

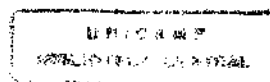
**Rogério Cardoso de Castro**

**MECANISMO DE AÇÃO DE FOSFOLIPASES A<sub>2</sub>  
SECRETADAS NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA AGUDA**

*Dissertação de Mestrado, apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia  
da Faculdade de Ciências Médicas da  
UNICAMP, para obtenção do Título de  
Mestre em Ciências na área de  
Farmacologia.*

**Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes**

**Campinas 1998**



|              |                                                                |
|--------------|----------------------------------------------------------------|
| UNIDADE      | BC                                                             |
| N.º CHAMADA: |                                                                |
| V.           | Ex.                                                            |
| TO-MBO BC/   | 35468                                                          |
| PRUC.        | 395/98                                                         |
| O            | <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> |
| PO CO        | R\$ 11,00                                                      |
| DATA         | 15/10/98                                                       |
| N.º OPD      |                                                                |

CM-00117151-6

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP**

C279m

Castro, Rogério Cardoso de

Mecanismo de ação de fosfolipases A2 secretadas na reação  
inflamatória aguda / Rogério Cardoso de Castro. Campinas,  
SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Edson Antunes

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas.

I. Leucócitos. 2. Inflamação. 3. Fosfolipase. 4. Edema. I.  
Edson Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

---

## Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

---

Orientador: PROF. DR. EDSON ANTUNES

---

### Membros:

1. PROF. DR. EDSON ANTUNES

2. PROFA. DRA. HELOISA SOBREIRO SELISTRE DE ARAUJO

3. PROFA. DRA. SANDRA HELENA POLISELI FARSKY

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 31/07/98

---

*“Vivemos a civilização do conhecimento,  
porém não da sabedoria. A sabedoria é o  
conhecimento temperado pelo juízo”*

**Arnold Toynbee (1889-1975)**

*Dedico este trabalho à minha esposa Ana Carla de Moliner que durante todo esse tempo foi companheira, carinhosa e compreensiva. A minha existência não teria nenhum sentido sem você. Te amo.*

Aos meus pais Luis Carlos de Castro e Maria Lorice Cardoso de Castro e avós Gumerindo de Castro e Deolinda Tibiriçá de Castro que não se contentaram em me fornecer apenas amor, carinho e compreensão. Fizeram o possível e o impossível para realizarem meu sonho de estudar. Ao meu irmão Gustavo Cardoso de Castro pela felicidade na infância e juventude.

## **À MINHA FILHA HANNAH**

*Hannah, estás me ouvindo? Onde te encontres, levanta os olhos! Vês, Hannah? O sol vai rompendo as nuvens que se dispersam! Estamos saindo das trevas para a luz! Vamos entrando num mundo novo - um mundo melhor, em que os homens estarão acima da cobiça, do ódio e da brutalidade. Ergue os olhos, Hannah! A alma do homem ganhou asas e afinal começa a voar. Voa para o arco-íris, para a luz da esperança. Ergue os olhos, Hannah! Ergue os olhos!*

**Charles Chaplin (1988-1977)**

Em meados deste século, Charles Chaplin sonhava tanto com um mundo melhor que chegava até a prometer-lo à sua mãe. Hoje, na entrada do século XXI, também gostaria de prometer-lo à minha filha Hannah. No entanto, mesmo com o alerta de grandes pensadores como Chaplin, a humanidade preferiu o caminho da cobiça, do ódio e da brutalidade. Um mundo melhor não posso prometer, mas ensinar minha filha que a esperança só morrerá junto com a humanidade é o meu dever.

*O meio socialista foi abolido mas o desejo de se chegar a um fim socialmente mais justo permanecerá enquanto houver humanidade.*

**Rogério Cardoso de Castro**

## AGRADECIMENTOS

### “A DEUS, OBRIGADO POR TUDO QUE O SENHOR ME CONCEDEU NESTA VIDA”

A epígrafe do início representa minha filosofia de vida. Mas, além disso, representa uma sincera homenagem ao meu orientador prof. Dr. Edson Antunes. Acima de seu grande conhecimento científico, de sua grande capacidade e honestidade, está sua sabedoria. Te considero um grande sábio por conseguir manter sua humildade mesmo com todo seu conhecimento. Obrigado por tudo que me ensinastes com competência, carinho, paciência e educação.

À Elen Cristina T. Landucci que não se contentou em ser apenas minha co-orientadora e preferiu se comportar como uma verdadeira mãe. A você, que me presenteou com este sentimento tão nobre, só me resta agradecer com um muito obrigado tão sincero quanto o amor de um filho pela sua mãe.

Ao Dr. Gilberto de Nucci que, entre outras coisas, me permitiu a maravilhosa experiência de conhecer um laboratório no exterior. Não há como expressar o tamanho de minha gratidão e de meu respeito por você.

À minha tia Maria Laudénir Cardoso Soares de Oliveira (Lau) que é uma das maiores responsáveis pelas minhas conquistas. Sem dúvida você representa a luz que Deus colocou em meu caminho. Ao meu avô José Luis Cardoso (*in memoriam*) e à minha avó Olinda Teixeira Cardoso.

À Soraia Katia Pereira Costa pela forte amizade e incondicional (fundamental) ajuda em Londres. Aprendi muito com você. Admiro profundamente suas conquistas. Às grandes amigas Marta Valéria Medeiros e Sisi Marcondes que sempre se dispuseram a me prestar qualquer tipo de ajuda. Sou eternamente grato à vocês.

Às amigas Heloisa H. A. Ferreira e Renata Zanardo pela ajuda na realização da técnica de migração celular *in vitro*.

Ao Dr. Mauro Perreti e seus alunos pela forma carinhosa e gentil com a qual me receberam em vosso laboratório no William Harvey Research Institute (Londres).

Aos meus grandes amigos André Gonzaga dos Santos, José Lídio Alves dos Santos, Marcelo Alves Paulino e Marcos Roberto da Cruz Pires. Além das ajudas incondicionais, aprendi muito com vocês.

Aos amigos Aldete, Alice, Ana Maria, Angelina, Anicleto, Cláudia, Cléber, Donato, Edmar, Flávio, Herick, Iramaia, José Eduardo, Leonardo, Lúcia, Luciana Bizeto, Luciana Nathan, Marcelo, Maura, Nicola, Pamela, Renato, Renata Pereira, Rita, Ronilson, Simone, Sócrates, Sônia, Toninho, Veridiana, Wellington e Wladimir pela colaboração na parte técnica e, principalmente, pela grande amizade.

Aos docentes da farmacologia da FCM e, em especial, aos Drs. Heitor Moreno Jr. e Stephen Hyslop pela amizade e ajuda técnica.

Aos funcionários Aguinaldo, Alessandra, Rita, Gislaine, Evandro, Miguel, Adilson e, especialmente, à Maria das Dores Ponciano e ao Paulo Sérgio de Oliveira pela ajuda nos momentos de necessidades.

Ao saudoso Dr. Carlos Alberto Flores (*in memoriam*). Te conhecer foi um grande privilégio. Não esquecerei de seu pensamento científico jamais.

Aos professores Dr. José R. Giglio (Depto. de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP) e Dr. Benedito Oliveira (Depto. de Bioquímica do Instituto de Biologia, UNICAMP) e ao doutorando Marcos H. Toyama pelo fornecimento das bothropstoxinas e da piratoxina-I utilizadas neste trabalho.

Aos animais que involuntariamente doaram suas vidas para o benefício da humanidade, o meu profundo respeito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

|                                                                       |      |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| LISTA DE ABREVIACÕES                                                  | xi   |
| ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS                                          | xii  |
| LISTA DE MATERIAIS                                                    | xiii |
| RESUMO                                                                | xiv  |
| 1. INTRODUÇÃO                                                         |      |
| 1.1 Considerações Gerais                                              | 1    |
| 1.2 Fosfolipases A <sub>2</sub> (PLA <sub>2</sub> s)                  | 2    |
| 1.3 Fosfolipases A <sub>2</sub> secretadas e o processo inflamatório  | 5    |
| 1.4 Objetivo                                                          | 10   |
| 2. MÉTODOS                                                            |      |
| 2.1 Animais                                                           | 11   |
| 2.2 Edema de pata                                                     | 11   |
| 2.3 Edema de pele                                                     | 11   |
| 2.4 Pleurisia                                                         | 12   |
| 2.5 Depleção dos estoques de histamina e 5-HT                         | 13   |
| 2.6 Degranulação de mastócitos                                        | 13   |
| 2.7 Purificação da BthTX-I e da BthTX-II                              | 14   |
| 2.8 Purificação da PrTX-I                                             | 14   |
| 2.9 Tratamento das BthTXs e PrTX-I com $\rho$ -BPB                    | 15   |
| 2.10 Tratamentos                                                      | 16   |
| 2.11 Análise estatística                                              | 16   |
| 3. RESULTADOS                                                         |      |
| 3.1 Edema de pata e pele                                              | 17   |
| 3.2 Degranulação <i>in vitro</i> de mastócitos pleurais e peritoneais | 21   |
| 3.3 Pleurisia                                                         | 25   |
| 4. DISCUSSÃO                                                          | 42   |
| 5. SUMMARY                                                            | 49   |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                         | 51   |

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

|           |    |
|-----------|----|
| FIGURA 1  | 18 |
| FIGURA 2  | 19 |
| FIGURA 3  | 20 |
| FIGURA 4  | 22 |
| FIGURA 5  | 23 |
| FIGURA 6  | 24 |
| FIGURA 7  | 26 |
| FIGURA 8  | 27 |
| FIGURA 9  | 28 |
| FIGURA 10 | 29 |
| FIGURA 11 | 31 |
| FIGURA 12 | 32 |
| FIGURA 13 | 33 |
| FIGURA 14 | 34 |
| FIGURA 15 | 35 |
| FIGURA 16 | 36 |
| TABELA 1  | 37 |
| TABELA 2  | 38 |
| TABELA 3  | 40 |
| TABELA 4  | 41 |

## LISTA DE ABREVIÇÕES

|                         |                                                       |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|
| $\rho$ -BPB             | Brometo de $\rho$ -bromofenacil                       |
| [ $^{14}\text{C}$ ]5-HT | Serotonina marcada                                    |
| 5-HT                    | Serotonina                                            |
| AA                      | Ácido araquidônico                                    |
| AUC                     | Área sobre a curva                                    |
| BSA                     | Soro albumina bovina                                  |
| BthTX-I                 | Bothropstoxina-I                                      |
| BthTX-II                | Bothropstoxina-II                                     |
| CGRP                    | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina           |
| EDTA                    | Ácido etileno diamino tetra-acético                   |
| i.p.                    | Intraperitoneal                                       |
| KRP                     | Tampão Krebs-Ringer fosfatado                         |
| LTB <sub>4</sub>        | Leucotrieno B <sub>4</sub>                            |
| LBC <sub>4</sub>        | Leucotrieno C <sub>4</sub>                            |
| PAF                     | Fator de ativação plaquetária                         |
| PBS                     | Tampão salina fosfato                                 |
| PGE <sub>2</sub>        | Prostaglandina E <sub>2</sub>                         |
| PLA <sub>2</sub> s      | Fosfolipases A <sub>2</sub>                           |
| cPLA <sub>2</sub>       | Fosfolipase A <sub>2</sub> citosólica ou intracelular |
| sPLA <sub>2</sub>       | Fosfolipase A <sub>2</sub> secretada ou extracelular  |
| rPLA <sub>2</sub>       | Fosfolipase A <sub>2</sub> recombinante do grupo II   |
| POPOP                   | 1,4-Di-2-4-metil(5-feniloxazole)-benzeno              |
| PPO                     | 2,5-Difenil-oxazole                                   |
| PrTX-I                  | Piratoxina-I                                          |
| TNF                     | Fator de Necrose Tumoral                              |
| TRIS                    | Hidroxi-metil-amino-metano                            |
| TxB <sub>2</sub>        | Tromboxano B <sub>2</sub>                             |

## ABREVIÇÕES PARA AMINOÁCIDOS

| AMINOÁCIDOS     | ABREVIÇÃO <sup>a</sup><br>(3 letras) | SÍMBOLO <sup>a</sup><br>(1 letra) |
|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| ÁCIDO ASPÁRTICO | Asp                                  | D                                 |
| ÁCIDO GLUTÂMICO | Glu                                  | E                                 |
| ALANINA         | Ala                                  | A                                 |
| ARGININA        | Arg                                  | R                                 |
| ASPARAGINA      | Asn                                  | N                                 |
| CISTEÍNA        | Cys                                  | C                                 |
| FENILALANINA    | Phe                                  | F                                 |
| GLICINA         | Gly                                  | G                                 |
| GLUTAMINA       | Gln                                  | Q                                 |
| HISTIDINA       | His                                  | H                                 |
| ISOLEUCINA      | Ile                                  | I                                 |
| LEUCINA         | Leu                                  | L                                 |
| LISINA          | Lys                                  | K                                 |
| METIONINA       | Met                                  | M                                 |
| PROLINA         | Pro                                  | P                                 |
| SERINA          | Ser                                  | S                                 |
| TIROSINA        | Tyr                                  | Y                                 |
| TREONINA        | Thr                                  | T                                 |
| TRIPTOFANO      | Trp                                  | W                                 |
| VALINA          | Val                                  | V                                 |

<sup>a</sup> Segundo nomenclatura IUPAC

## LISTA DE MATERIAIS

| <b>SUBSTÂNCIA</b>                              | <b>PROCEDÊNCIA</b>              |
|------------------------------------------------|---------------------------------|
| Albumina                                       | Pharmacia (Uppsala, Suécia)     |
| Azul de Evans                                  | Merck (Darmstadt, Alemanha)     |
| Brometo de <i>p</i> -bromofenacil              | Sigma (St. Louis, EUA)          |
| Carbonato de sódio                             | Merck (Rio de Janeiro, Brasil)  |
| Ciproheptadina                                 | Sigma (St. Louis, EUA)          |
| Cloreto de potássio                            | Merck (Rio de Janeiro, Brasil)  |
| Cloreto de sódio                               | Merck (Rio de Janeiro, Brasil)  |
| Composto 48/80                                 | Sigma (St. Louis, EUA)          |
| Éter etílico                                   | Chemco (Campinas, Brasil)       |
| Heparina sódica                                | Roche (São Paulo, Brasil)       |
| May Grünwald                                   | Diff-Quick (Baxter, EUA)        |
| PLA <sub>2</sub> do veneno de <i>Naja naja</i> | Sigma (St. Louis, EUA)          |
| PLA <sub>2</sub> pancreática bovina            | Sigma (St. Louis, EUA)          |
| POPOP                                          | Sigma (St. Louis, EUA)          |
| PPO                                            | Sigma (St. Louis, EUA)          |
| Sagatal                                        | Rhône Mérieux (Dublin, Irlanda) |
| Sais para tampão                               | Merck (Rio de Janeiro, Brasil)  |
| Serotonina marcada <sup>14</sup> C             | Amersham (U.K.)                 |
| Soro albumina marcada I <sup>125</sup>         | Amersham (U.K.)                 |

## RESUMO

Bothropstoxina-I (BthTX-I) e Bothropstoxina-II (BthTX-II) são sPLA<sub>2</sub>s homólogas com atividade miotóxica isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu*. A primeira é completamente destituída de atividade enzimática *in vitro* ao passo que a BthTX-II apresenta atividade fosfolipásica muito baixa. Piratoxina-I (PrTX-I) é uma sPLA<sub>2</sub> homóloga com atividade miotóxica isolada do veneno de *Bothrops pirajai*. Esta sPLA<sub>2</sub> também é destituída de atividade enzimática. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade edematogênica da PrTX-I em pata e pele de ratos. Também avaliamos a participação do sítio catalítico e do conteúdo de cargas catiônicas presentes nesta sPLA<sub>2</sub> sobre o aumento de permeabilidade vascular. Em uma segunda etapa, o objetivo foi investigar a capacidade da PrTX-I, BthTX-I e BthTX-II de induzir migração leucocitária comparado com a sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* (atividade enzimática alta) e sPLA<sub>2</sub> pancreática (atividade enzimática intermediária). O envolvimento de mastócitos na migração leucocitária induzida pelas sPLA<sub>2</sub> homólogas também foi investigado.

O edema de pata foi induzido pela injeção subplantar da PrTX-I na pata posterior esquerda dos animais e o volume da pata foi determinado utilizando um hidropletismômetro. O edema de pele foi determinado pelo acúmulo local de albumina humana marcada com <sup>125</sup>I administrada por via intravenosa em ratos anestesiados (Sagatal; 30 mg/kg, i.p.). A degranulação de mastócitos pleurais e peritoneais foi conduzida pela determinação da liberação de [<sup>14</sup>C]5-HT utilizando um contador β.

A migração leucocitária foi determinada através da injeção das sPLA<sub>2</sub>s na cavidade pleural de ratos anestesiados com éter. Os animais foram sacrificados nos intervalos de 6, 12 e 48 h e a cavidade pleural foi lavada com 5 ml de PBS heparinizado (10 UI/ml). A contagem total e diferencial de leucócitos foi avaliada no lavado pleural.

A PrTX-I promoveu aumento de permeabilidade vascular em pele e pata de rato levando à formação de edema. A atividade edematogênica nos dois locais foi praticamente abolida nos animais pré-tratados com ciproheptadina (2 mg/kg, i.p. 0.5 h antes). O ρ-BPB reduziu acentuadamente o edema induzido pela PrTX-I em pata e pele de ratos. O poliânion heparina reduziu significativamente o edema de pata (50 UI/pata), como também o edema de pele (5 UI/sítio) induzidos pela PrTX-I. Além disso, a PrTX-I (100 µg/ml) causou degranulação de mastócitos pleurais e peritoneais *in vitro*. O ρ-BPB e a heparina (50 UI/ml) inibiram significativamente a liberação de [<sup>14</sup>C]5-HT induzida pela PrTX-I em mastócitos pleurais e peritoneais de rato.

Nossos resultados indicam que a formação de edema induzido pela PrTX-I é devido à degranulação *in vivo* de mastócitos. Uma vez que a PrTX-I não é ativa enzimaticamente sugerimos que a atividade pró-inflamatória das sPLA<sub>2</sub>s não está, necessariamente, ligada à atividade enzimática destas enzimas. Assim, sugerimos que o efeito da PrTX-I deva ser decorrente de um possível sítio farmacológico que seria formado principalmente por cargas catiônicas distribuídas na molécula da PrTX-I. Além disso, nós sugerimos cautela quanto ao uso do brometo de  $\rho$ -bromofenacil como ferramenta para avaliar o papel da atividade enzimática nos efeitos farmacológicos induzidos pelas sPLA<sub>2</sub>s.

A sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* (10  $\mu$ g/cavidade) e BthTX-II (30  $\mu$ g/cavidade) induziram influxo leucocitário de forma dose e tempo-dependentes caracterizado pela infiltração de neutrófilos e células mononucleares em 6 h. Na pleurisia induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* esta migração foi acompanhada por uma migração de eosinófilos em 12 h. Na pleurisia induzida pela BthTX-I e PrTX-I (30  $\mu$ g/cavidade cada) o pico de infiltração celular foi em 12 h e formado, tanto por células mononucleares e neutrófilos, como também por eosinófilos. O brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB), um inibidor enzimático das sPLA<sub>2</sub>s, aboliu a atividade enzimática da sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* e BthTX-II mas não apresentou efeito na pleurisia induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja*, BthTX-I e BthTX-II. Surpreendentemente, o  $\rho$ -BPB reduziu parcialmente a pleurisia induzida pela PrTX-I. O tratamento prévio dos animais com ciproheptadina (10 mg/Kg, i.p.) não modificou a pleurisia induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* e BthTX-II. A depleção dos estoques de histamina/5-HT por injeções repetidas do composto 48/80 também não alterou a pleurisia induzida pelas BthTXs e PrTX-I. Nossos resultados demonstram que a migração leucocitária induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja*, BthTX-I, BthTX-II e PrTX-I independe da degranulação de mastócitos pleurais. Além disso, a hidrólise de fosfolídeos por estas sPLA<sub>2</sub>s não é essencial para a infiltração leucocitária para cavidade pleural.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O processo inflamatório representa a resposta do organismo a estímulos lesivos. A característica fundamental do processo inflamatório é manifestar-se de maneira estereotipada, isto é, a resposta obedece a um padrão semelhante independente da natureza do estímulo lesivo. Variações podem ocorrer dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou órgão afetados, da espécie animal e da coexistência de estados patológicos (Garcia-Leme, 1989).

Uma variedade de substâncias, denominadas de mediadores da inflamação, é formada e liberada concomitante ou sequencialmente no local da lesão. Estes mediadores originam-se a partir do plasma ou de uma variedade de tipos celulares tais como células endoteliais, mastócitos, macrófagos e leucócitos. Os mediadores de origem plasmática incluem fatores do sistema complemento (C3a, C5a) e cininas, os quais são gerados por ativação enzimática. Os mediadores de origem celular incluem a histamina e serotonina (oriundos de mastócitos e basófilos), prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos (originados da cascata do ácido araquidônico em vários tipos celulares), fator de agregação plaquetária (células endoteliais, leucócitos, etc), citocinas (TNF e diversas interleucinas oriundas principalmente de leucócitos mononucleares), substância P e CGRP (neuropeptídeos liberados de terminações nervosas não-adrenérgicas não-colinérgicas no sítio inflamatório) e óxido nítrico (oriundo de diversas fontes incluindo endotélio, leucócitos e terminação nervosas não-adrenérgicas não-colinérgicas).

Imediatamente após o início do processo inflamatório, ocorrem eventos de origem vascular caracterizados por aumento de fluxo sanguíneo na área lesada (eritema ou rubor) causando, conseqüentemente, elevação da temperatura local (calor). O aumento da permeabilidade em vênulas pós-capilares ocasiona o extravasamento de proteínas para o espaço intersticial o qual, somado ao aumento da pressão hidrostática de filtração (devido à vasodilatação) e pressão osmótica intersticial (devido ao acúmulo de proteínas) leva à formação de edema (tumor).

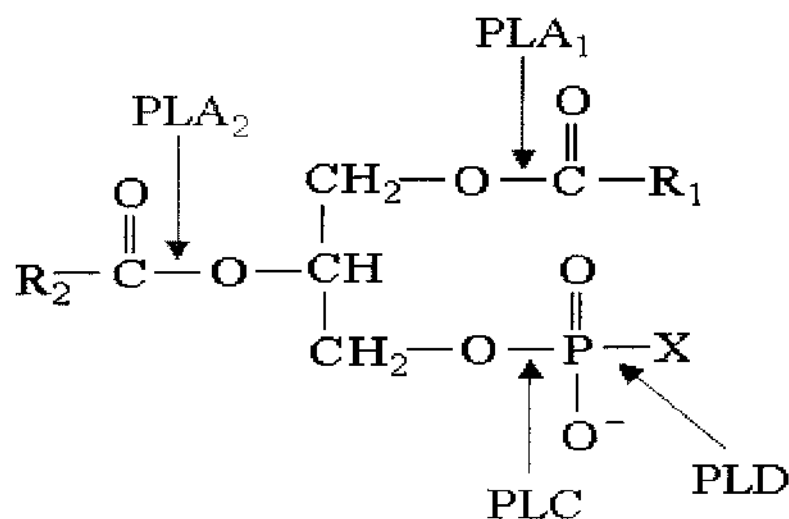
Ao lado dos eventos vasculares, os fenômenos celulares da reação inflamatória são muito importantes, uma vez que representam os principais mecanismos pelos quais o organismo "neutraliza" os agentes lesivos e repara o tecido danificado. As células envolvidas nesta resposta são as chamadas células residentes (células endoteliais, mastócitos, células mononucleares residentes) e

células que chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos).

Deve-se ressaltar, ainda, que em um processo inflamatório ocorrem, concomitantemente, eventos que se contrapõem aos efeitos da inflamação. São mecanismos que ocorrem no sentido de impedir a evolução da resposta inflamatória. O sistema mais conhecido de supressão da reação inflamatória é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que, uma vez ocorrido, leva à liberação de glicocorticóides do córtex das glândulas adrenais. Os glicocorticóides possuem efeitos imunossupressores e antiinflamatórios e, indiretamente, inibem a fosfolipase A<sub>2</sub>.

## 1.2. FOSFOLIPASES A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s)

As fosfolipases são enzimas que catalisam a hidrólise, em quatro diferentes posições, dos fosfoglicerídeos (lipídeos formados pela esterificação de dois ácidos graxos na primeira e segunda hidroxila do glicerol e de um grupamento fosfórico na terceira hidroxila), conforme mostra a figura abaixo:



R<sub>1</sub> - Ácidos graxos saturados (principalmente C<sub>16</sub> e C<sub>18</sub>)

R<sub>2</sub> - Predominantemente ácidos graxos insaturados (principalmente C<sub>20,4</sub>)

X - Grupo cabeça polar (colina, etanolamina serina ou inositol)

Dependendo da posição da hidrólise, as fosfolipases recebem diferentes designações. As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s; fosfatidil-acil-hidrolases; EC 3.1.1.4) atuam na posição sn-2 da ligação acil-

éster de 3-sn-fosfoglicerídeos gerando, como produtos desta hidrólise, quantidades equimolares de um ácido graxo e de um monoacilfosfatidil (lisofosfatidil).

A existência das PLA<sub>2</sub>s foi demonstrada no início do século quando se observou que a incubação de fosfatidilcolina com suco pancreático de mamíferos ou com venenos de cobra resultava na formação de ácidos graxos (Wittcoff, 1951). A partir de então, a atividade enzimática de PLA<sub>2</sub>s vem sendo descrita na maioria dos venenos ofídicos (Yang, 1994). Estas PLA<sub>2</sub>s apresentam alta homologia sequencial e estrutural e estão evolutivamente relacionadas (Davidson & Dennis, 1990). São enzimas de baixo peso molecular (14 a 18 kDa), sendo divididas em três grandes grupos (I, II e III) baseado na sequência de aminoácidos que possuem (Heinrikson *et al.*, 1977; Davidson & Dennis, 1990). O grupo I compreende as PLA<sub>2</sub>s de pâncreas de mamíferos e dos venenos de cobras das famílias *Elapidae* e *Hydrophidae*. O grupo II compreende as PLA<sub>2</sub>s dos venenos de *Crotalidae* e *Viperidae*. O grupo III é representado pelas PLA<sub>2</sub>s provenientes dos venenos de vespas e abelhas. Todas essas enzimas são dependentes de cálcio para sua ativação. Os resíduos que participam da alça de ligação para os íons Ca<sup>++</sup> nas PLA<sub>2</sub>s clássicas são Tyr-28, Gly-30, Gly 32 e Asp-49. A unidade catalítica é formada por His-48, Asp-99 e uma molécula de água (Renetseder *et al.*, 1985; Scott *et al.*, 1990).

As PLA<sub>2</sub>s de venenos e de pâncreas de mamíferos passaram a ser denominadas de PLA<sub>2</sub>s secretadas (sPLA<sub>2</sub>s) porque, a partir de 1934, observou-se a existência de PLA<sub>2</sub> em outros tecidos de mamíferos, além do pâncreas. Estas PLA<sub>2</sub>s foram identificadas como PLA<sub>2</sub> intracelulares as quais, na maioria da vezes, estão associadas às membranas plasmáticas ou membranas de organelas citoplasmáticas (Van Den Bosch, 1980). Mais tarde, a maioria destas PLA<sub>2</sub>s intracelulares foram caracterizadas como enzimas de alto peso molecular (Glaser *et al.*, 1993). Estas PLA<sub>2</sub>s, atualmente conhecidas como PLA<sub>2</sub>s citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), diferem das sPLA<sub>2</sub>s não só pelo peso molecular como também pelos sítios de ação, pelo requerimento de Ca<sup>++</sup> (atividade máxima em doses micromolares de Ca<sup>++</sup>) e pela especificidade por fosfoglicerídeos que possuem o ácido araquidônico em sua posição sn-2 (Glaser *et al.*, 1993). Algumas cPLA<sub>2</sub>s mostraram-se independentes de Ca<sup>++</sup>, mas também específicas pelo ácido araquidônico na posição sn-2 dos fosfoglicerídeos (Hazen *et al.*, 1990).

Desde a década de 80, uma outra PLA<sub>2</sub> extracelular vem sendo identificada em doenças inflamatórias humanas incluindo a artrite reumatóide (Pruzanski *et al.*, 1985), psoríase (Foster *et al.*, 1985), choque séptico causado por bactérias gram-negativas (Vadas *et al.*, 1988), pancreatite aguda (Formela *et al.*, 1995) e outros. Esta PLA<sub>2</sub> foi denominada PLA<sub>2</sub> secretada não-pancreática e incluída no grupo II devido às suas propriedades bioquímicas. O gene desta enzima já foi descrito (Seilhamer *et al.*, 1989) e sua forma recombinante desenvolvida (Kramer *et al.*, 1989). Tem sido

demonstrado que a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) induzem a expressão desta forma da sPLA<sub>2</sub>. Vários elementos como plaquetas (Kramer *et al.*, 1989), leucócitos (Marshall & Roshak, 1993) e condrócitos (Lyons-Giordano *et al.*, 1989) foram identificados como fontes desta enzima.

Atualmente, todas as PLA<sub>2</sub>s são classificadas em quatro diferentes grupos, conforme mostra a tabela abaixo (Dennis *et al.*, 1994). Os grupos I, II e III são os tradicionais grupos das PLA<sub>2</sub>s secretadas e o grupo IV inclui a PLA<sub>2</sub> de alto peso molecular, a cPLA<sub>2</sub>. Além disso, um quinto grupo está sendo proposto para incluir as cPLA<sub>2</sub>s que não requerem Ca<sup>++</sup> para sua atividade.

| Grupo     | Fonte                                                                           | Localização | Tamanho (kDa) | Ca <sup>2+</sup> |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------|---------------|------------------|
| Grupo I   | Pâncreas de mamíferos e veneno de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae | Secretada   | 13-15         | mM               |
| Grupo II  | Não-pancreática humana, veneno de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae | Secretada   | 13-15         | mM               |
| Grupo III | Veneno de abelhas e vespas                                                      | Secretada   | 16-18         | mM               |
| Grupo IV  | Células de mamíferos                                                            | Citosólica  | 85            | $\mu$ M          |
| Grupo V   | Células miocárdicas humanas e caninas                                           | Citosólica  | 40            | Não requer       |

No grupo II, particularmente, encontram-se as sPLA<sub>2</sub>s denominadas miotoxinas. Estas sPLA<sub>2</sub>s são enzimas com atividade miotóxica purificadas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Algumas miotoxinas são desprovidas de atividade enzimática devido à substituição do Asp-49 presente na região da molécula responsável pela ligação ao Ca<sup>++</sup>. Nesta posição, estas sPLA<sub>2</sub>s apresentam um resíduo de Lys e, assim, são denominadas de sPLA<sub>2</sub>s Lys-49 (Gutiérrez & Lomonte, 1995).

### 1.3. FOSFOLIPASES A<sub>2</sub> SECRETADAS E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

As observações, na década de 70, de que o ácido araquidônico é encontrado predominantemente esterificado na posição sn-2 de fosfolípidos levaram a um estudo sistemático destas enzimas, uma vez que as mesmas são fundamentais para mobilização deste ácido graxo e a consequente biossíntese de mediadores lipídicos pró-inflamatórios por ação da ciclooxigenase, da 5-lipoxigenase e das enzimas que levam à formação do PAF (Flower & Blackwell, 1976).

A capacidade das sPLA<sub>2</sub>s causarem inflamação foi primeiramente demonstrada quando observou-se que sPLA<sub>2</sub>s ofídicas provocavam edema de pata de rato (Brain *et al.*, 1977) e degranulação de mastócitos *in vivo* (Damerau *et al.*, 1975). Estudos posteriores propuseram que o edema induzido por estas sPLA<sub>2</sub>s não dependia somente da ação da histamina e serotonina, mas também de prostaglandinas e cininas. A ação conjunta de todos esses autacóides na microcirculação local seria a causa da formação de edema (Ohsaka *et al.*, 1979; Bonta *et al.*, 1979).

Contudo, os estudos dos efeitos pró-inflamatórios destas enzimas foram impulsionados somente a partir de 1985 quando descreveu-se a forma humana extracelular não-pancreática em fluidos de articulações artríticas (Vadas *et al.*, 1985). Desde então, muitos estudos têm sido realizados com a finalidade de elucidar o papel da sPLA<sub>2</sub> na inflamação através do uso das sPLA<sub>2</sub>s purificadas de pâncreas de mamíferos ou de venenos de serpentes (Pruzanski *et al.*, 1986; Cirino *et al.*, 1989; Vadas *et al.*, 1989; Moreno *et al.*, 1992).

Em 1987, Vishwanath *et al.* demonstraram a preocupação de estabelecer se a atividade pró-inflamatória destas enzimas era ou não decorrente da atividade catalítica das mesmas. Assim, estes autores estudaram o edema de pata e degranulação de mastócitos induzidos por três sPLA<sub>2</sub>s purificadas do veneno de Habu (*Trimeresurus flavoviridis*). Para tanto, usaram o ácido aristolóquico, alcalóide de origem vegetal capaz de inibir a atividade catalítica das sPLA<sub>2</sub>s. Os resultados mostraram que, apesar deste alcalóide inibir a atividade catalítica *in vitro* das três PLA<sub>2</sub>, a inibição do edema de pata de camandungos foi verificada somente com uma delas. Dessa forma, estes autores foram os primeiros a sugerir a existência de dois sítios distintos nestas enzimas sendo um responsável pela atividade catalítica e outro pelas atividades farmacológicas, independentes de ação enzimática. Apesar disto, estes mesmos autores demonstraram mais tarde que o edema de pata induzido pela sPLA<sub>2</sub> purificada de fluido sinovial humano é totalmente devido à sua atividade catalítica (Vishwanath *et al.*, 1988).

Em 1989, Cirino *et al.* estudaram o edema de pata de rato causado por sPLA<sub>2</sub>s purificadas dos venenos de *Naja mocambique mocambique*, *Vipera russeli*, *Apis mellifera* e sPLA<sub>2</sub> pancreática porcina. A atividade edematogênica destas enzimas foi caracterizada como sendo de início rápido

(aproximadamente 5 minutos) atingindo-se a resposta máxima em 90 minutos. As sPLA<sub>2</sub>s purificadas dos venenos foram mais potentes do que a pancreática porcina o que poderia refletir as propriedades líticas dessas enzimas, ou seja, a sPLA<sub>2</sub> pancreática porcina apresenta baixa atividade catalítica e, por isso, pequena atividade edematogênica em relação às outras três. Por outro lado, os autores demonstraram que, apesar de não ser a mais ativa enzimaticamente, a sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja mocambique mocambique* apresentou a maior atividade edematogênica. Foi também observado que o tratamento dessas enzimas com o brometo de  $\rho$ -bromofenacil (inibidor do sítio ativo de sPLA<sub>2</sub>) inibiu somente o edema induzido pela PLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja macambique mocambique*. No edema induzido por esta sPLA<sub>2</sub>, em particular, os autores testaram drogas tais como a metisergida (antagonista de receptores de serotonina), mepiramina (antagonista do receptor H<sub>1</sub> da histamina), BW755C (inibidor duplo de ciclo e lipoxigenase), indometacina (inibidor da ciclooxigenase), dexametasona (inibidor da PLA<sub>2</sub>), BN52021 e WEB2086 (antagonistas de receptores do PAF). Destas drogas, somente a metisergida e a dexametasona foram capazes de inibir significativamente o edema. Assim, concluíram que, neste caso, o edema dependente da ação da serotonina proveniente da degranulação de mastócitos à semelhança de outras sPLA<sub>2</sub>s. Estes resultados estão também de acordo com aqueles obtidos por Moreno *et al.* (1992) que demonstraram que o edema de pele em ratos induzido pela sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* em ratos é dependente dos mediadores liberados de mastócitos o qual é, por sua vez, dependente da atividade enzimática desta enzima.

Lloret *et al.* (1993) concluíram que a atividade edematogênica das sPLA<sub>2</sub>s está ligada à sua atividade enzimática. Tal conclusão está baseada em um estudo onde estes autores empregaram quatro diferentes sPLA<sub>2</sub>s e demonstraram que a que PLA<sub>2</sub> que apresentou maior potência edematogênica é a sPLA<sub>2</sub> mais ativa enzimaticamente.

Na tentativa de explicar os resultados contraditórios em relação às atividades farmacológicas e enzimáticas das sPLA<sub>2</sub>s purificadas de veneno, Kini & Evans (1989) formularam um modelo hipotético para descrever os efeitos farmacológicos induzidos por sPLA<sub>2</sub>s de venenos. O primeiro ponto, que serve de suporte para este modelo, é o fato que, a despeito da alta homologia estrutural destas enzimas, a variedade de efeitos farmacológicos apresentados pelas mesmas em animais de laboratório, é muito grande. Um segundo aspecto é que muitos desses efeitos tais como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, mionecrose, hipotensão, indução de edema e outros, não se correlacionam com atividade catalítica dessas sPLA<sub>2</sub>s. A característica essencial do modelo é a possível existência de sítios alvos (“receptores”) para diferentes sPLA<sub>2</sub>s. Estes “receptores” seriam proteínas (ou glicoproteínas) localizadas em alguns tecidos ou células (na superfície celular) os quais “reconheceriam” um sítio farmacológico específico localizado na estrutura das moléculas das sPLA<sub>2</sub>s. Este “reconhecimento” ocorre de acordo com a distribuição e conformação espacial da

densidade de cargas e da hidrofobicidade, o que determinaria a ligação de uma sPLA<sub>2</sub> com uma célula alvo específica. Somente após esta ligação específica, a sPLA<sub>2</sub> poderia ou não hidrolisar fosfolípídeos “vizinhos” ao sítio alvo. Ressalta-se também a diferença de afinidade que estas sPLA<sub>2</sub>s apresentam em relação à hidrólise de fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol. Os produtos da hidrólise destas enzimas (lisofosfolípídeos e ácidos graxos) poderiam ou não participar dos efeitos farmacológicos destas enzimas. De fato, Lambeau *et al.* (1989) foram os primeiros autores a demonstrar a existência de um sítio específico para sPLA<sub>2</sub>s ofídicas em membrana neuronal de cérebro de rato. Demonstraram que este sítio é uma proteína (receptor) capaz de se ligar à diferentes sPLA<sub>2</sub>s neurotóxicas entre elas a taipoxina, notexina, crotoxina (componente B) e uma sPLA<sub>2</sub> purificada do veneno de *Oxyuranus scutellatus* (OS<sub>2</sub>). De acordo com o modelo proposto por Kini & Evans, não houve correlação entre a atividade enzimática e a pontência de ligação ao receptor, apenas entre neurotoxicidade e ligação ao receptor. Posteriormente foi demonstrada a existência de outros sítios de ligação para sPLA<sub>2</sub>s em diferentes tecidos (Lambeau *et al.*, 1990; 1991a ; 1991b). Atualmente, o gene para o receptor da sPLA<sub>2</sub> em humanos já foi identificado (Ancian *et al.*, 1995). Este receptor é uma proteína de 180 KDa com uma região N-terminal extracelular, oito domínios repetidos de reconhecimento de carboidratos, uma porção transmembrana e outra região C-terminal intracelular e possui maior afinidade pela sPLA<sub>2</sub> humana do grupo II. Por outro lado, paralelamente a estes estudos, alguns autores vêm sugerindo a participação da sPLA<sub>2</sub> pancreática em processos fisiológicos tais como contração de músculo liso vascular (Nakajima *et al.*, 1992) e proliferação celular (Arita *et al.*, 1991). Assim, estes autores caracterizaram e demonstraram a existência de receptores da sPLA<sub>2</sub> pancreática em vários tipos celulares (Hanasaki *et al.*, 1992).

Levando em consideração o modelo hipotético de ação das sPLA<sub>2</sub>s descrito acima, Wang & Teng (1990) conduziram um estudo comparativo de edema de pata e degranulação de mastócitos peritoneais de rato induzidos por duas sPLA<sub>2</sub>s: PLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja atra* (PLA<sub>2</sub> ácida) e PLA<sub>2</sub> do veneno de *Trimeresurus mucrosquamatus* (PLA<sub>2</sub> básica). De modo geral, as sPLA<sub>2</sub>s básicas são farmacologicamente mais potentes do que as ácidas (Rosenberg *et al.*, 1979). Acredita-se que isso seja devido às propriedades catiônicas destas enzimas uma vez que as sPLA<sub>2</sub>s básicas apresentam maior número de sítios positivos do que as sPLA<sub>2</sub>s ácidas. De fato, a sPLA<sub>2</sub> de *T. mucrosquamatus*, apesar de menos ativa enzimaticamente, foi mais potente do que a sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja atra* na indução de edema. Estes autores também demonstraram que a heparina (um poliânion que previne a degranulação de mastócitos por polications) foi capaz de suprimir somente o edema induzido pela PLA<sub>2</sub> básica. Com relação ao brometo de *p*-bromofenacil, substância capaz de bloquear a atividade enzimática das sPLA<sub>2</sub>s, observou-se que o mesmo inibiu os efeitos de ambas

PLA<sub>2</sub>s. A combinação de heparina e tratamento com brometo de  $\rho$ -bromofenacil preveniu totalmente o edema induzido pela sPLA<sub>2</sub> básica de *T. mucrosquamatus*. Estes autores sugerem que as diferentes sPLA<sub>2</sub>s podem induzir efeitos pró-inflamatórios por, pelo menos, três diferentes mecanismos: i) atividade enzimática, ii) quantidade de sítios positivos na molécula e iii) presença de um sítio farmacológico com participação de resíduos positivos.

Choi *et al.* (1989) e Nagai *et al.* (1991) demonstraram que a degranulação de mastócitos peritoneais induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* é dependente de sua atividade enzimática, uma vez que inibidores enzimáticos como o  $\rho$ -BPB e a mepacrina inibiram esta resposta. Além disso, mostraram que a presença de Ca<sup>++</sup> no meio de suspensão dos mastócitos é essencial para a ocorrência da degranulação. Estes fatos, em conjunto, confirmam a dependência da atividade enzimática da sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* na degranulação de mastócitos pois estas enzimas requerem concentrações milimolares de Ca<sup>++</sup> para apresentar atividade enzimática.

Estes resultados foram corroborados por Moreno *et al.* (1992) em um estudo onde utilizaram a mesma sPLA<sub>2</sub> proveniente do veneno de *Naja naja*. Porém, demonstraram que, apesar da participação da atividade enzimática, não existiu correlação entre o aumento da produção de eicosanóides e a degranulação de mastócitos induzida por esta enzima. Além disso, demonstraram que a apomorfina, um composto capaz de inibir a degranulação induzida por lisofosfolídeos (Mietto *et al.*, 1984), reduziu de forma significativa esta degranulação. Sendo assim, estes autores sugeriram que a degranulação de mastócitos induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* é mediada por lisofosfolídeos produzidos pela atividade enzimática das sPLA<sub>2</sub>s na membrana de mastócitos. Desta forma, conclui-se que esta sPLA<sub>2</sub> estaria atuando em fosfolídeos que não contêm o ácido araquidônico esterificado em sua posição sn-2. Posteriormente, Lloret *et al.* (1995) demonstraram que os monoacilglicerídeos lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina e lisofosfatidilserina induzem degranulação de mastócitos, sendo os dois primeiros de forma inespecífica, e o último, de forma específica através da ativação de fosfolipase C.

Vadas *et al.* (1993) questionaram os estudos em que foram empregados sPLA<sub>2</sub>s de veneno porque os resultados encontrados são muitas vezes contraditórios. Além disso, algumas ações biológicas destas enzimas diferem daquelas produzidas pela sPLA<sub>2</sub> de mamíferos (Bomalaski *et al.*, 1991). Por outro lado, os estudos nos quais foram utilizados a sPLA<sub>2</sub> purificada de fontes biológicas ou sPLA<sub>2</sub> recombinante mostraram que a relação entre a atividade enzimática e os efeitos inflamatórios nem sempre ocorre (Murakami *et al.*, 1993; Cirino *et al.*, 1994b).

Recentemente, demonstrou-se que, em ratos, a atividade inflamatória das sPLA<sub>2</sub>s não está necessariamente relacionado ao poder catalítico dessas enzimas (Landucci *et al.*, 1998). Tais conclusões foram baseadas em estudos onde empregaram-se duas sPLA<sub>2</sub>s isoladas do veneno de

*Bothrops jararacussu*, a bothropstoxina-I (BthTX-I) e bothropstoxina-II (BthTX-II). A BthTX-I é completamente destituída de atividade fosfolipásica ao passo que a BthTX-II apresenta atividade fosfolipásica muito baixa (ainda menor do que a PLA<sub>2</sub> de pâncreas; Homs-Brandeburgo *et al.*, 1988; Cintra *et al.*, 1993). Foi observado que a BthTX-I e BthTX-II induziram edema de pata de rato e degranulação de mastócitos significantes e equivalentes àqueles observados com a PLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* (Landucci *et al.*, 1998). Dessa forma, outros mecanismos de ação, ainda não esclarecidos, devem ser os responsáveis pela atividade edematogênica da BthTX-I e BthTX-II e, possivelmente, de outras PLA<sub>2</sub>.

Com relação à migração celular induzida pelas sPLA<sub>2</sub>s, Pruzanski *et al.* (1985) foram os primeiros a demonstrar este efeito. Estes autores conduziram um estudo histológico das alterações provocadas na pele de coelho após injeção intradérmica de sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* e pancreática porcina. Demonstraram que a sPLA<sub>2</sub> do veneno foi mais potente do que a pancreática em provocar estas alterações teciduais. Além disso, a inibição enzimática da sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* resultou em diminuição significativa da lesão, embora algumas alterações inflamatórias teciduais tenham persistido. Estes mesmos autores observaram ainda alterações histológicas provocadas pela injeção intra-articular em ratos da sPLA<sub>2</sub> purificada de fluido de articulação artrítica humana e do veneno de *Naja naja*. Estas duas enzimas provocaram sinovite inflamatória com infiltrado leucocitário aparentemente relacionado à atividade enzimática das mesmas (Vadas *et al.*, 1989). Posteriormente, foi conduzido um estudo em coelhos através da injeção intra-articular de sPLA<sub>2</sub> recombinante de fluido sinovial humano (rPLA<sub>2</sub>; Seilhamer *et al.*, 1989), de veneno de *Naja mocambique mocambique* e pancreática porcina. Demonstrou-se que a rPLA<sub>2</sub> foi mais potente em induzir infiltrado leucocitário a despeito de sua menor atividade enzimática, quando comparada à sPLA<sub>2</sub> de *Naja mocambique mocambique*. Por outro lado, estes autores demonstraram que os efeitos pró-inflamatórios da rPLA<sub>2</sub> foram relacionados à produção de PGE<sub>2</sub> no sítio inflamado. Além disso, a inibição enzimática desta enzima pelo brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB) reduziu marcadamente estes efeitos (Bomalaski *et al.*, 1991).

A migração leucocitária induzida pelas mesmas sPLA<sub>2</sub>s foi investigada utilizando o modelo experimental de "air pouch" (bolsa de ar subcutânea no dorso do rato; Cirino *et al.*, 1994b). Aparentemente, o tecido formado nesta bolsa mimetiza aquele do líquido sinovial. Estes autores demonstraram que a sPLA<sub>2</sub> recombinante humana de fluido sinovial produziu infiltrado celular enquanto que a sPLA<sub>2</sub> proveniente do veneno de *Naja mocambique mocambique* e a pancreática porcina não causaram este efeito. Porém, estas respostas não foram relacionadas com produção de PGE<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub> ou LTB<sub>4</sub> (Cirino *et al.*, 1994b).

Em resumo, ainda é controverso se a atividade enzimática das sPLA<sub>2</sub>s é ou não importante para a migração celular induzida por estas enzimas.

#### 1.4. OBJETIVO

- 1) Caracterizar a atividade edematogênica da piratoxina-I em pele e pata de ratos;
- 2) Caracterizar a migração celular pleural induzida por sPLA<sub>2</sub>s com atividade enzimática elevada (sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja*), intermediária (sPLA<sub>2</sub> pancreática bovina), residual (bothropstoxina-II) ou nula (bothropstoxina-I e piratoxina-I);
- 3) Investigar a participação dos mastócitos nos fenômenos de aumento de permeabilidade vascular induzido pela PrTX-I e migração celular induzida pela sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja*, BthTX-I, BthTX-II e PrTX-I;
- 4) Investigar a importância da atividade catalítica e do conteúdo de cargas catiônicas da PrTX-I sobre o aumento de permeabilidade vascular;
- 5) Investigar a importância da atividade catalítica da BthTX-I, BthTX-II, PrTX-I e sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* no fenômeno de migração celular pleural.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar, mantidos com água e ração *ad libitum*. Os animais foram fornecidos pelo CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP).

### 2.2. EDEMA DE PATA

Os ratos (130-180 g) foram anestesiados superficialmente com éter e submetidos à uma injeção sub-plantar de 0.1 ml do agente edematogênico (dissolvido em solução fisiológica) na pata traseira esquerda do animal. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico, em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália).

Os resultados foram expressos como aumento do volume da pata (ml), calculado por subtração do volume basal. Em alguns casos, a área sob a curva (AUC) da formação de edema contra o tempo (ml x min) foi calculada usando o método trapezoidal.

### 2.3. EDEMA DE PELE

A técnica de edema de pele foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Williams (1979) e Brain & Williams (1985). Os ratos (180-220 g) foram anestesiados intraperitonealmente com pentobarbital sódico (Sagatal®; 30-40 mg/Kg) e doses de manutenção foram administradas quando necessárias. Após a depilação do dorso do animal, injetou-se albumina humana marcada com <sup>125</sup>I (2 µCi/Kg) juntamente com azul de Evans (0.5 ml/Kg, 2.5% w/v) através do seio venoso peniano ou da veia caudal. Os agentes em teste foram preparados em salina estéril e injetados subcutaneamente (em duplicata) em volume de 100 µl na pele dorsal. Após 15 minutos, uma amostra de aproximadamente 3 ml de sangue foi coletada através de punção cardíaca, e o animal foi então sacrificado injetando-se dose letal de Sagatal. A pele dorsal foi removida e os sítios injetados (delimitados pelo extravasamento do azul de evans) foram cortados com instrumento

circular cortante (15 mm de diâmetro) e a radioatividade de cada sítio contada em contador gama. O edema formado em cada sítio foi expresso como volume de plasma extravasado, calculado a partir da contagem de radioatividade em 1 ml de plasma (centrifugado a partir do sangue colhido). Utilizamos 12 sítios por animal (6 agentes testes em duplicatas).

## **2.4. PLEURISIA**

Os ratos (180-200 g) foram anestesiados superficialmente com éter e, após depilação na região intercostal esquerda, foi feita uma incisão ao nível do sexto espaço intercostal e uma dessecação subcutaneamente. Os músculos adjacentes foram afastados e os agentes inflamatórios (ou veículo) injetados na cavidade pleural com uma agulha BD 25/7 de 0,5 cm em um volume de 0.1 ml. As incisões foram suturadas e os animais recuperados da anestesia. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos após a injeção intrapleural, os animais, sob anestesia com éter, foram exsanguinados pelo corte de seus vasos cervicais. O tórax foi cuidadosamente exposto e a cavidade pleural lavada com 5 ml (2.5 ml na altura da quarta costela de cada lado) de tampão PBS (pH 7.4) heparinizado (10 U/ml). O lavado pleural foi aspirado e o volume total mensurado. Exsudatos contaminados com sangue foram desprezados. Os resultados foram calculados subtraindo-se o volume injetado (5 ml) do volume total recuperado. Após a realização da contagem total e diferencial de leucócitos, o lavado pleural foi centrifugado e o sobrenadante congelado.

### **2.4.1. Contagem total de leucócitos**

Uma alíquota de 20 µl do lavado pleural foi usada para contagem total do número de leucócitos. As hemácias foram lisadas pela adição da solução de Turk (diliuição 1:20). A leitura foi feita nos 4 quadrantes externos da câmara de Neubauer.

### **2.4.2. Contagem Diferencial**

O esfregaço foi obtido pela centrifugação de alíquotas do lavado pleural (50-150 µl dependendo da contagem total) em citocentrífuga marca Revan. O corante de May-Grünwald foi gotejado sobre os esfregaços sem permitir a sua evaporação. Após 3 min, foi gotejada água destilada sobre as lâminas e, movimentos leves, misturaram-na ao corante. Após 5 min, as lâminas foram

lavadas em água corrente. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico usando-se objetiva de imersão.

## **2.5. DEPLEÇÃO DOS ESTOQUES DE HISTAMINA E 5-HT**

Os ratos (180-200 g) foram depletados de seus estoques de histamina e 5-HT por injeções repetidas do composto 48/80 (Spector & Willoughby, 1959; Di Rosa *et al.*, 1971). Resumidamente, oito doses de uma solução a 0.1 % de 48/80 (m/v) em salina foi aplicada no peritônio (i.p.) dos animais. O intervalo entre as doses foi de aproximadamente 12 h (manhã e noite). A dose foi de 0.6 mg/Kg para as seis primeiras injeções e de 1.2 mg/Kg para as duas últimas. O grupo controle foi conduzido com injeções i.p. de salina administradas no mesmo volume. A pleurisia foi feita 5-6 h após a última dose do composto 48/80. Para confirmar a eficiência da depleção de histamina e 5-HT verificamos se o tratamento abolia o edema de pata induzido pelo 48/80.

## **2.6. DEGRANULAÇÃO DE MASTÓCITOS**

### **2.6.1. Obtenção de mastócitos pleurais e peritoneais**

Os ratos (180-220 g) foram anestesiados com éter e exsanguinados seccionando-se os vasos cervicais. Em seguida, injetou-se tampão Krebs-Ringer (KRP; pH 7,3) na cavidade peritoneal (10 ml) ou pleural (5 ml) dos animais e as mesmas foram massageadas para que a solução se espalhasse uniformemente por toda cavidade. Em seguida, os lavados peritoneal ou pleural foram coletados em tubos de polipropileno. Normalmente, procedia-se, primeiramente, a obtenção de mastócitos pleurais e, em seguida, utilizando os mesmos animais, obtinha-se os mastócitos peritoneais como descrito anteriormente. Após obtenção dos lavados (pleural e peritoneal), os mesmos foram separadamente centrifugados durante 5 minutos (800 rpm), à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados ressuspensos com KRP (6.5 ml). Em seguida, foram feitas as contagens total e diferencial destes dois lavados, no sentido de corrigir o volume para igualar a concentração de mastócitos nos dois lavados. Posteriormente, os mesmos foram incubados com 40 nCi/ml de [ $^{14}$ C]5-HT à 37°C por 60 min. Após incubação, as células foram lavadas 3 vezes com KRP para remover o conteúdo de [ $^{14}$ C]5-HT não incorporado pelos mastócitos. Após esse procedimento,

as suspensões de mastócitos foram divididas em diversas alíquotas (0.5 ml) para incubação com os agentes degranuladores.

### 2.6.2. Incubação de mastócitos

Agentes degranuladores foram adicionados à suspensão de mastócitos (0.5 ml) e incubados à 37°C por 20 min. Após a incubação, as células foram centrifugadas (300 g, 10 min.) e o sobrenadante removido para a determinação de [<sup>14</sup>C]5-HT. A solução de KRP (1.0 ml) foi adicionada ao resíduo para a determinação da [<sup>14</sup>C]5-HT residual. As concentrações de [<sup>14</sup>C]5-HT foram determinadas quantificando-se a radioatividade liberada e expressa como % do conteúdo total de 5-HT. Todos os valores obtidos foram corrigidos subtraindo-se o valor de liberação espontânea na ausência de estímulos.

## 2.7. PURIFICAÇÃO DA BthTX-I E DA BthTX-II

As Bothropstoxinas I e II foram purificadas do veneno de *Bothrops jararacussu* através de gel filtração em Sephadex G-75 e cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25 de acordo com o método descrito por Homsí-Brandeburgo *et al.* (1988). A purificação e sequenciamento foram feitos de acordo com método descrito por Cintra *et al.* (1993). As bothropstoxinas utilizadas em nossos experimentos foram fornecidas pelo Prof. Dr. José R. Giglio (Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo) e pelo Prof. Dr. Benedito Oliveira (Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP).

## 2.8. PURIFICAÇÃO DA PrTX-I

O veneno da *Bothrops pirajai* foi fracionado (SI a SVI) através de gel filtração em Sephadex G-75. A piratoxina-I foi obtida por cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25 da fração SIV de acordo com o método descrito por Mancuso *et al.* (1995). A piratoxina utilizada em nossos experimentos também foi fornecida pelo Prof. Dr. José R. Giglio (Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto) e pelo Prof. Dr. Benedito Oliveira (Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP).

## 2.9. TRATAMENTO DAS BOTHROPSTOXINAS E PIRATOXINA-I COM BROMETO DE $\rho$ -BROMOFENACIL

O tratamento das Bothropstoxinas e da Piratoxina com o brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB) foi realizado conforme o método descrito por Nishida *et al.* (1985).

As BthTX-I, BthTX-II e PrTX-I (1 mg) foram dissolvidas em 900  $\mu$ l tampão Tris-HCl (0,2 M, pH 8,0, contendo 1,4 mM de EDTA) e misturadas com 100  $\mu$ l de  $\rho$ -BPB para obtenção de concentração final de 1 mg/ml. A mistura foi incubada durante 20 horas à 37°C. Após este período, a mistura foi ultra-filtrada através de um sistema Amicon (modelo 8 MC) utilizando-se uma membrana capaz de reter substâncias com peso molecular menor que 3000. Este procedimento objetivou a eliminação do excesso de  $\rho$ -BPB que não se complexou com a sPLA<sub>2</sub>, do TRIS (hidroximetilaminometano), do EDTA (ácido etileno diamino tetracético) e do álcool etílico. Também procedeu-se um tratamento controle onde as amostras desta enzima passaram pelas mesmas etapas do tratamento, exceto a da adição do  $\rho$ -BPB. Esta amostra foi utilizada como controle dos experimentos nos quais se avaliou o efeito do  $\rho$ -BPB nas atividades farmacológicas das sPLA<sub>2</sub>s. Após o tratamento, a concentração proteica das amostras foi determinada pelo método de Peterson (1977).

Para os experimentos de pleurisia o tratamento foi realizado sem a etapa da ultra-filtração. Desta maneira, amostras de bothropstoxinas ou PrTX-I (2 mg) foram dissolvidas em 1800  $\mu$ l de tampão Tris-HCl (0,2 M, pH 8,0, contendo 1,4 mM de EDTA). Esta solução foi dividida em duas alíquotas de 900  $\mu$ l. A alíquota teste foi misturada com 100  $\mu$ l de solução alcoólica de brometo de  $\rho$ -bromofenacil (0,8 mg/ml) e a alíquota controle foi misturada somente com 100  $\mu$ l de álcool etílico. Um controle negativo foi feito misturando-se 900  $\mu$ l de tampão Tris-HCl com 100  $\mu$ l de solução alcoólica de  $\rho$ -BPB (0,8 mg/ml). As três misturas foram incubadas durante 20 horas à 37°C e, após este período, congeladas para utilização posterior.

Para confirmar a inibição da atividade enzimática da sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* e BthTX-II pelo tratamento com  $\rho$ -BPB, procedemos ensaio enzimático *in vitro* para determinação da atividade fosfolipásica pelo método colorimétrico, o qual utiliza o vermelho de fenol como indicador e gema de ovo (fonte de lecitina) como substrato (Lôbo de Araújo *et al.*, 1987). Como controle das sPLA<sub>2</sub>s complexadas com  $\rho$ -BPB utilizamos as amostras de sPLA<sub>2</sub>s que passaram pelo tratamento controle (Tabela 1).

## 2.10. TRATAMENTOS

O tratamento prévio dos animais com o antagonista duplo do receptor de histamina/serotonina, ciproheptadina, foi feito através de injeção intraperitoneal 30 min antes da injeção sub-plantar, intradérmica ou intrapleural das sPLA<sub>2</sub>s. No edema de pata e pele a dose utilizada foi de 2 mg/Kg, enquanto que na pleurisia foi de 10 mg/K. Em pata e pele de ratos, a heparina foi co-injetada com as sPLA<sub>2</sub>s nas doses de 50 UI/pata e 5 UI/sítio, respectivamente. Na degranulação de mastócitos a heparina foi co-incubada com as sPLA<sub>2</sub>s na dose de 50 UI/ml.

## 2.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As comparações estatísticas foram feitas de acordo com a análise de variância (ANOVA) com aplicação do teste de Bonferroni para correção dos valores de  $p$  para as comparações múltiplas. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significantes.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. EDEMA DE PATA E PELE

##### 3.1.1. Edema de pata induzido pela PrTX-I

A Figura 1 mostra que a injeção sub-plantar de PrTX-I (3-100  $\mu\text{g/pata}$ ,  $n=6$ ) induziu edema de pata dependente da dose. O edema caracterizou-se por apresentar início de ação rápido (30 min; 100  $\mu\text{g/pata}$ :  $0.84 \pm 0.06$  ml).

O tratamento prévio dos animais com ciproheptadina (2 mg/kg, i.p., 30 min antes;  $n=5$ ) aboliu o edema induzido pela PrTX-I (100  $\mu\text{g/pata}$ ; Figura 2A). Na dose empregada, a ciproheptadina praticamente aboliu o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (3  $\mu\text{g/pata}$ , 30 min:  $0.87 \pm 0.05$  ml e  $0.22 \pm 0.09$  ml, animais controle e tratados, respectivamente,  $n=5$ ;  $p<0.01$ ).

A Figura 2B mostra que a injeção sub-plantar de PrTX-I (100  $\mu\text{g/pata}$ ) previamente tratada com  $\rho$ -BPB resultou em uma resposta edematogênica marcadamente menor. Esta inibição foi específica, visto que o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (3  $\mu\text{g/pata}$ ; AUC =  $2.1 \pm 0.1$  ml.min,  $n=5$ ) não foi significativamente alterado quando este agente foi preparado em solução contendo o  $\rho$ -BPB (AUC =  $2.3 \pm 0.3$  ml.min,  $n=5$ ).

A co-injeção de PrTX-I (100  $\mu\text{g/pata}$ ) com heparina (50 UI/pata) causou uma inibição parcial, porém significativa ( $p<0.05$ ), do edema induzido por esta sPLA<sub>2</sub> (Figura 2C;  $n=10$ ).

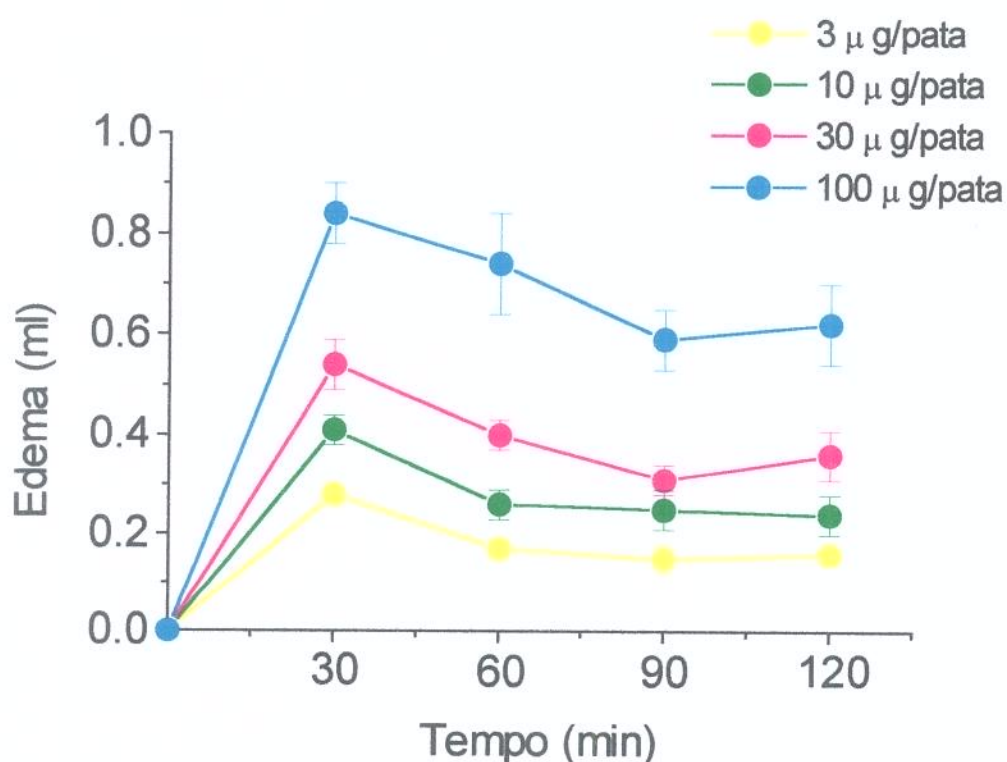
##### 3.1.2. Edema de pele induzido pela PrTX-I

A injeção intradérmica de piratoxina nas doses de 3 e 30  $\mu\text{g/pata}$  ( $n=4$ ) causou formação de edema ( $87 \pm 13$   $\mu\text{l}$  e  $134 \pm 10$   $\mu\text{l}$ , respectivamente), quando comparada aos sítios injetados com salina ( $10 \pm 2$   $\mu\text{l}$ ;  $p<0.05$ ). O tratamento prévio dos animais com ciproheptadina (2 mg/kg, i.p., 30 min antes) reduziu significativamente ( $p<0.01$ ) o edema induzido pela PrTX-I (3  $\mu\text{g/sítio}$ ; Figura 3). Na dose utilizada, a ciproheptadina reduziu em 90% o edema induzido pela injeção intradérmica do composto 48/80 (0.5  $\mu\text{g/sítio}$ ,  $n=4$ ).

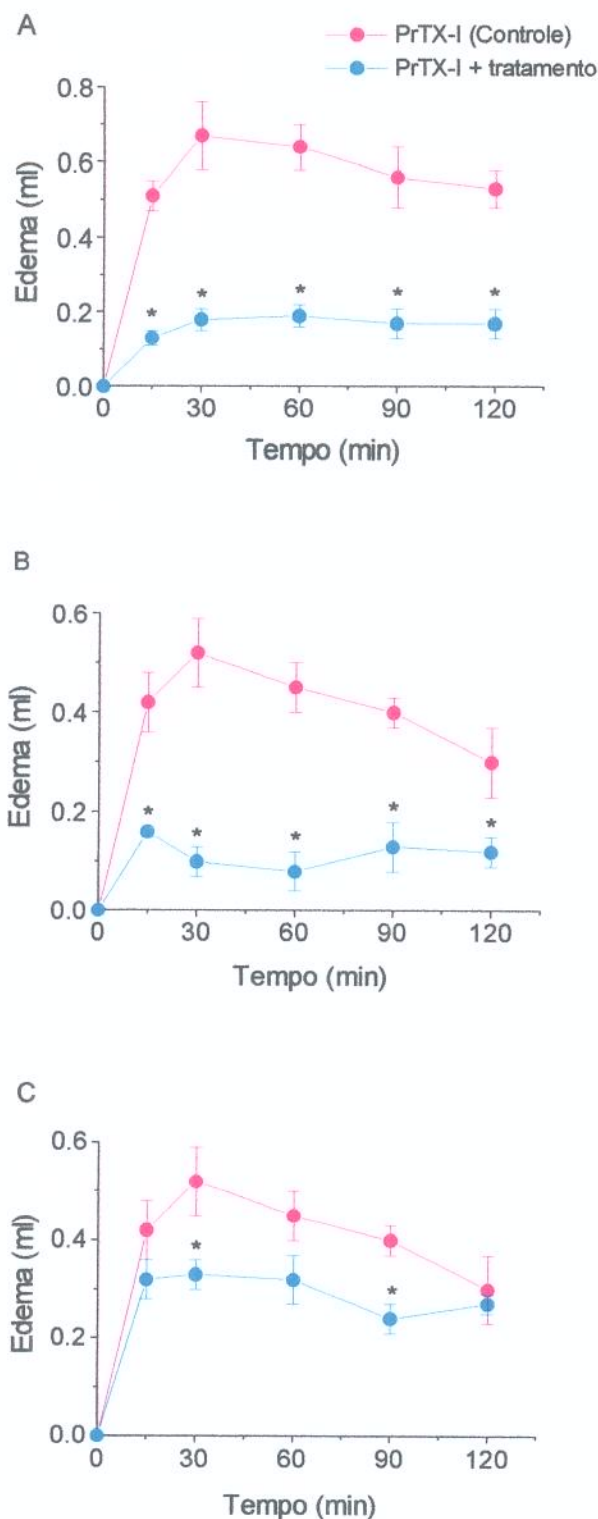
O  $\rho$ -BPB inibiu significativamente ( $p<0.01$ ) o edema de pele induzido pela PrTX-I (3  $\mu\text{g/sítio}$ ,  $n=4$ ; Figura 3) sem, contudo, interferir no edema de pele induzido pelo composto 48/80

( $0.5 \mu\text{g/sítio}$ ;  $97.2 \pm 3.5 \mu\text{l}$  e  $90.0 \pm 13.2 \mu\text{l}$ , volume de plasma extravasado em resposta ao 48/80 preparado em salina ou em solução de brometo de *p*-bromofenacil, respectivamente,  $n=4$ ).

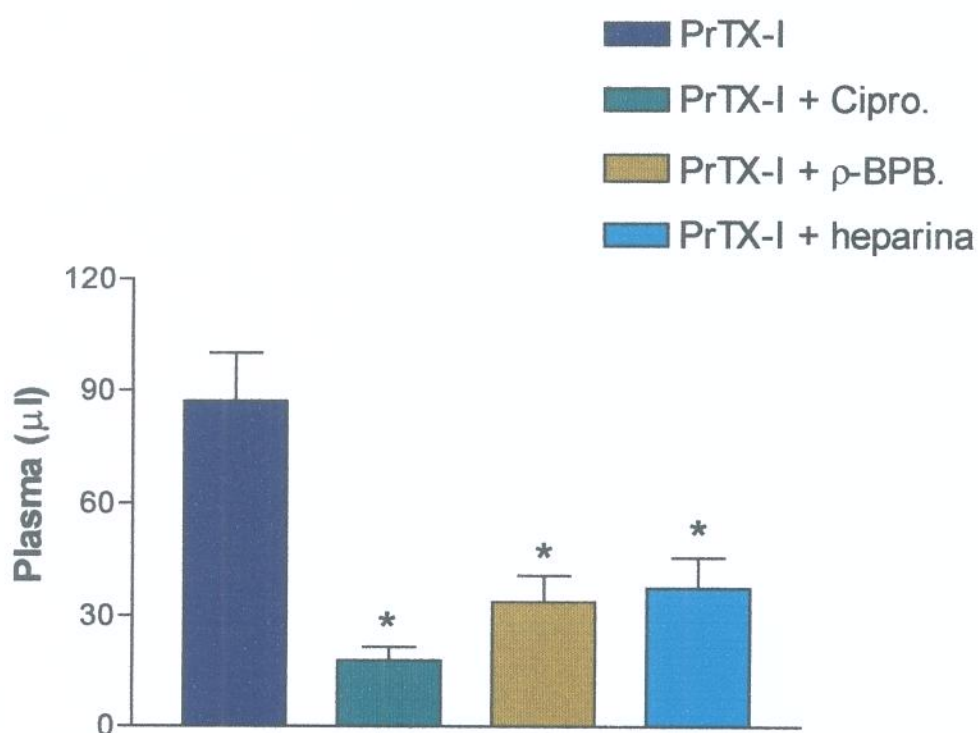
A heparina ( $5 \text{ UI/sítio}$ ) também reduziu significativamente ( $p<0.01$ ) o edema de pele induzido pela PrTX-I ( $3 \mu\text{g/sítio}$ ,  $n=4$ ; Figura 3).



**FIGURA 1** - Curva dose-resposta do edema de pata induzido pela PrTX-I. O edema foi expresso como o aumento de volume (ml) da pata em relação ao volume basal. Cada ponto representa a média de 6 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p<0.01$ , comparando-se com seus respectivos controles.



**FIGURA 2** - Efeito da ciproheptadina (2 mg/Kg, i.p., 30 min antes; **Painel A**), brometo de *p*-bromofenacil (**Painel B**) e heparina (50 UI/pata, co-injeção; **Painel C**) sobre o edema de pata induzido pela PrTX-I (100 µg/pata). O edema foi expresso como aumento do volume da pata (ml) em relação ao volume basal. Cada ponto representa uma média de 5-10 ratos ± E.P.M.. \*  $p < 0.01$ , comparando-se com seus respectivos controles.



**FIGURA 3** - Efeito da ciproheptadina (2 mg/Kg, i.p., 30 min antes), do tratamento com brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB) e da heparina (5 UI/pata, co-injeção) sobre o edema de pele induzido pela PrTX-I (3  $\mu$ g/sítio). O edema foi expresso como  $\mu$ l de plasma extravasado. Cada ponto representa a média de 4 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.01$ , comparando-se com seus respectivos controles.

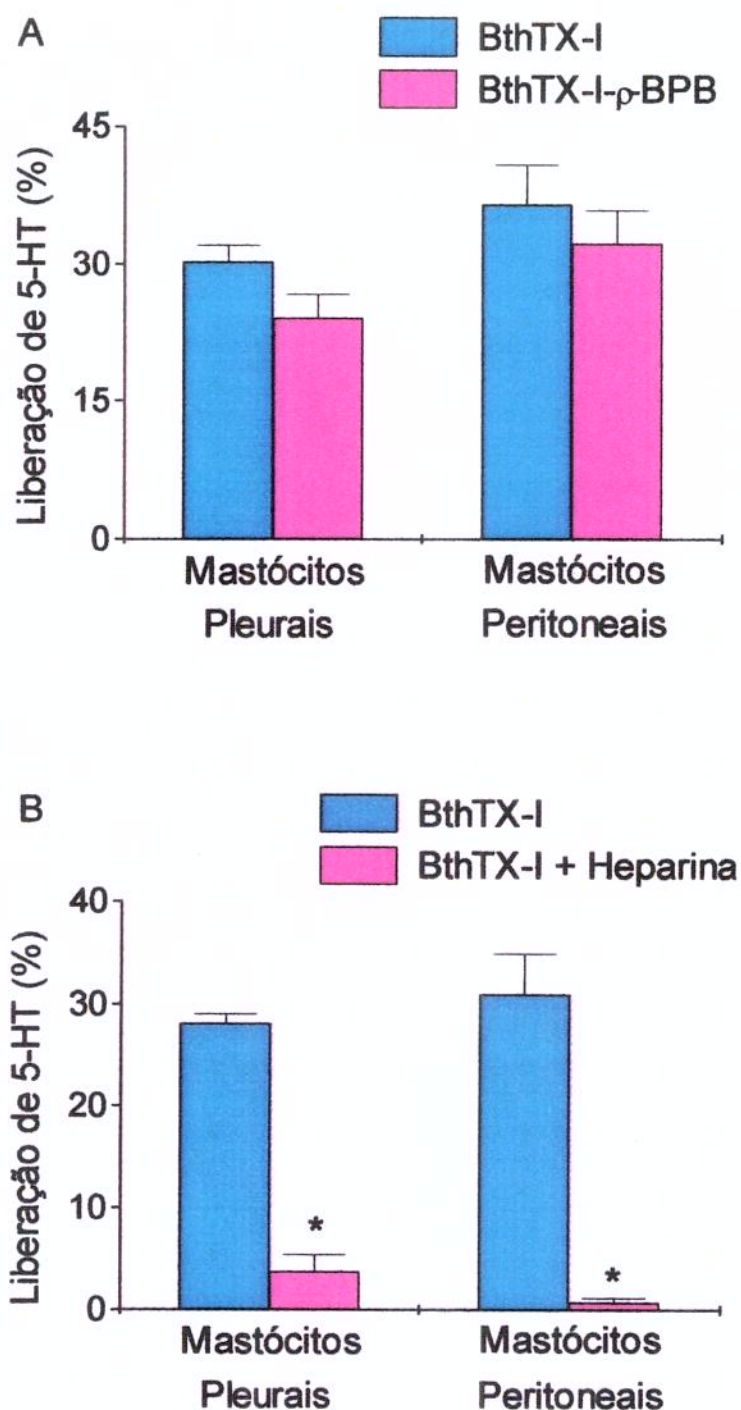
### 3.2. DEGRANULAÇÃO *IN VITRO* DE MASTÓCITOS PLEURAIS E PERITONEAIS

A BthTX-I (100 µg/ml,  $n=3$ ), BthTX-II (100 µg/ml,  $n=3$ ), PrTX-I (100 µg/ml,  $n=3$ ) e o composto 48/80 (10 µg/ml,  $n=3$ ) induziram liberação significativa de [ $^{14}$ C]5-HT de mastócitos pleurais de rato ( $20.5 \pm 1.0$  %,  $30.9 \pm 3.4$  %,  $42.1 \pm 3.3$  e  $71.5 \pm 3.3$ , respectivamente) quando comparados à liberação espontânea. Resultados semelhantes foram observados com a liberação de [ $^{14}$ C]5-HT de mastócitos peritoneais ( $19.5 \pm 1.8$  %,  $35.4 \pm 2.8$  %,  $32.0 \pm 2.3$  e  $74.7 \pm 1.6$  % para as mesmas concentrações de BthTX-I, BthTX-II, PrTX-I e 48/80, respectivamente;  $n=3$ ). Isto mostrou que as sPLA<sub>2</sub>s utilizadas e o composto 48/80 são equipotentes em ambas as populações de mastócitos.

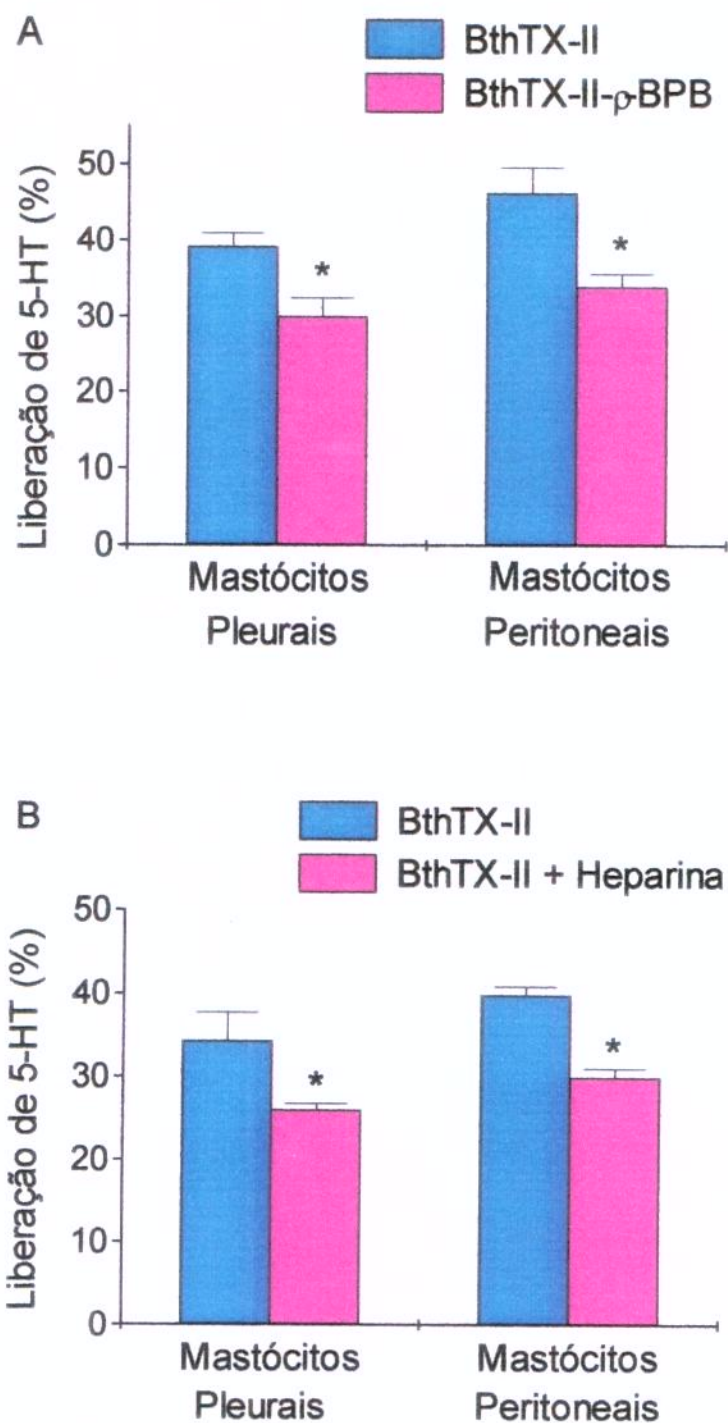
O  $\rho$ -BPB não inibiu significativamente a liberação de [ $^{14}$ C]5-HT induzida por BthTX-I (100 µg/ml,  $n=3$ ) em mastócitos pleurais ou peritoneais (Figura 4A). Entretanto, a heparina (50 UI/ml) inibiu marcadamente a liberação de [ $^{14}$ C]5-HT induzida por BthTX-I (100 µg/ml,  $n=3$ ;  $p<0.01$ ), tanto de mastócitos pleurais como de mastócitos peritoneais (Figura 4B).

A liberação de [ $^{14}$ C]5-HT induzida pela BthTX-II (100 µg/ml) em mastócitos pleurais e peritoneais foi reduzida de maneira parcial, porém significativa ( $p<0.05$ ), pelo  $\rho$ -BPB ( $n=4$ ; Figura 5A) e heparina ( $n=3$ , 50 U/ml; Figura 5B).

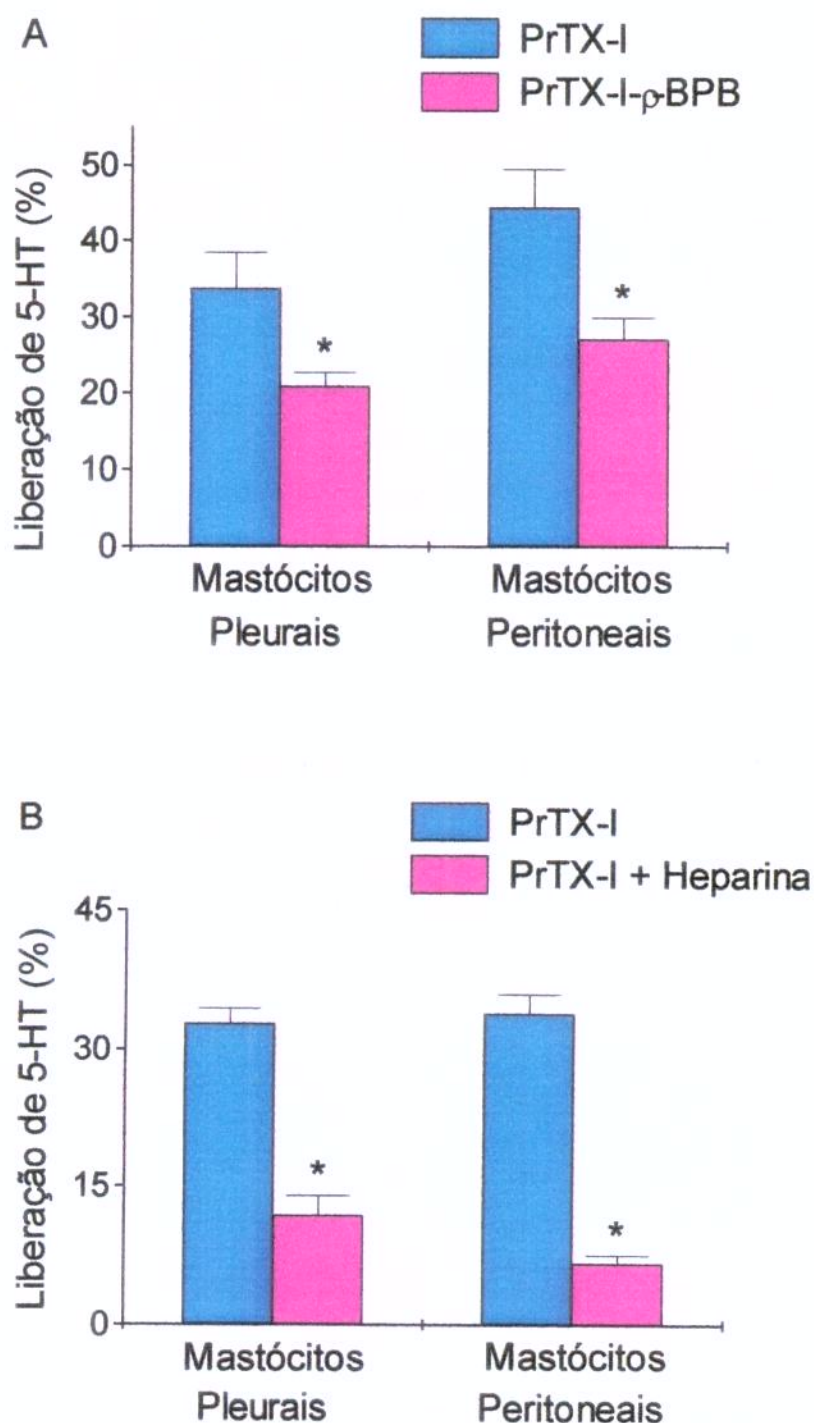
O  $\rho$ -BPB inibiu significativamente a liberação de [ $^{14}$ C]5-HT induzida por PrTX-I (100 µg/ml,  $n=3$ ) em mastócitos pleurais e peritoneais (Figura 6A). A heparina (50 UI/ml) inibiu marcadamente a liberação de [ $^{14}$ C]5-HT induzida por piratoxina-I (100 µg/ml,  $n=3$ ;  $p<0.05$ ), tanto de mastócitos pleurais, como de mastócitos peritoneais (Figura 6B).



**FIGURA 4** - Efeito do tratamento com brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB; **Painel A**) e da heparina (50 UI/ml, co-incubação; **Painel B**) na degranulação de mastócitos pleurais e peritoneais *in vitro* induzida pela BthTX-I (100  $\mu$ g/ml). O estímulo foi usado em duplicata em cada experimento ( $n=3$ ). \*  $p<0.01$  comparando-se com seus respectivos controles. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de liberação de [ $^{14}$ C]5-HT.



**FIGURA 5** - Efeito do tratamento com brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB; **Painel A**) e da heparina (50 UI/ml, co-incubação; **Painel B**) na degranulação de mastócitos pleurais e peritoneais *in vitro* induzida pela BthTX-II (100  $\mu$ g/ml). O estímulo foi usado em duplicata em cada experimento ( $n=3-4$ ). \*  $p<0.01$  comparando-se com seus respectivos controles. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de liberação de [ $^{14}$ C]5-HT.



**FIGURA 6** - Efeito do tratamento com brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB; **Painel A**) e da heparina (50 UI/ml, co-incubação; **Painel B**) na degranulação de mastócitos pleurais e peritoneais *in vitro* induzida pela PrTX-I (100  $\mu$ g/ml). O estímulo foi usado em duplicata em cada experimento ( $n=3$ ). \*  $p<0.01$  comparando-se com seus respectivos controles. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. da porcentagem de liberação de [ $^{14}$ C]5-HT.

### 3.3. PLEURISIA

#### 3.3.1. sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja*

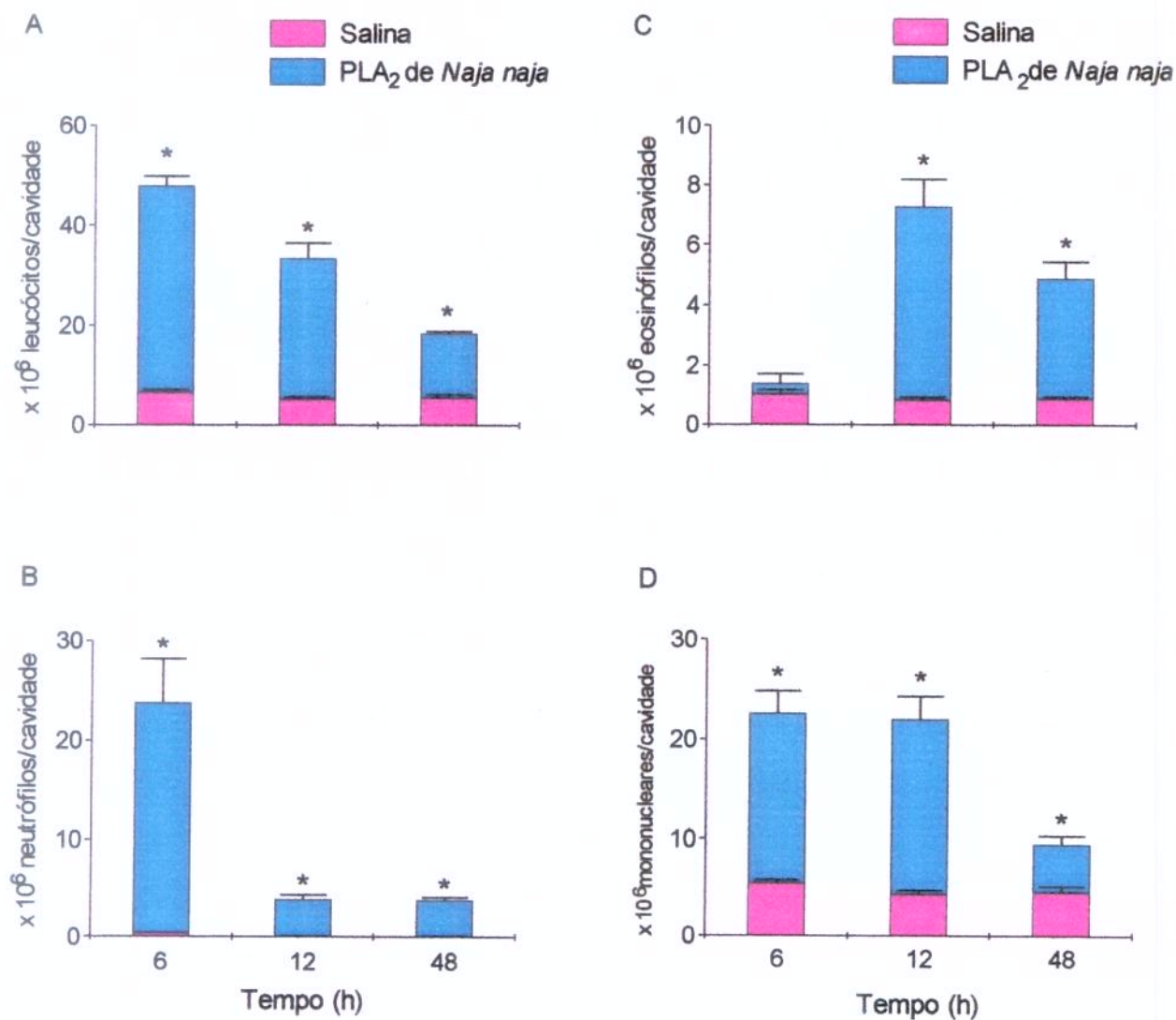
A Figura 7 mostra que a injeção intrapleural da sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* (10 µg/cavidade,  $n=6$ ) induziu migração leucocitária significativa ( $p<0.05$ ) para cavidade pleural em relação ao grupo controle (salina,  $n=4$ ), nos tempos de 6, 12 e 48 h após a injeção. O conteúdo total de leucócitos foi maior em 6 h, decaindo nos tempos seguintes. A migração máxima de neutrófilos e eosinófilos ocorreu, respectivamente, em 6 e 12 h. O maior conteúdo de células mononucleares foi observado nos tempos de 6 e 12 h. Nos três períodos de tempo estudados, não foi observado formação significativa de exsudato pleural.

Em 6 h, o influxo celular foi avaliado utilizando as doses de 3, 10 e 30 µg/cavidade desta sPLA<sub>2</sub> ( $n=5$ ; Figura 8). Foi observado que o infiltrado total de leucócitos foi dependente da dose sendo a resposta sub-máxima atingida com a dose de 10 µg/cavidade (Figura 8). O infiltrado leucocitário pleural consistiu sobretudo de neutrófilos e células mononucleares sendo que, neste período de tempo, não houve infiltrado significativo de eosinófilos. Para os experimentos subsequentes com esta sPLA<sub>2</sub>, padronizamos o tempo de 6 h e a dose de 10 µg/cavidade.

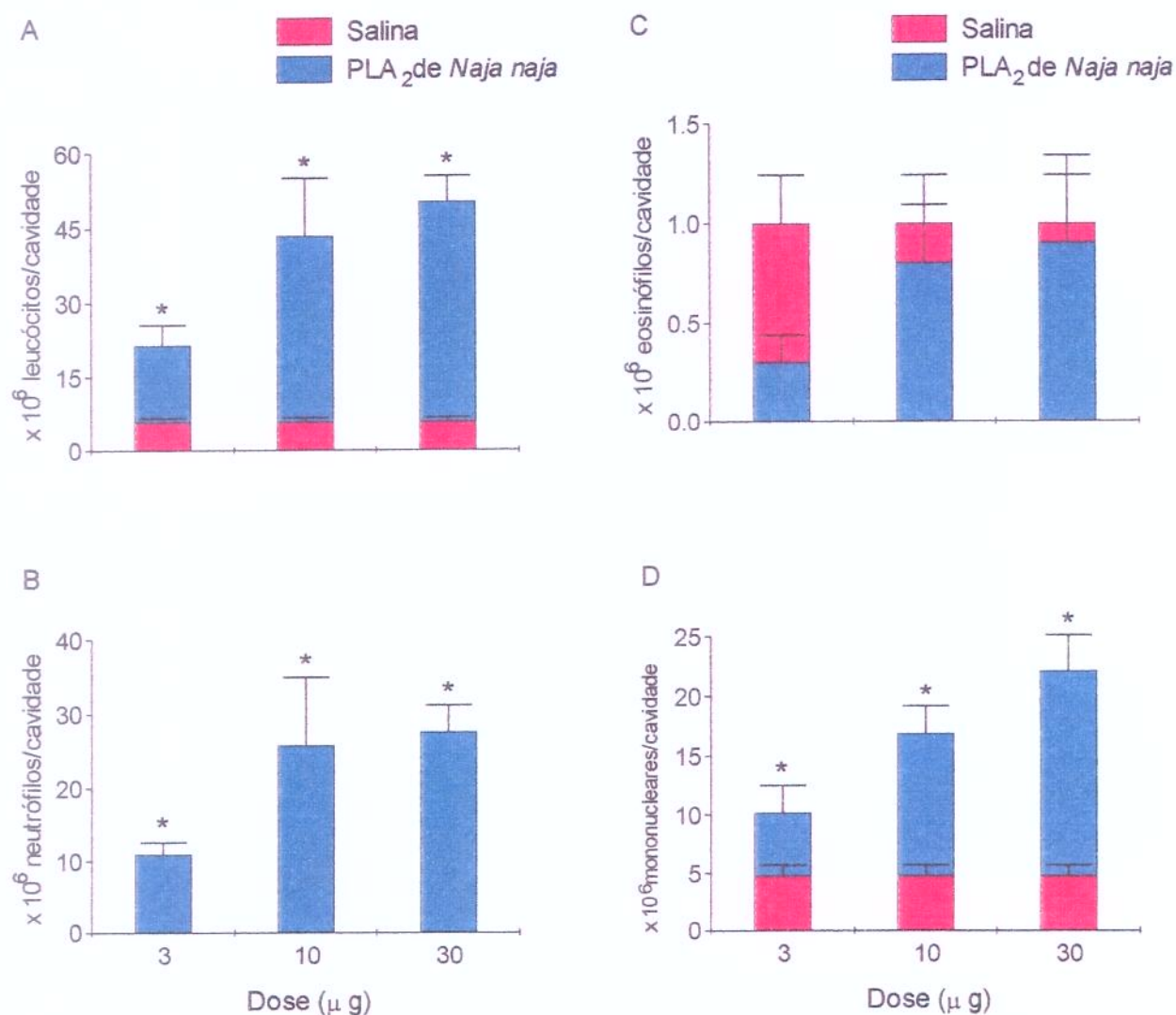
#### 3.3.2. sPLA<sub>2</sub> pancreática bovina

A injeção intrapleural da sPLA<sub>2</sub> pancreática bovina (10 µg/cavidade,  $n=6$ ; Figura 9) induziu migração celular total discreta, porém significativa ( $p<0.05$ ), no intervalo de 6 h. Esta migração resultou de um influxo significativo de neutrófilos e células mononucleares, mas não de eosinófilos.

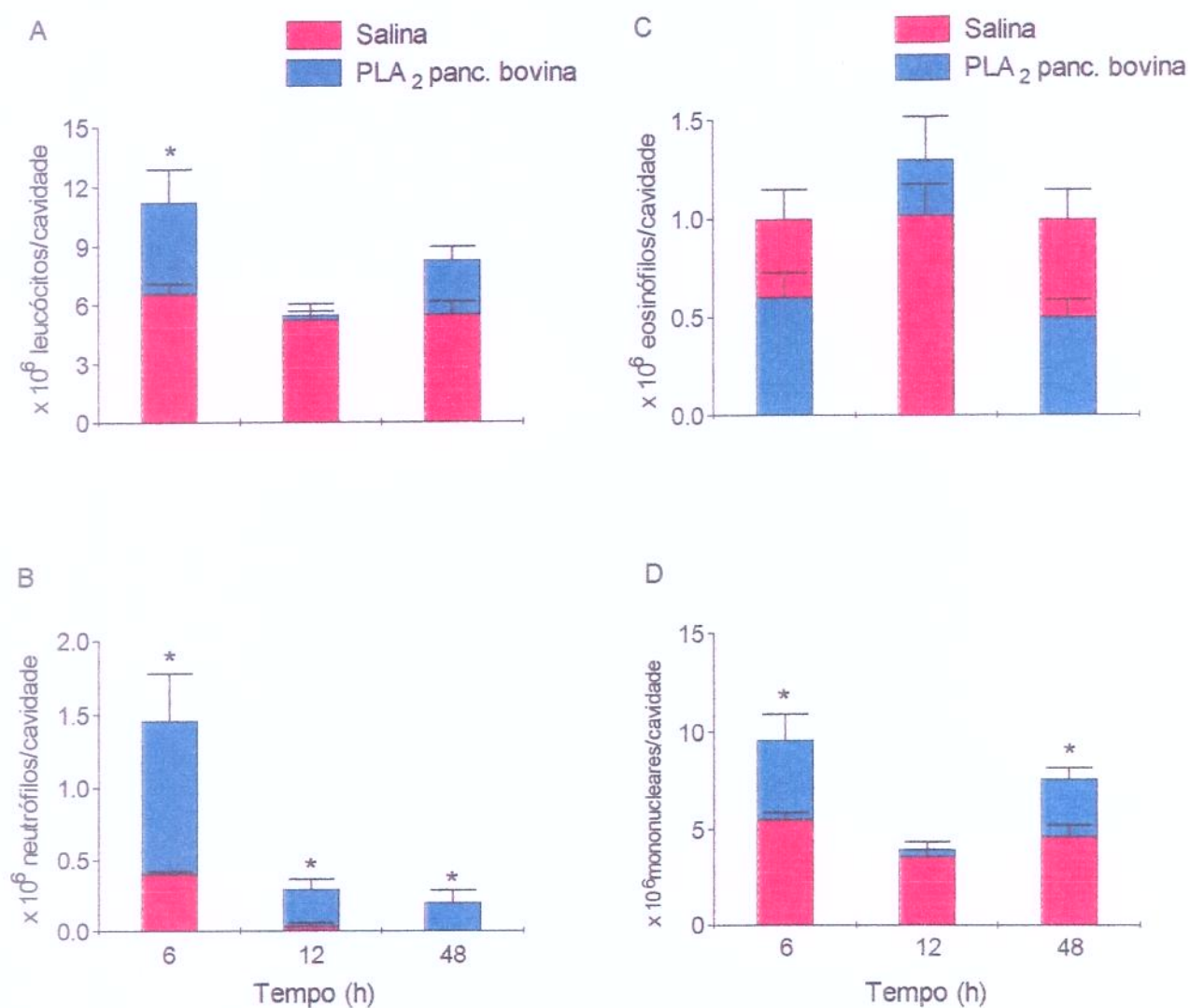
Em 6 h, o influxo celular foi avaliado também para a dose de 100 µg/cavidade ( $n=6$ , Figura 10). Observamos que o influxo celular total e diferencial foi equivalente aquele observado com a dose de 10 µg/cavidade.



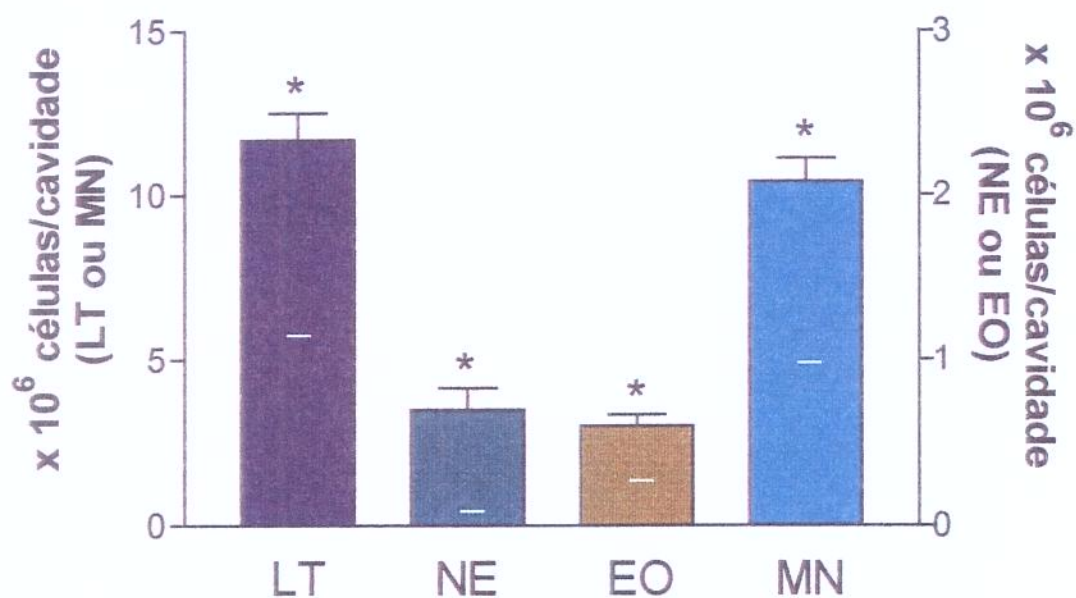
**FIGURA 7** - Efeito da injeção intrapleural da PLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* (10 µg/cavidade) na migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) em intervalos de 6, 12 e 48 h após a injeção. Cada ponto representa a média de 6 ratos ± E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o grupo controle, injetado com salina (0.1 ml;  $n=4$ ).



**FIGURA 8** - Migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) para cavidade pleural 6 h após a injeção intrapleural da PLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* nas doses de 3, 10 e 30 µg/cavidade. Cada ponto representa a média de 5 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , significativo comparando-se com o grupo injetado com salina (0.1 ml;  $n=3$ ).



**FIGURA 9** - Efeito da injeção intrapleural da sPLA<sub>2</sub> pancreática bovina (10 µg/cavidade) na migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) em intervalos de 6, 12 e 48 h após a injeção. Cada ponto representa a média de 6 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o grupo injetado com salina (0.1 ml;  $n=3$ ).



**FIGURA 10** - Migração de leucócitos totais (LT), neutrófilos (NE), eosinófilos (EO) e células mononucleares (MN) para cavidade pleural 6 horas após a injeção intrapleural da PLA<sub>2</sub> pancreática bovina (100 µg/cavidade). Cada ponto representa a média de 6 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o grupo injetado com salina (0.1 ml;  $n=3$ ).

### 3.3.3. Bothropstoxina-I (BthTX-I)

A injeção intrapleural da BthTX-I (10 µg/cavidade,  $n=6$ ) induziu migração celular total ( $p<0.05$ ) no intervalo de 12 h após a injeção, sendo esta resposta decorrente de influxo significativo de neutrófilos e células mononucleares (Figura 11).

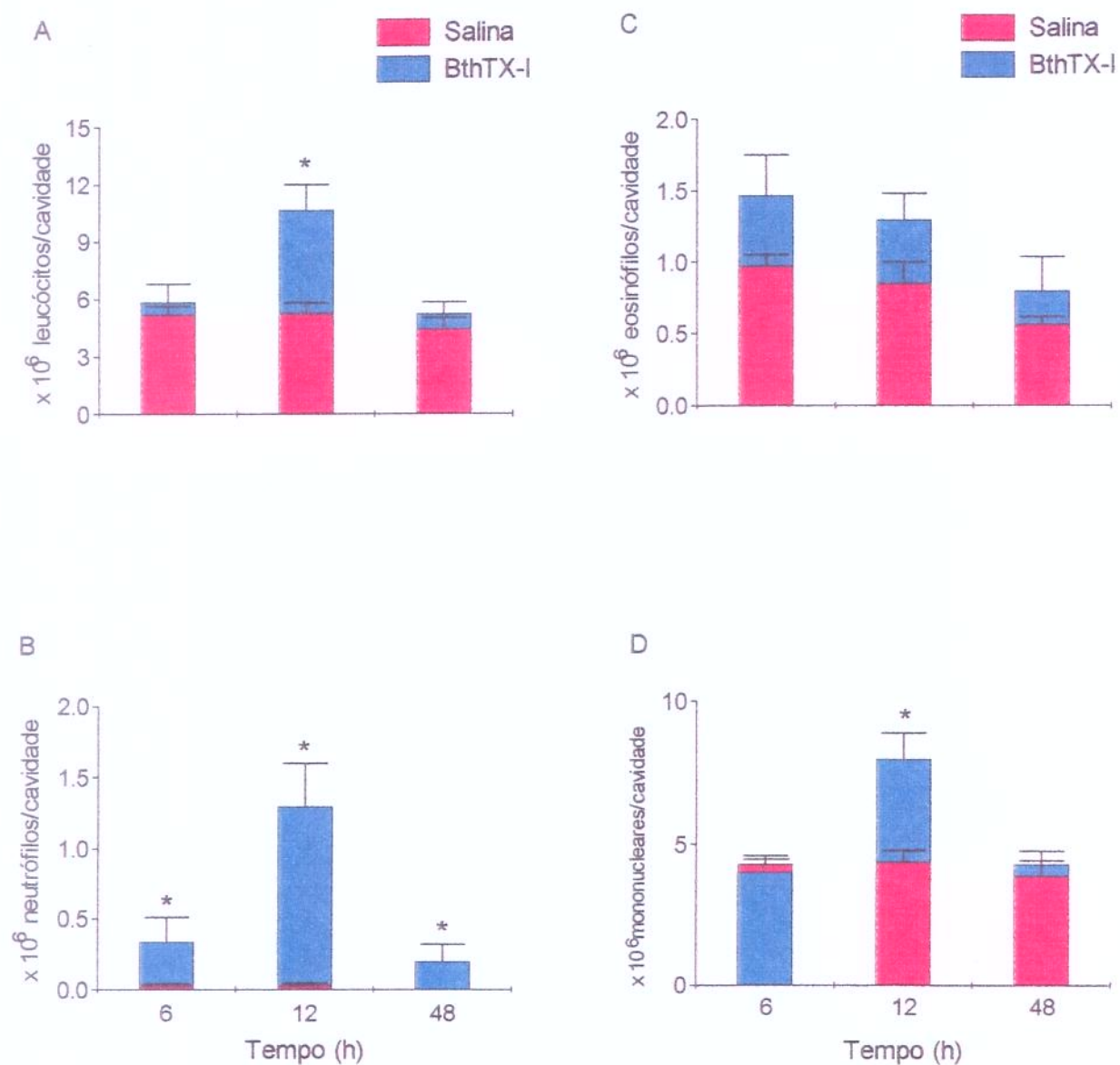
Em 12 h, o influxo celular foi avaliado também para as doses de 30 e 100 µg/cavidade ( $n=5$ , Figura 12). Observamos que o influxo celular total e diferencial foi dependente da dose sendo a resposta máxima atingida com a dose de 30 µg/cavidade. O infiltrado foi decorrente da migração pleural de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos.

Não houve formação significativa de exsudato pleural em nenhum período de tempo estudado para as três doses empregadas.

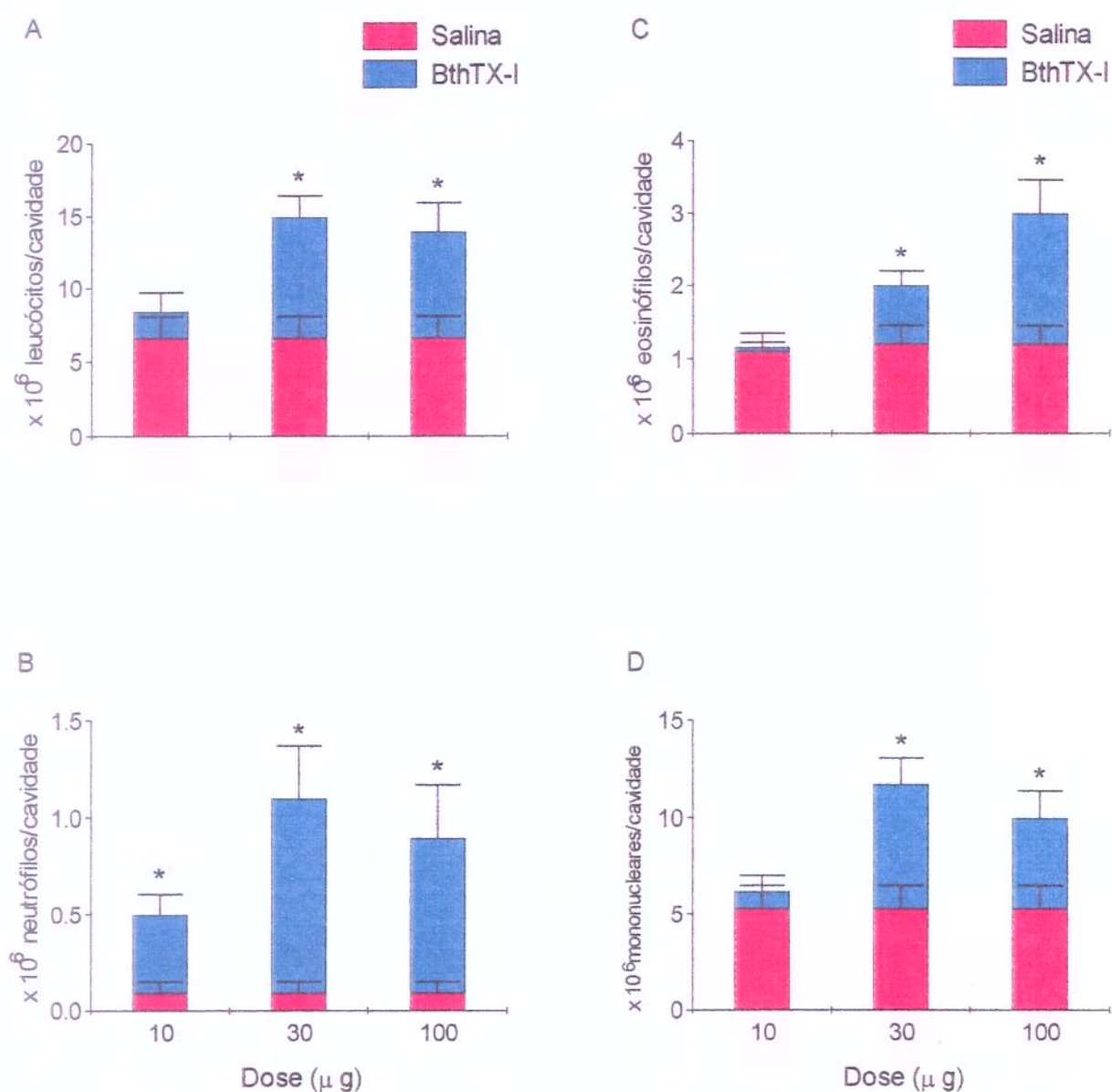
### 3.3.4. Bothropstoxina-II (BthTX-II)

A injeção intrapleural da BthTX-II (10 µg/cavidade,  $n=6$ ) induziu migração leucocitária total significativa ( $p<0.05$ ) nos tempos de 6 e 12 h após a injeção (Figura 13). A contagem total de leucócitos foi maior em 6 h, decaindo nos tempos seguintes. Esta resposta decorreu principalmente da migração de neutrófilos para cavidade pleural (Figura 13B). Nessa dose de BthTX-II, não observamos infiltrado significativo de eosinófilos e células mononucleares em quaisquer dos tempos estudados.

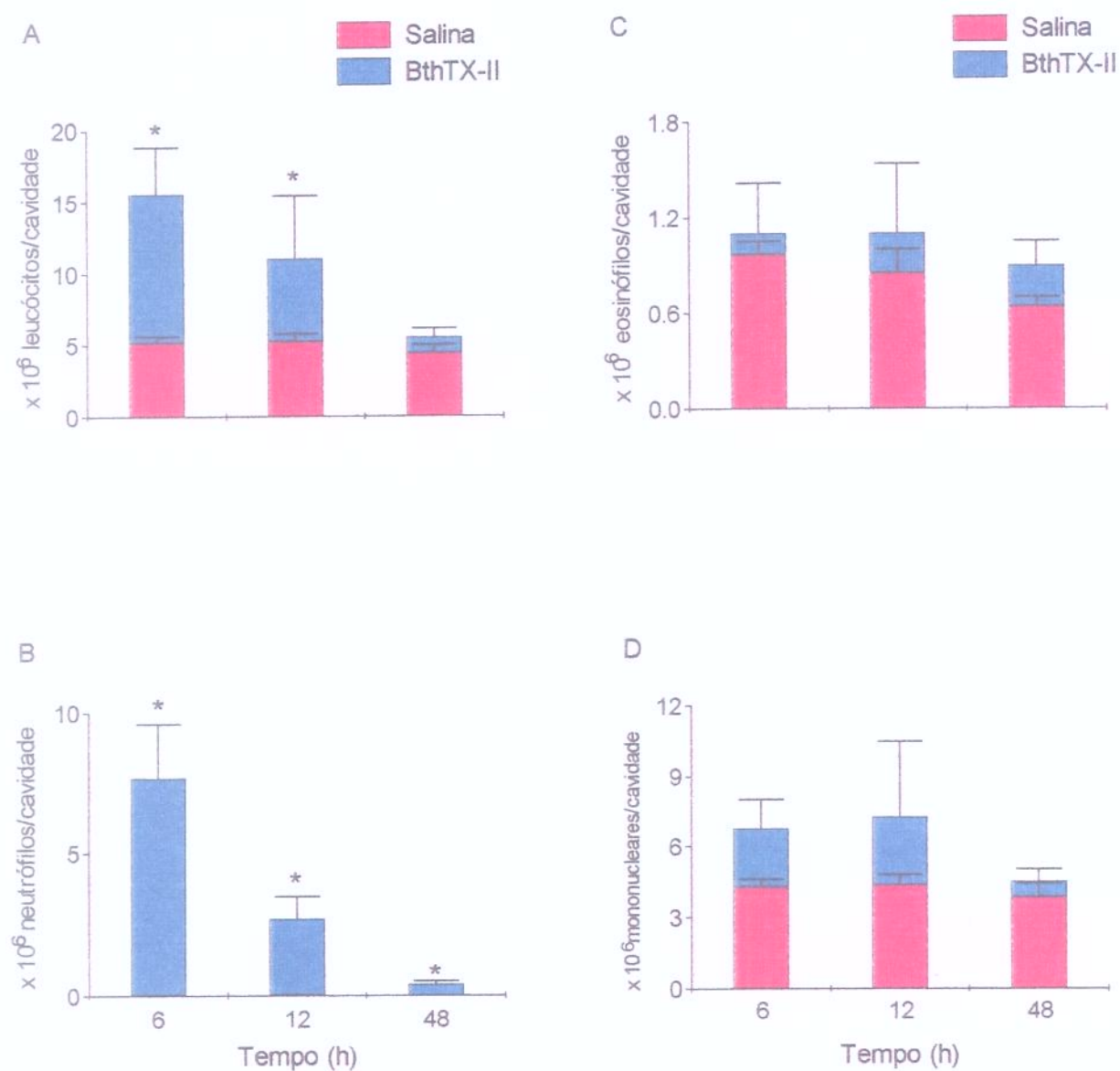
No intervalo de 6 h, também avaliamos o influxo celular para as doses de 30 e 100 µg/cavidade ( $n=5$ ). O aumento da dose resultou em aumento da migração de leucócitos totais (Figura 14) devido à migração de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares (Figura 14). Com nenhuma das doses foi observada formação significativa de exsudato pleural.



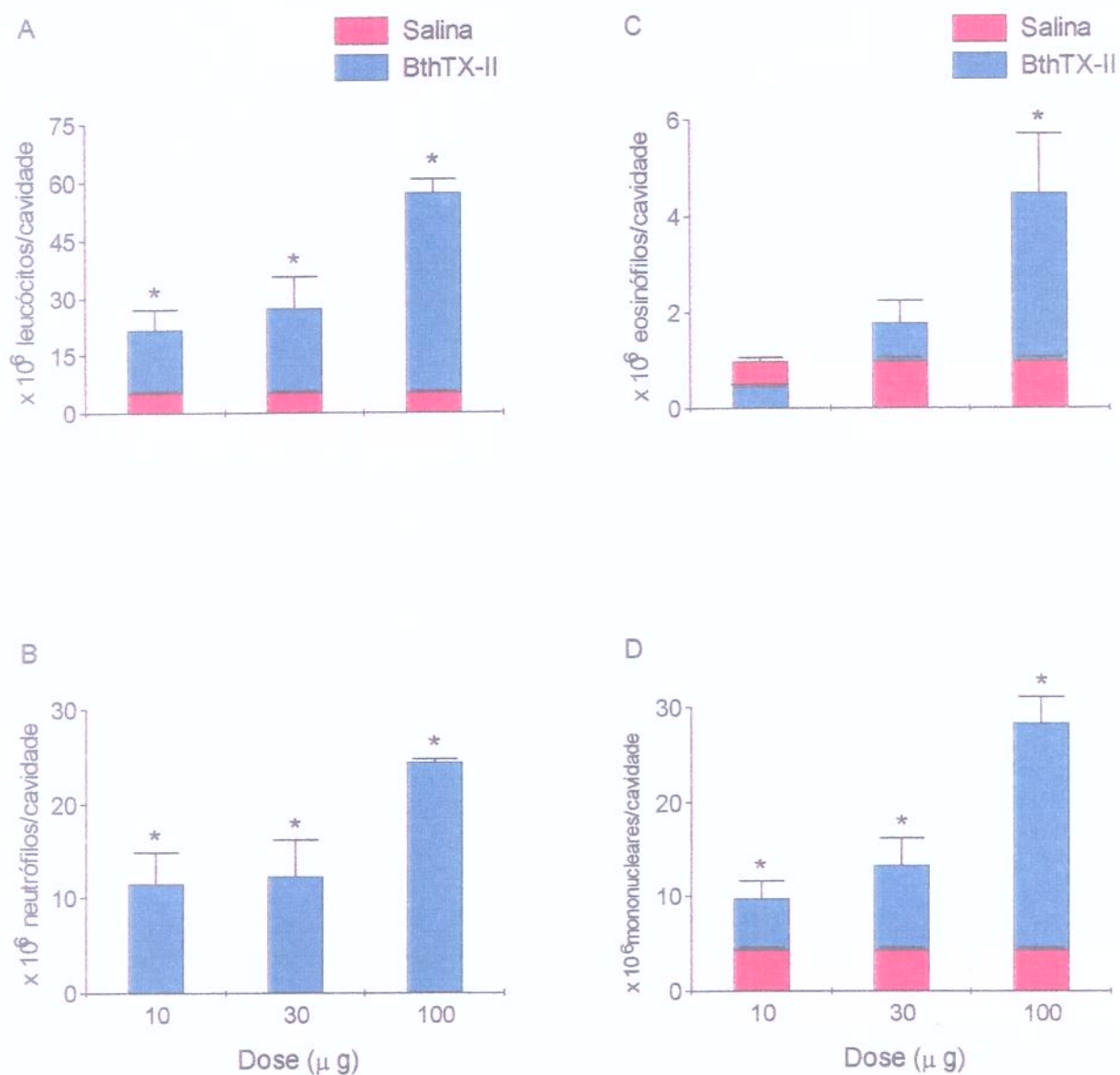
**FIGURA 11** - Efeito da injeção intrapleural da BthTX-I (10  $\mu$ g/cavidade) na migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) em intervalos de 6, 12 e 48 h após a injeção. Cada ponto representa a média de 6 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o grupo injetado com salina (0.1 ml;  $n=3$ ).



**FIGURA 12** - Migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) após a injeção intrapleural da BthTX-I (12 h) nas doses de 10, 30 e 100  $\mu$ g/cavidade. Cada ponto representa a média de 5 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , significativo comparando-se com o grupo controle injetado com salina (0.1 ml;  $n=4$ ).



**FIGURA 13** - Efeito da injeção intrapleural da BthTX-II (10 µg/cavidade) na migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) em intervalos de 6, 12 e 48 h após a injeção. Cada ponto representa a média de 6 ratos ± E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o grupo injetado com salina (0.1 ml;  $n=4$ ).

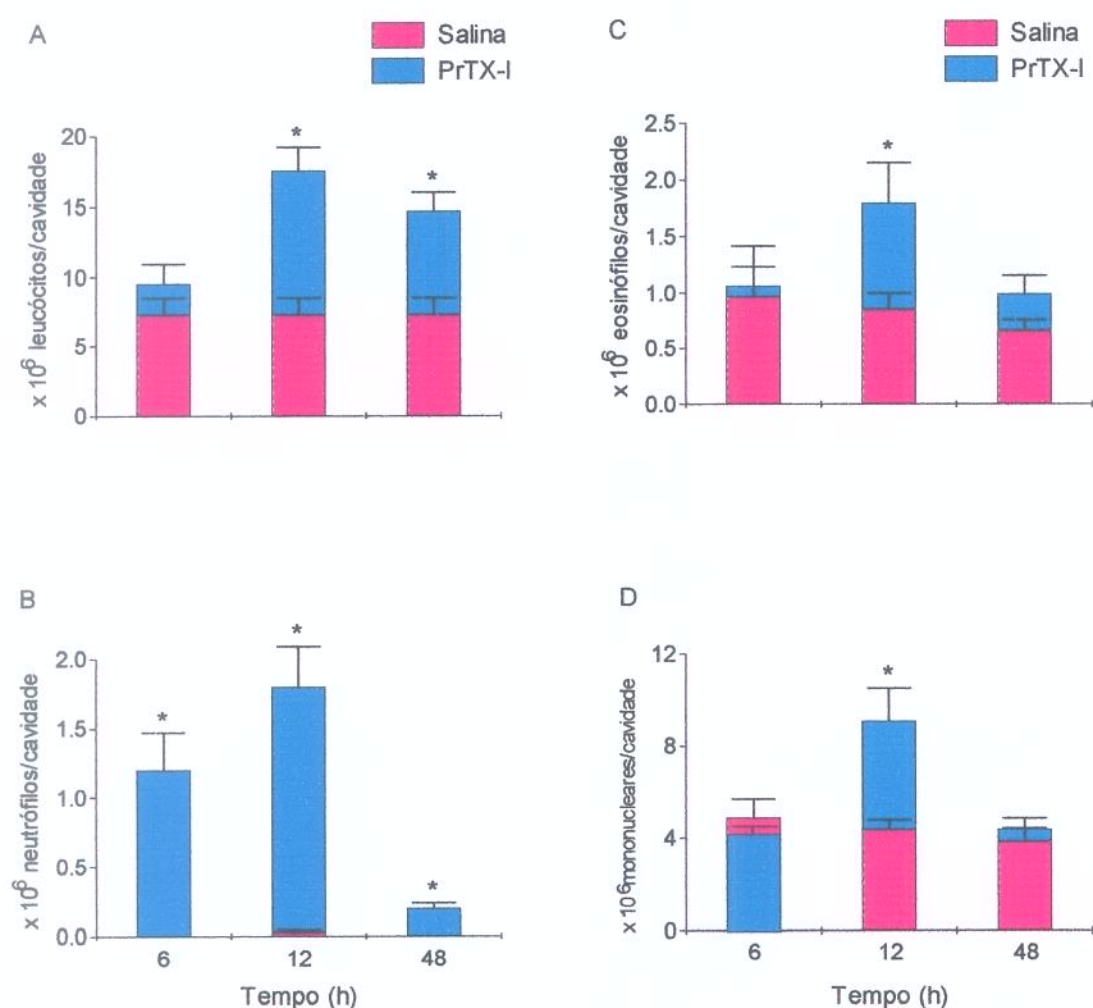


**FIGURA 14** - Migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) após a injeção intrapleural da BthTX-II (6 h) nas doses de 10, 30 e 100  $\mu$ g/cavidade. Cada ponto representa a média de 4-5 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , significativo comparando-se com o grupo controle injetado com salina (0.1 ml;  $n=3$ ).

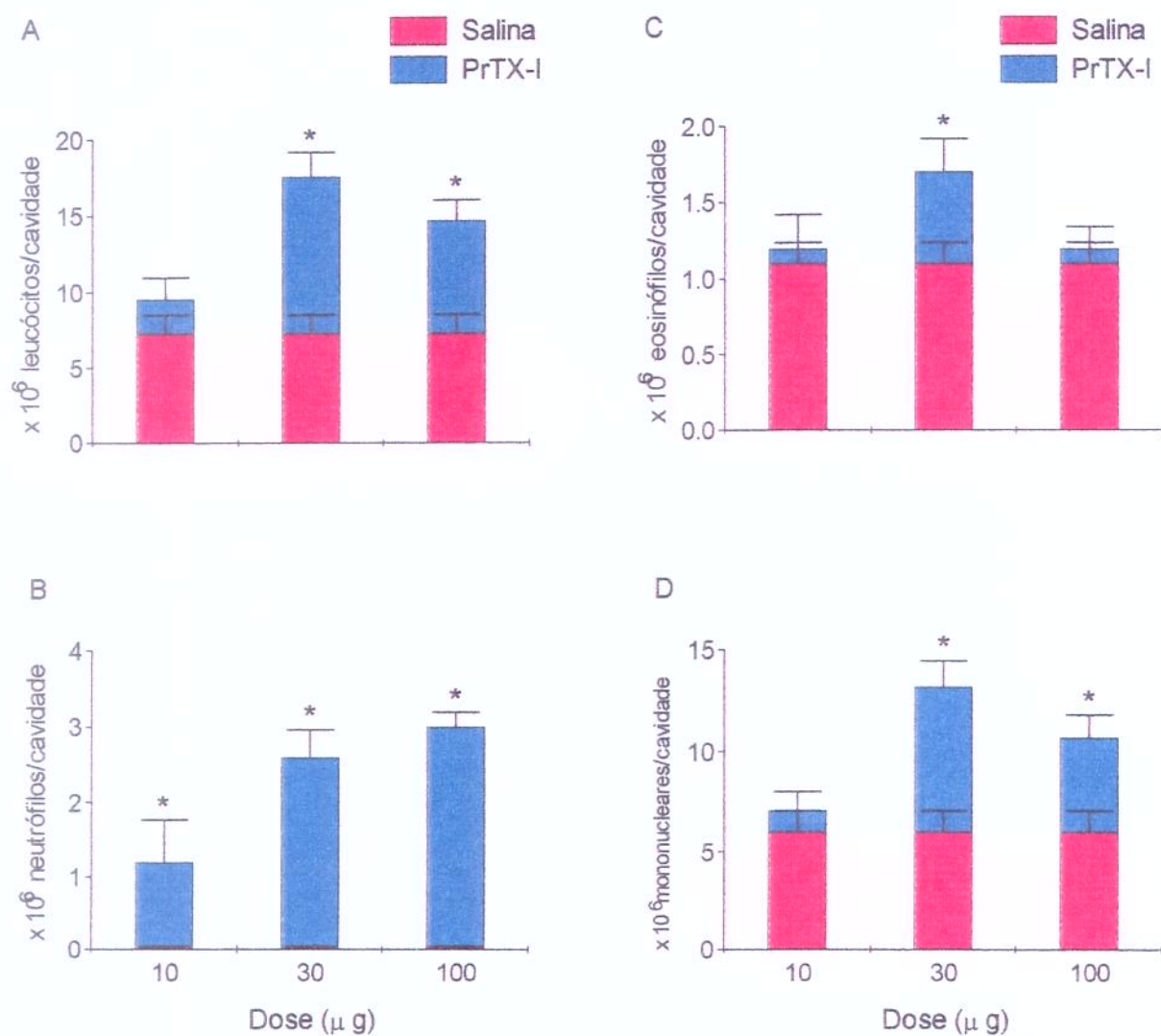
### 3.3.5. Piratoxina-I (PrTX-I)

A injeção intrapleural da PrTX-I (10  $\mu$ g/cavidade,  $n=6$ ) induziu migração leucocitária significativa no intervalo de 12 h após a injeção (Figura 15) sendo esta migração resultante de influxo significativo de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos (Figura 15).

No intervalo de 12 h, a resposta foi avaliada também para as doses de 30 e 100  $\mu$ g/cavidade ( $n=5$ , Figura 16). O influxo celular máximo foi observado com a dose de 30  $\mu$ g/cavidade. Com esta dose, observamos influxo de neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos (Figura 16). Não houve formação de exsudato pleural nos períodos de tempo estudados e doses utilizadas.



**FIGURA 15** - Efeito da injeção intrapleural da PrTX-I (10  $\mu$ g/cavidade) na migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) em intervalos de 6, 12 e 48 h após a injeção. Cada ponto representa a média de 5-6 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o grupo injetado com salina (0.1 ml;  $n=4$ ).



**FIGURA 16** - Migração de leucócitos totais (**Painel A**), neutrófilos (**Painel B**), eosinófilos (**Painel C**) e células mononucleares (**Painel D**) após a injeção intrapleural da PrTX-I (12 h) nas doses de 10, 30 e 100  $\mu$ g/cavidade. Cada ponto representa a média de 5-6 ratos  $\pm$  E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , significativo comparando-se com o grupo controle injetado com salina (0.1 ml;  $n=4$ ).

### 3.3.6. Efeito do brometo de $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB) na pleurisia induzida pela sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja*, BthTX-I, BthTX-II e PrTX-I

O tratamento com o  $\rho$ -BPB (veja secção de Métodos) foi efetivo visto que reduziu significativamente ( $p<0.05$ ) a atividade enzimática da sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* e BthTX-II (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra que o tratamento prévio da sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* (10  $\mu$ g/cavidade, 6 h;  $n=5$ ) com o inibidor enzimático  $\rho$ -BPB não causou redução significativa no conteúdo de leucócitos totais, neutrófilos, células mononucleares e eosinófilos quando comparada com o tratamento controle ( $n=4$ ).

A Tabela 2 mostra também que o tratamento prévio da BthTX-I (30  $\mu$ g/cavidade, 12 h;  $n=5$ ) e BthTX-II (30  $\mu$ g/cavidade, 6 h;  $n=5$ ) com o  $\rho$ -BPB não modificou o influxo celular total e diferencial em relação aos respectivos controles. O tratamento da PrTX-I (30  $\mu$ g/cavidade, 12 h;  $n=5$ ) com o  $\rho$ -BPB resultou em inibição parcial, porém significativa ( $p<0.05$ ), da migração celular induzida por esta enzima (Tabela 2).

**TABELA 1** - Atividade enzimática das sPLA<sub>2</sub>s controle e tratadas com brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB).

| sPLA <sub>2</sub>          | Atividade enzimática<br>( $\theta$ D.O. / min / $\mu$ g) |               |
|----------------------------|----------------------------------------------------------|---------------|
|                            | - $\rho$ -BPB                                            | + $\rho$ -BPB |
| veneno de <i>Naja naja</i> | 1.560                                                    | 0.062 *       |
| bothropstoxina-II          | 0.012                                                    | 0.000         |
| bothropstoxina-I           | 0.000                                                    | 0.000         |
| piratoxina-I               | 0.000                                                    | 0.000         |

Os resultados expressam a variação de densidade ótica ( $\theta$  D.O.; diminuição da absorbância em relação ao basal) por minuto por  $\mu$ g de proteína. Cada ponto representa a média de três determinações. \*  $p<0.05$ , comparando-se com o respectivo controle.

**TABELA 2** - Efeito do brometo de  $\rho$ -bromofenacil ( $\rho$ -BPB) sobre a migração de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares após a injeção intrapleural da sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja*, bothropstoxina-I (BthTX-I), bothropstoxina-II (BthTX-II) e piratoxina-I (PrTX-I).

| sPLA <sub>2</sub>                                                   | Leucócitos<br>(x 10 <sup>6</sup> / cavidade) | Controle    | + $\rho$ -BPB |
|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|---------------|
| veneno de <i>Naja naja</i><br>(5 µg/cavidade; 6 h)<br><i>n</i> =4-6 | LT                                           | 31.9 ± 4.91 | 23.4 ± 3.78   |
|                                                                     | NE                                           | 16.6 ± 2.12 | 12.0 ± 2.26   |
|                                                                     | EO                                           | 0.9 ± 0.11  | 0.8 ± 0.14    |
|                                                                     | MN                                           | 14.3 ± 3.04 | 10.6 ± 2.46   |
| BthTX-I<br>(30 µg/cavidade; 12 h)<br><i>n</i> =5                    | LT                                           | 19.2 ± 2.06 | 18.9 ± 3.47   |
|                                                                     | NE                                           | 3.8 ± 0.36  | 3.2 ± 0.33    |
|                                                                     | EO                                           | 2.2 ± 0.54  | 2.1 ± 0.45    |
|                                                                     | MN                                           | 13.2 ± 1.72 | 13.5 ± 2.71   |
| BthTX-II<br>(30 µg/cavidade; 6 h)<br><i>n</i> =5                    | LT                                           | 25.1 ± 1.80 | 21.3 ± 2.46   |
|                                                                     | NE                                           | 7.8 ± 1.01  | 5.2 ± 0.90    |
|                                                                     | EO                                           | 1.6 ± 0.44  | 1.4 ± 0.29    |
|                                                                     | MN                                           | 15.8 ± 0.82 | 14.6 ± 1.59   |
| PrTX-I<br>(30 µg/cavidade; 12 h)<br><i>n</i> =5                     | LT                                           | 27.8 ± 2.5  | 19.3 ± 1.60 * |
|                                                                     | NE                                           | 7.4 ± 0.85  | 4.4 ± 0.49 *  |
|                                                                     | EO                                           | 2.7 ± 0.18  | 2.1 ± 0.35    |
|                                                                     | MN                                           | 17.7 ± 2.18 | 12.9 ± 1.44   |

Os resultados representam o número de células/cavidade e estão expressos como Média ± E.P.M. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o respectivo controle. LT, leucócitos totais; NE, neutrófilos; EO, eosinófilos; MN, células mononucleares.

### 3.3.7. Envolvimento de mastócitos na pleurisia induzida pela sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja*, BthTX-I, BthTX-II e PrTX-I

#### 3.3.7.1. Efeito da ciproheptadina

O tratamento prévio dos animais com o antagonista do receptor de histamina/serotonina, ciproheptadina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes da injeção intrapleural) não alterou a migração total e diferencial induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* ( $n=5-6$ ; Tabela 3). A dose empregada de ciproheptadina foi eficiente uma vez que reduziu marcadamente o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (3 µg/pata;  $0.80 \pm 0.03$  ml e  $0.24 \pm 0.01$  ml, 30 min após a injeção de 48/80, animais controle e tratados respectivamente,  $n=5$ ;  $p<0.05$ ).

A tabela 3 mostra também que o tratamento prévio dos animais com ciproheptadina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes da injeção intrapleural) não alterou significativamente a migração induzida pela BthTX-II em 6 h (30 µg/cavidade,  $n=5$ ).

#### 3.3.7.2. Depleção dos estoques de histamina e 5-HT

A depleção dos estoques de histamina/5-HT foi realizada injetando-se diariamente por 5 dias consecutivos o composto 48/80 (veja a seção de Materiais e Métodos). Notamos que a depleção foi efetiva uma vez que o edema de pata induzido pelo composto 48/80 (3 µg/pata,  $n=4$ ) foi abolido no grupo tratado com este composto ( $1.03 \pm 0.06$  ml e  $0.10 \pm 0.03$  ml para grupo controle e depletado em 15 min, respectivamente).

A depleção dos estoques de histamina e 5-HT não alterou a migração leucocitária total induzida pela BthTX-I (30 µg/cavidade,  $n=8$ ; Tabela 4). Em relação à migração diferencial, não houve diferença significativa quanto ao número de neutrófilos. No entanto, houve uma redução parcial, porém significativa, do número de células mononucleares ( $p<0.05$ ). Curiosamente, o grupo depletado apresentou aumento significativo ( $p<0.05$ ) no número de eosinófilos. A possibilidade do aumento do número de eosinófilos ter sido decorrente do tratamento prolongado com 48/80 foi descartada uma vez que a depleção dos estoques de histamina e 5-HT não alterou o número de leucócitos totais e diferenciais contados 12 h após a injeção de salina estéril (0.1 ml) na cavidade pleural.

Com relação à BthTX-II e PrTX-I, a depleção de histamina e 5-HT não alterou a migração leucocitária total e diferencial induzida por estas sPLA<sub>2</sub>s (30 µg/cavidade,  $n=6-8$ ; Tabela 4).

**TABELA 3** - Efeito da ciproheptadina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes) sobre a migração de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares 6 h após a injeção intrapleural da sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* e bothropstoxina-II (BthTX-II).

| SPLA <sub>2</sub>                                            | Leucócitos<br>(x 10 <sup>6</sup> / cavidade) | Controle    | Ciproheptadina |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|----------------|
| veneno de <i>Naja naja</i><br>(5 µg/cavidade)<br><i>n</i> =5 | LT                                           | 32.1 ± 6.37 | 37.5 ± 2.08    |
|                                                              | NE                                           | 13.1 ± 2.18 | 18.2 ± 1.09    |
|                                                              | EO                                           | 2.9 ± 1.20  | 1.4 ± 0.27     |
|                                                              | MN                                           | 16.1 ± 3.41 | 17.9 ± 1.26    |
| BthTX-II<br>(30 µg/cavidade)<br><i>n</i> =5-6                | LT                                           | 24.8 ± 2.96 | 17.5 ± 2.04    |
|                                                              | NE                                           | 12.2 ± 2.26 | 8.0 ± 0.90     |
|                                                              | EO                                           | 1.3 ± 0.14  | 0.9 ± 0.18     |
|                                                              | MN                                           | 11.2 ± 1.39 | 8.6 ± 1.18     |

Os resultados representam o número de células/cavidade e estão expressos como Média ± E.P.M.. LT, leucócitos totais; NE, neutrófilos; EO, eosinófilos; MN, células mononucleares.

**TABELA 4** - Efeito da depleção do estoque de histamina/5-HT pelo tratamento diário com o composto 48/80 sobre a migração de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares após a injeção intrapleurar da bothropstoxina-I (BthTX-I), bothropstoxina-II (BthTX-II) e piratoxina-I (PrTX-I).

| SPLA <sub>2</sub>                          | Leucócitos<br>(x 10 <sup>6</sup> / cavidade) | Controle    | Depletado    |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------|--------------|
| BthTX-I<br>(30 µg/cavidade; 12 h)<br>n=5-6 | LT                                           | 12.2 ± 0.75 | 11.0 ± 0.59  |
|                                            | NE                                           | 1.3 ± 0.16  | 1.6 ± 0.26   |
|                                            | EO                                           | 1.3 ± 0.10  | 2.4 ± 0.16 * |
|                                            | MN                                           | 9.6 ± 0.55  | 7.0 ± 0.61 * |
| BthTX-II<br>(30 µg/cavidade; 6 h)<br>n=5   | LT                                           | 18.3 ± 1.20 | 21.1 ± 2.35  |
|                                            | NE                                           | 7.1 ± 0.74  | 10.1 ± 2.20  |
|                                            | EO                                           | 1.2 ± 0.23  | 1.8 ± 0.15   |
|                                            | MN                                           | 10.0 ± 0.57 | 9.1 ± 0.75   |
| PrTX-I<br>(30 µg/cavidade; 12 h)<br>n=8    | LT                                           | 16.4 ± 0.34 | 15.5 ± 0.39  |
|                                            | NE                                           | 4.2 ± 0.90  | 4.2 ± 0.37   |
|                                            | EO                                           | 2.1 ± 0.38  | 2.5 ± 0.36   |
|                                            | MN                                           | 10.2 ± 0.51 | 8.7 ± 0.68   |

Os resultados representam o número de células/cavidade e estão expressos como Média ± E.P.M.. \*  $p < 0.05$ , comparando-se com o respectivo controle. LT, leucócitos totais; NE, neutrófilos; EO, eosinófilos; MN, células mononucleares.

## 4. DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que a PrTX-I foi capaz de promover aumento de permeabilidade vascular em pele e pata de rato, levando à formação de edema. Este efeito foi devido à degranulação *in vivo* de mastócitos com consequente liberação de serotonina e histamina, visto que o pré-tratamento dos animais com ciproheptadina praticamente aboliu a atividade edematogênica desta sPLA<sub>2</sub>. Além disso, o fato desta substância ser capaz de ativar mastócitos *in vitro* confirma os resultados observados *in vivo*. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Landucci *et al.* (1998) para duas sPLA<sub>2</sub>s isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu* e com aqueles de Cirino *et al.* (1989) obtidos para sPLA<sub>2</sub>s de diversas fontes.

Moreno *et al.* (1992) e Lloret *et al.* (1993) sugeriram que a formação de edema, induzida pelas sPLA<sub>2</sub>s, está ligada à atividade enzimática destas enzimas. No entanto, nossos resultados demonstraram que a PrTX-I, uma sPLA<sub>2</sub> enzimaticamente inativa, induziu edema de pata e pele em ratos comparado às sPLA<sub>2</sub>s enzimaticamente ativas, utilizadas por aqueles autores. Estes dados sugerem que a hidrólise de fosfolípidos pelas sPLA<sub>2</sub>s não é essencial para formação de edema confirmando os resultados encontrados por Landucci *et al.* (1998) para as bothropstoxinas. De fato, muitos efeitos farmacológicos induzidos por sPLA<sub>2</sub>s purificadas de veneno não dependem da atividade enzimática destas enzimas (Kini & Evans, 1989).

O  $\rho$ -BPB atua como inibidor enzimático das sPLA<sub>2</sub>s e é largamente empregado para investigar a correlação entre atividade enzimática e farmacológica das sPLA<sub>2</sub>s (Yang, 1994). Este composto promove uma alquilação do resíduo de His-48 do sítio catalítico destas enzimas (Volwerk *et al.*, 1974). Apesar da PrTX-I ser desprovida de atividade enzimática por ser uma sPLA<sub>2</sub> Lys-49, esta sPLA<sub>2</sub> mantém o resíduo His-48. Assim, investigamos o efeito do  $\rho$ -BPB na atividade pró-inflamatória da PrTX-I. Nossos resultados demonstraram que este composto foi capaz de reduzir acentuadamente, tanto a formação de edema, quanto a degranulação de mastócitos *in vitro* induzidos pela PrTX-I. A hipótese desta inibição ter sido decorrente da desnaturação da PrTX-I durante o tratamento com o  $\rho$ -BPB foi descartada uma vez que foi realizado o devido controle. Resultados semelhantes foram observados para outras sPLA<sub>2</sub>s inativas enzimaticamente. Diaz *et al.* (1993) demonstraram que a reação da miotoxina II, uma sPLA<sub>2</sub> enzimaticamente inativa isolada do veneno de *Bothrops asper*, com o  $\rho$ -BPB reduziu sua atividade miotóxica. Recentemente, Landucci *et al.* (1998) demonstraram que o  $\rho$ -BPB reduz marcadamente a atividade edematogênica da BthTX-I e BthTX-II em ratos apesar das mesmas apresentarem atividade enzimática nula ou baixa,

respectivamente. Estes dados sugerem que, ao lado da alquilação da His-48 e consequente inibição enzimática das sPLA<sub>2</sub>s, o  $\rho$ -BPB pode ter um efeito adicional na atividade farmacológica destas enzimas. Como vários estudos já comprovaram a existência de receptores para as sPLA<sub>2</sub>s (Arita *et al.*, 1991; Lambeau *et al.*, 1994; Ancian *et al.*, 1995), nossos resultados sugerem que o resíduo de histidina-48 da PrTX-I deve participar de seu sítio farmacológico, ou seja, ter importância na ligação da PrTX-I a um possível receptor. Desta maneira, nós sugerimos cautela quanto ao uso do  $\rho$ -BPB como ferramenta para avaliar o papel da atividade enzimática nos efeitos biológicos induzidos pelas sPLA<sub>2</sub>s.

Compostos ricos em cargas catiônicas como a poliarginina e a polilisina ativam mastócitos de rato *in vitro* (Coleman *et al.*, 1981) e *in vivo* (Antunes *et al.*, 1990; Santana *et al.*, 1993) e este efeito é largamente reduzido por moléculas polianiónicas incluindo a heparina e seus análogos. A ativação de mastócitos pelos polications acontece pela interação eletrostática destes com os sítios aniônicos constituintes da membrana plasmática destas células, principalmente os glicosaminoglicanos sulfatados (Shwartz, 1994). As sPLA<sub>2</sub>s do grupo II são proteínas básicas e seus sítios catiônicos podem se associar com a superfície celular via glicosaminoglicanos (Murakami *et al.*, 1993; Sartipy *et al.*, 1996). Além disso, têm sido demonstrado que glicosaminoglicanas da família da heparina são capazes de formar complexos com sPLA<sub>2</sub>s como a miotoxina II purificada do veneno de *Bothrops asper* (Lomonte *et al.*, 1994a) e BthTX-I purificada do veneno de *Bothrops jararacussu* (Melo *et al.*, 1993) anulando, assim, a atividade miotóxica destas enzimas. Assim, investigamos o efeito da heparina na atividade pró-inflamatória da PrTX-I. Nossos resultados mostraram que a heparina inibiu a degranulação de mastócitos pela PrTX-I tanto *in vitro* quanto *in vivo* sugerindo que as cargas catiônicas presentes nesta molécula são o principal fator responsável por suas propriedades farmacológicas. Resultados similares foram encontrados para sPLA<sub>2</sub>s de outros venenos como o de *Trimeresurus mucrosquamatus* (Wang e Teng, 1990) e *Bothrops jararacussu* (Landucci *et al.*, 1998).

Diante do exposto, parece existir grande contraste quanto aos resultados acima apresentados e aqueles obtidos por Choi *et al.* (1989) e Lloret *et al.* (1993), pois estes últimos demonstraram que a degranulação de mastócitos induzido por sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* é dependente da atividade enzimática desta enzima. Vale ressaltar que a sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* é uma enzima do grupo I e, portanto, bioquimicamente distinta da PrTX-I que pertence ao grupo II. Dessa forma, acreditamos que estas diferenças possam ser decorrentes deste fato. Com isso, consideramos que, como ferramenta farmacológica para investigar o papel da sPLA<sub>2</sub> do grupo II identificada em doenças inflamatórias humanas, os resultados obtidos com a PrTX-I e outras sPLA<sub>2</sub>s do grupo II possa contribuir mais que aqueles encontrados para as sPLA<sub>2</sub>s do grupo I.

De fato, nossos dados são semelhantes àqueles encontrados por Murakami *et al.* (1993) que estudaram a degranulação de mastócitos induzida pela sPLA<sub>2</sub> do grupo II purificada de plaquetas de rato. Estes autores demonstraram que os sítios de ligação desta enzima com a heparina são importantes para degranulação de mastócitos uma vez que este poliânion inibiu significativamente este efeito. Além disso, mostraram também que o sítio catalítico é essencial para a degranulação induzida por esta enzima, uma vez que o inibidor enzimático  $\rho$ -BPB e um anticorpo que reconhece o sítio catalítico desta enzima reduziram de forma significativa a degranulação. Curiosamente, os autores sugerem que a atividade enzimática desta sPLA<sub>2</sub> não deve ser importante neste processo uma vez que não houve aumento da produção de PGD<sub>2</sub> e nem requerimento de Ca<sup>++</sup> quando os mastócitos foram estimulados pela sPLA<sub>2</sub>. Considerando a ação inibitória do  $\rho$ -BPB sobre o edema induzido pela PrTX-I, os resultados encontrados por Murakami *et al.* (1993) poderiam ser explicados da mesma forma, ou seja, o resíduo de His-48 (complexado pelo  $\rho$ -BPB ou pelo anticorpo), além de fundamental para atividade enzimática, deve ser importante para um possível sítio farmacológica desta enzima.

Fonteh *et al.* (1994) estudaram a participação da sPLA<sub>2</sub> endógena na degranulação de mastócitos induzida pela interação antígeno (anti-dinitrofenol) - anticorpo (IgE). Estes autores demonstraram que a ativação de mastócitos de medula óssea por antígenos leva à rápida liberação de ácido araquidônico (Fonteh *et al.*, 1993) decorrente da liberação de sPLA<sub>2</sub> do grupo II pelo mastócito. Além disso, mostraram que a sPLA<sub>2</sub> recombinante humana do grupo II (rPLA<sub>2</sub>) induziu a geração de eicosanóides no sobrenadante da cultura de mastócitos. No entanto, os próprios autores não descartam a possibilidade da produção de eicosanóides ser devido à ativação da cPLA<sub>2</sub>, também presente em mastócitos.

Por outro lado, é surpreendente notar que a rPLA<sub>2</sub> não foi edematogênica em ratos (Morgan *et al.*, 1993; Cirino *et al.*, 1994a), o que sugere que a rPLA<sub>2</sub> *per se* não é capaz de induzir degranulação de mastócitos do tecido subplantar de ratos. Este dado contrapõe os resultados da ação da rPLA<sub>2</sub> em mastócitos peritoneais encontrados por Fonteh *et al.* (1993).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a atividade edematogênica das sPLA<sub>2</sub> não está necessariamente ligada à atividade enzimática destas enzimas uma vez que a PrTX-I induziu formação de edema e degranulação de mastócitos à semelhança de outras sPLA<sub>2</sub>s enzimaticamente ativas. O efeito da PrTX-I parece ser decorrente de um possível sítio farmacológico presente nesta sPLA<sub>2</sub>, formado principalmente por cargas catiônicas distribuídas na molécula, sendo uma delas formada pelo resíduo de His-48.

Além da formação de edema e degranulação de mastócitos, a migração celular induzida pelas sPLA<sub>2</sub>s também foi objeto de estudo deste trabalho. Assim, demonstramos que tanto as sPLA<sub>2</sub>s de

*Naja naja*, pancreática bovina e BthTX-II (ativas enzimaticamente), como a BthTX-I e piratoxina-I (destituídas de atividade enzimática), induziram migração leucocitária para cavidade pleural de ratos de forma dose e tempo-dependentes, porém com diferenças quanto ao perfil da migração.

Nos tempos em que o infiltrado celular foi medido (6, 12 e 48 h), a sPLA<sub>2</sub> pancreática, do veneno de *Naja naja* e a BthTX-II, induziram um maior grau de migração em 6 h, sendo que o infiltrado celular foi constituído, principalmente, por neutrófilos e células mononucleares. Entretanto, o pico de infiltração celular induzido pela BthTX-I e PrTX-I foi em 12 h e formado, tanto por células mononucleares e neutrófilos, como também por eosinófilos. Além disso, a magnitude do efeito da sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* e da BthTX-II foi maior do que a da BthTX-I, PrTX-I e sPLA<sub>2</sub> pancreática. Este fato poderia refletir a atividade catalítica destas enzimas. No entanto, quando comparamos a migração leucocitária induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* e pela BthTX-II, observamos que a primeira é aproximadamente três vezes mais potente do que a segunda (ambas com pesos moleculares aproximado de 14 KDa). Porém, é conhecido que a atividade enzimática da sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* é muitas vezes maior que a da BthTX-II. Os dados de ensaio enzimático obtidos em nosso laboratório mostram essa diferença (Tabela 1). Assim, esperava-se que, em virtude de seu poder catalítico marcadamente maior, a sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* apresentasse um maior grau de potência com relação à migração celular o que, de fato, não ocorreu. Estes dados, juntamente com o fato das sPLA<sub>2</sub>s enzimaticamente inativas BthTX-I e PrTX-I apresentarem efeito na migração celular, demonstram, a priori, que este efeito farmacológico também não é decorrente da atividade enzimática, mas provavelmente de outros fatores relacionados com a estrutura destas moléculas.

O resultado do tratamento destas enzimas com o brometo de *p*-bromofenacil confirmam esta hipótese. Este composto não alterou a migração induzida pela sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja*, BthTX-I e BthTX-II. A hipótese de não ter ocorrido inibição da atividade enzimática da BthTX-II ou da sPLA<sub>2</sub> de *Naja naja* foi descartada uma vez que comprovamos esta inibição realizando ensaio enzimático após o tratamento (ver item 3.10.). Além disso, descartamos a possibilidade de alterações na estrutura proteica destas enzimas durante o tratamento uma vez que utilizamos para o controle dos experimentos as amostras que passaram pelo tratamento controle. Sendo assim, sugerimos que a hidrólise de fosfolípidos por estas sPLA<sub>2</sub>s não é essencial para a infiltração leucocitária para cavidade pleural.

Como já foi citado, nós temos sugerido que o resíduo de histidina-48 pode ser importante para atividade farmacológica das sPLA<sub>2</sub>s, já que o *p*-BPB apresentou efeito inibitório em algumas atividades pró-inflamatórias da BthTX-I (Landucci *et al.*, 1998) e PrTX-I. Desta forma, estudamos o efeito deste composto na migração celular induzida pela BthTX-I e PrTX-I. Apesar do *p*-BPB não apresentar efeito na migração induzida pela BthTX-I, este composto reduziu parcialmente a

migração induzida pela PrTX-I. Este resultado contrapõe a observação de que o perfil da atividade farmacológica destas duas sPLA<sub>2</sub>s Lis-49 apresenta um alto grau de semelhança. Sendo assim, é interessante notar que o resíduo de histidina-48 é importante na migração celular induzida pela PrTX-I e não pela BthTX-I e BthTX-II.

Nossos dados se opõem aos de outros estudos que demonstram que a atividade farmacológica da sPLA<sub>2</sub> do grupo II parece estar relacionada com sua atividade enzimática (Vadas *et al.*, 1986; Vadas *et al.*, 1989; Bomalaski *et al.*, 1991). Além disso, Lam *et al.* (1990) demonstraram que sPLA<sub>2</sub>s de plaquetas humanas induzem a formação de leucotrienos em leucócitos polimorfonucleares humanos e, sugerem que os efeitos pró-inflamatórios celulares induzidos pela sPLA<sub>2</sub> humana poderiam ser o resultado da produção de eicosanóides tais como PGE<sub>1</sub> e LTB<sub>4</sub>. Neste estudo, não foi aventada a possibilidade de coexistência de outras vias de liberação de ácido araquidônico uma vez que já é sabido da existência de várias formas de PLA<sub>2</sub> na mesma célula (Balsinde *et al.*, 1994; Murakami *et al.*, 1992a). Marshall *et al.* (1993) descreveram a coexistência da sPLA<sub>2</sub> e da cPLA<sub>2</sub> em neutrófilos. Além disso, Murakami *et al.* (1993) sugeriram que a sPLA<sub>2</sub> pode induzir a atividade da cPLA<sub>2</sub> em mastócitos.

Por outro lado, nossos resultados corroboram alguns estudos que não encontraram correlação entre a migração celular e a atividade enzimática das sPLA<sub>2</sub>s. Cirino *et al.* (1994b) demonstraram que a sPLA<sub>2</sub> recombinante humana de fluido sinovial produziu infiltrado celular em modelo de “air pouch” em ratos e esta resposta não foi relacionada com produção de PGE<sub>2</sub>, TxB<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub> ou LTB<sub>4</sub>. Utilizando o mesmo modelo experimental, Payá *et al.* (1995) demonstraram que o *scalaradial*, um inibidor específico para sPLA<sub>2</sub>, foi capaz de inibir parcialmente a migração leucocitária induzida pelo zimosan, sem alterar de modo significativo a produção de prostaglandinas. Dessa maneira, sugeriram que a sPLA<sub>2</sub> participa no fenômeno da migração celular, mas que a produção de eicosanóides ocorre independentemente desta enzima. Neste sentido, observaram que o pico da migração celular coincidiu com a atividade máxima da sPLA<sub>2</sub> (8 h), enquanto que a produção de eicosanóides atingiu o máximo em 4 h. Resultados semelhantes foram encontrados por Tesson *et al.* (1993) que demonstraram, usando o modelo de pleurisia induzida por carragenina ou zimosan em ratos, que a liberação de TxB<sub>2</sub> é consequência da atividade de uma PLA<sub>2</sub> associada à membrana celular e não da presença da sPLA<sub>2</sub> no exsudato inflamatório. Uma vez que a atividade catalítica destas enzimas parece não ser essencial para indução de migração celular, torna-se importante estabelecer os prováveis mecanismos envolvidos neste efeito farmacológico.

Landucci *et al.* (1998) demonstraram que a ciproheptadina foi capaz de inibir completamente a formação de edema em pata e pele de ratos induzida pela BthTX-I e BthTX-II. O mesmo resultado foi observado para a PrTX-I no presente estudo e para sPLA<sub>2</sub> do veneno de *Naja naja* e pancreática

porcina (Lloret *et al.*, 1993). Também demonstramos, neste estudo, que a degranulação de mastócitos peritoneais pelas bothropstoxinas e piratoxina-I não está necessariamente ligado à atividade catalítica. Estes dados sugerem que estas sPLA<sub>2</sub>s poderiam induzir migração leucocitária através da degranulação de mastócitos pleurais. Martins *et al.* (1990) estudaram a migração de leucócitos induzida por composto 48/80, um agente capaz de degranular mastócitos. Estes autores demonstraram que, em 6 h, existe uma migração significativa de células mononucleares e neutrófilos e, em 24 h, observa-se uma migração significativa de eosinófilos. Além disso, verificaram que as duas fases da resposta (6 e 24 h) são dependentes da degranulação de mastócitos. Em relação à segunda fase, em particular, demonstraram que esta migração é dependente do fator quimiotático para eosinófilo, uma proteína solúvel sintetizada e liberada por mastócitos estimulados pelo 48/80.

Nossos resultados demonstram que o tratamento prolongado com 48/80 não alterou a migração leucocitária induzida pela BthTX-I, BthTX-II e PrTX-I. A eficácia do tratamento foi confirmada conduzindo um experimento paralelo onde o edema de pata induzido pelo composto 48/80 estava inibido. Sendo assim, ao contrário do aumento de permeabilidade vascular, a migração leucocitária induzida por estas sPLA<sub>2</sub>s aparentemente não depende da degranulação de mastócitos e a consequente liberação de mediadores quimiotáticos como o fator quimiotático para eosinófilo da anafilaxia e outros (Wasserman *et al.*, 1974; Oertel & Kaliner, 1981).

Por outro lado, é interessante notar que o tratamento prolongado com 48/80 provocou um aumento significativo do número de eosinófilos na pleurisia induzida pela BthTX-I. Este resultado poderia ser decorrente do próprio tratamento com 48/80 que estaria provocando um aumento no número basal de eosinófilos. No entanto, os resultados obtidos com a injeção de salina em animais depletados e controle mostraram que o tratamento prolongado dos animais não altera o número basal de eosinófilos da cavidade pleural. Sendo assim, acreditamos que o aumento observado tenha sido resultante de variações inerentes à própria metodologia.

Os diferentes resultados observados quanto ao perfil de inibição da heparina na degranulação de mastócitos do tecido subplantar, derme e peritônio induzida pelas bothropstoxinas (Landucci *et al.*, 1998) e PrTX-I (presente estudo) sugerem que poderiam existir diferenças na degranulação de mastócitos pleurais e peritoneais por estas sPLA<sub>2</sub>s, mesmo considerando que estas células pertencem à mesma população (tecido conjuntivo; Schwartz *et al.*, 1994). Desta forma, mastócitos pleurais poderiam não responder como os peritoneais frente às sPLA<sub>2</sub>s. Sendo assim, estudamos a degranulação dos mastócitos pleurais em comparação com os peritoneais para as bothropstoxinas e PrTX-I. Os resultados demonstraram que estas sPLA<sub>2</sub>s são equipotentes na degranulação destas duas populações de mastócitos. Além disso, a heparina e o  $\rho$ -BPB apresentaram o mesmo perfil de ação nestas populações. Dessa maneira, podemos considerar que os mastócitos pleurais respondem

essencialmente através dos mesmos mecanismos envolvidos na degranulação de mastócitos peritoneais frente às bothropstoxinas e PrTX-I. Com isso, descartamos a hipótese de que estas sPLA<sub>2</sub>s não são capazes de induzir a degranulação de mastócitos pleurais.

A ausência de correlação entre degranulação de mastócitos e migração celular induzida pelas sPLA<sub>2</sub>s observada no presente trabalho pode ser correlacionada com a sPLA<sub>2</sub> humana do tipo II. Apesar de ter sido demonstrado (Cirino *et al.*, 1994b) que a sPLA<sub>2</sub> recombinante humana de fluido sinovial produz infiltrado celular no modelo de “air pouch”, Murakami *et al.* (1990) demonstraram que a mesma enzima não induz edema de pata em ratos e, portanto, não promove degranulação de mastócitos. Sendo assim, parece que o efeito quimiotático desta enzima também é independente da degranulação de mastócitos.

Estes resultados indicam que a migração leucocitária induzida pelas sPLA<sub>2</sub>s pode ser resultante da neoformação de mediadores quimiotáticos (LTB<sub>4</sub>, PAF, citocinas) de tipos celulares como o macrófago presentes na cavidade pleural. Visto que a migração induzida por estas sPLA<sub>2</sub>s não está necessariamente ligada à atividade catalítica das mesmas, sugerimos que a síntese destes possíveis mediadores estaria ocorrendo por um mecanismo independente da atividade fosfolipásica destas sPLA<sub>2</sub>s. Alternativamente, a migração celular induzida pelas sPLA<sub>2</sub>s poderia ser devido a uma ação direta destas enzimas nos fenômenos envolvidos neste processo tais como adesão às células endoteliais e quimiotaxia. Esta ação poderia ocorrer pela ativação de possíveis receptores para sPLA<sub>2</sub>s presentes na superfície celular de leucócitos.

Assim, nossos dados demonstram que a atividade enzimática das sPLA<sub>2</sub>s não é essencial para atividade farmacológica tais como aumento da permeabilidade e migração celular induzidos por estas enzimas. Além disso, confirmamos que o aumento de permeabilidade induzido pelas sPLA<sub>2</sub>s é resultante da degranulação de mastócitos e consequente liberação de histamina/5-HT. No entanto, a migração leucocitária induzida pelas bothropstoxinas e piratoxina-I para cavidade pleural de ratos independe da degranulação dos mastócitos pleurais possivelmente pelo fato da degranulação não levar à liberação de quantidades suficientes de mediadores que poderiam exercer algum efeito quimiotático.

## 5. SUMMARY

Bothropstoxin I (BthTX-I) and Bothropstoxin II (BthTX-II) are sPLA<sub>2</sub>s homologues with myotoxic activity isolated from *Bothrops jararacussu* venom. The former is devoided of enzymatic activity in egg yolk lecithin whereas the latter has low phospholipase activity in this substrate. Piratoxin-I (PrTX-I) is a PLA<sub>2</sub> homologue with myotoxic activity isolated from *Bothrops pirajai* venom. This sPLA<sub>2</sub> is also devoided of enzymatic activity. The aim of this study was to investigate the ability of PrTX-I, BthTX-I and BthTX-II to induce leucocyte migration compared with *Naja naja* PLA<sub>2</sub> (known to contain high enzymatic activity) and bovine pancreatic PLA<sub>2</sub> (known to contain intermediate enzymatic activity). We have also investigate the role of mast cells in the leucocyte migration induced by PrTX-I, BthTX-I and BthTX-II.

Leucocyte migration was determined through of the injection of sPLA<sub>2</sub>s into the pleural cavity of male Wistar rats under ether anaesthesia. The animals were killed at 6, 12 and 48 h later and the pleural cavity rinsed with 5 ml of PBS containing heparin (20 IU/ml). Total and differential leucocyte counts were evaluated in the pleural exudate.

*Naja naja* PLA<sub>2</sub> (10 µg/cavity) and BthTX-II (30 µg/cavity) induced a dose- and time-dependent rat pleural leucocyte influx characterized by an early neutrophil and mononuclear cells infiltration (6 h). This migration was followed by a late eosinophil and mononuclear cells influx (12 h) in the *Naja naja* PLA<sub>2</sub>- induced pleurisy. BthTX-I and PrTX-I (30 µg/cavity each) induced dose- and time-dependent rat pleural leucocyte influx characterized by an infiltration of neutrophils, eosinophils and mononuclear cells at 12 h. *p*-Bromophenacyl bromide (*p*-BPB), a compound known to inhibit phospholipase A<sub>2</sub> activity, abolished the enzymatic activity of *Naja naja* PLA<sub>2</sub> and BthTX-II but it had no effect on the pleurisy induced by *Naja naja* PLA<sub>2</sub>, BthTX-I and BthTX-II. Interestingly, *p*-bromophenacyl partially reduced the PrTX-I-induced pleurisy. Previous treatment of the animals with cyproheptadine (10 mg/kg, i.p.) did not affect the pleurisy induced by *Naja naja* PLA<sub>2</sub> and BthTX-II. The depletion of histamine and 5-HT stores by repeated injections of compound 48/80 also failed to modify the pleurisy induced by BthTXs and PrTX-I. Our results demonstrate that pleurisy mediated by *Naja naja* PLA<sub>2</sub>, BthTX-I, BthTX-II and PrTX-I is not dependent on pleural mast cell degranulation. Furthermore, hydrolysis of phospholipids by these sPLA<sub>2</sub>s is not essential for the pleural leucocyte infiltration.

In the second part of this study the aim was to investigate the ability of PrTX-I to induce local oedema formation in both rat paw and skin *in vivo*. The importance of their catalytic and cationic sites were evaluated using *p*-BPB and heparin, respectively.

Male Wistar rats were used. Paw oedema was induced by a subplantar injection of PrTX-I into the left hind-paw of animals and paw volume was measured using a hydroplethysmometer. Skin oedema formation was measured as the local accumulation of i.v. injected [ $^{125}$ I]-human serum albumin into the skin sites of anaesthetized rats (Sagatal; 30 mg/kg, i.p.). *In vitro* pleural and peritoneal mast cells degranulation was carried out by measuring the released [ $^{14}$ C]5-HT using a  $\beta$  counter.

PrTX-I caused dose-dependent rat paw and skin oedema. These oedematogenic activity were largely reduced in animals pretreated with cyproheptadine (2 mg/Kg, i.p. 0.5 h before). Similarly,  $\rho$ -BPB significantly inhibited rat paw and skin oedema induced by PrTX-I. The polyanion heparin significantly reduced the paw oedema (50 IU/paw) as well as the skin oedema (5 IU/site) induced by PrTX-I. In addition, PrTX-I (100  $\mu$ g/ml) caused *in vitro* pleural and peritoneal mast cells degranulation.  $\rho$ -BPB and heparin (50 IU/ml) significantly inhibited the [ $^{14}$ C]5-HT release induced by PrTX-I in both pleural and peritoneal mast cells.

Our results indicate that oedema formation induced by PrTX-I is mostly dependent on *in vivo* mast cell degranulation. Since heparin reduced the oedematogenic activity of this sPLA<sub>2</sub> homologue, it is likely that the cationic charge of this substance plays a role in the mast cell activation. Our results also indicate that  $\rho$ -bromophenacyl bromide may not be a suitable pharmacological tool to investigate the correlation between enzymatic activity and the inflammatory effects of phospholipases A<sub>2</sub>.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, N.G.; Teller, D.C.; Bienkowski, M.J.; McMullen, B.A.; Lipkin, E.W. & de Haen, C. (1988). Sedimentation equilibrium analysis of five lipocortin-related phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from human placenta. Evidence against a mechanistically relevant association between enzyme and inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 263: 18657-18663.
- Amaral, C.F.S.; Silva, O.A.; Godoy, P. & Miranda, D. (1985). Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon*, 23: 877-885.
- Amaral, C.F.S.; Rezende, N.A.; Silva, O.A.; Ribeiro, M.M.F.; Magalhães, R.A.; Reis, R.J.; Carneiro, J.G. & Castro, J.R.S. (1986). Insuficiência renal aguda secundária acidentes ofídicos Botrópico e Crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 28: 220-227.
- Ancian, P.; Lambeau, G.; Mattéi, M-G. & Lazdunski, M. (1995). The human 180-KDa receptor for secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, 270(15): 8963-8970.
- Antunes, E.; Mariano, M.; Cirino, G.; Levi, S. & De Nucci, G. (1990). Pharmacological characterization of polycation-induced rat hind-paw oedema. *Br. J. Pharmacol.* 101: 986-990.
- Arita, H.; Hanasaki, K.; Nakano, T.; Oka, S.; Teraoka, H. & Matsumoto, K. (1991). Novel proliferative effect of phospholipase A<sub>2</sub> in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *J. Biol. Chem.*, 266(29): 19139-19141.
- Azevedo-Marques, M.M.; Cupo, P.; Coimbra, T.M.; Hering, S.E.; Rossi, M.A. & Laure, C.J. (1982). Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus* envenomation in Brazil). *Toxicon*, 23: 631-636.
- Balsinde, J.; Baubour, S.E.; Bianco, I.D. & Dennis, E.A. (1994). Arachidonic acid mobilization in P388D<sub>1</sub> macrophages is controlled by two distinct Ca<sup>++</sup>-dependent phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Proc. Natl. Acad. Scin. U.S.A.*, 91: 11060-11064.

- Berkenkopf, J.W.; Marinari, L.R. & Weichman, B.M. (1991). Phospholipase A<sub>2</sub> acyl-hydrolytic activity in rat RPAR-induced pleurisy. *Agents and Action*, **34**(1/2): 93-96.
- Berridge, M.J. (1987). Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**: 159-193.
- Bevilacqua, M.P.; Stengalin, S.; Gimbrone, M.A. & Seed, B. (1989). Endothelium leukocyte adhesion molecule-1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, **243**: 1160.
- Blackwell, G.J. & Flower, R.J. (1983). Inhibition of phospholipase. *Br. Med. Bull.*, **39**: 260-264.
- Bomalaski, J.S.; Lawton, P. & Browning, J.L. (1991). Human extracellular recombinant phospholipase A<sub>2</sub> induces an inflammatory response in rabbit joints. *J. Immunol.*, **146**: 3904-3910.
- Bon, C.; Changeux, T.J. & Fraenkel-Conrat, H. (1979). Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.*, **99**: 471-481.
- Bon, C. (1982). Synergism of the two subunits of crotoxin. *Toxicon*, **2**: 105-109.
- Bonta, I.L.; Vargaftig, B.B. & Bohm, G.M. (1979). *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52, pp. 629-683 (Lee, C.Y., Ed.). Berlin: Springer.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brain, S.; Lewis, G.P. & Whittle, B.J.R. (1977). Action of phospholipase A<sub>2</sub> on mast cell histamine release and paw oedema in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, **59**: 440P.
- Brain, S.D. & Williams, T.J. (1985). Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.*, **86**: 855-860.

- Brazil, O.V. (1966). Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan*, 33: 981-992.
- Bray, M.A.; Cunningham, F.M.; Ford-Hutchinson, A.W. & Smith, M.J.H. (1981). Leukotriene B<sub>4</sub>: A mediator of vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.*, 72: 483-486.
- Canduri, F.; Mancuso, L.C.; Soares, A.M.; Giglio, J.R.; Ward, R.J. & Arni, R.K. (1998). Crystallization of piratoxin I, a myotoxic Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of *Bothrops pirajai*. *Toxicon*, 36(3): 547-551.
- Choumet, V.; Saliou, B.; Fideler, L.; Chen, Y. & Gubensek, F. (1993). Snake-venom phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins. *Eur. J. Biochem.*, 211: 57-62.
- Choi, S.H.; Sakamoto, T.; Fukutomi, O.; Inagaki, N.; Matsuura, N.; Nagai, H. & Koda, A. (1989). Pharmacological study of phospholipase A<sub>2</sub>-induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *J. Pharmacobio-Dyn.*, 12: 517-522.
- Cintra, A.C.O.; Marangoni, S.; Oliveira, B. & Giglio, J.R. (1993). Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Prot. Chem.*, 12: 57-64.
- Cirino, G.; Peers, S.H.; Flower, R.J.; Browning, J.L. & Pepinsky, R.B. (1989). Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 3428-3432.
- Cirino, G.; Peers, S.H.; John, L.W. & Flower, R.J. (1989). A study of phospholipase A<sub>2</sub>-induced oedema in rat paw. *Euro. J. Pharmacol.*, 166: 505-510.
- Cirino, G.; Cicala, C.; Sorrentino, L.; Maiello, F.M. & Browning, J.L. (1994a). Human recombinant platelet phospholipase A<sub>2</sub> exacerbates poly-L-arginine induced rat paw oedema. *Inflammation*, 18: 59.

- Cirino, G.; Cicala, C.; Sorrentino, L.; Maiello, F.M. & Browning, J.L. (1994b). Recombinant secreted non pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> induces a synovitis-like inflammation in the rat air pouch. *J. Rheumatol.*, 21: 824.
- Clark, M.A.; Chen, M.; Crooke, S.T. & Bomalaski, J.S. (1988). Tumor necrosis factor (cachetin) induces phospholipase A<sub>2</sub> activity and synthesis of phospholipase A<sub>2</sub> activating protein in endothelial cells. *Biochem. J.*, 250: 125.
- Coleman, J.W.; Holgate, S.T.; Church, M.K; Godfrey, R.C. (1981). Immunoglobulin E decapeptide-induced 5-hydroxytryptamine release from rat peritoneal mast cells. *Biochem. J.*, 198: 615-619.
- Condrea, E.; Rapuano, B.E., Fletcher, J.E.; Yang, C.C. & Rosenberg, P. (1981). Effects of arginine modification of *Naja nigricollis* and *Naja naja atra* snake venom phospholipase A<sub>2</sub> on enzymatic activity, lethality, and anticoagulant action. *Toxicon*, 19: 721.
- Cupo, P.; Azevedo-Marques, M.M. & Hering, S.E. (1988). Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 924-929.
- Dale, M.M. & Foreman, J.C. (1989). Introduction of immunology and pathology of host defense mechanisms. In: *Textbook of Immunopharmacology*, Dale, M.M. & Foreman, J.C. (editores). *Blackwell Scientific Publications (2nd ed.)*, pp. 1-16.
- Dale, M.M.; Foreman, J.C. (1992). INFLAMMATION In: *Textbook of immunofarmacology* *Blackwell Scientific Publication Ltd, Oxford*.
- Damerau, B.; Lege, L.; Oldigs, H.D. & Vogt, W. (1975). Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.*, 287(2): 141-156.
- Davidson, F.F.; Dennis, E.A.; Powell, M. & Glenney, J.R. (1987). Inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> by "lipocortins" and calpactins. An effect of binding to substrate phospholipids. *J. Biol. Chem.*, 262: 1698-1705.

- Davidson, F.F. & Dennis, E.A. (1990). Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venom to human secreted forms. *J. Mol. Evol.*, 31: 228-238.
- De Hass, G.H.; Postema, N.M.; Nieuwenhuizen, W. & Van Deenen, L.L.M. (1968). Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. biophys. Acta.*, 159: 103-117.
- Dennis, E.A. (1994). Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, 269(18): 13057-13060.
- De Nucci, G.; Gryglewski, R.G.; Warner, T.D. & Vane, J.R. (1988). The receptor-mediated release of EDRF and PGI<sub>2</sub> from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2334-2338.
- Diaz, C.; Gutierrez, J.M.; Lomonte, B. & Nunez, J. (1993). *p*-Bromophenacyl bromide modification of *Bothrops asper* myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub>, affects its pharmacological activities. *Toxicon*, 31: 1202-1206.
- Di Rosa, M.; Giroud, J.P. & Willoughby, D.A. (1971). Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. *J. Pathol.*, 104: 15-29.
- Doerfler, M.E.; Weiss, J.; Clark, J.D. & Elsbach P. (1994). Bacterial lipopolysaccharide primes human neutrophils for enhanced release of arachidonic acid and causes phosphorylation of a 85-KDa cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Clin. Invest.*, 93(4): 1583-1591.
- Edelman, A.M.; Blumenthal, D.K. & Krebs, E.G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 567-613.
- Errasfa, M. & Russo-Marie, F. (1989). A purified lipocortin shares the anti-inflammatory effects of glucocorticosteroids *in vivo* in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 97: 1051-1058.

- Farsky, S.H.P.; Walber, J.; Costa-Cruz, M.; Curry, Y. & Teixeira, C.F.P. (1997). Leucocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon*, **35**(2): 185-193.
- Flores, C.A.; Zappellini, A. & Prado-Franceschi, J. (1993). Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. *Toxicon*, **31**(12): 1551-1559.
- Flower, R. J. & Blackwell, G.J. (1976). The importance of phospholipase A<sub>2</sub> in prostaglandin biosynthesis. *Biochem. Pharmacol.*, **25**(3): 285-291.
- Flower, R.J. (1988). Lipocortin and the mechanism of action of glucocorticoides. *Br. J. Pharmacol.*, **94**: 987-1015.
- Fonteh, A.N. & Chilton, F.H. (1993). Mobilization of different arachidonate pools and their roles in the generation of leukotrienes and free AA during immunologic activation of mast cells. *J. Immunol.*, **150**: 563.
- Fonteh, A.N., Bass, D.A., Marshall, L.A., Seeds, M., Samet, J.M. & Chilton, F.H. (1994). Evidence that secretory phospholipase A<sub>2</sub> plays a role in arachidonic acid release and eicosanoid biosynthesis by mast cells. *J. Immunol.* **152**: 5438-5446.
- Formela, L.J.; Galloway, S.W & Kingsnorth, A.N. (1995). Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *Br. J. Surg.*, **82**(1): 6-13.
- Forster, S.; Ilderton, E.; Norris, J.; Summerly, R. & Yardley, H. (1985). Characterization and activity of phospholipase A<sub>2</sub> in normal human epidermis and in lesion-free epidermis of patients with psoriasis or eczema. *Br. J. Dermatol.*, **112**: 135-147.
- Fox, N.; Song, M.; Schrementi, J.; Sharp, J.D.; White, D.L.; Snyder, D.W.; Hartley, L.W.; Carlson, D.G.; Bach, N.J.; Dillard, R.D.; Draheim, S.E.; Bobbitt, J.L.; Fisher, L. & Mihelich, E.D. (1996). Transgenic model for the discovery of novel human secretory non-pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.*, **308**: 195-203.

Francioli, M. (1934). *Fermentforschung*, 14: 241-249.

Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376.

Garcia-Leme, J.M.D. (1989). Hormones and Inflammation. *Ed. J. Garcia-Leme (CRC Press Inc.; Flórida)*.

Glaser, K.B.; Mobilio, D.; Chang, J.Y. & Senko, N. (1993). Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: regulation and inhibition. *TiPS*, 14(3): 92-98.

Glynn, L.E. (1978). Regeneration and repair. Em: Vane, J.R. & Ferreira, S.H. (editores). *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 50/1, Springer-Verlag, pp. 206-230.

Gutiérrez, J.M. & Lomonte B. (1995). Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33(11): 1405-1424.

Hanasaki, K. & Arita, H (1992). Purification and characterization of a high-affinity binding protein for pancreatic-type phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta*, 1127: 233-241.

Harris, J.B. & Johnson, M.A. (1978). Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, *Notechis scutatus scutatus*. *Clin. Exp. Pharmac. Physiol.*, 5: 587-600.

Hazen, S.L.; Stuppy, R.J. & Gross, R.W. (1990). Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>. A calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub> with absolute fl-2 regiospecificity for diacyl glycerophospholipids. *J. Biol. Chem.* 265(18): 10622-10630.

Heinrikson, R.L.; Krueger, E.T. & Keim, P.S. (1977). Amino acid sequence of phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipase A based upon structural determinants. *J. Biol. Chem.*, 252: 4913.

- Hendon, R.A. & Fraenkel-Conrat, H. (1971). Biological role of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash)*, **68**: 1560-1563.
- Hidi, R.; Vargaftig, B.B. & Touqui, L. (1993). Increased synthesis and secretion of a 14 KDa phospholipase A<sub>2</sub> by guinea pig alveolar macrophages. *J. Immunol.*, **151**: 5613-5623
- Homsí-Brandeburgo, M.I.; Queiroz, L.S.; Santo-Neto, H.; Rodrigues-Simioni, L. & Giglio, J.R. (1988). Fractionation of *Bothrops Jararacussu* snake venom : partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*, **26**(7): 615-627.
- Horton, E.W. (1963). Action of prostaglandin E<sub>1</sub> on tissues which respond to bradykinin. *Nature* **200**: 892-893.
- Ignarro, L.J. (1989). Biological actions and properties of endothelium derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.*, **64**: 1-21.
- Kakutani, M.; Murakami, M.; Okamoto, H.; Kudo, I. & Inoue, K. (1994). Role of type II phospholipase A<sub>2</sub> in the inflammatory process of carrageenan-induced pleurisy in rats. *FEBS Letters*, **339**: 76-78.
- Kampschmidt, R.F. & Upchurch, H.F. (1980). Rate of clearance of circulating leukocytic endogenous mediator in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **164**: 537-539.
- Kramer, R.M.; Hession C.; Johansen, B.; Hayes, G.; McGray, P.; Chow, P.E.; Tizard, R. & Pepinsky, R.B. (1989). Structure and properties of a human nonpancreatic phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, **264**: 5768.
- Lam, B.K.; Yang, C.Y. & Wong, P.Y.K. (1990). Phospholipase A<sub>2</sub> as leukotriene B<sub>4</sub> secretagogue for human polymorphonuclear leukocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **275**: 183-191.

- Lambeau, G.; Barhanin, J.; Schweitz, H.; Qar, J. & Lazdunski, M. (1989). Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J. Biol. Chem.*, **264**(19): 11503-11510.
- Lambeau, G.; Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M. & Barhanin, J. (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipase A<sub>2</sub> in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **265**(16): 9526-9532.
- Lambeau, G.; Lazdunski, M. & Barhanin, J. (1991a). Properties of receptors for neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> in different tissues. *Neurochem. Res.*, **16**: 651-658.
- Lambeau, G.; Barhanin, J. & Lazdunski, M. (1991b). Identification of different receptor types for toxic phospholipase A<sub>2</sub> in rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.*, **293**: 29-33.
- Lambeau, G.; Ancian, P.; Barhanin, J. & Lazdunski, M. (1994). Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, **269**(3): 1575-1578.
- Landucci, E.C.T. (1992). Purificação e atividade biológica da crotoxina e suas sub-unidades, crotapotina e fosfolipase A<sub>2</sub> sobre agregação de plaquetas humanas. *Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP*.
- Landucci, E.C.T.; Antunes, E.; Donato, J.L., Maragoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G. & de Nucci, G. (1995). Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A<sub>2</sub>. *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 578-583.
- Landucci, E.C.T.; Castro, R.C.; Pereira, M.F.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Maragoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G.; Antunes, E. & de Nucci, G. (1998). Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Euro. J. Pharmacol.*, **343**: 257-263.
- Lloret, S. & Moreno, J.J. (1993). Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A<sub>2</sub> purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon*, **31**(8): 949-956

- Lloret, S. & Moreno, J.J. (1995).  $\text{Ca}^{2+}$  influx, phosphoinositide hydrolysis, and histamine release induced by lysophosphatidylserine in mast cells. *J. Cell. Physiol.*, **165**: 89-95.
- Lobo, I.B. & Hoult, J.R.S. (1994). Groups I, II and III extracellular phospholipases  $\text{A}_2$ : Selective inhibition of group II enzymes by indomethacin but not other NSAIDs. *Agents Actions*, **41**: 111-113.
- Lôbo de Araújo, A. & Radvanyi, F. (1987). Determination of phospholipase  $\text{A}_2$  activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon*, **25(11)**: 1181-1188.
- Lomonte, B.; Tarkowski, A. & Hanson, L.Å. (1993). Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, **17**: 93-105.
- Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Bagge, U. & Hanson, L. Å. (1994a). Neutralization of cytolytic and myotoxic activities of phospholipases  $\text{A}_2$  from *Bothrops asper* snake venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem. Pharmacol.*, **47(9)**: 1509-1518.
- Lomonte, B.; Moreno, E.; Tarkowski, A.; Hanson, L. Å. & Maccarana, M. (1994b). Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase  $\text{A}_2$  from *Bothrops asper* snake venom. *J. Biol. Chem.*, **269(47)**: 29867-29873.
- Lyons-Giordano, B.; Davis, G.L.; Galbrath, W.; Pratta, M.A. and Arner, E.C. (1989). Interleukin- $1\beta$  stimulates phospholipase  $\text{A}_2$  mRNA synthesis in rabbit articular chondrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**: 488.
- Mackay, C.R. & Imhof, B.A. (1993). Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today*, vol. **14(3)**: 99.
- Mancuso, L.C.; Correa, M.M.; Vieira, C.A.; Cunha, O.A.B.; Lachat, J.J.; Selistre de Araujo, H.S.; Ownby, C.L. & Giglio, J.R. (1995). Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon*, **33(5)**: 615-626.

- Marinari, L.R.; Berkenkopf, J.W. & Weichman. (1991). Characterization of phospholipase A<sub>2</sub> activity in rat RPAR-induced pleurisy. *Agents and Actions*, 34(1/2): 97-99.
- Marshall, L.A. & Roshak A. (1993). Co-existence of two biochemically distinct phospholipase A<sub>2</sub> activities in human platelet, monocyte and neutrophil. *Biochem. Cell Biol.*, 71: 331-339.
- Martins, M.A.; Pasquale, C.P.; Silva, P.M.R.; Cordeiro, R.S.B. & Vargafitg, B.B. (1990). Eosinophil accumulation in rat pleural cavity after mast cell stimulation with compound 48/80 involves protein synthesis and is selectively suppressed by dexamethasone. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 92: 416-424.
- Mietto, L.; Battistella, A.; Toffano, G. & Bruni, A. (1984). Modulation of lysophosphatidylserine-dependent histamine release. *Agents Actions*, 14: 376-378.
- Miyake, A.; Yamamoto, H.; Kubota, E.; Hamaguchi, K.; Kouda, K.; Honda, K. & Kawashima, H. (1993). Suppression of inflammatory responses to 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and carrageenin by YM-26734, a selective inhibitor of extracellular group II phospholipase A<sub>2</sub>. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 447-453.
- Mizushima, H.; Kudo, I.; Horigome, K.; Murakami, M.; Hayakawa, M.; Kim, D.K.; Kondo, E.; Tomita, M. & Inoue, K. (1989). Purification of rabbit platelet secretory phospholipase A<sub>2</sub> and its characteristics. *J. Biochem.*, 105: 520.
- Melo, P.A.; Homsí-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R. & Suarez-Kurtz, G. (1993). Antagonism of the myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom and bothroptoxin by polyanions. *Toxicon*, 31: 285-291.
- Moreno, J.J.; Ferrer, X.; Ortega, E. & Carganico, G. (1992). PLA<sub>2</sub>-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cells. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. *Agents Actions*, 36: 258-263.
- Morgan, D.W.; Anderson, C.M. & Meyers, K.P. (1993). Recombinant human type phospholipase A<sub>2</sub> lacks edema producing activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 235: 45.

- Murakami, M., Kudo, I., Nakamura, H., Yokoyama, Y., Mori, H. & Inoue, K. (1990). Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified 14 KDa group II phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS Lett.*, **268**: 113-115.
- Murakami, M., Kudo, I. & Inoue, K. (1991). Eicosanoid generation from antigen-primed mast cell by extracellular 14-KDa group II phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS Lett.*, **294**: 247
- Murakami, M.; Kudo, I.; Umeda, M.; Matsuzawa A.; Takeda, M.; Komada, M.; Fujimori, Y.; Takahashi, K. & Inoue, K. (1992a). Detection of three distinct phospholipases A<sub>2</sub> in cultured mast cells. *J. Biochem.*, **111**: 175-185.
- Murakami, M.; Kudo, I.; Suwa, Y. & Inoue, K. (1992b). Release of 14-KDa group phospholipase A<sub>2</sub> from activated mast cells and its possible involvement in the regulation of the degranulation process. *Eur. J. Biochem.*, **209**: 257.
- Murakami, M.; Hara, N.; Kudo, I. & Inoue, K. (1993). Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II Phospholipase A<sub>2</sub>. *J. Immunol.*, **151** (10): 5675-5684.
- Nagai, H.; Sakamoto, T.; Kondo, M.; Miura, T.; Inagaki, N. & Koda, A. (1991). Extracellular Phospholipase A<sub>2</sub> and histamine release from rat peritoneal mast cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **96**: 311-316.
- Nakajima, M.; Hanasaki, K.; Ueda, M. & Arita, H. (1992). Effect of pancreatic type of phospholipase A<sub>2</sub> on isolated porcine cerebral arteries via its specific binding sites. *FEBS Lett.*, **309**: 261-264.
- Nakano, T.; Ohara, O.; Ternoka, H. & Arita, H. (1990). Group II phospholipase A<sub>2</sub> mRNA synthesis stimulated by two distinct mechanisms in rat smooth muscle cells. *FEBS Lett.*, **261**: 171.
- Nishida, S.; Terashima, M.; Shimazu, T.; Takasaki, C. & Tamiya, N. (1985). Isolation of two Phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of an Australian Elapid Snake (*Pseudoechis Australis*). *Toxicon*, **23**(1): 73-85.

- Northup, J.K.; Valentine-Braun, K.A.; Johnson, L.K.; Severson, D.L. & Hollenberg, M.D. (1988). Evaluation of the anti-inflammatory and phospholipase-inhibitory activity of calpactin II/lipocortin I. *J. Clin. Invest.*, **82**: 1347-1352.
- Oertel, H. & Kaliner, M. (1981). The biologic activity of mast cell granules. III. Purification of inflammatory factors of anaphylaxis (IF-A) responsible for causing late-phase reactions. *J. Immunol.*, **127**: 1398-1402.
- Ohsaka, A. (1979). Hemorrhagic necrotizing and edema formation effects in snake venom. *Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 52, Snake Venoms*, pp.480 (Lee, C.Y., Ed.). Berlin: Springer.
- Ohuchi, K.; Wabanabe, M.; Numajiri, N. & Tsurufuji, S. (1982). Phospholipase A<sub>2</sub> activity in carrageenin-induced inflammatory tissue of rats. *Biochem. Pharmacol.*, **31**(18): 2993-2998.
- Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G. & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524-526.
- Parente, L.; Becherucci, C.; Parretti, M.; Solito, E.; Mugridge, K.G.; Galeotti, C.; Raugei, G.; Melli, M. & Sanso, M. (1990). Are the lipocortins the second messengers of the anti-inflammatory action of glucocorticoids? In: *Cytokines and Lipocortins in Inflammation and Differentiation* ed. Melli, M. & Parente, L. pp. 55-68. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Paton, W.D.M. (1951). Compound 48/80: A potent histamine liberator. *Br. J. Pharmacol.*, **6**: 499-508.
- Payá, M.; Terencio, M.C.; Ferrándiz, M.L. & Alcaraz, M.J. (1995). Involvement of secretory phospholipase A<sub>2</sub> activity in the zimosan rat air pouch model of inflammation. *Brit. J. Pharmacol.*, **117**: 1773-1779.
- Pedersen, J.Z.; Lomonte, B.; Massoud, R.; Gubensek, F.; Gutiérrez, J.M. & Rufini, S. (1995). Autocatalytic acylation of phospholipase-like myotoxins. *Biochem.*, **34**: 4670-4675.

- Pereira, M.F.; Novello, J.C.; Cintra, A.C.; Giglio, J.R.; Landucci, E.T.; Oliveira, B. & Marangoni, S. (1998). The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacussu) venom with low phospholipase A<sub>2</sub> activity. *J. Protein Chem.*, **17**(4): 381-386.
- Perretti, M.; Becherucci, C.; Mugridge, K.G.; Solito, E.; Silvestri, S. & Parente, L. (1991). A novel anti-inflammatory peptide from human lipocortin 5. *Br. J. Pharmacol.*, **103**: 1327-1332.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Analytical Biochem.* **83**: 346-356.
- Pruzanski, W.; Vada, P.; Stefanski, E & Urowitz, M.B. (1985). Activity of phospholipase A<sub>2</sub> in sera and synovial fluids in arthritis. *J. Rheumatol.*, **12**: 211.
- Pruzanski, W.; Vadas, P. & Fornasier V. (1986). Inflammatory effect of intradermal administration of soluble phospholipase A<sub>2</sub> in rabbits. *J. Invest. Dermatol.*, **86**: 380-383.
- Rampart, M.; De Smet, W.; Fiers, W. & Herman, A.G. (1989). Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin in vivo. *J. Exp. Med.*, **169**: 2227-2232.
- Rang, H.P.; Dale, M.M. (1993). Hormônios locais, inflamação e alergia. Em: *Pharmacology, Longman Group UK Limited*.
- Renetseder, R.; Brunie, S.; Dijkstra, B.W.; Drenth, J. & Sigler, P.B. (1985). A comparison of the crystal structure of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J. Biol. Chem.*, **260**: 11627.
- Renetseder, R.; Dijkstra, B.W.; Huizinga, K.; Kalk, K.H. & Drenth, J. (1988). Crystal structure of bovine pancreatic phospholipase A<sub>2</sub> covalently inhibited by *p*-bromophenacyl bromide. *J. molec. Biol.*, **200**: 180-188.
- Richards, K.L. & McCullough, J. (1984). A modified microchamber method for chemotaxis and chemokinesis. *Immunol. Commun.*, **13**: 49-62.

- Rosenberg, P. (1979). Pharmacology of phospholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **52**: 403.
- Santana, A.; Hyslop, S.; Antunes, E.; Mariano, M.; Bakhle, Y.S. & De Nucci. (1993). Inflammatory responses induced by poly-L-arginine in rats lungs *in vivo*. *Agents Actions*, **39**: 104-110.
- Sartipy, P.; Johansen, B.; Camejo, G.; Rosengren, B.; Bondjers, G. & Hurt-Camejo, E. (1996). Binding of human phospholipase A<sub>2</sub> type II to proteoglycans: Differential of glycosaminoglycans on enzyme activity. *J. Biol. Chem.*, **271**: 26307-26314.
- Schagger, H.; Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368-379.
- Schevitz, R.W.; Bach, N.J.; Carlson, D.G.; Chirgadze, N.Y.; Clawson, D.K.; Dillard, R.D.; Draheim, S.E.; Hartley, L.W.; Jones, N.D.; Mihelich, E.D.; Olkowski, J.L.; Snyder, D.W.; Sommers, C. & Wery, J.-P. (1995). Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Nature Struct. Biol.*, **2**: 458.
- Schleimer, R.P.; Claman, H.N. & Oronsky, A. (1989). Anti-inflammatory Steroid Action. *Basic and Clinical Aspect. San Diego: Academic Press*.
- Schwartz, L.B. (1987). Mediators of human mast cells and human mast cell subsets. *Ann. Allergy*, **58**: 226.
- Schwartz, L.B. (1994). Mast cells: function and contents. *Curr. Opinion Immunol.* **6**: 91-97
- Scilhamer, J.J.; Pruzanski, W.; Vadas, P.; Plant, S.; Miller, J.A.; Kloss, J. & Johnson, L.K. (1989). Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.*, **264**: 5335.
- Scott, D.L.; White, S.P.; Otwinowski, Z.; Yuan, W.; Gelb, M.H. & Sigler, P.B. (1990). Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. *Science*, **250**: 1541-1546.

- Sedgwick, A.D. & Willoughby, D.A. (1985). Initiation of the inflammatory response and its prevention. Em : Banta, I.L.; Bray, M.A. & Parnham, M.J. (editores). *Handbook of Inflammation, Vol. 5, Elsevier, pp. 27-47.*
- Seilhamer, J.J.; Pruzanski, W.; Vadas, P.; Plant, S.; Miller, J.A.; Kloss, J. & Johnson, L.K. (1989). Cloning and recombinant expression of phospholipase A<sub>2</sub> present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.*, 264: 5335.
- Sháafi, R.I.; Naccache, P.H.; Molski, T.F.P.; Borgeat, P. & Goetzel, E.J. (1981). Cellular regulatory role of leukotriene B<sub>4</sub>: its effects on cation homeostasis in rabbit neutrophils. *J. Cell. Physiol.*, 108: 401.
- Simionescu, N.; Hatteanu, C.; Antohe, F. & Simionescu, M. (1982). Endothelial cell receptors for histamine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 401: 132-149.
- Slotta, K.H.; Fraenkel-Conrat, H.L. (1938). Schlangengifte, III: Mitteilung Reiningung und krystallization des klapperschlangengiftes. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 71: 1076-1081.
- Smith, C.W.; Rothelein, R.; Hughes, B.J.; Mariscalco, M.M.; Schmalstiege, F.C. & Aderson, D.C (1988). Recognition of endothelium determinant for CD 18-dependent neutrophil adherence and transendothelium migration. *J. Clin. Invest.*, 82: 1746.
- Smith, C.W.; Kishimoto, T.K.; Abbass, O.; Rothelein, R.; McIntere, L.V.; Butcher, E. & Anderson, D.C. (1991). Chemotactic factor regulated lectin adhesion molecule-1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 87: 609.
- Smith, M.J.H.; Ford-Hutchinson, A.W. & Bray, M.A. (1988). Leukotriene B : A potencial mediators of inflammation. *J. Pharm. Pharmacol.*, 32: 517-518.
- Spector, W.G. & Willoughby, D.A. (1959). The demonstration of the role of mediators in turpentine pleurisy in rats by experimental suppression of the inflammatory changes. *J. Pathol. Bact.*, 77: 1-17.

- Tan, N. H. & Tan, C.S. (1988). Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. *Anal. Biochem.*, **170**: 282-288.
- Tanaka, K.; Kato, T.; Koichi, M. & Yoshida, T. (1993). Antiinflammatory action of thielocin A1 $\beta$ , a group II phospholipase A<sub>2</sub> specific inhibitor, in rat carrageenan-induced pleurisy. *Inflammation*, **17**(2): 107-119.
- Tateson, J.E.; Moncada, S. & Vane, J.R. (1977). Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. *Prostaglandins*, **13**: 389-397.
- Tesson, F.; Ruffié, C.; Hidi, R.; Silva, P.M.R., Vazeux, G.; Vargaftig, B.B. & Bon, C. (1993). Cell-associated and soluble phospholipases A<sub>2</sub> increase during carrageenan and zymosan-induced pleurisy in rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **248**: 27-32.
- Touqui, L.; Herpin-Richard, N. & Gene, R.M. (1994). Excretion of platelet activating factor-acetylhydrolase and phospholipase A<sub>2</sub> into nasal fluids after allergen challenge: possible role in the regulation of platelet activating factor release. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **94**: 109-119.
- Traynor, J.R. & Authi, K.S. (1981). Phospholipase A<sub>2</sub> activity in lysosomal origin secreted by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis or on treatment with calcium. *Biochim. Biophys. Acta.*, **665**: 571-577.
- Vadas, P. & Hay, J.B. (1983). Involvement of circulating phospholipase A<sub>2</sub> in the pathogenesis of the hemodynamic changes in endotoxin shock. *J. Physiol. Pharmacol.*, **61**: 561.
- Vadas, P.; Pruzanski, W. & Stefanski, E. (1985). Characterization of extracellular phospholipase A<sub>2</sub> in human synovial fluid. *Life Sci.*, **36**: 579.
- Vadas, P. & Pruzanski, W. (1986). Role of secretory phospholipase A<sub>2</sub> in the pathobiology of disease. *Lab. Invest.*, **55**: 391-404.
- Vadas, P.; Pruzanski, W. & Stefanski, E. (1988). Extracellular phospholipase A<sub>2</sub>: causative agent in circulatory collapse of septic shock ?. *Agents Actions*, **24**: 320.

- Vadas, P.; Pruzanski, W.; Kim, J. & Fornasier, V. (1989). The proinflammatory effect of intra-articular injection of soluble human and venom phospholipase A<sub>2</sub>. *Am. J. Pathol.*, 134(4): 807-811.
- Vadas, P.; Pruzanski, W.; Stefanski, E.; Ellies, G.L., Aubin, J.E., Sos, A. & Melcher, A. (1991). Extracellular phospholipase A<sub>2</sub> secretion is a common effector pathway of interleukin-1 and tumour necrosis factor action. *Immunol. Lett.*, 28: 187.
- Vadas, P.; Browning, J.; Edelson, J. & Pruzanski, W. (1993). Extracellular phospholipase A<sub>2</sub> expression and inflammation: the relationship with associated disease state. *J. Lipid Mediat.* 8: 1.
- Van Den Bosh, H. (1980). Intracellular Phospholipases A. *Biochim. Biophys. Acta*, 604: 191-246.
- Vishwanath, B.S.; Kini, R.M. & Gowda, T.V. (1987). Characterization of three edema-inducing phospholipase A<sub>2</sub> enzymes from Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. *Toxicon*, 25: 501-515.
- Vishwanath, B.S.; Fawzy, A.A. & Franson, R.C. (1988). Edema-inducing activity of phospholipase A<sub>2</sub> purified from human synovial fluid and inhibition by aristolochic acid. *Inflammation*, 12(6): 549-561.
- Volwerk, J.J.; Pieterse, W.A. & de Haas, G.H. (1974). Histidine at the active site of phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochemistry* 13: 1446.
- Wasserman, S.I., Goetzel, E.J., Austen, K.F. (1974). Preformed eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A). *J. Immunol.*, 112: 351-358.
- Wedmore, C.V. & Williams, T.J. (1981). Platelet-activating factor (PAF), a secretory product of polymorphonuclear leucocytes, increases vascular permeability in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.*, 74: 916-917.

- Williams, T.J. & Morley, J. (1973). Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. *Nature*, 246: 215-217.
- Williams, T.J. & Peck, M.J. (1977). Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature*, 270: 530-532.
- Williams, T.J. (1982). Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E<sub>2</sub> as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.*, 77: 505-509.
- Wilkinson, P.C.; Dale, M.M. & Foreman, J.C. (1984). Cellular accumulation and inflammation. *Immunopharmacology Blackwell Scientific Publication*, pp. 217-232.
- Wittcoff, H. (1951). The Phosphatides. *Ed. Reinhold Publising Corporation (New York)*, pp. 99-115.
- Yamaguchi, Y.; Shimohigashi, Y.; Chiwata, T.; Tani, A.; Chijiwa, T.; Lomonte, B. & Ohno, M. (1997). Lys-49-phospholipase A<sub>2</sub> as active enzyme for  $\beta$ -arachidonoyl phospholipid bilayer membranes. *Biochem. Mol. Biol. Intern.*, 43(1): 19-26.
- Yang, C.C. (1994). Structure funtion relationship of phopholipase A<sub>2</sub> from snake venoms. *J. Toxicol. - Toxin Reviews*, 13(2): 125-177.
- Zhao, H.; Tang, L.; Wang, X.; Zhou, Y.; Lin, Z. (1998). Structure of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub> modified by  $\rho$ -bromophenacyl bromide. *Toxicon*, 36(6): 875-886.