não chegaria até aqui. Obrigada por me proporcionar e me direcionar todas as vezes que eu me encontrei perdida, sua compreensão sempre foi essencial para mim. Te amo.

As minhas amigas especiais Renata e Eveline, por todos os momentos em que passamos juntas trabalhando e nas horas mais difíceis, obrigada por me fazer acreditar em coisas boas.

Ao grupo que me acompanhou nesta longa jornada e me ajudaram direta ou indiretamente.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Fisiopatologia pelo apoio e convívio diário. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao Programa de Aprimoramento Profissional, pela iniciativa.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| 15-Epi-LXA₄ | Aspirin-triggered lipoxina A ₄ |
| A₂ (FLA₂-CB) | Fosfolipase A ₂ (subunidade da CTX toxina isolada do veneno bruto) |
| ALXR- | Receptores transmembrânicos conhecidos também como FPRL- Receptor para peptídeo formil |
| ATLs- | Análogos estáveis |
| Boc2- | Antagonista de receptor peptídeo formil |
| CA (CTB)- | Crotapotina (subunidade da CTX toxina isolada do veneno bruto) |
| CTX- | Crotoxina |
| DMSO- | Dimetilsulfóxido |
| eNOS- | Oxido nítrico sintase |
| GPCR- | Receptores acoplados a proteína G |
| H₂O₂- | Peróxido de Hidrogênio |
| H₃PO₄- | Ácido fosfórico |
| HCl- | Ácido clorídrico |
| IL-1β- | Interleucina 1 beta |
| IL-6- | Interleucina 6 |
| iNOS- | Oxido nítrico induzido |
| LLC- | Linhagem de célula tumoral Walker 256- |
| LTD₄- | Leucotrienos D4 |
| LXA₄- | Lipoxina A ₄ |
| NO- | Oxido Nítrico |
| PKC- | Proteína tirosinas cinase |
| RNI- | Reativos intermediários do nitrogênio |
| ROI- | Reativos intermediários do oxigênio |
| RPMI- | Meio de cultura |
| TNF-α- | Fator de Necrose Tumoral |
| VCdt- | Veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema fagocítico mononuclear. O esquema mostra a diferenciação, distribuição e ativação dos macrófagos da medula.

Figura 2. Propriedades distintas de macrófagos associados ao tumor. Frente à diferenciação de monócitos exposto a diferentes substâncias, sendo M1 na presença de fator estimulador de colônia de macrófagos/granulócitos, interferon-gama e lipopolissacarídeo (LPS). M2 fator estimulador de colônia de macrófagos, interleucina IL-4, IL-13, IL-10 e agentes imunossupressores (corticoides, vitamina D3, prostaglandinas). Esquema de Antonio Sica, 2006.

Figura 3. Biossíntese das lipoxinas (LXs) e dos análogos estáveis da lipoxina gerados na presença da aspirina (ALTs). Esquema proposto por Chiang e colaboradores, 2005.

Figura 4. Receptor ALX/FPRL. Lipoxina A₄ e análogos bioativos de lipoxina A₄ estáveis podem ingerir com receptores de lipoxina A₄ (ALX), para regular as respostas de células leucocitárias. Esquema de Levy, 2005.

Monoculturas

Figura 5A. Efeito da CTX sobre a produção de **IL-6**, por monoculturas de macrófagos após 12 h cultivados.

Figura 5B. Efeito da CTX sobre a produção de **TNF- α** , por monoculturas de macrófagos após 24 h cultivados.

Figura 5C. Efeito da CTX sobre a produção de **IL-1 β** , por monoculturas de macrófagos após 24 h cultivados.

Figura 5E. Efeito da CTX sobre a produção de **TNF- α** , por monoculturas de macrófagos após 24 h de incubação.

Figura 5F. Efeito da CTX sobre a produção de **IL-1 β** , por monoculturas de macrófagos após 24 h de incubação.

Co-culturas

Figura 6A. Efeito da CTX sobre a produção de **IL-6** por co-culturas de macrófagos após 12 h de incubação.

Figura 6B. Efeito da CTX sobre a produção de **TNF- α** , por co-culturas de macrófagos após 12 h de incubação.

Figura 6C. Efeito da CTX sobre a produção de **IL-1 β** , por co-culturas de macrófagos após 12 h de incubação.

Figura 6D. Efeito da CTX sobre a produção de **IL-6**, por co-culturas de macrófagos após 24 h de incubação.

Figura 6E. Efeito da CTX sobre a produção de **TNF- α** , por co-culturas de macrófagos após 24 h de incubação.

Figura 6F. Efeito da CTX sobre a produção de **IL-1 β** , por co-culturas de macrófagos após 24 h de incubação.

Efeito do antagonista de receptor para peptídeo formil (Boc2)

Figura 7. Efeito do Boc2 sobre a ação estimulatória da CTX sobre a liberação de H₂O₂ por macrófagos co-cultivados com células LLC WRC 126.

Figura 8. Efeito do Boc2 sobre a ação estimulatória da CTX sobre a produção de óxido nítrico, por macrófagos co-cultivados com células LLC WRC 126.

Figura 9 Efeito do Boc2 sobre o efeito antiproliferativo de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a proliferação de células tumorais.

LXA₄

Figura 10A. Liberação de lipoxina A₄ por macrófagos pré-tratados com a CTX e co-cultivados com células tumorais por 12 h, tendo como controle as monoculturas tratadas ou não com CTX.

Figura 10B. Liberação de lipoxina A₄ por macrófagos pré-tratados com a CTX e co-cultivados com células tumorais por 24h, tendo como controle as monoculturas tratadas ou não com CTX.

Figura 10 Liberação de lipoxina A₄ por macrófagos pré-tratados com a CTX e co-cultivados com células tumorais por 48 h, tendo como controle as monoculturas tratadas ou não com CTX.

Epi-15-LXA₄

Figura 10D. Liberação de Epi-15-LXA₄ por macrófagos pré-tratados com a CTX e co-cultivados com células tumorais por 12 h, tendo como controle as monoculturas tratadas ou não com CTX.

Figura 10E. Liberação de Epi-15-LXA₄ por macrófagos pré-tratados com a CTX e co-cultivados com células tumorais por 24 h, tendo como controle as monoculturas tratadas ou não com CTX.

Figura 10F. Liberação de Epi-15-LXA₄ por macrófagos pré-tratados com a CTX e co-cultivados com células tumorais por 48 h, tendo como controle as monoculturas tratadas ou não com CTX.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 1.1- Veneno de serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i> (VCdt) e suas toxinas | 12 |
| 1.2- Estudos experimentais sobre os efeitos imunoregulatorios, anti-inflamatórios e antitumoral do veneno de <i>crotalus durissus terrificus</i> e suas toxinas isoladas | 14 |
| 1.3- Características gerais das citocinas | 17 |
| 1.4- Macrófagos, crescimento tumoral e Mediação | 19 |
| 1.5- Modelos experimentais para o estudo da interação entre células | 24 |
| 2. JUSTIFICAÇÃO | 26 |
| 3. OBJETIVO | 26 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 4.1- Obtenção dos macrófagos peritoneais | 27 |
| 4.2- Linhagem das Células LLC-Walker 256 | 27 |
| 4.3- Obtenção da Crotoxina | 27 |
| 4.4- Tratamento Farmacologia e ensaios de co-cultura | 28 |
| 4.4.1- Tratamento com CTX | 28 |
| 4.4.2- Tratamento com o Boc2 | 28 |
| 4.5- Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por macrófagos | 29 |
| 4.6- Quantificação da produção de óxido nítrico (NO•) por macrófagos | 29 |
| 4.7- Ensaio de proliferação celular | 30 |
| 4.8- Quantificação de Interleucina (IL) do sobrenadante da cultura de macrófagos | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.9- | Quantificação da concentração de Lipoxina A ₄ e o análogo 15-epi-LXA ₄ | 31 |
| 4.10- | Análise estatística | 32 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 46 |
| 7. | CONCLUSÕES | 47 |
| 8. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| 9. | ANEXO 1 | |
| 10. | ANEXO 2 | |

*Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia do instituto Butantan com o apoio financeiro da **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo nº 09/52330-9 (Auxílio de Pesquisa).*

1- INTRODUÇÃO

Os venenos animais contêm grande variedade de toxinas, em sua maioria peptídeos e proteínas, que são utilizadas para a captura de presas e como defesa. Estas toxinas, por atuarem em diferentes alvos celulares e moleculares, como canais iônicos, receptores, enzimas, membranas celulares ou vias metabólicas, possuem grande diversidade de ações farmacológicas. Desta forma, as toxinas animais se constituem em importante ferramenta para o estudo das propriedades fisiológicas e farmacológicas destes alvos e para a compreensão de como disfunções destes alvos podem contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças. Ainda, estas toxinas, em decorrência de sua seletividade ou mesmo especificidade pelos seus alvos, são modelos importantes para o desenho de novos e eficazes agentes terapêuticos. Dentre as toxinas que apresentam potencial como ferramentas científicas e/ou potencial biotecnológico e farmacológico, estão aquelas originadas do veneno de serpentes (Bailey & Wilce, 2001; Lewis & Garcia, 2003, para revisão).

Os venenos das serpentes são constituídos por misturas complexas de substâncias inorgânicas e orgânicas. Os constituintes inorgânicos incluem cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobre e zinco (Friederich *et al.*, 1971). Os componentes orgânicos são representados principalmente por proteínas com propriedades enzimáticas, peptídeos biologicamente ativos e algumas moléculas não-protéicas, que agem isolada ou sinergisticamente, interferindo em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares específicos (Lee, 1979). Alguns destes componentes do veneno possuem efeitos tóxicos, sendo assim denominados toxinas, e estas são responsáveis por diversos efeitos biológicos, como distúrbios na coagulação sanguínea, hemólise, hemorragia local e sistêmica, hipotensão, efeitos neurotóxicos, necrose tecidual, entre outros (Iwanaga and Suzuki, 1979; Markland,

1998; Walter *et al.*, 1999; Tanen *et al.*, 2001). A grande maioria das toxinas presentes nos venenos de serpentes é, na verdade, composta por moléculas endógenas da própria serpente, envolvidas em processos fisiológicos, contudo, quando produzidas em grandes quantidades na glândula de veneno, acarretam funções adicionais, às vezes lesivas (Ohno *et al.*, 1998; Hayashi and Camargo, 2005; Hayashi and Kerkis, 2008). Apesar da sua toxicidade, vários trabalhos da literatura têm demonstrado a importância de compostos derivados de venenos de serpentes para o tratamento de diferentes doenças. Isto se deve ao fato de milhões de anos de evolução terem conferido a estas substâncias, duas características importantes para o desenvolvimento de um fármaco: especificidade e seletividade a seus alvos (Bailey & Wilce, 2001; Lewis & Garcia, 2003; Cury e Picolo, 2006, para revisão).

1.1 Veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) e suas toxinas isoladas

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

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

de rabdomiólise generalizada e incoagulabilidade (Azevedo-Marques *et al.*, 1987; Sano-Martins *et al.*, 2001).

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

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

A crotoxina (CTX) foi isolada por Slotta & Fraenkel-Conrat, em 1938, e sua estrutura foi descrita por Fraenkel-Conrat & Singer (1956), sendo uma β -neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não-covalente de duas diferentes subunidades: a crotapotina (CA) e a fosfolipase A₂ (FLA₂ - CB). O peso molecular desta toxina é de 24 a 26 kDa, ponto isoelétrico de 4,7 e exibe atividades fosfolipásica, neurotóxica (bloqueio da transmissão neuromuscular) e miotóxica (Vital Brazil, 1972; Gopalakrishnakone, 1984; Stoker, 1990; Sampaio *et al.*, 2010, para revisão). A subunidade CA (crotapotina) apresenta peso molecular de 8,9 kDa, com ponto isoelétrico de 3,4, características ácidas, sendo desprovida de atividade enzimática e tóxica.

Sua função não está totalmente evidenciada, porém é aceito que CA pode agir como uma molécula carreadora potencializando a atividade letal de CB, porém diminuindo sua atividade enzimática dentro do complexo crotoxina (Bon *et al.*, 1989; Choumet *et al.*, 1996). A subunidade CB ou FLA₂ apresenta cerca de 14 kDa, ponto isoelétrico 9,7. (Aird *et al.*, 1986). Para a subunidade CB são atribuídas as atividades fosfolipásicas encontradas no veneno crotálico ou na fração crotoxina. Esta fração possui maior atividade enzimática que o complexo crotoxina, porém com menor toxicidade (Choumet *et al.*, 1996).

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

Vários estudos experimentais têm mostrado que, o VCdt ou substâncias isoladas deste veneno são capazes de modular as respostas inflamatória e imune (Sampaio *et al.*, 2010, Revisão). Em relação aos efeitos sobre o sistema imune, foi evidenciado que o veneno crotálico ou a crotoxina apresentam papel supressor sobre a resposta imunológica humoral (Cardoso & Mota, 1997). Ainda, Cardoso e colaboradores (2001) mostraram que a crotoxina, quando injetada por via subcutânea em camundongos, é capaz de induzir diminuição do número de leucócitos circulantes. Dados obtidos em nosso laboratório são indicativos de que o VCdt, CTX e o componente CB (FLA₂), mas não a crotapotina, administrados por via subcutânea, em ratos, reduzem o número de linfócitos circulantes em ratos. Este efeito é modulado, pelo menos em parte, por mediadores gerados na via da 5-lipoxigenase (Zambelli *et al.*, 2008).

Em relação à resposta inflamatória, Landucci e colaboradores (1995, 2000) mostraram que a crotapotina inibe o edema de pata de ratos induzido por carragenina ou

por fosfolipases A₂ isoladas de venenos animais. Ainda, a injeção, em camundongos, de VCdt, imediatamente após a administração intraperitoneal de tioglicolato, determina decréscimo no número de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996). Em continuidade a esses estudos, Nunes e colaboradores (2007) mostraram que a ação inibitória sobre os componentes vascular e celular da resposta inflamatória induzida pela carragenina é de longa duração e mais efetiva quando comparado a anti-inflamatórios clássicos, caracterizando assim, o efeito anti-inflamatório sugerido para este veneno. Estes autores demonstraram que a CTX é a toxina responsável por este efeito prolongado (Nunes *et al.*, 2010), mediado por receptores para peptídeo formil.

Sampaio *et al.* (2001), avaliando o efeito do veneno de cascavel sobre o metabolismo de macrófagos e a possível correlação entre as modificações deste metabolismo e as alterações funcionais destas células, demonstraram dualismo na ação deste veneno, uma vez que foi observada tanto inibição de alguns parâmetros funcionais, como espriamento e fagocitose, quanto estimulação do “burst” respiratório (geração de peróxido de oxigênio), da geração de óxido nítrico, da atividade microbicida (fungicida) e do metabolismo de glicose e glutamina destas células. O incremento deste metabolismo foi demonstrado por meio da determinação da influência do veneno sobre a atividade máxima de enzimas-chave do metabolismo de glicose e glutamina (hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, citrato sintase e glutaminase dependente de fosfato) e da oxidação destes substratos. Tanto as ações estimulatórias quanto inibitórias são de longa duração, pois serão observadas por até 7 dias após a administração de uma única dose do veneno. Estes efeitos manifestam-se independentemente do estado de ativação do macrófago – residente, inflamatório ou ativado. Contudo, as ações estimulatórias do VCdt são mais significativas no macrófago residente. Recentemente, Faiad e colaboradores (2012), demonstraram que a

CTX é a toxina responsável pelo efeito estimulatório sobre o metabolismo oxidativo e enzimático dos macrófagos. Neste estudo, foi mostrado que a ação estimulatória é de longa duração, pois é observada após 14 dias de uma única administração subcutânea da CTX, em macrófagos peritoneais de ratos portadores de tumor de Walker 256 no flanco superior, acompanhada por significativa diminuição da massa tumoral.

Em adição, ensaios *in vitro* demonstraram que tanto o veneno crotálico como as toxinas isoladas (CTX e FLA₂) são capazes de aumentar a liberação da lipoxina A₄, (Sampaio *et al.*, 2006a), um mediador lipídico gerado na via das lipoxigenases com potente efeito anti-inflamatório (McMahon & Godson, 2004) e inibidor de diversos eventos envolvidos com o crescimento tumoral (Fierro, 2005; Cezar-de-Mello *et al.*, 2008).

Apesar dessas evidências, não havia sido demonstrado a importância das ações estimulatórias da CTX sobre a atividade secretória dos macrófagos peritoneais, no microambiente tumoral. Em ensaios de co-cultura, Costa e colaboradores (2010) demonstraram que macrófagos previamente tratados com CTX apresenta ação antiproliferativa, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e da produção de óxido nítrico (NO).

Considerando a importância dos macrófagos no desenvolvimento de tumores e as ações imunomodulatória e antitumoral, *in vivo* e *in vitro*, descritas para a CTX, a elucidação dos mecanismos envolvidos nestes efeitos traz novas perspectivas para o desenvolvimento de um novo modelo para substâncias com propriedades terapêuticas no controle de neoplasias, além de contribuir com os mecanismos de ação da toxina.

1.2 Características gerais dos macrófagos

O macrófago foi descrito por Metchnikoff no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir dos estudos de MacKness *et al.* (1970), a atividade secretora desta célula adquiriu importância.

Ontogeneticamente, o macrófago deriva do saco vitelínico (Moore & Metcalf, 1970) e, no homem adulto, da medula óssea (van Furth, 1989), a partir da célula precursora para macrófagos e polimorfonucleares, a CFU-GM (colony-forming unit, granulocyte-macrophage) (Metcalf, 1971). A primeira célula da linhagem macrofágica na medula óssea, morfologicamente, é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos que, ao contrário do seu precursor, já apresentam capacidade de pinocitose e expressam receptores característicos de macrófagos (van Furth & Diesselhoff -Den Dulk, 1970; van Furth *et al.*, 1980). O pró-monócito, ao dividir-se, dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas, encaminhando-se então, para a corrente sanguínea, na forma de monócitos circulantes, que permanecem na circulação por cerca de 70 horas, no homem (Whitelaw, 1966) e 25 horas, no camundongo (van Furth & Cohn, 1968). Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo (macrófago). Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade de espraiamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos tais como lisozima, proteinases neutras e ácidas e espécies reativas do oxigênio, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (Cohn, 1978; Takemura & Werb, 1984) (**Figura 1**).

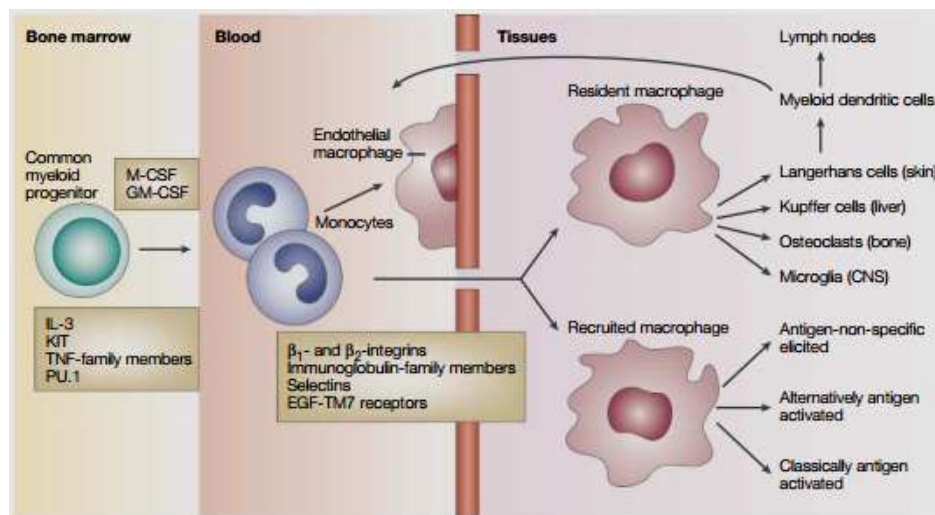


Figura 1. Sistema fagocítico mononuclear. O esquema mostra a diferenciação, distribuição e ativação dos macrófagos da medula. Esquema de Siamom Gordon 2002.

O macrófago residente permanece no órgão ou cavidade para o qual migrou por alguns meses (van Furth & Cohn, 1968) e é considerado célula terminal, sem capacidade de proliferação (Gordon, 1986), embora em algumas ocasiões, tal fenômeno tenha sido observado, como em macrófagos alveolares (Tarling *et al.*, 1987).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (Metcalf, 1971), assim como redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão (van Furth *et al.*, 1973). No sítio inflamatório, o monócito, agora denominado macrófago, passa por processo de diferentes estágios de ativação (Cohn, 1978; Gordon, 1986; Werb *et al.*, 1986; Nathan, 1987), definido como a aquisição de competência para executar uma tarefa complexa (Adams & Hamilton, 1984). Exemplos de funções

complexas incluem quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e capacidade de morte tumoral.

1.3 Macrófagos, crescimento tumoral e Mediação

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

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

O fenótipo *M1* é comumente encontrado nas infecções e na inflamação crônica, sendo, portanto, pró-inflamatório. Esta célula é caracterizada pela liberação de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF- α , reativos intermediários do nitrogênio (RNI) e dos reativos intermediários do oxigênio (ROI). No contexto do tumor, os macrófagos *M1* inibem o crescimento tumoral, erradicando as células tumorais e estimulando a resposta imune. Por outro lado, os macrófagos *M2*, encontrados quando o tumor está estabelecido,

ou seja, quando atinge o tamanho de 1 cm^3 e a angiogênese torna-se necessária para sua manutenção (Dvorak, 1986). Neste contexto, os macrófagos *M2* contribuem para a progressão do tumor por produzir mediadores pró-angiogênicos e mediadores anti-inflamatórios, além de proteases e fatores de crescimento (Mantovani *et al.*, 2002; Gordon, 2003; Mantovani *et al.*, 2004; Pollard, 2004; Sica *et al.*, 2006; Lamagna *et al.*, 2006). Ainda, expressam baixos níveis das citocinas inflamatórias e perdem a capacidade de liberação e de produção de ROI e RNI, importantes para ação tumoricida. Entre os reativos do nitrogênio, o óxido nítrico é a principal molécula, e este reativo interage com proteínas e ácidos ribonucleicos, inibindo a proliferação das células tumorais (**Figura 2**).

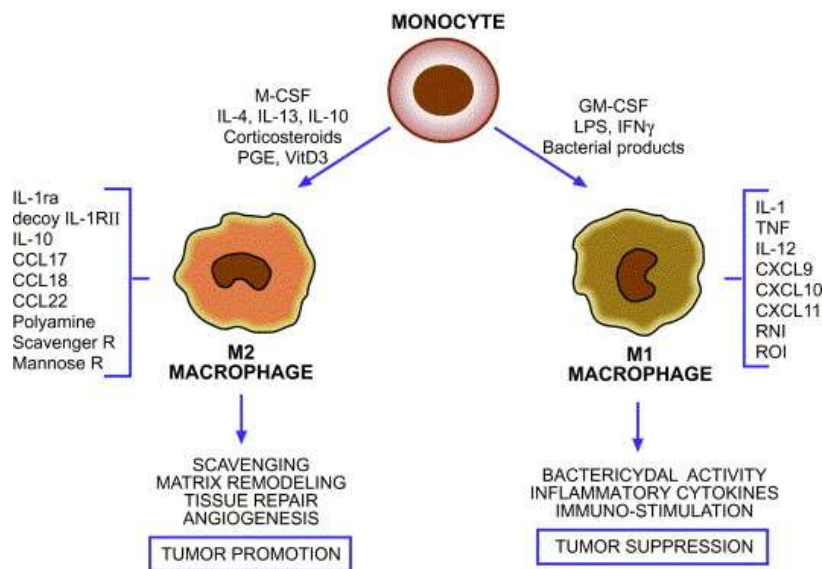


Figura 2. Propriedades distintas de macrófagos associados ao tumor. Frente à diferenciação de monócito exposto a diferentes substâncias, sendo **M1** na presença de fator estimulador de colônia de macrófago/granulocito, interferon-gama e lipopolissacarídeo (LPS). **M2** fator estimulador de colônia de macrófago, Interleucina IL-4, IL13, IL-10 e agentes imunossupressores (corticoides, vitamina D3, prostaglandinas). Esquema de Antonio Sica, 2006.

Além da participação das citocinas e dos reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio, é demonstrado também que mediadores lipídicos gerados na lipoxigenase, tais

como a lipoxina A₄ apresenta importante ação inibitória sobre o crescimento tumoral (Calorini *et al.*, 2005). As lipoxinas (LXAs) foram identificadas por Serhan e colaboradores (1984), em frações purificadas de suspensão de leucócitos. As LXAs são rapidamente produzidas em resposta a diferentes estímulos e apresentam diversas bioatividades sobre leucócitos, estimulando a ativação de monócitos e macrófagos, os quais inibem a atividade de neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. Ainda, este mediador lipídico modula as atividades de células de origem não mielóides, incluindo fibroblastos, células endoteliais, epiteliais gastrointestinais, mesangial renal e células dendríticas esplênicas (McMahon & Godson, 2004, para revisão). A LXA, bem como seus análogos naturais (ATLs), gerados na presença de aspirina agem como moduladores da resposta inflamatória, apresentando potente ação supressora sobre os eventos cruciais da inflamação.

Em relação ao mecanismo molecular, as lipoxinas são biosintetizadas e rapidamente inativadas enzimaticamente, gerando assim seus análogos estáveis (15 R-epímero, especificamente 15-epi-LXA₄ e 15-epi-LXB₄), análogos estáveis e mais potentes que mimetizam algumas das bioatividades das LXAs (Parkinson, 2006). Tanto a lipoxina nativa quanto seus análogos estáveis exercem seus efeitos biológicos específicos após a ligação a receptores transmembrânicos (ALXR, conhecidos também como receptores para peptídeo formil (FPRL)), acoplados à proteína G, identificados em vários tipos celulares (Fiore *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 2006) (**Figura 3**).

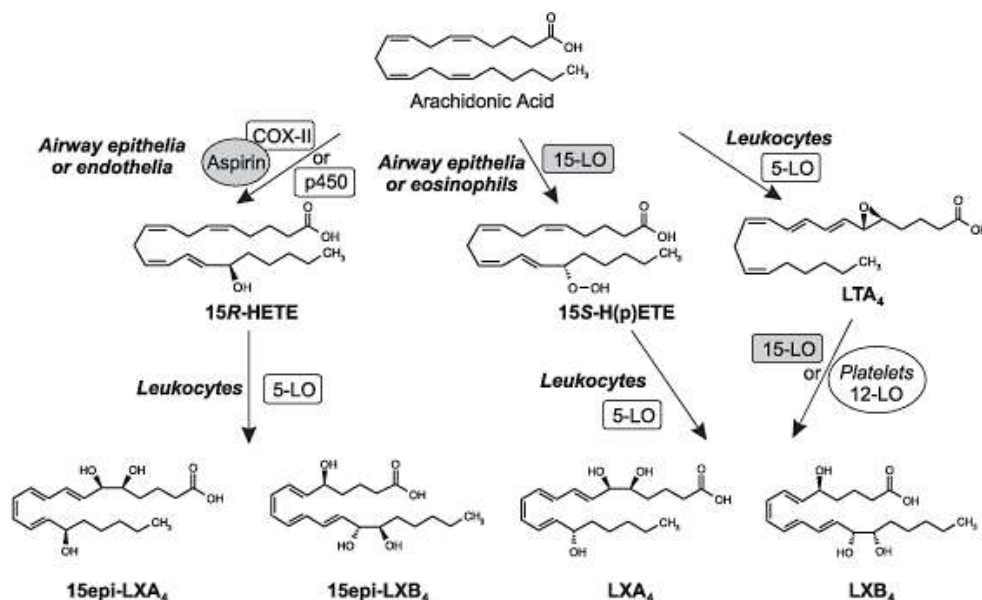


Figura 3 - Biossíntese das Lipoxinas (LXs) e dos análogos estáveis da lipoxina, gerados na presença da aspirina (ALTs). Esquema proposto por Chiang e colaboradores, 2005.

Ações antiproliferativas da lipoxina foram observadas, primeiramente, em células de adenocarcinoma de pulmão (Claria *et al.*, 1996) e células mesangial renal humanas (McMahon *et al.*, 2000). Ainda, este metabólito biologicamente ativo é considerado regulador-chave tanto da proliferação celular como da neoangiogênese, sendo, portanto investigado como substância com potencial antitumoral (Claria, 2006). Paul-Clark e colaboradores (2004) demonstraram que a aspirina dispara a síntese de 15-epi-lipoxina A₄, acarretando em aumento da síntese de eNOS e iNOS. Este óxido nítrico induzido pela aspirina exerce efeitos inibitórios sobre os eventos vascular e celular da resposta inflamatória.

A LXA₄ e seus ATLs atuam em receptores acoplados a proteína G (GPCR) denominado de ALX (também classificado de receptor peptídeo formil 2 (FRP2) Chiang N,

et al., 2005), presentes em varios tipos celulares, gerando sinais intrínsecos após a ativação específica (**Figura 4**). Além disso, as LXA₄ agem em receptores cysLT1 como antagonistas competitivos de leucotrienos D₄ (LTD₄), pró-inflamatórios que também podem atuar em receptores distintos (McMahon e Godson, 2004; Gronert et al., 2001; Fierro, 2005).

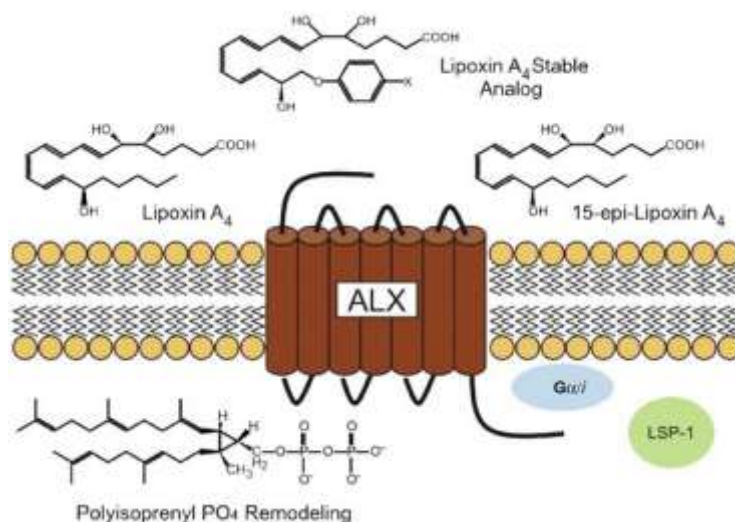


Figura 4. Receptor ALX/FPRL. Lipoxina A₄ e análogos bioativos de lipoxina A₄ estáveis podem interagir com receptores de lipoxina A₄ (ALX), para regular as respostas de células leucocitárias. Esquema de Levy, 2005.

1.4 Modelos experimentais para o estudo da interação entre células

Nos ensaios experimentais, utilizando os modelos *in vitro* é essencial mimetizar as condições naturais possíveis envolvidas no ambiente celular. Neste sentido, ao escolher um modelo para a realização de experimentos *in vitro* é imprescindível os cuidados com a observação, mensuração e a manipulação das células para que o sistema *in vitro* reproduza o comportamento celular observado no ambiente *in situ*. No modelo de co-cultura, diferentes tipos celulares são agregados em um mesmo ambiente, promovendo a comunicação celular, importante para a regulação da fisiologia e diferenciação dessas células. Esta comunicação pode ocorrer de diferentes maneiras: via *sinalização paracrina* ou *autócrina* (sinais liberados por uma célula ligada a receptores de membrana de outras células), por *sinalização justacrina* (sinais expressos na membrana de uma célula são reconhecidos por receptores de membrana de outras células), ou por *comunicação juncional (gap)* (mudanças na sinalização intracelular) (Hendriks et al., 2007). Quando diferentes tipos celulares estão co-cultivados as células podem interagir e se comunicarem por essas diferentes vias, dependendo da proximidade e habilidade de interação ou comunicação.

Utilizando ensaios em co-cultura, Hauptmam e colaboradores (1993) investigaram as interações entre células tumorais e diferentes sub-populações de macrófagos murinos. Nestes estudos foi investigado o comportamento proliferativo e migratório de células tumorais quando co-cultivadas com as sub-populações de macrófagos. Outros estudos focaram a participação do macrófago na angiogenese tumoral e inflamação (Ono, 2008, para revisão). Nesses estudos foi mostrado a importância da mediação química secretada por macrófagos no controle das respostas inflamatória e angiogênica, sugerindo novos alvos para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico.

Assim, considerando os diferentes estudos relatados na literatura, o modelo de co-cultura provou ser uma ferramenta *in vitro* fundamental para elucidar a importância de interações celulares na fisiologia, homeostasia, reparo e regeneração tecidual e a gênese e desenvolvimentos de diversas doenças, tais como o câncer (Hendriks et al., 2007).

* * *

2- JUSTIFICATIVA

A CTX apresenta efeitos anti-inflamatório, imunomodulatório e antitumoral e modula, particularmente, a funcionalidade de macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata. Em ensaios de co-cultura, demonstrou-se que macrófagos previamente tratados com CTX apresenta ação antiproliferativa, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e da produção de óxido nítrico (NO).

3- OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é ampliar a caracterização da modulação envolvida na ação estimulatória da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos co-cultivados com as células tumorais da linhagem LLC WRC 256, correspondentes ao tumor de Walker 256.

Para tanto, serão avaliados os seguintes objetivos específicos:

- 1) determinar concentração de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α e da lipoxina A₄/ ou ATL liberados no sobrenadante da co-cultura de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos, previamente incubados com CTX ou apenas meio de cultura (controle), e células LLC WRC 256;
- 2) avaliar a participação dos ALXR/FPRL, ligantes da lipoxina A₄ e análogos, na ação modulatória da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos previamente incubados com a CTX e co-cultivados com as células tumorais.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Obtenção de macrófagos peritoneais - Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso médio variando entre 160 a 180 gramas, obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos no laboratório, com livre acesso a água e ração, por um período mínimo de 3 dias antes dos experimentos. Os procedimentos experimentais foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB-protocolo 631/09).

4.2- Linhagem das Células LLC Walker 256 - Foram utilizadas células LLC Walker 256, linhagem correspondente ao tumor Walker 256 (Hull *et al.*, 1953). Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB, na concentração de $2,5 \times 10^4$ /ml, em 10 ml de meio, em garrafa de cultura de 75cm^3 . As células foram repicadas a cada 2 dias, utilizando tripsina 0,25% em PBS, por 2 minutos, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura fresco.

4.3- Obtenção da Crotoxina - A CTX foi purificada a partir de veneno da espécie *Crotalus durissus terrificus*, liofilizado, extraído de vários exemplares de espécimes adultos, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e estocado a -20°C . A purificação da fração crotoxina do veneno foi realizada segundo o método descrito por Rangel-Santos e colaboradores (2004), pelo Prof. André Fonseca Alves, assistente técnico responsável do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

4.4- Tratamentos Farmacológicos e ensaios de co-cultura

4.4.1 Tratamento com a CTX– Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos, conforme descrito no **item 4.1** e pré-incubados com CTX (0,3µg/mL), em uma atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram centrifugados e ressuspensos em meio fresco e cultivados (5x10⁵ células/100µL/poço), em placas de 96 poços, na presença de células LLC WRC (5x10⁴/100µL), aderidas, previamente, por 24 horas.

4.4.2 Tratamento com o Boc2 - Os macrófagos residentes foram primeiramente pré-incubados na presença de Boc2 (100µM) (Cezar-de-Melo *et al.*, 2008), dissolvido em 10% de DMSO em meio RPMI 1640, por 15 min, em uma atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C, para o bloqueio do receptor para peptídeo formil (FPRL). Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas 1 vez em PBS e ressuspensas em meio de cultura contendo CTX (0,3µg/mL), por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram centrifugados e ressuspensos em meio fresco e cultivados (5x10⁵ células/100µL/poço), em placas de 96 poços, na presença de células LLC WRC (5x10⁴/100µL), aderidas, previamente, por 24 horas.

Após os tratamentos, os ensaios de co-cultura foram realizados nos períodos de 24 horas, para a determinação da liberação de H₂O₂, 48 horas para a determinação da produção de NO e proliferação das células tumorais, 12, 24 e 48 horas, para quantificar a secreção das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α e de LXA₄ e 15-epi-LXA₄. Monoculturas de macrófagos ou células tumorais LLC WRC 256 foram mantidas como ensaios controles para a determinação basal da concentração dos mediadores investigados. A concentração da CTX,

bem como o tempo de incubação com a CTX foram baseados em estudos anteriores (Sampaio *et al.*, 2003; 2005, 2006, Costa *et al.*, 2010).

4.5- Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos

A técnica utilizada será a descrita e adaptada para microensaio por Pick & Mizel (1981). Em placas de 96 poços, contendo células tumorais LLC WRC 256 (2×10^4), já aderidas por 24 horas, foram adicionadas de macrófagos (2×10^5), previamente tratados, conforme descrito nos **itens 4.4.**, e mantidas no ensaio de co-cultura, por 24 horas. Após este período, as placas foram lavadas e adicionados aos poços, 100 µl de solução de fenol vermelho e acetato de forbol miristato (PMA-40 ng). As placas foram incubadas, a 37°C, em atmosfera úmida, por 1 hora onde após esse período a reação foi interrompida pela adição de hidróxido de sódio 1N (NaOH). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas e, simultaneamente, as mesmas amostras sem estímulo de PMA, foram avaliadas para aquilatar a produção espontânea do H₂O₂ obtida nas co-culturas e monoculturas de macrófagos e células tumorais. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 620 nm obtendo-se a densidade óptica (D.O.) e calculando-se os resultados em nmols de H₂O₂ por 2×10^5 macrófagos.

4.6- Quantificação da produção de óxido nítrico (NO•) por macrófagos

A determinação da concentração de NO• no sobrenadante da co-cultura de macrófagos peritoneais com células tumorais foi realizado segundo o protocolo de Ding *et al* (1988). Em placas de 96 poços, contendo células tumorais LLC WRC 256 (2×10^4), já aderidas por 24 horas, foram adicionadas de macrófagos (2×10^5), previamente

tratados, conforme descrito nos **itens 4.4.**, e mantidas no ensaio de co-cultura, por 48 horas. Após a co-cultura por 48 horas a 37°C, em atmosfera úmida, a 5% de CO₂, os sobrenadantes foram transferidos para a placa de leitura e reagente de Griess, na proporção de 1:1 (v/v) será adicionado. Em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA a 550 nm. Os valores de leitura foram comparados com uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) a 5-60 µM e os resultados expressos em µM de nitrito liberado.

4.7- Ensaio de proliferação celular

Após a co-cultura de células da linhagem LLC WRC 256 (2×10^4) incubadas na presença de macrófagos (2×10^5), previamente tratados com CTX (0,3µg/mL) ou apenas na presença de meio de cultura (controle). Após 48 horas de incubação, a viabilidade celular e o número de células foram determinados, incubando 20 µL de MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide] (5 mg/mL), dissolvido em PBS, por 3 horas. Em seguida, serão adicionados 100 µl de SDS 10%, dissolvido em PBS (contendo 0,01 M de HCl). As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 18 horas. A leitura foi realizada em espectrofotométrica a 595 nm em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem) e os resultados expressos em números de células.

4.8- Quantificação de interleucinas (IL) do sobrenadante da cultura de macrófagos

Após 12, 24 e 48 horas dos ensaios de monocultura e de co-cultura de macrófagos (5×10^5) e células tumorais LLC (5×10^4), placas de 24 poços, após os tratamentos farmacológicos, conforme descrito no **item 4.4**, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80° C, para determinação das citocinas. Para as dosagens das citocinas

inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , foram utilizados kits reagentes (R&D System®), por meio da técnica de ELISA, de acordo com as técnicas padronizadas pelo fabricante. Foram adicionados 100 μ l do anticorpo específico em cada poço e incubados em temperatura ambiente, *overnight*. Após esse tempo, a suspensão foi aspirada e a placa lavada com tampão (PBS 0,05% Tween-20), por 3 vezes. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 μ l do diluente do ensaio e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. A suspensão foi novamente aspirada e as placas lavadas com tampão, por 3 vezes. Foram adicionados 100 μ l do padrão ou amostra em cada poço. As placas foram incubadas por um período de 2 h a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram aspiradas e lavadas novamente, com tampão, por 3 vezes. Em seguida, 100 μ l do anticorpo específico de detecção, marcado com biotina, em cada poço foram adicionados e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram novamente aspiradas e lavadas com tampão por 3 vezes. Foram adicionados 100 μ l do conjugado e as placas foram incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Após esta incubação as placas foram aspiradas e lavadas com tampão, por 3 vezes. O substrato tetrametilbenzidina (100 μ l) foi adicionado e as placas incubadas por 30 min, em temperatura ambiente, protegido da luz. A reação foi bloqueada com 50 μ l da solução de ácido fosfórico (H₃PO₄). A leitura foi realizada até 30 minutos depois do ensaio, em espectrofotômetro, a 450nm.

4.9- Quantificação da concentração de Lipoxina A₄ e o análogo 15-epi-LXA₄

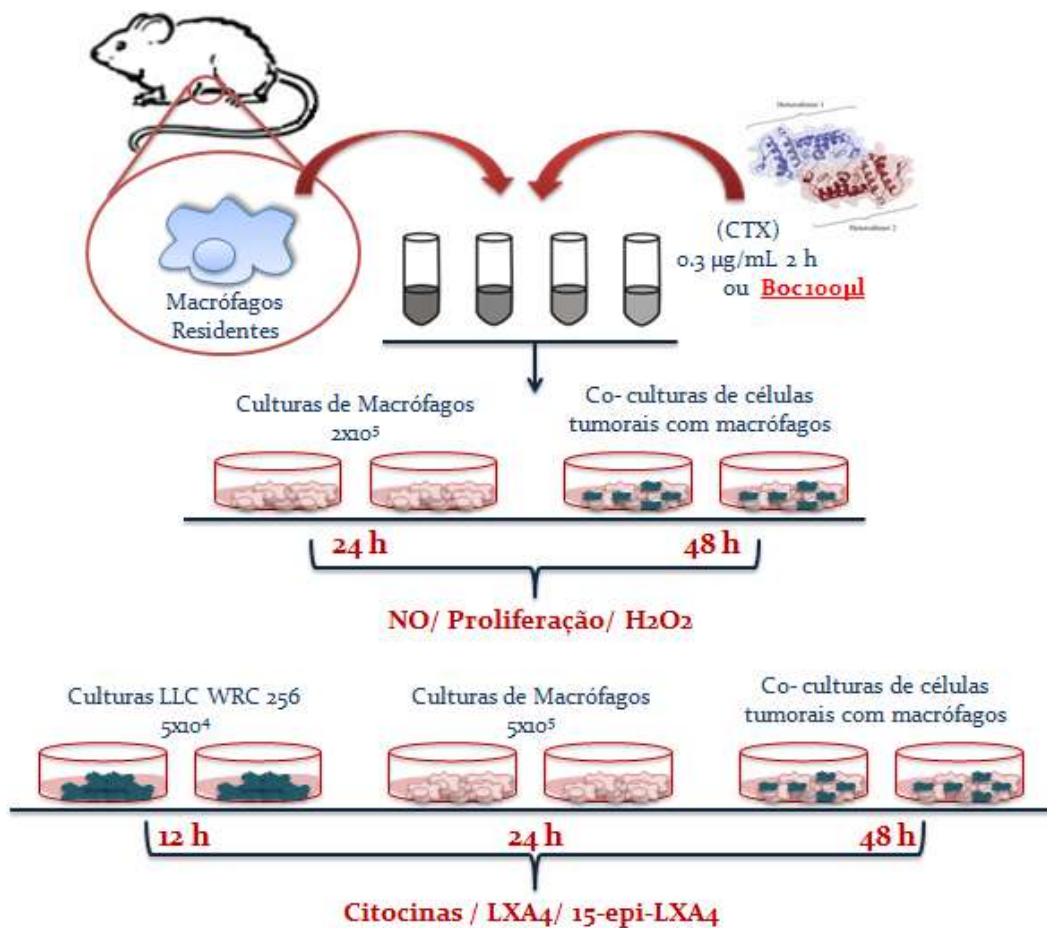
Para avaliar a liberação destes mediadores lipídicos, após a incubação dos ensaios de monocultura e de co-cultura de macrófagos (5x10⁵) e células tumorais LLC (5x10⁴), placas de 24 poços, após os tratamentos farmacológicos, conforme descrito no **item 4.4**, os

sobrenadantes foram coletados para a determinação da concentração de lipoxina A₄ e do 15-epi-LXA₄. Para tanto, o sobrenadante foi acidificado com 1 N de HCl, pH 3,4 -3,6 e extraídos em coluna Sep Pak C-18, previamente ativadas com 10 mL de etanol absoluto, seguido de 10 mL de água deionizada. Posteriormente, as colunas foram lavadas com 10 ml de água, 10 ml de etanol absoluto e 2ml de água. Os eicosanóides foi eluído com 1 ml de éter e 2 mL de metilformato. Os eluatos foram concentrados em atmosfera de nitrogênio, ressuspensos em tampão de ELISA e analisados por ensaio imunoenzimático (EIA), utilizando kits comerciais (Neogen Corporation, USA). A sensibilidade do ensaio é de 20 pg/ml de LXA₄ ou 15-epi-LXA₄.

4.10- Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm e.p.m. (erro padrão da média) e analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey-Kramer (INSTAT – GraphPad Software), comparando-se os valores do grupo controle com os valores dos experimentais. As diferenças foram consideradas significativas para o nível de $p < 0,05$ (5%).

**ESQUEMAS DOS TRATAMENTOS COM A CTX
EM ENSAIOS DE MONOCULTURA E DE CO-CULTURA**



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como citado anteriormente, a CTX apresenta efeitos anti-inflamatório, imunomodulatório e antitumoral e modula, particularmente, a funcionalidade de macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata. Em ensaios de co-cultura, nosso grupo demonstrou que macrófagos previamente tratados com CTX apresenta ação antiproliferativa, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da produção de óxido nítrico (NO) (Costa *et al.*, 2010). Neste estudo investigou a ação da CTX sobre a produção de óxido nítrico de monoculturas de macrófagos e células tumorais. Em seguida, avaliou-se o efeito da CTX sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos incubados previamente na presença da toxina, por um período de 2 h, e co-cultivados na presença das células tumorais da linhagem LLC WRC 256, por um período de 48 horas.

No presente estudo foram determinados os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , importantes para a proliferação das células tumorais, em monoculturas de macrófagos e co-cultura de células tumorais e macrófagos incubados previamente na presença de CTX (0,3 μ g/mL), após os períodos de 12 e 24 horas. A possível participação da LXA₄ na ação modulatória da CTX sobre a capacidade secretória de macrófagos foi avaliada utilizando Boc2, antagonista de receptores peptídeo formil. Após o bloqueio deste receptor, investigou-se a capacidade da CTX modular a liberação de H_2O_2 , produção de NO e secreção das citocinas e mediadores lipídicos, nas monoculturas e co-culturas. Ainda, a determinação da concentração de LXA₄, bem como seu análogo natural estável (15-epi-LXA₄) foi realizada após períodos de 12, 24 e 48 h.

Conforme demonstrado na **Figura 5A**, a monocultura de macrófagos obtidos de animais normais, pré-incubados por um período de 2 h na presença de CTX (0,3µg/mL), e cultivados por um período de 12 horas, apresentou aumento significativo (219%) da secreção da IL-6, em quando comparado às monoculturas de macrófagos incubados, pelo mesmo período, apenas na presença de meio de cultura (controle). Diferentemente do que observado para aquela citocina, a quantidade de TNF- α e de IL-1 β foi inibida pela CTX, conforme demonstrado nas **Figuras 5B** (57%) e **5C** (48%), respectivamente. É interessante comentar que não foi utilizado nenhum estímulo durante a cultura. Portanto, sugerimos que a própria manipulação e aderência dos macrófagos na placa acarretaram a secreção dessas citocinas em níveis suficientes para que a ação inibitória da toxina fosse observada. Após o período de 24 horas, foi observado que a ação estimulatória da toxina sobre a secreção da IL-6 ainda é mantido (80%), quando comparada as monoculturas controles (**Figura 5D**). Por outro lado, a atividade inibitória da CTX sobre a secreção do TNF- α e de IL-1 β em monocultura de macrófagos não é mais observada (**Figuras 5E** e **5F**, respectivamente). Após 24 horas os níveis detectados das citocinas investigadas já são mais baixos do que os níveis das monoculturas de macrófagos de 12 horas, sendo a secreção da IL-1 β , neste período, extremamente baixa (**Figura 5F**). Após 48 horas não foi possível detectar os níveis das citocinas investigadas em monoculturas de macrófagos. Ainda, a produção destas citocinas foi determinada em monoculturas das células LLCWRC 256. Os resultados obtidos demonstraram que este tipo de célula tumoral não é capaz de produzir este metabólito, em níveis detectáveis, em até 48 horas de cultura (*dados não mostrados*).

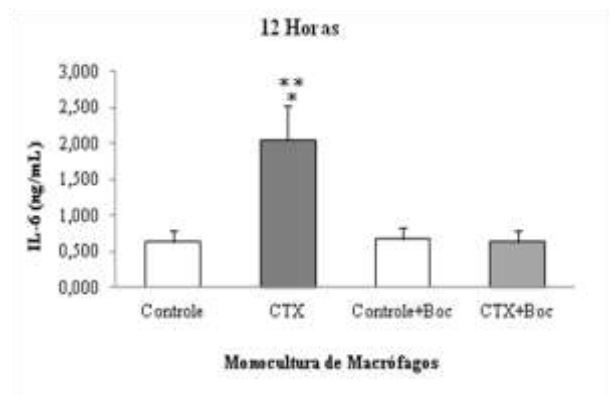
Para avaliar a importância dos receptores ALX/FPRL, ligantes de LXA₄ e análogos estáveis (ATL), nas ações estimulatórias da CTX sobre a capacidade secretória de

macrófagos, os macrófagos foram, primeiramente incubados na presença de BOC-2 (100 μ M), antagonista de receptor peptídeo formil, por 15 minutos. Após esse período, meio de cultura (controle) ou meio de cultura contendo CTX (0,3 μ g/mL) foram incubados com os macrófagos. Inicialmente, investigou-se a importância deste receptor para a secreção das citocinas. Os resultados expressos nas **Figuras 5A, 5B, 5C e 5D** demonstram que tanto a ação estimulatória da CTX sobre a secreção da IL-6, como o efeito inibitório da toxina são totalmente bloqueados pelo antagonista, sugerindo que o receptor peptídeo formil é importante para as ações da CTX.

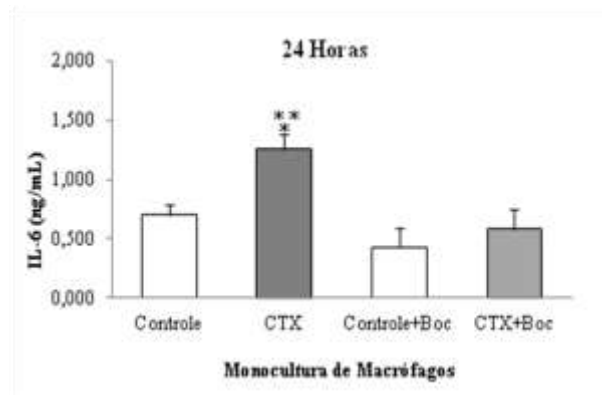
Nos ensaios experimentais, os macrófagos obtidos para as monoculturas foram também utilizados nos ensaios de co-cultura de macrófagos e células tumorais. Em relação aos ensaios de co-cultura, foi observado que macrófagos pré-tratados com a CTX e co-cultivados com as células tumorais apresentaram significativo aumento da IL-1 β , tanto em co-culturas de 12 horas (273%), como nas co-culturas de 24 horas (216%), conforme demonstrado nas **Figuras 6C e 6F**. Esta ação estimulatória foi bloqueada pelo tratamento com o BOC-2 (**Figuras 6C e 6F**).

Já, a secreção do TNF- α e da IL-6 não foi alterada pela pré-incubação dos macrófagos com a CTX, quando comparada às co-culturas controles, independentemente dos períodos avaliados (12 e 24 horas) (**Figuras 6A, 6B, 6D e 6E**).

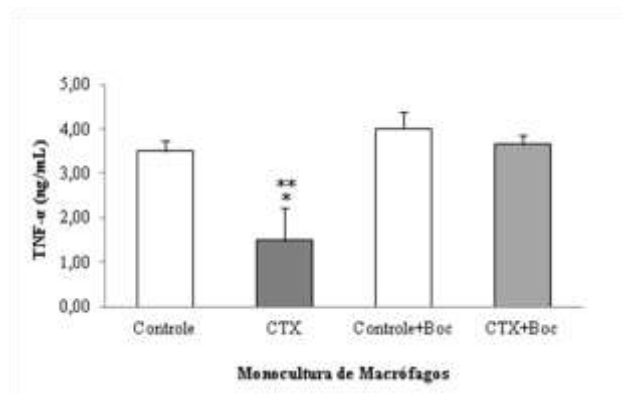
A



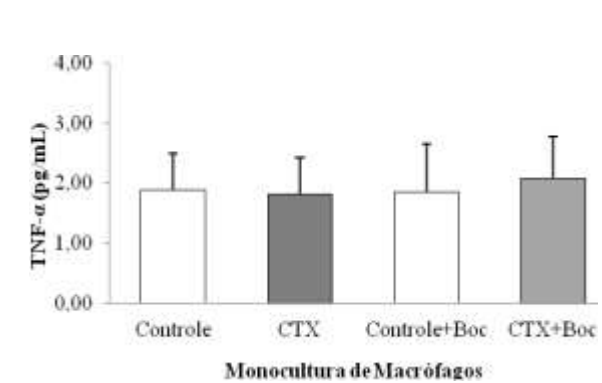
D



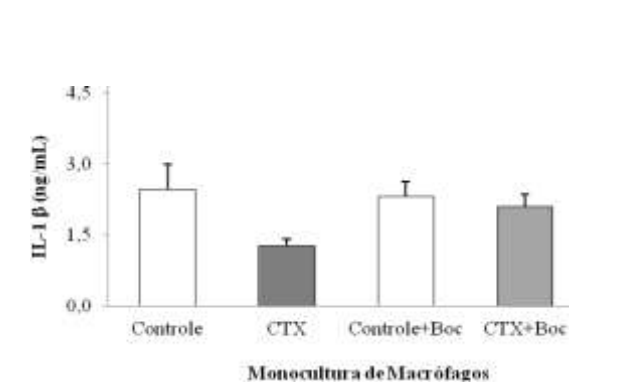
B



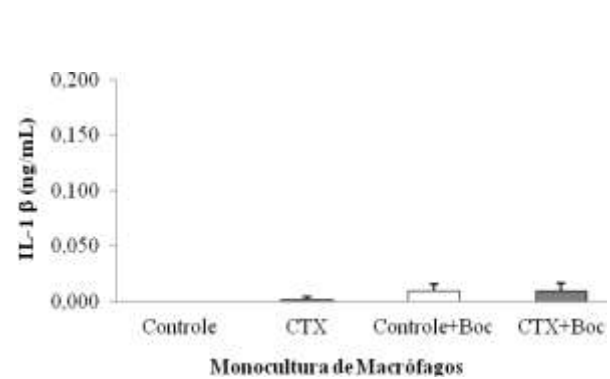
E



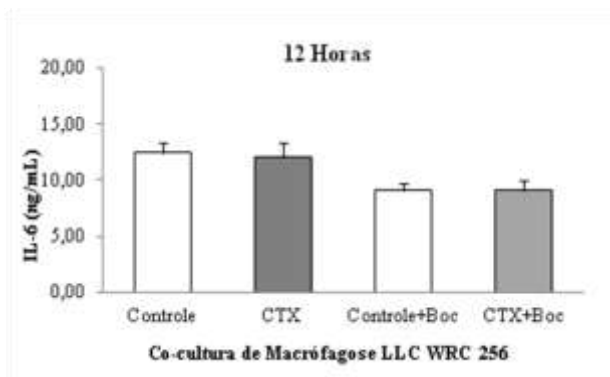
C



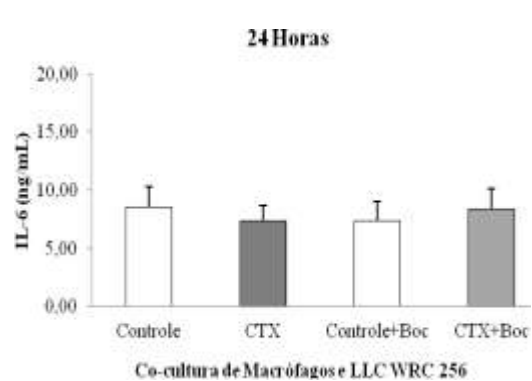
F



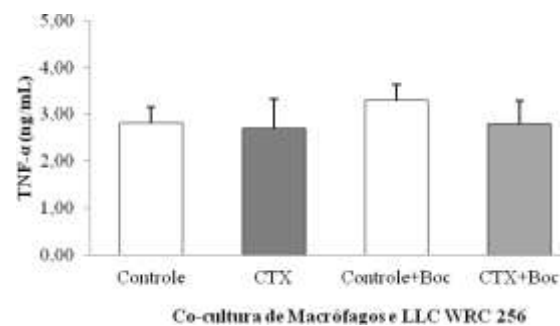
A



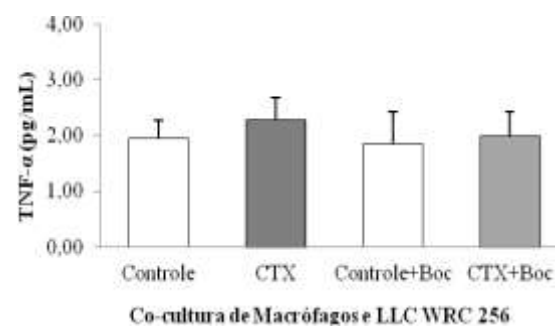
D



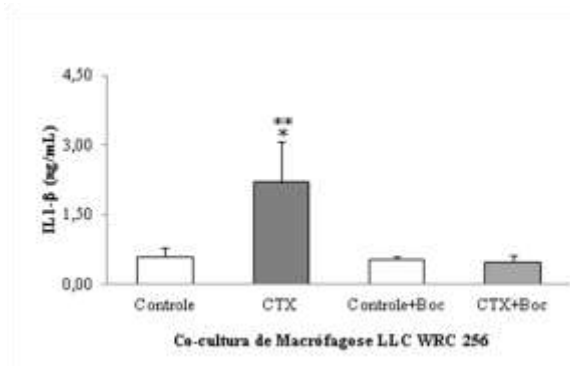
B



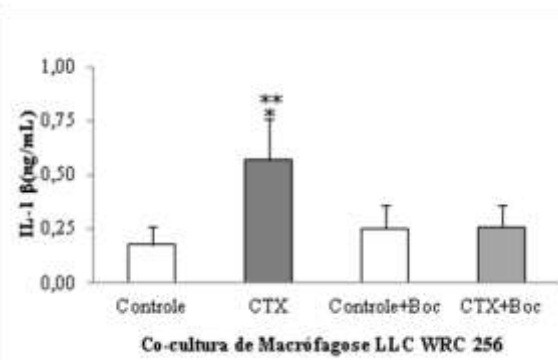
E



C



F



Conforme assinalado na Introdução, Em ensaios de co-cultura, Costa e colaboradores (2010) demonstraram que macrófagos previamente tratados com CTX apresenta ação antiproliferativa, em modelo de co-cultura, mediada, em parte, pelo aumento da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da produção de óxido nítrico (NO). Assim, dando continuidade aos objetivos propostos para esta parte do Projeto de Pesquisa, investigou-se a participação destes receptores na ação estimulatória da CTX sobre a liberação de H_2O_2 e produção do óxido nítrico. Os resultados obtidos demonstraram que o Boc2, um antagonista seletivo para receptores para peptídeo formil foi capaz de bloquear a liberação de H_2O_2 (**Figura 7**), bem como a produção de óxido nítrico por macrófagos pré-incubados com a CTX e co-cultivados com células tumorais (**Figura 8**). Ainda, o efeito sobre a proliferação celular observado para as co-culturas de macrófagos tratados com esta toxina foi totalmente abolido pela pré-incubação com este antagonista (**Figura 9**), evidenciando a importância do receptor para LXA na ação estimulatória da CTX sobre a atividade secretória a anti-proliferativa de macrófagos.

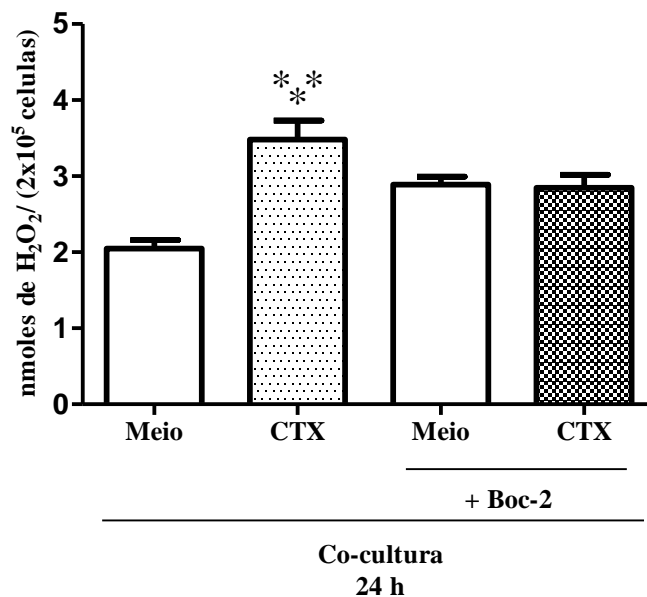


Figura 7. Efeito do Boc2 sobre a ação estimulatória da CTX sobre a liberação de H₂O₂, por macrófagos co-cultivados com células LLC WRC 256. Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos e pré-incubados na presença de Boc2 (100μM), por 15 min. Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas 1 vez em PBS e ressuspensas em meio de cultura contendo CTX (0,3μg/mL), por um período de 2 h. *P<0,05, por comparação com os macrófagos pré-tratados apenas na presença de meio de cultura e co-cultivados com as células LLC WRC 256 (controle). Este gráfico é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (com 6 animais por experimento).

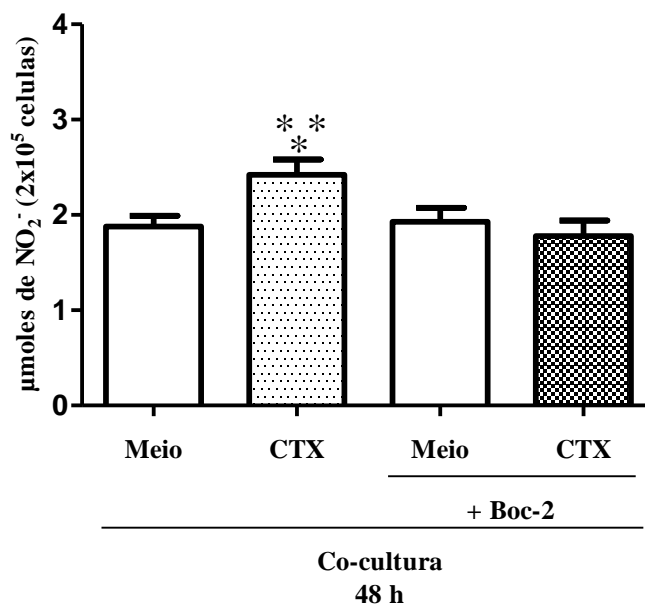


Figura 8 – Efeito do Boc2 sobre a ação estimulatória da CTX sobre a produção de óxido nítrico, por macrófagos co-cultivados com células LLC WRC 256. Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos e pré-incubados na presença de Boc2 (100μM), por 15 min. Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas 1 vez em PBS e ressuspensas em meio de cultura contendo CTX (0,3μg/mL), por um período de 2 h. *P<0,05, por comparação com os macrófagos pré-tratados apenas na presença de meio de cultura e co-cultivados com as células LLC WRC 256 (controle). Este gráfico é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (com 6 animais por experimento).

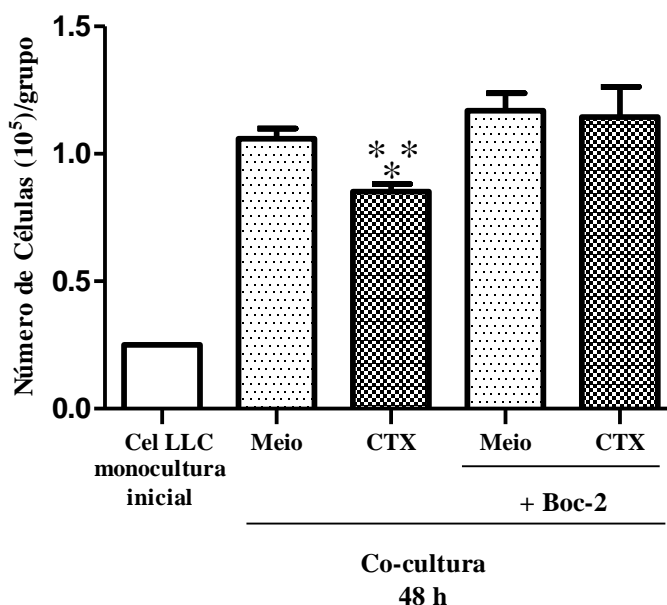


Figura 9 – Efeito do Boc2 sobre o efeito anti-proliferativo de macrófagos pré-incubados com a CTX sobre a proliferação de células tumorais. Macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal de ratos e pré-incubados na presença de Boc2 (100 μ M), por 15 min. Após este período, as células foram centrifugadas, lavadas 1 vez em PBS e ressuspensas em meio de cultura contendo CTX (0,3 μ g/mL), por um período de 2 h. Após esta incubação, os macrófagos foram centrifugados e ressuspensos em meio fresco e cultivados (2 \times 10⁵ células/100 μ L/poço), em placas de 96 poços, na presença de células LLC WRC (2 \times 10⁴/100 μ L), aderidas, previamente, por 3 horas. *P<0,05 por comparação com o grupo incubado apenas com o meio (controle). **P<0,05 por comparação com o grupo controle previamente incubado com Boc2. Este gráfico é representativo de pelo menos 3 experimentos independentes (com 6 animais por experimento).

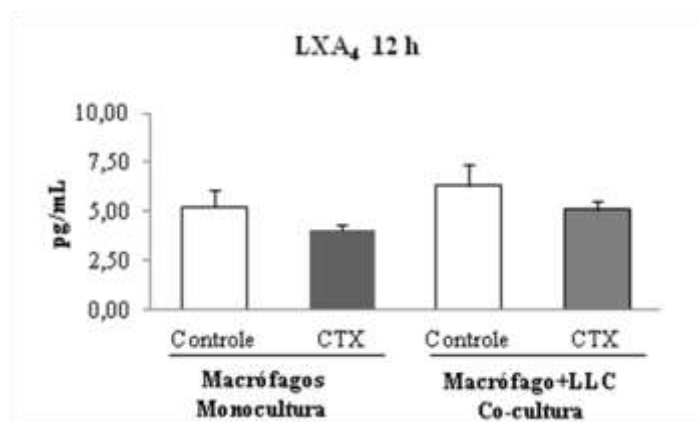
Interessantemente, Calorini e colaboradores (2005) demonstraram que macrófagos co-cultivados na presença de células tumorais, tanto de origem murina, quanto humana demonstram marcada redução na geração dos produtos da via da lipoxigenase. O perfil de produção desses metabólitos pelos macrófagos é restabelecido após a remoção das células tumorais das co-culturas. Os autores sugerem que bloquear a formação de produtos da via da lipoxigenase seria um dos mecanismos utilizados pelas células tumorais para ludibriar a defesa do hospedeiro. De fato, em relação aos nossos resultados, foi observado que macrófagos co-cultivados na presença de células tumorais apresentaram níveis menores de formação de nitrito/nitrato do que os macrófagos mantidos em monoculturas. A CTX estabelece indução de formação/ligação de LXA₄ nestas células (Sampaio *et al.*, 2006b), acarretando assim uma condição metabólica para que os macrófagos respondam à presença tumoral. Para comprovarmos o aumento da formação deste mediador lipídico, foram quantificadas das monoculturas e co-culturas, os níveis tanto da LXA₄, como do seu análogo estável (ATL), conforme propostos nos objetivos do Projeto de Pesquisa.

Os resultados demonstraram que a pré-incubação dos macrófagos com a CTX determinou a liberação significativa da LXA₄, em monocultura de macrófago (59%), como em co-cultura desta célula na presença das células tumorais LLCWRC 256 (35%), após o período de 24 horas de incubação, quando comparado com os respectivos controles (**Figura 10B**). Nos períodos de 12 h (**Figura 10A**) e 48 h (**Figura 10C**), a ação da CTX não é observada nas monoculturas e co-culturas, quando comparado aos respectivos grupos controles.

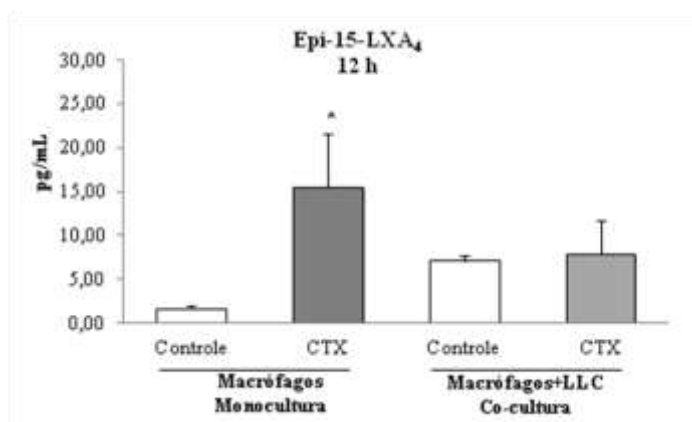
Por outro lado, quando quantificou-se a liberação do 15-epi-LXA₄, análogo natural e estável da LXA₄, foi detectado pronunciado aumento deste mediador nas

monoculturas, em todos os tempos avaliados (12h: 9,3x - **Figura 10D**; 24h: 5,5x - **Figura 10E**; 48h: 2,7x - **Figura 10F**) e nas co-culturas que continham macrófagos pré-incubados presença de CTX (0,3µg/mL), nos períodos de 24 horas (2,3x - **Figura 10E**) e 48 horas (2,1x - **Figura 10F**), quando comparado aos controles.

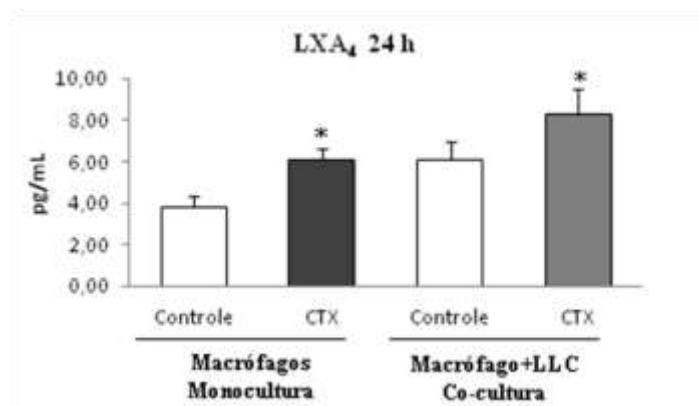
A



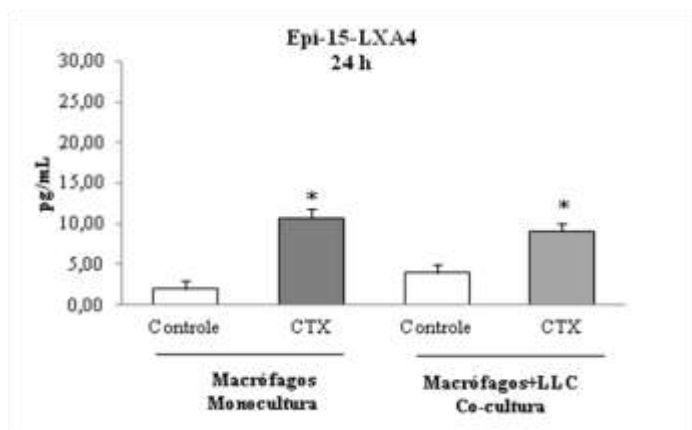
D



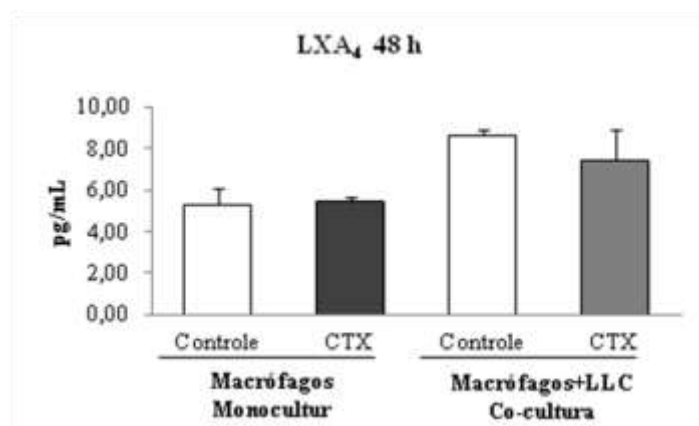
B



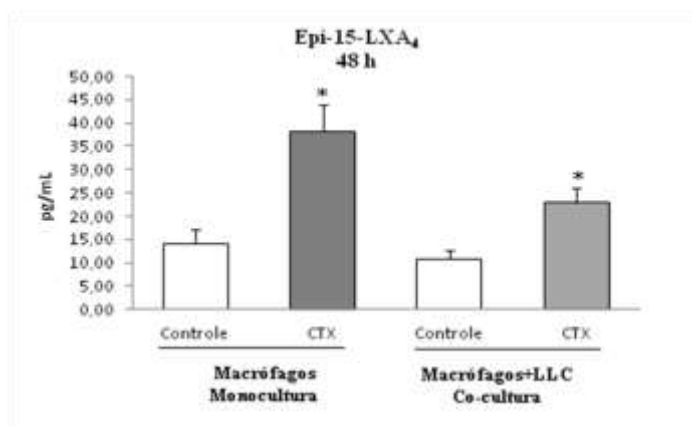
E



C



F



6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultado *in vitro*, utilizando o modelo de co-cultura, obtidos durante o desenvolvimento do presente projeto evidenciam importante inibição da proliferação de células tumorais, quando co-cultivadas com macrófagos pré-tratados com CTX. Nestas mesmas co-culturas foi observada a ação estimulatória da CTX sobre a produção de óxido nítrico, secreção de IL-1 β e formação dos mediadores lipídicos LXA₄ e 15-epi-LXA₄. Adicionalmente a esses fatos, é observado que o Boc2 bloqueia as ações da CTX no modelo de co-cultura, evidenciando a importante participação do receptor para peptídeo formil. Tanto a LXA nativa quanto seu análogo natural 15-epi-LXA₄, mais potente e estável que mimetiza algumas das bioatividades das LXAs (Parkinson, 2006), exercem seus efeitos biológicos específicos após a ligação a aqueles receptores transmembrânicos (conhecidos também como ALXR), acoplados à proteína G, identificados em vários tipos celulares (Fiore *et al.*, 1994; Chiang *et al.*, 2006). De fato, estes mediadores lipídicos acoplados aos receptores peptídeo formil podem interagir com alvos intracelulares relacionados com respostas celulares, tais como tirosinas cinases e PKC. Uma dessas ações pode levar, por exemplo, à inibição de algumas interleucinas, tais como TNF- α e IL-1 β , em modelos de resposta inflamatória (Wu *et al.*, 2005). Este fato pode explicar, pelo menos em parte as ações inibitórias da CTX observadas na quantificação destas citocinas em monoculturas de macrófagos. No contexto tumoral, a literatura relata a ação inibitória das células tumorais sobre a atividade da lipoxigenase de macrófagos, mecanismo que favorece o desenvolvimento do tumor (Calorini *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2011). Interessantemente, a CTX estimula a geração da LXA₄ e 15-epi-LXA₄, o que pode contribuir para

estabelecimento da capacidade secretória dos macrófagos, importante para a supressão da proliferação e invasão tumoral e angiogênese.



7- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a CTX estimulou a secreção da IL-1 β e a geração da LXA₄ e 15-epi-LXA₄, o que pode contribuir, em conjunto com a liberação de H₂O₂ e a produção de óxido nítrico, para a supressão da proliferação das células tumorais. As ações estimulatórias da CTX sobre esses mediadores são bloqueadas com a utilização do Boc2, sugerindo que os receptores FPRL/ALX, ligantes da LXA₄ e 15-epi-LXA₄ são fundamentais para a ação estimulatória da CTX sobre a atividade secretória de macrófagos, importante para a inibição da proliferação das células tumorais.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D.O. & Hamilton, T.A. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 283-318, 1984.
- Aird Sd, Kaiser Ii, Lewis Rv, Kruggel Wg. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch Biochem Biophys.*, 249 (2):296-300, 1986.
- Alexander, G.; Grothusen, J.; Zepeda, H.; Schwartzman, R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombin-like enzyme. *Toxicon*, 26: 953-60, 1988.
- Amorim, M.F.; Franco De Mello, R.; Saliba, F. Envenenamento botrópico e crotálico. *Mem.Inst.Butantan*,23:108, 1951.
- Auger, M.J. & Ross, J.A. The biology of the macrophage. In *The natural immune system: The macrophage*. Rds. C.E. Lewis & J. O'D. McGee, IRL Press, Oxford, New York, Tokio, pp. 1-57, 1992.
- Azevedo Marques, M.M., Cupo, P., Hering, S.E. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in human causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon*,11: 1163-8, 1987.
- Azevedo-Marques, M.M.; Cupo, P.; Coimbra, T.M.; Hering, S.E.; Rossi, M.A.; Laure, C.J. Myonecrosis myoglobinuria and acute renal failure indice by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, 23: 633-6, 1985.
- Bailey P., and Wilce J. 2001, *Emerg. Med. (Fremantle)*, 13, 28-36.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.*,7(3):211-7, 2005.
- Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J. Immunol.*,180(4): 2011-7, 2008.
- Bon, C.; Bouchier, C.; Choumet, V.; Faure, G.; Jiang, M.S.; Lambezart, M.P.; Radvany, F.; Saliou, B. Crotoxin halfcentury of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. *Acta Physiol. Pharmacol.Latino-Am.*, 39: 439-48, 1989.
- Brazil, V. Do emprego da peçonha em terapêutica. São Paulo: An. Paul. Med. Cir., v.60.398-408 p., 1950.
- Brazil, V. Do emprego da peçonha na terapêutica. São Paulo. 1934.
- Calorini L, Bianchini F, Mannini A, Mugnai G, Ruggieri S. Inhibition of lipoxigenase pathway in macrophages co-cultivated with tumor cells. *Cancer Lett.* 1; 223(1):151-8. 2005.
- Cardoso, D.F. & Mota, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. *Toxicon*, 4: 607-612, 1997.
- Cardoso, D.F.; Lopes-Ferreira, M.; Faquim-Mauro, E.L.; Macedo, M.S.; Farsky, S.H.P. Role of crotoxin, a phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators of inflammation*, 10: 125-33, 2001.
- Cezar-de-Mello, P.F.T.; Vieira, A.M.; Nascimento-Silva, V.; Villela, C.G.; Barja-Fidalgo, C.; Fierro, I.M. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A₄, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *British Journal of Pharmacology* 153, 956-965, 2008.
- Cezar-de-Mello, P.F.T.; Vieira, A.M.; Nascimento-Silva, V.; Villela, C.G.; Barja-Fidalgo, C.; Fierro, I.M. ATL-1, an analogue of aspirin-triggered lipoxin A₄, is a potent inhibitor of several steps in angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. *British Journal of Pharmacology* 153, 956-965, 2008.
- Chiang, N., Arita, M. & Serhan, C.N. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 163-77 (2005).
- Chiang, N.; Serhan, C.N.; Dahlén, S.E.; Drazen, J.M.; Hay, D.W.; Rovati, G.E.; Shimizu, T.; Yokomizo, T.; Brink, C. The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions *in vivo*. *Pharmacol Rev.* 58(3): 463-87, 2006.
- Choumet, V.; Bouchier, C. Delot, E.; Faure, G.; Saliou, B.; Bon, C. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A₂ from the venom of a South-American rattlesnake. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 391: 197-202, 1996.

- Claria J, Lee MH, Serhan CN. Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549) -neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation. *Mol Med.*, 2 (5): 583-96, 1996.
- Clària J. Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.*: 1(3): 369-82, 2006.
- Cohn, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J. Immunol.*, 121: 813-6, 1978.
- Costa ES, Francisco AMSC, Faiad OJ, Cury Y, Sampaio SC. Effect of Crotoxin, the main toxin of the rattlesnake c.d. terrificus venom, on secretory activity of peritoneal macrophages during tumor progression. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* In: 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology; 2010. Official Journal of Word Pharma. 2010;107 Suppl 1: 2729. ISSN: 1742-7835.
- Cupo P, Azevedo-Marques MM, Hering SE. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 82(6):924-9, 1988.
- Cury, Y. and Picolo, G. Animal toxins as analgesics--an overview, *Drug News Perspect*, 19 (7), 381-92, 2006.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1;141(7):2407-12, 1988.
- Dvorak, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 25: 315(26):1650-1659, 1986.
- Faiad, O.J. Efeito da Crotoxina Sobre Função e o Metabolismo de Glicose e Glutamina de Macrófagos Durante a Progressão Tumoral 2012. XX f. Dissertação, (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- Fierro IM. Angiogenesis and lipoxins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*; 73(3-4): 271-5, 2005.
- Fiore, S.; Maddox, J.F.; Perez, H.D.; Serhan, C.N. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J Exp Med.* 1;180(1): 253-60, 1994.
- Fraenkel-Conrat, H. & Singer, B. Fractionation and composition of crotoxin. *Archs Biochem.* 60: 64-73, 1956.
- Friederich, C., and Tu, A.T. Role of metals in snake venoms of hemorrhage, esterase and proteolytic activities. *Biochem. Pharmacol.* 20, 1549-1556, 1971.
- Gopalakrishnakone, P. Dempsster, 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*, 22: 85-98, 1984.
- Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 12: 953-64, 2005.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 1: 23-35, 2003.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 1: 23-35, 2003.
- Gordon, S. Biology of the macrophages. *J. Cell Sci.*, 4: 267-86, 1986.
- Gronert K, Martinsson-Niskanen T, Ravasi S, Chiang N, Serhan CN. Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol.* 158 (1): 3-9, 2001.
- Hao H, Liu M, Wu P, Cai L, Tang K, Yi P, Li Y, Chen Y, Ye D. Lipoxin A4 and its analog suppress hepatocellular carcinoma via remodeling tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 1;309(1): 85-94, 2011.
- Hauptmann, S.; Zwadlo-Klarwasser, G.; Jansen, M.; Klosterhalfen, B.; Kirkpatrick, C.J. Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration. *Am. J. Pathol.* 143(5):1406-15, 1993. Review Article.
- Hayashi, M.A.F., and Camargo, A.C.M. Endogenous inhibitors of the angiotensin-converting enzyme (EVASINs) are present within the natriuretic peptide precursor of the Bothrops jararaca. *Toxicon* 45, 1163-1170, 2005.
- Hayashi, M.A.F., and Kerkis, I. Toxinas como agentes terapêuticos. In: *Bases Moleculares da Biotecnologia*, eds. H Ulrich, W Colli, PL Ho, M Faria, CA Trujillo, Ed. ROCA, pp. 15-36, 2008.
- Hendriks, J.; Riesle, J.; van Blitterswijk, C.A. Co-culture in cartilage tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 1: 170-178, 2007. Review Article.
- Iwanaga, S., and Suzuki, T. Enzymes in snake venoms: In: *Handbook of experimental*

- pharmacology, ed. CY Lee, vol. 52, pp. 61-158, 1979.
- Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2006 Oct;80(4):705-13. Epub 2006 Jul 24. Review.
- Landucci, E.C. et al. Effect of crotoptin and heparin on the rat paw oedema induced by different secretory phospholipases A2. *Toxicon* 38, 199-208 (2000).
- Landucci, E.C. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotoptin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *Br J Pharmacol* 114, 578-83 (1995).
- Lee, C.Y. Snake Venoms: In Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52. Berlin, Springer-Verlag, 1979.
- Levy BD. Lipoxins and lipoxin analogs in asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005 Sep-Oct;73(3-4):231-7. Review.
- Lewis, R. J. and Garcia, M. L. 'Therapeutic potential of venom peptides', *Nat Rev Drug Discov*, 2 (10), 790-802, 2003.
- MaCKANNES et al. 1970. Apud AUGER & ROOS, 1992.
- Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25(12): 677-86, 2004.
- Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 11: 549-55, 2002.
- Markland, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749-1800, 1998.
- McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 6 (2):F189-201, 2004.
- McMahon B, Godson C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 6 (2):F189-201, 2004.
- McMahon B, Stenson C, McPhillips F, Fanning A, Brady HR, Godson C. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J Biol Chem.* 8; 275(36): 27566-75, 2000.
- Metcalf, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 77: 277-80, 1971.
- Metcalf, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 77: 277-80, 1971.
- Metchnikoff, E. 1905. Apud AUGER & ROSS
- Moore, M.A.S.; Metcalf, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br. J. Haematol.*, 18: 279-96, 1970.
- Nahas L, Macfarlane Rg, Denson Kw. A Study of the Coagulant Action of Eight Snake Venoms. *Thromb Diath Haemorrh.* 31; 12:355-67, 1964.
- Nathan, C.F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, 79: 319-26, 1987.
- 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*, 15; 49(8), 1090-8, 2007.
- Nunes FP, Zychar BC, Della-Casa MS, Sampaio SC, Gonçalves LR, Cirillo MC. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon*, 55(6):1100-6, 2010.
- Ohno, M., Ménez, R., Ogawa, T., Danse, J.M., Shimohigashi, Y., Fromen, C., Ducancel, F., Zinn-Justin, S., Le Du, M.H., Boulain, J.C., Tamiya, T., and Ménez, A. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 59, 307-364, 1998.
- Ono, M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 99(8):1501-6, 2008. Review Article.
- Parkinson JF. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: an overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. *Inflamm Allergy. Drug Targets.* 5(2):91-106, 2006. Review.
- Paul-Clark, M.J.; van Ca, T.; Moradi-Bidhendi, N.; Cooper, D.; Gilroy, D.W. 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J. Exp. Med.* 200:69-78, 2004.
- Pick, E.; Keisari, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced

- by cells in culture. *J. Immunol. Methods.*, v.38., n. 1-2., p. 161-170, 1980.
- Pick, E.; Mizel, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods.*, v.46., n.2., p. 211-226, 1981.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 1:71-8, 2004.
- Rosenfeld, G. Symptomatology, Pathology and Treatment of snakes bites in South America. In: *Venomous Animals and Their Venoms*, Bücherl, W and Buckley, E. eds. New York, *Academic Press*, 2.:345-84, 1971.
- Sampaio SC, Alba-Loureiro TC, Brigatte P, Landgraf RG, Dos Santos EC, Curi R, Cury Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon.* 2006 Mar;47(3):313-21.
- Sampaio, S.C.; Alba-Loureiro, T.C.; Brigatte, P.; Landgraf, R.G.; Dos-Santos, E.C.; Curi, R.; Cury, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon.*, 47(3):313-21, 2006.
- Sampaio, S.C.; Brigatte, P.; Sousa-E-Silva, M.C.C.; Dos-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* 41: 899-907, 2003.
- Sampaio, S.C.; Hyslop, S.; Fontes, M.R.; Prado-Franceschi, J.; Zambelli, V.O.; Magro, A.J.; Brigatte, P.; Gutierrez, V.P.; Cury, Y. Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin. *Toxicon.* 1: 55(6), 1045-60, 2010, Review.
- Sampaio, S.C.; Sousa-E-Silva, M.C.C.; Borelli, P.; Curi, R.; Cury, Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J. Leukoc. Biol.* 70: 551-8, 2001.
- Sano-Martins IS, Tomy SC, Campolina D, Dias MB, de Castro SC, de Sousa-e-Silva MC, Amaral CF, Rezende NA, Kamiguti AS, Warrell DA, Theakston RD. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in Brazil, 94(10):551-9, 2001.
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.*, 26 (Epub ahead of print), 2008.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer.* 2006 Apr;42(6):717-27. 2006. Review.
- Sinan: ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2011.
- Slotta, K.H. & Fraenkel-Conrat, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4-Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan*, 12: 505-12, 1938.
- Sousa-E-Silva, M.C.C.; Gonçalves, L.R.C.; Mariano, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediators of Inflammation*, 5:18-23, 1996.
- Stocker, K. Composition of snake venoms. In: Stocker K.F. *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, Boston: CRC, pg. 33-56, 1990.
- Takemura, R. & Werb, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.*, 246: C1-C9, 1984.
- Tanen, D.A., Ruha, A.M., Graeme, K.A., Curry, S.C., and Fischione, M.A. Rattlesnake envenomations: unusual case presentations. *Arch. Intern. Med.* 161, 474 – 479, 2001.
- Tarling, J.D.; Lin, H-S & Hsu, S. Self renewal of pulmonary alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 42: 443-6, 1987.
- Van Furth, R. & Cohn, Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, 128: 415-35, 1968.
- Van Furth, R. & Diesselhoff-Den Dulk, M.M.C. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.*, 132: 813-28, 1970.
- Van Furth, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr. Top. Pathol.*, 79: 125-150, 1989.
- Van Furth, R.; Diesselhoff-Den Dulk, M.M.C. & Mattie, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J. Exp. Med. Med.*, 138: 1314-30, 1973.
- Van Furth, R.; Diesselhoff-Den Dulk, M.M.C.; Raeburn, J.A.; Van Zwet, H.L.; Crofton, R. & Blussé Van

- Oud Alblas, A. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In Mononuclear phagocytes. Functional aspects. Ed. R. van FURTH, Martinus Nijhoff, The Hague, Boston, London, 1980.
- Vital-Brazil, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. *J. Formosan Med. Assoc.*, 71: 394-6, 1972.
- Walter, F.G., Bidlen, E.F., and Gibly, R.L. Envenomations. *Crit. Care Clin.* 5, 353 – 386, 1999.
- Werb, Z.; Hembry, R.M.; Murphy, G. & Aggeler, J. Commitment to expression of metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. *J. Cell Biol.*, 102: 697-702, 1986.
- Whitelaw, D.M. The intravascular lifespan of monocytes. *Blood*, 28: 445-464, 1966.
- Wu SH, Lu C, Dong L, Zhou GP, He ZG, Chen ZQ. Lipoxin A4 inhibits TNF-alpha-induced production of interleukins and proliferation of rat mesangial cells. *Kidney Int.* 68(1): 35-46, 2005.
- Zambelli, V.O. et al. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon* 51, 1357-67, 2008.