Tatiane Soares de Lima

**Caracterização do efeito da crotoxina sobre a
funcionalidade dos neutrófilos da medula
óssea**

São Paulo

2015

Tatiane Soares de Lima

Caracterização do efeito da crotoxina sobre a
funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências, na Área de
Fisiologia Geral.

Orientadora: Dr. Maria Cristina Cirillo

São Paulo

2015

Lima, Tatiane Soares de
Caracterização do efeito da crotoxina sobre a funcionalidade
dos neutrófilos da medula óssea
111 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade
de São Paulo. Departamento de Fisiologia Geral.

1. Crotoxina. 2. Neutrófilos. 3. Inflamação. I. Universidade de
São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de
Fisiologia Geral.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Dr. Maria Cristina Cirillo
Orientadora

*À minha mãe, Vera Lúcia, pelo
amor e apoio incondicionais.*

*“O que prevemos raramente
ocorre; o que menos esperamos
geralmente acontece.”*

Benjamin Disraeli

Agradeço...

A Deus, por esta vida e pela oportunidade de trabalho constante em busca de crescimento espiritual.

À Cristina, pela orientação, e mais do que isso, pela amizade que construímos ao longo desses 10 anos. Obrigada pela oportunidade de fazer ciência, pela confiança depositada em mim para a realização de mais este trabalho e pelos ensinamentos ao longo desses anos.

À Camila, pela ajuda e a companhia para a realização de tantos experimentos. Obrigada por trabalhar ao meu lado, por estar sempre disponível a ajudar e por trabalhar de forma tão dedicada e criteriosa.

À Dr. Sandra Sampaio, sempre disponível para uma conversa, uma ajuda, uma discussão de resultado. Obrigada pela colaboração em mais este trabalho e obrigada pela amizade desses 10 anos.

À Dr. Cornelia Brunner e à Dr. Katia Fiedler, por terem me recebido tão bem no Laboratório de Química Fisiológica e por terem me ensinado tanto durante minha estada na Alemanha.

À Dr. Primavera Borelli, pela colaboração e pela disponibilidade para sempre discutirmos este e outros trabalhos.

Ao Dr. Luis Roberto Gonçalves, pela oportunidade de desenvolver mais este trabalho no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

Ao André Alves, por realizar a purificação da fração crotoxina.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Fisiopatologia: Cris, Sandra, Luis, Ida, Marcelo, Renata e Diva, pela convivência enriquecedora durante esses 10 anos.

A todos os alunos do Laboratório de Fisiopatologia, de hoje e do passado, que sempre tornaram os meus dias no laboratório mais especiais! Obrigada pela amizade e pelo carinho de vocês!

A todos os funcionários do Laboratório de Fisiopatologia pela convivência e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

À Roseli, secretária do departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP, pelo convívio durante o mestrado e o doutorado e por estar sempre disponível para ajudar.

À CAPES e à FAPESP, pelo importante apoio financeiro.

À minha mãe, Vera Lúcia. Obrigada por ser minha melhor amiga, por me amar, apoiar e respeitar sempre. Você foi fundamental para mais esta conquista! Te amo!

Aos meus avós, Wanda e Wilson, pelo amor e por tudo que fizeram por mim. Vocês sempre estarão presentes no meu coração!

Sumário

I. RESUMO	16
II. ABSTRACT	18
III. INTRODUÇÃO.....	20
1. Veneno da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	21
2. Considerações gerais sobre a origem e a diferenciação dos neutrófilos.....	22
3. Funções dos neutrófilos	25
3.1. Quimiotaxia	27
3.2. Adesão à matriz extracelular	28
3.3. Fagocitose.....	29
3.4. Produção de espécies reativas do oxigênio e desgranulação	30
4. Vias de sinalização intracelular envolvidas nas atividades funcionais dos neutrófilos dependentes da polimerização de actina	33
5. Crotoxina e suas ações moduladoras sobre a resposta inflamatória.....	35
IV. OBJETIVOS.....	39
V. MATERIAIS E MÉTODOS	41
1. Animais.....	42
2. Crotoxina	42
3. Tratamentos com CTX	43
3.1. <i>In vitro</i>	43
3.2. <i>In vivo</i>	43
4. Obtenção de células hematopoéticas da medula óssea	43
4.1. Contagem total das células e viabilidade celular	43
5. Isolamento dos neutrófilos da suspensão total de células da medula óssea	44
5.1. Imunofenotipagem dos neutrófilos isolados da medula óssea.....	44

6. Avaliação da atividade funcional dos neutrófilos isolados da medula óssea	45
6.1. Quimiotaxia	45
6.2. Adesão à proteína de matriz extracelular fibronectina	46
6.3. Atividade fagocítica.....	46
6.3.1. Opsonização das partículas de zimosan com soro homólogo	47
6.4. Expressão do receptor CR3 (Mac-1 ou CD11b/CD18) na membrana de neutrófilos.....	47
6.5. Produção de espécies reativas do oxigênio.....	47
6.6. Desgranulação de neutrófilos	48
7. Expressão e atividade de proteínas de sinalização intracelular	48
7.1. Expressão e translocação de GTPases	48
7.2. Expressão de Syk, Syk (phospho Y525+Y526), Vav1, Vav1 (phospho Y174), subunidade 1B do complexo Arp 2/3 e F-actina	50
8. Análise estatística	51
VI. RESULTADOS.....	52
1. Isolamento dos neutrófilos da suspensão total de células da medula óssea	53
2. Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da crotoxina sobre a quimiotaxia de neutrófilos isolados da medula óssea.....	55
3. Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da crotoxina sobre a adesão de neutrófilos medulares à fibronectina.....	57
4. Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da crotoxina sobre a fagocitose de partículas de zimosan opsonizado com fragmentos C3b/C3bi do complemento por neutrófilos isolados da medula óssea.....	59
5. Efeito <i>in vitro</i> da crotoxina sobre a expressão do receptor CR3 (Mac-1 ou CD11b/CD18) na membrana plasmática de neutrófilos isolados da medula óssea	62
6. Efeito <i>in vitro</i> da crotoxina sobre a produção de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos isolados da medula óssea.....	64

7. Efeito <i>in vitro</i> da crotoxina sobre a desgranulação de neutrófilos isolados da medula óssea	66
8. Efeito <i>in vitro</i> da crotoxina sobre a expressão total e a atividade de proteínas de sinalização intracelular envolvidas na polimerização de actina em neutrófilos isolados da medula óssea	67
9. Efeito <i>in vivo</i> da crotoxina sobre a expressão total e a atividade de proteínas de sinalização intracelular envolvidas na polimerização de actina em neutrófilos isolados da medula óssea	73
VII. DISCUSSÃO	78
VIII. RESUMO DOS RESULTADOS.....	90
IX. CONCLUSÃO	93
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

Lista de Abreviações

ANOVA: Análise de variância

APC: *Allophycocyanin*

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: *Bovine serum albumin*

CMP: *Common myeloid progenitor*

CO₂: Dióxido de carbono

CR1: *Complement receptor 1*, CD35

CR3: *Complement receptor 3*, Mac-1, CD11b/CD18

CTX: Crotoxina

DCF-DA: *2,7 Dichlorofluorescein diacetate*

ECL: *Enhanced chemiluminescent substrate*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EGTA: *Ethylene glycol tetraacetic acid*

ESL-1: *E-selectin ligand-1*

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*

fMLP: *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

G-CSF: *Granulocyte colony stimulating factor*

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

GDP: Guanosina difosfato

GEF: *Guanine nucleotide exchange factor*

GMP: *Granulocyte-macrophage progenitor*

GTP: Guanosina trifosfato

GTPase: Guanosina trifosfatase

HBSS: *Hank's buffered salt solution*

H₂O₂: Preróxido de hidrogênio

HOCl: Ácido hipocloroso

HSC: *Hematopoietic stem cell*

ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*

IL-1: Interleucina 1

IL-3: Interleucina 3

IL-6: Interleucina 6

IMDM: *Iscove's modified Dulbecco's medium*

LFA-1: *Lymphocyte function-associated antigen, CD11a/CD18*

MCP-1: *Macrophage inflammatory protein-1*

MgCl₂: Cloreto de magnésio

NaCl: Cloreto de sódio

NADPH oxidase: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*

O₂⁻: Ânion superóxido

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PE: *R-phycoerythrin*

PGE₂: Prostaglandina E₂

PMA: *Phorbol 12-myristate 13-acetate*

PSL-1: *P-selectin ligand-1*

ROS: *Reactive oxygen species*

SCF: *Stem cell factor*

SEM: *Standard error of the mean*

SOD: Superóxido dismutase

Syk: *Spleen tyrosine kinase*

TBS-T: *Tris-buffered saline – Tween*

TGF- β : *Transforming growth factor β*

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

VCdt: Veneno de *Crotalus durissus terrificus*

VLA-4: *Very late antigen 4, $\alpha 4\beta 1$*

VLA-5: *Very late antigen 5, $\alpha 5\beta 1$*

VLA-6: *Very late antigen 6, $\alpha 6\beta 1$*

VLA-9: *Very late antigen 9, $\alpha 9\beta 1$*

WASP: *Wiskott-Aldrich syndrome protein*

WAVE: *WASP-family verprolin homologous protein*

Lista de Figuras

Figura 1: Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	21
Figura 2: Representação esquemática do desenvolvimento dos neutrófilos durante a granulopoese	23
Figura 3: Migração de neutrófilos circulantes para sítios inflamatórios e funções desempenhadas por essas células no foco inflamatório.....	27
Figura 4: Moléculas com ação microbicida produzidas e liberadas pelos neutrófilos....	32
Figura 5: Via de sinalização intracelular desencadeada após estimulação de integrinas ou receptores quimiotáticos	34
Figura 6: Estrutura e função do complexo Arp2/3	35
Figura 7: Análise fenotípica dos neutrófilos isolados da suspensão total de células da medula óssea.....	54
Figura 8: Efeito <i>in vitro</i> (A) e <i>in vivo</i> (B) da CTX sobre a quimiotaxia de neutrófilos medulares.....	56
Figura 9: Efeito <i>in vitro</i> (A) e <i>in vivo</i> (B) da crotoxina sobre a adesão de neutrófilos medulares à quimiotaxia.....	58
Figura 10: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a atividade fagocítica de neutrófilos medulares.....	60
Figura 11: Efeito <i>in vivo</i> da CTX sobre a atividade fagocítica de neutrófilos medulares.....	61
Figura 12: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a expressão das subunidades α e β do receptor CR3 de neutrófilos medulares	63
Figura 13: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a produção de ROS por neutrófilos medulares.....	65
Figura 14: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a desgranulação de neutrófilos medulares	67
Figura 15: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a expressão total e a atividade de Syk.....	69
Figura 16: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a expressão total e a atividade de Vav1	70

Figura 17: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a expressão e a ativação de Cdc42, Rac1, RhoA e Rac2.....	71
Figura 18: Efeito <i>in vitro</i> da CTX sobre a expressão da subunidade 1B de Arp2/3 e a expressão de F-actina.....	72
Figura 19: Efeito <i>in vivo</i> da CTX sobre a expressão total e a atividade de Syk	72
Figura 20: Efeito <i>in vivo</i> da CTX sobre a expressão total e a atividade de Vav1	75
Figura 21: Efeito <i>in vivo</i> da CTX sobre a ativação de Cdc42 e sobre a expressão e a ativação de Rac2.....	76
Figura 22: Efeito <i>in vivo</i> da CTX sobre a expressão da subunidade 1B da Arp2/3 e a expressão de F-actina.....	77

Resumo

I. RESUMO

Estudos anteriores demonstraram que a crotoxina (CTX), o principal componente do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, apresenta ação anti-inflamatória, inibindo a migração celular e a atividade fagocítica de neutrófilos peritoneais. Esses efeitos inibitórios são prolongados, uma vez que podem ser observados até 14 dias após a administração de uma única dose dessa toxina. Considerando-se a vida média curta dos neutrófilos, é difícil explicar como a ação inibitória da CTX sobre os neutrófilos circulantes e peritoneais persiste por períodos prolongados após a administração de uma única dose da toxina. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* da CTX sobre a atividade funcional dos neutrófilos da medula óssea de camundongos e alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na ação inibitória da CTX sobre as funções avaliadas. Para os ensaios *in vitro*, os neutrófilos foram incubados com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 ou 24 horas. Para os ensaios *in vivo*, os animais foram pré-tratados com uma única administração de CTX (44 mg/kg), 1 dia antes do isolamento das células. Uma vez obtidos os neutrófilos, os seguintes parâmetros funcionais foram avaliados: quimiotaxia, adesão à fibronectina, fagocitose, produção de espécies reativas do oxigênio e desgranulação. Os resultados obtidos demonstraram que a CTX, *in vitro* e *in vivo*, inibiu os processos de quimiotaxia, adesão à fibronectina e fagocitose de partículas opsonizadas, entretanto não alterou a produção de espécies reativas do oxigênio ou a desgranulação em neutrófilos da medula óssea. Esses resultados demonstram que a CTX induz efeito inibitório sobre a funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea, particularmente sobre funções associadas à polimerização de actina e consequente reorganização do citoesqueleto. Ainda, com o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos neste efeito inibitório, foram realizados ensaios para a análise da expressão do receptor CR3, bem como para a avaliação da expressão total e da atividade de proteínas de sinalização intracelular envolvidas na polimerização de actina nos neutrófilos. Os resultados obtidos mostraram que a CTX inibiu a expressão de ambas as subunidades (CD11b e CD18) do receptor CR3, bem como inibiu a atividade de Syk, Vav1, Cdc42, Rac1 e RhoA e a expressão da subunidade 1B do complexo Arp2/3. Em conjunto, os resultados desse estudo mostraram que a CTX inibe a funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea e que essa ação está associada à inibição do receptor CR3, bem como à inibição da atividade de Syk e de suas proteínas *downstream*, o que resulta na redução da formação de filamentos de F-actina. Os resultados desse estudo comprovam a hipótese de que ação inibitória prolongada da CTX sobre a atividade dos neutrófilos circulantes e peritoneais está associada a alterações funcionais dos neutrófilos da medula óssea. Ainda, considerando-se a participação central dessas células na resposta inflamatória aguda, esse estudo contribui para a elucidação do efeito anti-inflamatório prolongado da CTX.

Palavras-chave: crotoxina, neutrófilo, inflamação, medula óssea, funcionalidade, sinalização intracelular.

Abstract

II. ABSTRACT

Previous studies demonstrated that crotoxin (CTX), the main component of *Crotalus durissus terrificus* venom, presents anti-inflammatory properties, inhibiting cell migration and the phagocytic activity of peritoneal neutrophils. These inhibitory effects are long-lasting, since it can be observed up to 14 days after a single administration of this toxin. Considering the short half-life of neutrophils, it is difficult to explain how the inhibitory effect of CTX on circulating and peritoneal neutrophils persists for long periods after a single injection of this toxin. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effect of CTX on the functionality of bone marrow neutrophils from mice and some of the molecular mechanisms involved on the inhibitory effect of CTX on these functions. For *in vitro* assays, neutrophils were incubated with CTX (0,08 µg/mL), for 1 or 24 hours. For *in vivo* assays, the animals were pretreated with a single administration of CTX (44 mg/kg), 1 day before the isolation of cells. Once obtained the neutrophils, the following functional parameters were evaluated: chemotaxis, adhesion to fibronectin, phagocytosis, reactive oxygen species production and degranulation. The results demonstrated that CTX, *in vitro* and *in vivo*, inhibited the processes of chemotaxis, adhesion to fibronectin and phagocytosis of opsonized particles, however, it did not alter the reactive oxygen species production and degranulation. These results showed that CTX induces an inhibitory effect on the functionality of bone marrow neutrophils, particularly on functions that depend on actin polymerization and cytoskeleton rearrangement. Furthermore, to elucidate some possible mechanisms involved on this inhibitory effect, assays to analyze the expression of the receptor CR3, as well as, assays to analyze the total expression and activity of signaling proteins involved on actin polymerization were done. The results showed that CTX inhibited both subunits of CR3 (CD11b and CD18) and the activity of Syk, Vav1, Cdc42, Rac1 and RhoA and the expression of the subunit 1B from Arp2/3. Together, the results presented herein demonstrate that CTX inhibits the functionality of bone marrow neutrophils and that this effect is associated to the inhibition of CR3 receptor and inhibition of the activity of Syk and its downstream signaling proteins, which results in the decrease of F-actin. The results prove the hypothesis that the long-lasting inhibitory effect of CTX on the activity of circulating and peritoneal neutrophils is associated to functional modifications of bone marrow neutrophils. Besides, considering the central role of these cells on the inflammatory response, this study contributes to the better understanding of the long-lasting anti-inflammatory effect of CTX.

Keywords: crotoxin, neutrophil, inflammation, bone marrow, functionality, signaling pathways

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*

Os estudos que caracterizaram as ações do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) (**Figura 1**) datam do início do século XX. Os primeiros relatos feitos por Vital Brazil em 1909 descrevem as manifestações sistêmicas observadas no envenenamento experimental. Entretanto, os estudos sobre a caracterização bioquímica e sobre as ações biológicas do veneno somente avançaram a partir dos meados do mesmo século com os estudos clínicos e experimentais e, ainda, com os avanços tecnológicos que permitiram o isolamento das toxinas presentes no veneno. Nesse sentido, as principais toxinas presentes no VCdt foram isoladas e caracterizadas; dentre estas destacam-se: a crotoxina, a crotamina, a giroxina e a convulxina (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Moura-Gonçalves & Vieira, 1950; Barrio, 1961; Prado-Francesqui & Vital-Brazil, 1981).

Figura 1. Serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Fonte: Martins PH, 2011.

A crotoxina (CTX) é o principal componente tóxico do VCdt, representando cerca de 60% do veneno total. Esta toxina é uma β -neurotoxina heterodimérica formada pela associação não covalente de duas subunidades: a fosfolipase A₂ (componente B, CB), uma proteína básica com atividade fosfolipásica e baixa toxicidade, e a crotapotina (componente A, CA), uma proteína ácida desprovida de atividade enzimática ou tóxica,

que atua como carreadora da fosfolipase A₂, potencializando sua atividade letal ao mesmo tempo em que diminui sua atividade enzimática dentro do complexo crotoxina (Habermann & Breithaupt, 1978; Bon *et al.*, 1979; Choumet *et al.*, 1996; Sampaio *et al.*, 2010). Diferentes isoformas de CA e CB podem combinar-se de formas diversas originando complexos com propriedades farmacológicas e biológicas distintas (8, Faure *et al.*, 2011; Faure & Saul, 2012).

O VCdt apresenta atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante (Nahas *et al.*, 1964; Rosenfeld, 1971; Azevedo-Marques *et al.*, 1987; Cupo *et al.*, 1988). A atividade neurotóxica do veneno é a responsável pelo quadro de paralisia dos músculos esqueléticos (fácies neurotóxica), ptose palpebral, diminuição da motricidade ocular e da acuidade visual e insuficiência respiratória (Rosenfeld, 1971; Amaral *et al.*, 1991). Esta atividade é atribuída à CTX, a qual atua sobre o sistema nervoso periférico, bloqueando a transmissão na junção neuromuscular e inibindo a liberação de acetilcolina, um importante neurotransmissor (Vital-Brazil & Excell, 1971; Hawgood & Santa de Sá, 1979). Quando em altas concentrações, a crotoxina também atua na membrana pós-sináptica, dessensibilizando os receptores para acetilcolina (Bon *et al.*, 1979).

Apesar dessas manifestações sistêmicas, nos envenenamentos humanos e experimentais, não se observam reações inflamatórias significativas no local da picada (Amorim *et al.*, 1951; Rosenfeld, 1971).

2. Considerações gerais sobre a origem e a diferenciação dos neutrófilos

Os neutrófilos representam a maior população de células mieloides diferenciadas da linhagem granulocítica, que atuam na reposta imune inata e adaptativa (Borregaard, 2010; Mantovani *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012). Estas células originam-se na medula

óssea a partir de uma célula precursora comum, a *stem cell* hematopoética (HSC). Esta por sua vez, se diferencia em progenitores mieloides (CMP) e, a seguir, em progenitores das linhagens granulocítica e macrofágica (GMP). Os GMPs da linhagem granulocítica se diferenciam sequencialmente em: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, neutrófilo bastonete e neutrófilo segmentado (Baldrige *et al.*, 2011) (**Figura 2**).

Figura 2. Representação esquemática do desenvolvimento dos neutrófilos durante a granulopoese. *Acima e a direita:* imagem em projeção z da medula óssea de camundongos lisozima-GFP. *Esquerda e embaixo:* desenvolvimento dos neutrófilos na medula óssea mostrando os estágios de maturação comumente descritos. Fonte: Li & Ng, 2012.

O processo de desenvolvimento sequencial descrito acima envolve alterações morfológicas e funcionais que estão associadas com: o tamanho das células; a morfologia e ultraestrutura nuclear; e com o desenvolvimento de organelas citoplasmáticas. Essas alterações, bem como a liberação das células maduras para o sangue circulante são reguladas pela ação conjunta de citocinas, fatores de crescimento

e hormônios (Bradley & Metcalf, 1966; Metcalf, 1989; Mayani *et al.*, 1992; Lieschke *et al.*, 1994; Dale *et al.*, 2008). As citocinas IL-1 (interleucina 1), IL-6 (interleucina 6), IL-3 (interleucina 3) e SCF (*stem cell factor*) são necessários para a diferenciação das *stem cells* em progenitores mieloides; por sua vez IL-3 e GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) são fundamentais para diferenciação dos progenitores mieloides em progenitores das linhagens granulocítica e macrofágica. Por fim, IL-3, GM-CSF, G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) e SCF são necessários à diferenciação em granulócitos (Edwards, 2005).

Estudos sobre a cinética da produção das células mieloides demonstraram que o tempo de diferenciação de mielócito para neutrófilo é de aproximadamente 7 a 10 dias, (Dancey *et al.*, 1976). No interior da medula óssea, os neutrófilos completam o processo de maturação e são armazenados no *pool* de reserva da medula óssea. A seguir, são liberados para a circulação sanguínea onde permanecem até serem removidos por apoptose. A sua vida média na circulação sanguínea varia de acordo com a espécie, em camundongos é de aproximadamente 10 horas (Basu *et al.*, 2002), enquanto que em humanos esse tempo pode ser estendido por 5,4 dias (Pillay *et al.*, 2010). Entretanto, em resposta a agentes estimulatórios, tais como endotoxina ou citocinas pró-inflamatórias, a vida média dessas células aumenta (Chilvers *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2008).

Os neutrófilos maduros podem ser caracterizados morfológicamente como células arredondadas, com 10 a 14 µm de diâmetro, apresentando núcleo lobulado com dois a cinco lóbulos ligados por pontes de cromatina e, com citoplasma contendo grânulos azurófilos (primários) e específicos (secundários e terciários) (Laszlo & Rundles, 1972). Inicialmente, os grânulos azurófilos e específicos foram classificados segundo a presença ou não de mieloperoxidase, respectivamente (Bainton & Farquhar, 1966). Posteriormente, essa classificação foi baseada também de acordo com a presença

de outras proteínas intragranulares. Assim, os grânulos específicos peroxidase-negativa podem ser divididos em secundários e terciários com base no conteúdo de lactoferrina e gelatinase. Além disso, outras substâncias, tais como: lizozimas, elastases, catepsinas e ficolina, podem ser encontradas nos grânulos dos neutrófilos (Borregaard, 2010).

3. Funções dos neutrófilos

Os neutrófilos são as principais células efectoras na resposta imune inata para defesa do hospedeiro. Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o foco inflamatório, onde iniciam o processo de fagocitose do agente lesivo, bem como a liberação de espécies reativas do oxigênio e de enzimas proteolíticas com o objetivo de destruir esse agente (**Figura 3**) (Borregaard & Cowland, 1997; Kim *et al.*, 2014).

A resposta inflamatória é uma resposta do organismo à injúria que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado. Essa resposta, independente da natureza do estímulo lesivo, é caracterizada por eventos vasculares, celulares e linfáticos, que se desenvolvem com a finalidade de eliminar o agente lesivo, restituir o tecido lesado e manter a homeostasia do organismo (Kumar *et al.*, 2010). As manifestações uniformes que caracterizam a resposta inflamatória são decorrentes da ação de mediadores químicos, liberados após o estímulo lesivo que atuam de maneira inter-relacionada em todos os eventos da resposta inflamatória (Rocha e Silva & Garcia-Leme, 1972; Ferreira & Vane, 1973; Majno & Joris, 2004). Esses mediadores podem ser originados do plasma, tais como os componentes do sistema complemento e do sistema de coagulação e as cininas ou ainda originados de células e de tecidos, tais como a histamina, a serotonina, os metabólitos do ácido araquidônico, o fator de ativação plaquetária, o óxido nítrico e as interleucinas (Rankin, 2004; Majno & Joris, 2004, Kumar *et al.*, 2010).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas, que culminam com o extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Imediatamente após o estímulo lesivo, ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação observada, principalmente, nas vênulas pós-capilares. Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso caracterizadas, principalmente, pela contração da célula endotelial e abertura de junções entre essas células. Essas aberturas levam ao aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (Kowal-Vern *et al.*, 1997; Rankin, 2004), o que caracteriza o edema inflamatório (Janeway & Travers, 1994; Vane, 1994; Blake & Ridker, 2001; Tedgui & Mallat, 2001). Ainda, em consequência ao extravasamento plasmático ocorre o aumento da viscosidade sanguínea e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à estase sanguínea, marginação leucocitária e migração destas células para o tecido extravascular (Kumar *et al.*, 2010). O processo de migração transendotelial dos leucócitos pode ocorrer através das junções das células endoteliais adjacentes (via para celular) ou ainda, em alguns casos, através do corpo celular (via transcelular) (Engelhard & Wolburg, 2004; Carman & Springer, 2004).

O recrutamento de células para o foco inflamatório é um fenômeno fundamental na resposta inflamatória que envolve a interação específica e a consequente sinalização bidirecional entre as células endoteliais e os leucócitos. Essa interação é mediada por moléculas de adesão e pela liberação de mediadores inflamatórios, tais como: citocinas (IL-1; TNF- α , fator de necrose tumoral α) e, quimiocinas (MCP-1, *macrophage inflammatory protein-1*), fragmentos do sistema complemento (C5a) e outros (Muller, 2009).

O processo de migração transendotelial dos leucócitos ocorre em diferentes

fases: inicialmente, os leucócitos rolam sobre o endotélio, em seguida se aderem firmemente à superfície deste e, migram em direção ao foco inflamatório. Esses eventos são denominados, respectivamente, de *rolling*, adesão e migração e, envolvem a expressão de moléculas de adesão, entre estas, as selectinas, as integrinas, as imunoglobulinas e os seus ligantes (Springer, 1995; Rankin, 2004). Nesse sentido, as moléculas E-selectina, P-selectina e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), presentes na célula endotelial se ligam aos seus respectivos ligantes presentes na membrana do neutrófilo: ESL-1 (*E-selectin ligand-1*); PSL-1 (*P-selectin ligand-1*) e as integrinas β_2 , tais como LFA-1 (CD11a/CD18) e Mac-1 (CD11b/CD18, CR3) (Woodfin *et al.*, 2010) (**Figura 3**).

Figura 3. Migração de neutrófilos circulantes para sítios inflamatórios (1,2 e 3) e funções desempenhadas por essas células no foco inflamatório (4 e 5). Fonte: Wright *et al.*, 2014.

3.1. Quimiotaxia

A migração dos neutrófilos em direção a um gradiente quimiotático, processo

denominado quimiotaxia, é essencial para garantir que essas células migrem da circulação periférica ao tecido conjuntivo durante a inflamação ou infecção. Este processo envolve uma variedade de moléculas que atuam como agentes quimiotáticos para os leucócitos, os quais incluem: oligopeptídeos de bactérias do tipo formilpeptídeo (fMLP; *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*); proteínas desnaturadas, alguns lipídios e lipopolissacarídeos; fragmentos do sistema complemento (C5a e C3a); lipídios bioativos (leucotrieno B₄); citocinas (interleucina 8) e quimiocinas, tais como MCP-1 (Niggli, 2003; Kumar *et al.*, 2010).

Os agentes quimiotáticos se ligam a receptores específicos presentes na superfície dos leucócitos, em sua maioria receptores acoplados a proteína G, os quais desencadeiam a ativação de diversas proteínas de sinalização intracelular e a consequente polimerização dos filamentos de actina, polarização da célula e movimento celular direcionado (Niggli, 2003; Simon & Green, 2005, Kölsch, 2008). Uma vez detectado o gradiente quimiotático, o processo de migração celular é essencialmente mecânico e consiste na polimerização de filamentos de actina na extremidade frontal (lamelipodia) da célula, os quais fornecem a força necessária para empurrá-la. Por sua vez, a contração da extremidade posterior (uropodia) da célula, onde predominam os filamentos de miosina, garante a descolamento do neutrófilo, o qual ocorre de forma rápida e mediada por fracos contatos adesivos com o substrato (Renkawitz & Sixt, 2010; Ridley, 2011).

3.2. Adesão à matriz extracelular

Uma vez no tecido, os neutrófilos aderem à matriz extracelular por meio da interação com diferentes proteínas, como por exemplo, a fibronectina, a laminina e o colágeno. Tais interações têm, além do papel estrutural, importância significativa como

sinalizadoras e estimuladoras da funcionalidade dos leucócitos (Borgquist *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2014). Nesse contexto, existem evidências de que a ligação dos neutrófilos à matriz extracelular induz a produção de espécies reativas do oxigênio, bem como estende o tempo de meia vida dessas células por inibir o processo de apoptose (Ginis & Faller, 1997; Umanskiy *et al.*, 2003; Padmanabhan & Gonzalez, 2012).

No tecido, a ligação dos neutrófilos aos componentes da matriz extracelular é mediada, principalmente, pelas integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ presentes na membrana da célula, tais como VLA-4 (*very late antigen 4*, $\alpha 4\beta 1$), VLA-5 (*very late antigen 5*, $\alpha 5\beta 1$), VLA-9 (*very late antigen 9*, $\alpha 9\beta 1$) e $\alpha v\beta 3$ que interagem com a fibronectina e a VLA-6 (*very late antigen 6*, $\alpha 6\beta 1$) que se liga a laminina (Wagner & Roth, 2000; Hood & Cheresch, 2012). Ainda, recentemente, vem sendo demonstrado o papel das integrinas $\beta 2$, tais como a LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen*, CD11a/CD18) e a Mac-1 (CD11b/CD18, CR3) na adesão dos neutrófilos a fibronectina e ao fibrinogênio (Ryckman *et al.*, 2003; Anceriz *et al.*, 2007). A interação dos receptores descritos com seus respectivos ligantes desencadeia a ativação de diferentes proteínas de sinalização intracelular que, da mesma forma que para o processo de quimiotaxia, induzem polimerização dos filamentos de actina. Estes filamentos de F-actina tendem a se acumular nas extremidades da célula de maneira a formar projeções chamadas lamilipodia, as quais são importantes para a manutenção da adesão à matriz extracelular (Ladoux & Nicolas, 2012).

3.3. Fagocitose

A fagocitose é um processo dinâmico desencadeado após a interação do substrato com o fagócito, essa interação é facilitada pela presença de opsoninas (imunoglobulinas e fatores do complemento) que se ligam aos seus receptores

específicos presentes na membrana desses fagócitos (Berger *et al.*, 1988; Neuman *et al.*, 1990). Dentre estes receptores estão, o Fc γ que reconhece o fragmento Fc da IgG, e os receptores CR1 (*complement receptor 1*) e CR3 (*complement receptor 3*, Mac-1), os quais interagem com os fragmentos C3b e C3bi do complemento (Unkeless & Wrigt, 1988; Lee *et al.*, 2003).

O processo de fagocitose requer consideráveis alterações no formato da célula para que a mesma seja capaz de envolver partículas as quais representam uma fração significativa do seu tamanho, sendo assim a interação dessas partículas com seus receptores específicos inicia uma complexa cascata de sinalização que resulta no aumento da expressão e no agrupamento (*cluster*) dos receptores na membrana plasmática, seguido da polimerização de filamentos de actina e englobamento da partícula (Flannagan *et al.*, 2012). Para que seja possível o englobamento dessa partícula, filamentos de F-actina acumulam-se na região do fagossoma nascente, entretanto, alguns minutos após a formação o fagossomo ocorre despolimerização da F-actina para impedir a fusão de membranas intracelulares ao fagossomo. Diferente da fagocitose mediada por receptores Fc γ , quando o processo é ocorre via receptores CR3, uma segunda onda de polimerização de actina é observada ao redor dos fagossomos maduros e completamente internalizados (Bohdanowics *et al.*, 2010).

3.4. Produção de espécies reativas do oxigênio e desgranulação

Uma vez internalizado o agente lesivo pelo processo de fagocitose, espécies reativas do oxigênio são produzidas com o objetivo de destruí-lo. A geração de espécies reativas do oxigênio no neutrófilo se inicia pela ativação da enzima NADPH oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), presente na membrana plasmática e na membrana do fagossomo. A NADPH oxidase consiste de cinco

componentes que são essenciais para a sua atividade, os quais estão distribuídos entre a membrana do fagossomo (flavocitocromo b558, p22+gp91) e o citoplasma da célula (p67, p40 e p47 e a GTPase Rac 2). Na presença de um estímulo, ocorre a fosforilação de p67, p40 e p47 e a ativação de Rac 2 pela sua ligação a uma guanosina trifosfato (GTP); e a seguir, a translocação desses componentes para a membrana, o que leva a ativação da NADPH oxidase (DeLeo & Quinn, 1996; Babior *et al.*, 2002; Roos *et al.*, 2003; Nordenfelt & Tapper, 2011). Essa enzima, por sua vez, catalisa a geração de ânion superóxido (O_2^-), pela transferência de um elétron para uma molécula de O_2 . O ânion superóxido é convertido, pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual em altas concentrações apresenta atividade microbicida (Imlay & Linn, 1986). A maior parte do peróxido de hidrogênio reage com a mieloperoxidase, presente nos grânulos azurófilos, formando o complexo MPO- H_2O_2 . Este complexo, por sua vez, reage com os íons cloro formando o ácido hipocloroso (HOCl), principal espécie reativa do oxigênio produzida pelos neutrófilos (Klebanoff, 2005) (**Figura 4**).

Além da produção de espécies reativas do oxigênio, o processo de desgranulação contribui para a destruição do agente lesivo. Desgranulação é processo de secreção de substâncias contidas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. Após estimulação de receptores específicos, como por exemplo, receptores do tipo formil peptídeo, os grânulos citoplasmáticos são mobilizados e seus conteúdos podem ser liberados no meio intracelular, fusionando-se ao fagossomo ou podem ser liberados no meio extracelular. Por meio da exocitose de seus grânulos, os neutrófilos liberam uma diversidade de proteínas com ação microbicida, incluindo algumas com propriedades que induzem lesão tecidual, a qual pode ser observada durante a reação inflamatória (Lecy & Eitzen, 2008).

A primeira etapa do processo de desgranulação envolve o recrutamento de grânulos do citoplasma para a membrana do fagossomo ou para a membrana plasmática, o qual é mediado pela reorganização do citoesqueleto de actina e pela formação de microtúbulos (Burgoyne & Morgan, 2003). Em seguida, os grânulos acoplam-se a membrana e fusionam-se, liberando seus conteúdos para o meio extracelular ou para dentro do fagossomo. A literatura relata que em neutrófilos não estimulados existe um anel de F-actina na periferia da célula que funciona como uma barreira para a desgranulação indevida. Uma vez estimulado o neutrófilo, vias de sinalização, as quais envolvem a ativação da proteína Rac2, induzem a despolimerização do anel de F-actina e consequentemente induzem o processo de desgranulação (Muallem *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2008). Ainda, é descrito o papel central das Rab GTPases, particularmente da Rab27a no processo de desgranulação (Johnson *et al.*, 2012; Catz, 2014).

Figura 4. Moléculas com ação microbicida produzidas e liberadas pelos neutrófilos. Essas moléculas estão contidas nos grânulos primários (azurófilos), secundários e terciários ou são produzidas pela ação da enzima NADPH oxidase. Fonte: Nordenfelt & Tapper, 2011.

4. Vias de sinalização intracelular envolvidas nas atividades funcionais dos neutrófilos dependentes da polimerização de actina

A quimiotaxia dos neutrófilos, bem como a adesão da célula à matriz extracelular e a fagocitose do agente lesivo são atividades que, assim como mencionado, dependem da reorganização do citoesqueleto da célula. Esse processo envolve mecanismos moleculares que levam a polimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto da célula. A actina, principal componente do citoesqueleto, pode ser encontrada nas células como monômeros (G-actina) e filamentos (F-actina). A sua polimerização e despolimerização permite à célula alterar sua forma, mover-se, internalizar partículas extracelulares e formar estruturas contráteis. A função da actina em prover suporte mecânico para o movimento celular depende de sua associação com proteínas moduladoras que regulam a transição entre G-actina e F-actina; dentre essas estão as que sequestram monômeros de G-actina (β -tiosina, profilina e cofilina), as que cortam e separam o filamento de F-actina (gelsolina e severina) e o complexo polimerizador de actina, o complexo Arp 2/3 (Welch & Mullins, 2002; Pollard & Cooper, 2009; Park *et al.*, 2010; Aktories *et al.*, 2012).

A estimulação de receptores acoplados a proteína G, envolvidos nos processos de quimiotaxia, bem como a estimulação de integrinas β_1 e β_2 , envolvidas nos processos de adesão à matriz extracelular e fagocitose desencadeiam a ativação subsequente de vias de sinalização intracelular, que de modo geral, se iniciam pela fosforilação de resíduos de tirosina, serina ou treonina presentes nas diversas proteínas *downstream*. Estas, por sua vez, são ativadas e passam a desempenhar suas funções como sinalizadoras ou efetoras do processo de reorganização do citoesqueleto (Walzog *et al.*, 1996; Kwiatkowska & Sobota, 1999; Groves *et al.*, 2008; Plow *et al.*, 2000). Particularmente, em relação a uma via de sinalização comum aos três tipos de

receptores mencionados, a literatura relata à ativação da proteína tirosina quinase Syk e de outras moléculas sinalizadoras *downstream*, como por exemplo, as proteínas GEF (*guanine nucleotide exchange factors*) da família Vav. Estas são fosforiladas e ativam as GTPases (guanosina trifosfatases) da família Rho, tais como a RhoA, a Rac1 e a Cdc42, as quais, por sua vez, levam a ativação subsequente dos complexos WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), WAVE (*WASP-family verprolin homologous protein*) e Arp2/3 resultando na polimerização da actina e reorganização citoesqueleto. (Tapon & Hall, 1997; May *et al.*, 2000; Gakidis *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2006; Schymeinsky *et al.*, 2006, 2007; Park *et al.*, 2010) (**Figura 5**).

Figura 5. Via de sinalização intracelular desencadeada após estimulação de integrinas ou receptores quimiotáticos. Esta via está envolvida nos processos de quimiotaxia, adesão à matriz extracelular e fagocitose por neutrófilos, e resulta na polimerização de actina necessária a essas funções. Fonte: Park *et al.*, 2010, modificado.

O complexo Arp2/3 (**Figura 6**), o qual é formado por 7 subunidades (Arp2, Arp3, ArpC1 ou componente 1B, ArpC2, ArpC3, ArpC4 e ArpC5) tem a capacidade de alongar filamentos de F-actina previamente existentes formando diversas ramificações, por sua vez, as pontas dessas ramificações empurram a membrana plasmática de maneira a projetar os pseudópodes (Pollard, 2007).

Figura 6. Estrutura e função do complexo Arp2/3. (a) Representação esquemática das subunidades do complexo. (b) Diagrama da estrutura das subunidades do complexo. (c) Diagrama da provável conformação ativa do complexo. (d) Formação de ramificações de filamentos de F-actina a partir de um filamento mãe pelo complexo Arp2/3. (e) Dois modelos que descrevem a orientação do complexo. Fonte: Goley & Welch, 2006.

5. Crotoxina e suas ações moduladoras sobre a resposta inflamatória

Diversas linhas de investigação têm evidenciado a ação moduladora do VCdt e da CTX sobre a resposta inflamatória. Assim, Landucci e colaboradores (1995) mostraram que a crotapotina, o componente A da CTX, inibe o edema de pata de ratos induzido por carragenina. Da mesma forma, em camundongos, a injeção de VCdt imediatamente após a administração intraperitoneal de tioglicolato, determina o

decréscimo no número de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, além de causar a inibição, *in vitro* e *in vivo*, do espraimento e da fagocitose por macrófagos peritoneais (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996).

Em continuidade a esse estudo, Sampaio e colaboradores (2001), avaliando o efeito do VCdt sobre o metabolismo de macrófagos peritoneais de ratos e a possível correlação entre as modificações deste metabolismo com as alterações funcionais destas células, demonstraram dualismo na ação deste veneno, uma vez que foi observada tanto estimulação do *burst* respiratório (geração de peróxido de oxigênio e óxido nítrico), da atividade fungicida e do metabolismo de glicose e glutamina, quanto a inibição do espraimento e da atividade fagocítica dessas células. Além disso, foi demonstrado que a CTX é a responsável pela ação inibitória do VCdt sobre o processo de fagocitose por macrófagos (Sampaio *et al.*, 2003; 2005). Em relação a essa ação inibitória, Sampaio e colaboradores (2006a) demonstraram que a mesma é modulada, por mediadores químicos gerados na via da lipoxigenase sendo decorrente da drástica diminuição da fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas sinalizadoras e da expressão de proteínas GTPases, RhoA e Rac (Sampaio *et al.*, 2006b).

Dando continuidade aos estudos que evidenciam o efeito modulador do VCdt sobre a inflamação, foi demonstrado pelo nosso grupo que o VCdt tem efeito antiinflamatório prolongado sobre a resposta inflamatória induzida pela carragenina, em camundongos. Esse estudo mostrou que uma única dose de VCdt, administrada pela via subcutânea, 7 ou 21 dias antes da injeção de carragenina inibe, respectivamente, o desenvolvimento do edema de pata e a migração celular para a cavidade peritoneal, induzidos por este agente inflamatório. Este efeito antiinflamatório também foi observado após a instalação da resposta inflamatória (Nunes *et al.*, 2007). Além disso, recentemente, Nunes e colaboradores (2010) demonstraram que a crotoxina é o

componente responsável pelo efeito antiinflamatório do VCdt e que este efeito envolve a ativação de receptores formil peptídeo.

Considerando o papel fundamental dos neutrófilos na resposta inflamatória, estudos anteriores evidenciaram que o VCdt e a CTX, *in vitro e in vivo*, também inibem a fagocitose mediada por CR3 por neutrófilos obtidos no modelo de peritonite induzido pela carragenina, em ratos. Adicionalmente, esses estudos mostraram que esse efeito inibitório *in vivo* é prolongado, uma vez que o mesmo permanece por 14 dias após a administração de uma única dose de VCdt ou CTX. Além disso, foi observado que esse efeito inibitório prolongado é decorrente da intensa diminuição da fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas sinalizadoras e da consequente inibição da polimerização de actina. Por outro lado, o mesmo estudo mostrou que o VCdt e a CTX não alteram a ativação da enzima NAPH oxidase e a produção de espécies reativas do oxigênio induzidas por PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Lima *et al.*, 2012).

Ainda, foi demonstrado que a CTX tem efeito inibitório prolongado sobre a expressão das moléculas de adesão P-selectina e ICAM-1 e, sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela carragenina (Nunes *et al.*, 2011).

Recentemente, o efeito *in vivo* da CTX foi investigado em modelo de doença inflamatória intestinal. A administração intraperitoneal de CTX é capaz de reduzir os sinais característicos da colite, tais como perda de peso e dano tecidual macroscópico, bem como reduz o infiltrado neutrofílico e a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-17. Ainda, nesse mesmo modelo a CTX induz secreção de TGF- β (*transforming growth factor β*), PGE₂ (prostaglandina E₂) e lipoxina A₄ (Almeida *et al.*, 2015).

Além do efeito anti-inflamatório da CTX, diversos outros efeitos imunomodulatórios dessa toxina vêm sendo descritos. Entre esses efeitos estão a

inibição da proliferação de linfócitos (Castro *et al.*, 2007), o aumento do número de linfócitos B e T nos linfonodos e a diminuição dessas células na circulação (Zambelli *et al.*, 2008), bem como a inibição da resposta humoral e celular induzida por imunização com albumina de soro humano (Favoretto *et al.*, 2011). Além disso, tem sido descrita atividade antibacteriana, analgésica e antitumoral para essa toxina (Sampaio *et al.*, 2010 para revisão).

Apesar dos diversos estudos que vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar o efeito anti-inflamatório da CTX, até o momento não foi esclarecido o mecanismo envolvido em seu efeito inibitório prolongado sobre a resposta inflamatória, particularmente sobre a funcionalidade dos neutrófilos.

Estudos de biodistribuição mostram que o VCdt permanece no tecido subcutâneo por até 6 horas, entretanto, 4 horas após sua administração, já não é mais detectado em órgãos como rins, baço e cérebro (Gomes *et al.*, 2002). Por outro lado, em relação à CTX, estudos farmacocinéticos demonstram que 2 horas após a administração intramuscular desta toxina ocorre decréscimo da sua concentração plasmática e, após 24 horas eliminação de 90% em órgãos tais como, rins, baço, e cérebro (Cura *et al.*, 2002).

Baseado neste fato, e ainda na vida média curta dos neutrófilos, é difícil explicar como uma única dose da CTX permanece, por um longo período de tempo (14 dias) inibindo a fagocitose por neutrófilos e processos relacionados com essa função, como a polimerização de actina e a fosforilação de tirosina (Lima *et al.*, 2012). Dessa forma, uma possível hipótese para explicar o efeito prolongado da CTX sobre os neutrófilos seria o fato de que essa toxina poderia alterar a funcionalidade dessas células, ainda na medula óssea.

Objetivos

II. Objetivos

O objetivo geral desse estudo é avaliar o efeito da CTX sobre a atividade funcional dos neutrófilos da medula óssea de camundongos e alguns dos mecanismos envolvidos na ação da CTX sobre as funções avaliadas. Para tanto, os objetivos específicos são:

- Investigar o efeito *in vitro* e *in vivo* da CTX sobre: quimiotaxia, adesão à fibronectina, fagocitose, produção de espécies reativas do oxigênio e desgranulação de neutrófilos da medula óssea.
- Avaliar o efeito *in vitro* da CTX sobre a expressão das subunidades CD11b e CD18 do receptor CR3 na membrana dos neutrófilos da medula óssea.
- Avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* da CTX sobre a expressão e a translocação (ativação) das GTPases: RhoA, Rac1, Rac2 e Cdc42 nos neutrófilos da medula óssea.
- Avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* da CTX sobre a expressão de Syk, Syk (*phospho* Y525+Y526), Vav1, Vav1 (*phospho* Y174), Arp2/3 e F-actina nos neutrófilos da medula óssea.

Materiais e Métodos

III. Materiais e Métodos

1. Animais

Foram utilizados camundongos C57black/6 (8-10 semanas de idade, 20-25 g) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos com livre acesso a água e ração, pelo período mínimo de um dia antes de serem utilizados nos experimentos (Protocolos n° 880/12, 1115/13 e 1217/14 da Comissão de Ética no Uso de Animal do Instituto Butantan - CEUAIB).

2. Crotoxina

A CTX foi obtida a partir do veneno de vários exemplares de espécimes adultos da serpente *Crotalus durissus terrificus*, extraído e fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. A purificação dessa toxina foi realizada pelo Prof. André Fonseca Alves, Assistente Técnico do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, segundo o método descrito por Rangel-Santos (2004). Neste processo são obtidos três picos (I, II e III), sendo o pico II correspondente à eluição da CTX, a qual representa aproximadamente 60% do VCdt bruto (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938). Nos picos I e III estão contidas as demais toxinas do VCdt (crotamina, giroxina e convulxina), entretanto a literatura não descreve quais toxinas estão contidas em cada um desses picos. As amostras contendo a CTX foram testadas quanto à homogeneidade por eletroforese em gel de poliacrilamida e pelo teste de atividade de fosfolipase A₂ em substrato cromogênico (Lôbo-de-Araújo & Radvanyi, 1987). Os tubos correspondentes a CTX foram reunidos, dialisados e a sua concentração foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3. Tratamentos com CTX

3.1. *In vitro*

Os neutrófilos isolados da suspensão total de células da medula óssea de animais normais foram incubados com meio RPMI 1640 na ausência (controle) ou na presença de CTX (0,08 µg/mL) por 1 ou 24 h, em estufa de CO₂ (5%), a 37°C. Em seguida, foram lavados e utilizados nos diferentes ensaios. A concentração de CTX utilizada foi baseada em estudos anteriores e não mostrou sinais de toxicidade celular (Lima *et al.*, 2012).

3.2. *In vivo*

Os neutrófilos da medula óssea foram isolados de animais pré-tratados com CTX (44 mg/kg, via subcutânea) ou salina (controle) 1 dia antes da coleta das células hematopoéticas da medula óssea. A concentração de CTX utilizada foi baseada em estudos anteriores e não causou quaisquer sinais de envenenamento nos animais (Nunes *et al.*, 2010). O tempo da administração (s.c.) da CTX foi escolhido com base em ensaios pilotos (ensaios de fagocitose), que mostraram efeito da CTX sobre aos neutrófilos da medula.

4. Obtenção de células hematopoéticas da medula óssea

As células hematopoéticas da medula óssea dos camundongos foram obtidas por meio da dissecação e lavagem da cavidade medular de ambos os fêmures e tíbias com 10 mL do tampão HBSS (*Hanks's buffered salt solution*, BSA 15 mM, glicose 55 mM).

4.1. Contagem total das células e viabilidade celular

A suspensão de células obtida da medula óssea foi diluída em Azul de Tripan e a contagem total de células foi realizada em hemocítômetro de Neubauer. A porcentagem de viabilidade foi calculada pela incorporação ou não do corante Azul de Tripan.

5. Isolamento dos neutrófilos da suspensão total de células da medula óssea

Os neutrófilos foram separados da suspensão total de células hematopoéticas da medula óssea por meio de gradientes descontínuos de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e um gradiente de Histopaque 1119 (Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA) (Fiedler *et al.*, 2011). Para tanto, a suspensão total de células foi centrifugada (470 g, 5 min, 22°C) e o pellet ressuspenso em 3 mL de HBSS. Cuidadosamente, foram adicionadas à suspensão de células as soluções de Percoll diluído em HBSS de diferentes concentrações: 51% (2 mL), 55% (2 mL), 62% (2 mL) e 81% (3 mL). O material foi centrifugado (1600 g, 30 min, 22°C, sem breque) para a obtenção das diferentes camadas de células. Após a centrifugação, os neutrófilos e eritrócitos foram coletados da interface entre as camadas de 62% e 81% e foram lavados em 10 mL de HBSS. Em seguida, para o isolamento dos neutrófilos, o pellet obtido foi ressuspenso em 3 mL de HBSS e cuidadosamente foi adicionado 3 mL de Histopaque 1119. O material foi centrifugado (1600 g, 30 min, 22°C, sem breque) e os neutrófilos foram coletados da interface entre o tampão e o Histopaque. As células foram lavadas em 10 mL de HBSS e o pellet final foi ressuspenso em 1 mL de HBSS para determinação do número total de células e da sua viabilidade como descrito no item 4.1.

5.1. Imunofenotipagem dos neutrófilos isolados da medula óssea

As células isoladas como descrito no item 5 foram analisadas por citometria de fluxo para confirmação do fenótipo referente aos neutrófilos (CD11b⁺ Gr-1⁺ Ter119⁻

B220⁺). Para tanto, 2×10^6 células foram ressuspensas em 100 μ l de PBS e incubadas com os anticorpos anti-CD11b (APC; 1,25 μ g/mL), anti-Gr-1 (Pacif Blue; 0,3 μ g/mL), anti-Ter119 (FITC; 2,5 μ g/mL) e anti-B220 (PE; 5 μ g/mL) (eBioscience, San Diego, CA, USA) por 30 min, a 4°C, no escuro. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em 500 μ l de PBS e analisadas em citometria de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences) para a avaliação da expressão dos marcadores de superfície em questão. O software utilizado para aquisição foi o BD FACSDiva (BD, Biosciences) e para análise o FlowJo (Ashland, OR, USA).

6. Avaliação da atividade funcional dos neutrófilos isolados da medula óssea e dos neutrófilos diferenciados *in vitro* a partir de progenitores mielóides

6.1. Quimiotaxia

Os ensaios de quimiotaxia foram realizados em placas de *transwell* com poros de 5 μ m e membrana de polycarbonato (Corning Costar, Corning, NY, USA) (Yagi *et al.*, 2009). Para tanto, os filtros foram equilibrados com meio RPMI 1640 (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 μ g/mL, 10% soro fetal bovino inativado, Gibco, Grand Island, NY, USA) por 2 h em estufa de CO₂ (5%), a 37°C. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se à placa 600 μ l de meio de cultura contendo ou não fMLP (*N-Formyl-Met-Leu-Phe*, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA) 10 μ M e ao filtro 100 μ l da suspensão de neutrófilos (5×10^6 /mL). A placa foi incubada em estufa de CO₂ (5%), a 37°C por 4 h, o meio de cultura do *transwell* foi retirado e posteriormente foi adicionado ao filtro 300 μ l de EDTA 20 μ M. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente para remoção total das células remanescentes do filtro. Em

seguida, foi realizada a contagem total das células que atravessaram o filtro *transwell* em hemocítômetro de Neubauer.

6.2. Adesão à proteína de matriz extracelular fibronectina

Para a realização dos ensaios de adesão, placas de 96 poços foram previamente recobertas com fibronectina (50 µg/mL, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA) *overnight*, a 4°C. Os poços foram lavados e em seguida, bloqueados com BSA 1% (soro albumina bovina, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA) por 60 min, a 37°C. Neutrófilos (100 µl de uma suspensão 5×10^6 /mL) foram plaqueados na presença ou ausência do estímulo PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*, 100 ng/mL, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA) e a placa foi incubada por 60 minutos, a 37°C, em estufa de CO₂ (5%) para permitir a adesão das células. Após a incubação, os poços foram lavados e foi estabelecida uma curva padrão constituída por diferentes concentrações da suspensão de neutrófilos em poços não recobertos por fibronectina. A porcentagem de adesão celular foi calculada mediante a incorporação do corante cristal violeta 0,5% (Sample *et al.*, 1991; Bohnsack & Chang, 1994; Assis *et al.*, 2005).

6.3. Atividade fagocítica

Para o ensaio de fagocitose, neutrófilos (1×10^6 /mL) foram estimulados ou não com fMLP 10 µM por 30 min e em seguida foram incubados, por 40 min, a 37°C, em estufa de CO₂ (5%), com partículas de zimosan opsonizado com soro homólogo (5×10^6 partículas/mL), mantendo-se a proporção de células e partículas de zimosan, 1:5, respectivamente. Após a incubação, os esfregaços foram obtidos utilizando uma centrífuga citológica (30 g, 200 s). As lâminas obtidas foram coradas pelo corante pancromático de Rosenfeld (Rosenfeld, 1947) e um total de 100 neutrófilos foi contado.

Do total de células contadas, foi avaliado o número de neutrófilos que não fagocitou nenhuma partícula (x0), que fagocitou apenas uma (x1), duas (x2) ou três ou mais (x3). Esses valores foram multiplicados por seus respectivos *scores* e o valor da atividade fagocítica para os 100 neutrófilos contados foi calculado pela soma dos valores obtidos em cada *score* (Lima *et al.*, 2012).

6.3.1 Opsonização das partículas de zimosan com soro homólogo

Uma solução contendo 56 mg/mL de zimosan foi diluída 20 vezes em PBS. O material foi incubado com soro obtido de camundongos C57black/6 normais (fonte de fragmentos C3b/C3bi do sistema complemento), na proporção de 1:1, a 37°C, sob agitação. Após 30 min, o material foi centrifugado (2400 g, 5 min) e ressuspensão em meio RPMI 1640 para utilização no ensaio de fagocitose.

6.4. Expressão do receptor CR3 (Mac-1 ou CD11b/CD18) na membrana dos neutrófilos

Os neutrófilos (2×10^6 /mL) foram incubados ou não com fMLP 10 μ M por 20 min. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos anti-CD11b (FITC; 1,25 μ g/mL) e anti-CD18 (PE; 10 μ g/mL) (BD, Biosciences) por 30 min, a 4°C, no escuro. Em seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em 500 μ L de PBS e analisadas em citometria de fluxo (BD FACSCanto II, BD Biosciences) para a avaliação da expressão de ambas as subunidades do receptor CR3. O software utilizado para aquisição foi o BD FACSDiva (BD, Biosciences) e para análise o FlowJo (Ashland, OR, USA).

6.5. Produção de espécies reativas do oxigênio

A produção de ROS foi quantificada intracelularmente com o auxílio da sonda DCF-DA (2,7 *Dichlorofluorescein diacetate*, Sigma Aldrich, St. Lois, MO, USA), a qual floresce quando oxidada. Para tanto, os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados com 5 μM de DCF-DA por 30 min, a 37°C, em estufa de CO₂ (5%). Em seguida, foram lavados, plaqueados e estimulados ou não com fMLP (10 μM). As leituras das unidades relativas de fluorescência foram realizadas em um fluorômetro (excitação: 485 nm, emissão: 540 nm) em diferentes intervalos de tempo: 0, 30, 60 e 90 min (Itou *et al.*, 2006).

6.6. Desgranulação de neutrófilos

A desgranulação de neutrófilos foi avaliada mensurando-se as atividades relativas das enzimas elastase e gelatinase, as quais se encontram estocadas nos grânulos primários e terciários, respectivamente. Para tanto, os neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram plaqueados e estimulados com PMA (25 ng/mL). Em seguida foram adicionados os substratos correspondentes às enzimas elastase e gelatinase diluídos em seus respectivos tampões de acordo com as instruções do fabricante (*EnzCheck Elastase Assay Kit* e *Genatinase Assay Kit*, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A placa foi incubada a 37°C, em estufa de CO₂ (5%) por 3 horas. As leituras das unidades relativas de fluorescência foram realizadas em um fluorômetro (excitação: 480 nm, emissão: 530 nm) em diferentes intervalos de tempo: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min (Fiedler *et al.*, 2011, modificado).

7. Expressão e atividade de proteínas de sinalização intracelular

7.1. Expressão e translocação de GTPases

A expressão total e a ativação das GTPases RhoA, Rac1, Rac2 e Cdc42 foi determinada em neutrófilos (4×10^7) estimulados com fMLP 10 μ M por 3 min e ressuspensos em 500 μ l de tampão de extração (20 mM Tris pH 7,5; 2 mM EDTA; 10 mM EGTA; sacarose 0,25 M; inibidores de protease e inibidores de fosfatase 1:300). A amostra resultante foi separada em duas partes, uma para extração das proteínas totais (80 μ l) e outra para o isolamento das frações de membrana e de citosol (420 μ l). Para avaliação da expressão total das GTPases, foi adicionado à suspensão 1% de Triton X-100. A amostra foi sonicada (2 vezes, frequência 30, 15 s) e centrifugada (700 g, 15 min, 4°C) para a extração das proteínas totais das células. Para análise da translocação dessas GTPases do citosol para a membrana plasmática a suspensão de neutrófilos referida acima foi ultracentrifugada (100.000 g, 30 min, 4°C). Após a centrifugação, as frações correspondentes ao citossol (sobrenadante) e a membrana (pellet) foram separadas e sonicadas (2 vezes, frequência 30, 15 s). A quantificação das proteínas totais, proteínas de membrana e proteínas de citosol foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, as amostras (30 μ l) foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com TBS-T (*Tris-buffered saline – tween*) 5% BSA por 1 h, em temperatura ambiente. Após o bloqueio, estas membranas foram incubadas *overnight*, a 4°C, com um dos anticorpos primários: anti-RhoA 1:500, anti-Rac1 1:500, anti-Rac2 1:350 ou anti-Cdc42 1:500 (Abcam, Cambridge, MA, USA). Os anticorpos anti-caveolina1 1:1000 e anti-GAPDH 1:5000 (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, Abcam, Cambridge, MA, USA) foram utilizados como controle do fracionamento celular, respectivamente, da membrana e do citosol. Todos os anticorpos primários foram diluídos em TBS-T 5% BSA. No dia seguinte as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários por 2 h,

em temperatura ambiente. Todos os anticorpos secundários foram diluídos em TBS-T 5% leite desnatado. A detecção das bandas foi feita por quimioluminescência utilizando-se o kit de revelação ECL (*Enhanced chemiluminescent substrate*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) e a revelação em um foto documentador (UVITEC Cambridge, Reino Unido). A análise quantitativa das imagens obtidas foi feita pelo software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

A ativação da GTPase Cdc42 foi analisada também utilizado-se um kit para o enriquecimento seletivo e a detecção de Cdc42 ativa (*Active Cdc42 pull down*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A metodologia baseia-se na utilização de uma proteína de fusão-GST (GST-Pak1-PDB) a qual se une especificamente a Cdc42 ligada a GTP e em seguida é precipitada.

7.2. Expressão de Syk, Syk (phospho Y525+Y526), Vav1, Vav1 (phospho Y174), subunidade 1B do complexo Arp2/3 e F-actina

Para a avaliação da expressão de Syk, Syk (phospho Y525+Y526), Vav1, Vav1 (phospho Y174), subunidade 1B da Arp2/3 e F-actina os neutrófilos (1×10^7) foram estimulados com fMLP 10 μ M por 3 min, ressuspensos em tampão de lise (25 mM Tris-HCl pH 7,2; 150 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$; 1% NP-40; 5% glicerol, inibidores de protease e fosfatase 1:300, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) e incubados no gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas (16000 g, 15 min, 4°C) e a quantificação das proteínas totais foi realizada pelo método de BCA (Ácido bicinonínico) (Smith *et al.*, 1985). Em seguida, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com TBS-T 5% BSA por 1 h, em temperatura ambiente e incubadas *overnight*, a 4°C,

com um dos anticorpos primários: anti-Syk 1 µg/mL, anti-Syk (*phospho* Y525+Y526) 1:150, anti-Vav1 1:1000, anti-Vav1 (*phospho* Y174) 1:100, anti-Arp2/3 1:100 ou anti-F-actina 1:200 (Abcam, Cambridge, MA, USA). O anticorpo anti-GAPDH 1:5000 (Abcam, Cambridge, MA, USA) foi utilizado como controle da concentração de proteínas aplicadas no gel. Todos os anticorpos primários foram diluídos em TBS-T 5% BSA. No dia seguinte, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários por 2 h, em temperatura ambiente. Todos os anticorpos secundários foram diluídos em TBS-T 5% leite desnatado. A detecção das bandas foi feita por quimioluminescência utilizando-se o kit de revelação ECL (*Enhanced chemiluminescent substrate*, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) e a revelação em um foto documentador (UVITEC Cambridge, Reino Unido). A análise quantitativa das imagens obtidas foi feita pelo software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software InStat, GraphPad. Para múltiplas comparações foi utilizada a análise de variância de uma via (*One-way* ANOVA) seguida do teste de Turkey. Para comparações entre dois grupos foi utilizado o test t de Student não pareado. Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) dos valores obtidos do número indicado de animais.

Resultados

IV. Resultados

1. Isolamento dos neutrófilos da suspensão total de células da medula óssea

Os neutrófilos foram obtidos da medula óssea e o processo para o isolamento foi realizado por meio de gradientes de densidade. Esse processo mostrou-se eficiente, uma vez que, de cada animal foi possível a obtenção de aproximadamente 1×10^7 neutrófilos. A população obtida foi caracterizada fenotipicamente por citometria de fluxo e mostrou-se ser composta por mais de 80% de neutrófilos ($CD11b^+$ $Gr1^+$ $Ter119^-$ $B220^-$). Uma pequena contaminação com eritrócitos (1,8%) e linfócitos (6,7%) foi observada (**Figura 7**). A viabilidade das células obtidas foi maior do que 90%.

Figura 7. Análise fenotípica dos neutrófilos isolados da suspensão total de células da medula óssea. As células da medula óssea de camundongos C57black/6 foram obtidas por meio da lavagem da cavidade medular de ambos os fêmures e tíbias. Os neutrófilos foram isolados por meio de um gradiente descontínuo de Percoll seguido de um gradiente com Histopaque 1119. Para a análise fenotípica, 1×10^6 células foram incubadas com os anticorpos anti-CD11b-APC, anti-Gr1-Pacific Blue, anti-Ter119-FITC e anti B220-PE por 30 min, a 4°C. Em seguida, as células foram analisadas em citometria de fluxo para a avaliação da expressão dos marcadores de superfície em questão.

2. Efeito *in vitro* e *in vivo* da crotoxina sobre a quimiotaxia de neutrófilos isolados da medula óssea

A pré-incubação de neutrófilos medulares com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 hora, reduziu em 55% a migração dessas células em direção ao agente quimiotático fMLP (10 µM), quando comparado à migração dos neutrófilos incubados com meio RPMI 1640 na ausência da CTX. Por outro lado, na ausência do fMLP, não foi observada diferença significativa entre a quimiotaxia dos neutrófilos tratados com a CTX ou somente incubados na presença de meio RPMI 1640.

Em relação aos ensaios *in vivo*, a administração da CTX (44 mg/kg, s.c.) nos animais, 1 dia antes do isolamento das células, inibiu a quimiotaxia dos neutrófilos em direção ao fMLP (10 µM) em 55%, quando comparado aos animais tratados apenas com salina (controle). Entretanto, na ausência do agente quimiotático, o pré-tratamento dos animais com a CTX, nas mesmas condições experimentais, não reduziu, de forma significativa, a quimiotaxia dos neutrófilos (**Figura 8**).

Figura 8. Efeito *in vitro* (A) e *in vivo* (B) da CTX sobre a quimiotaxia de neutrófilos medulares. Os neutrófilos isolados da medula óssea foram incubados com CTX (0,08 μ g/mL), por 1 hora. Neutrófilos incubados somente na presença de meio RPMI 1640 foram utilizados como controle (A). Neutrófilos foram isolados de animais pré-tratados com a CTX (44 μ g/kg, s.c.), um dia antes da coleta das células. Animais tratados apenas com salina foram utilizados como controle (B). O ensaio de quimiotaxia dos neutrófilos (5×10^6 /mL) foi realizado em placas de *transwell*, na presença ou ausência do estímulo quimiotático fMLP (10 μ M). Após 4 h, a contagem total de células migradas foi realizada em hemocítômetro de Neubauer. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle na presença de fMLP.

3. Efeito *in vitro* e *in vivo* da crotoxina sobre a adesão de neutrófilos medulares à fibronectina

Como mostra a **Figura 9**, a incubação dos neutrófilos com a CTX (0,08 µg/mL), na presença de PMA (100 ng/mL), por 1 hora, reduziu a adesão dessas células à fibronectina em 39%, quando comparado a neutrófilos incubados apenas na presença de meio RMPI 1640 (controle). Ainda, a administração de CTX (44 mg/kg, s.c.) nos animais, 1 dia antes do isolamento dos neutrófilos, inibiu a adesão dessas células à fibronectina, na presença de PMA (100 ng/mL), em 51%, quando comparado aos animais controles, administrados (s.c.) apenas com salina.

Não foram observadas diferenças significativas, nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, entre os grupos controle e CTX quando o ensaio foi realizado na ausência do estímulo PMA.

Figura 9. Efeito *in vitro* (A) e *in vivo* (B) da crotoxina sobre a adesão de neutrófilos medulares à fibronectina. Os neutrófilos isolados da da medula óssea foram incubados com CTX (0,08 $\mu\text{g/mL}$), por 1 hora. Neutrófilos incubados somente na presença de meio RPMI 1640 foram utilizados como controle (A). Neutrófilos foram isolados de animais pré-tratados com a CTX (44 $\mu\text{g/kg}$, s.c.), um dia antes da coleta das células. Animais tratados apenas com salina foram utilizados como controle (B). O ensaio de adesão dos neutrófilos ($5 \times 10^6/\text{mL}$) foi realizado por 1 h em placas previamente recobertas com fibronectina na presença ou ausência do estímulo PMA 100 ng/mL. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle na presença de PMA.

4. Efeito *in vitro* e *in vivo* da crotoxina sobre a fagocitose de partículas de zimosan opsonizado com fragmentos C3b/C3bi do completo por neutrófilos isolados da medula óssea

A fagocitose de partículas de zimosan opsonizado apresentou-se significativamente reduzida (47%) após a incubação dos neutrófilos com a CTX (0,08 µg/mL) por 1 h, seguida da estimulação com fMLP (10 µM) por 30 minutos, quando comparado a neutrófilos pertencentes ao grupo controle (meio RMPI 1640 + fMLP). Diferenças na atividade fagocítica entre neutrófilos controles e experimentais não foram observadas na ausência do estímulo fMLP (**Figura 10**).

Da mesma forma que a inibição observada nos ensaios *in vitro*, o pré-tratamento dos animais com uma única dose de CTX (44 mg/kg, s.c.), 1 ou 14 dias antes do isolamento dos neutrófilos medulares, inibiu a atividade fagocítica dessas células em 40% e 38%, respectivamente, quando comparado aos animais administrados (s.c.) com salina (controle). Novamente não foram observadas diferenças significativas quando o ensaio foi realizado com neutrófilos não estimulados com fMLP (**Figura 11**).

Figura 10. Efeito *in vitro* da CTX sobre a atividade fagocítica de neutrófilos medulares. Neutrófilos (1×10^6 /mL) isolados da medula óssea foram incubados com CTX (0,08 μ g/mL) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle), por 1 h. Em seguida, foram estimulados ou não com fMLP 10 μ M por 30 min. Partículas de zimosan opsonizado (5×10^6 /mL) foram utilizadas como estímulo fagocítico. Um total de 100 células foi contato e a atividade fagocítica determinada. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle estimulado com fMLP.

Figura 11. Efeito *in vivo* da CTX sobre a atividade fagocítica de neutrófilos medulares. Neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram isolados de animais pré-tratados com CTX (44 $\mu\text{g/kg}$, s.c.) ou salina (controle), um dia (A) ou 14 dias (B) antes da coleta das células. Em seguida, os neutrófilos foram estimulados ou não com fMLP 10 μM por 30 min. Partículas de zimosan opsonizado ($5 \times 10^6/\text{mL}$) foram utilizadas como estímulo fagocítico. Um total de 100 células foi contato e a atividade fagocítica determinada. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle estimulado com fMLP.

5. Efeito *in vitro* da crotoxina sobre a expressão do receptor CR3 (Mac-1 ou CD11b/CD18) na membrana plasmática de neutrófilos isolados da medula óssea

A incubação de neutrófilos medulares com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 h, reduziu a expressão de ambas as subunidades do receptor CR3 na ausência (CD11b: 29%, CD18: 18%) ou na presença (CD11b: 36%, CD18: 20%) do estímulo fMLP (10 µM), quando comparado aos seus respectivos controles incubados apenas na presença do meio RPMI 1640 (**Figura 12**).

Figura 12. Efeito *in vitro* da CTX sobre a expressão das subunidades α e β do receptor CR3 de neutrófilos medulares. Neutrófilos ($2 \times 10^6/\text{mL}$) isolados da medula óssea foram incubados com CTX ($0,08 \mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle) por 1 h. Em seguida, foram estimulados ou não com fMLP ($10 \mu\text{M}$) por 20 min, incubados com os anticorpos anti-CD11b (FITC) e anti-CD18 (PE) por 30 min e analisados em citometria de fluxo. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ quando comparado ao respectivo grupo controle.

6. Efeito *in vitro* da crotoxina sobre a produção de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos isolados da medula óssea

A incubação de neutrófilos medulares com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 h, não alterou a produção de espécies reativas do oxigênio em diferentes intervalos de tempo (5, 30, 60 e 90 min) na ausência ou na presença do estímulo fMLP (10 µM), quando comparado aos respectivos grupos controles incubados apenas na presença de meio RPMI 1640 (**Figura 13**).

Figura 13. Efeito *in vitro* da CTX sobre a produção de ROS por neutrófilos medulares. Neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) isolados da medula óssea foram incubados com CTX ($0,08 \mu\text{g}/\text{mL}$) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle) por 1 h. Em seguida, os neutrófilos foram marcados com a sonda DCF-DA por 30 min e incubados na presença ou ausência de fMLP ($10 \mu\text{M}$). A produção intracelular de ROS foi avaliada em diferentes intervalos de tempo com o auxílio de um fluorômetro. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo.

7. Efeito *in vitro* da crotoxina sobre a desgranulação de neutrófilos isolados da medula óssea

Como mostra a **Figura 14**, a incubação dos neutrófilos medulares com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 h, não alterou a liberação das enzimas gelatinase ou elastase em diferentes intervalos de tempo (15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min) por neutrófilos estimulados com PMA (25 ng/mL), quando comparado aos neutrófilos controles incubados apenas na presença de meio RPMI 1640.

Figura 14. Efeito *in vitro* da CTX sobre a desgranulação de neutrófilos medulares. Neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados com a CTX ($0,08 \mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle) por 1 h. Em seguida, a atividade das enzimas elastase (A) e gelatinase (B) foi avaliada em diferentes intervalos de tempo após a estimulação com PMA (25 ng/mL) ou não. A análise foi realizada com o auxílio de um fluorômetro e reflete o consumo de substratos ligados a sondas fluorescentes fornecidos para cada uma das enzimas. As atividades relativas das enzimas referem-se a razão entre os resultados obtidos na presença ou na ausência do PMA. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo.

8. Efeito *in vitro* da crotoxina sobre a expressão total e a atividade de proteínas de sinalização intracelular envolvidas na polimerização de actina em neutrófilos isolados da medula óssea

A incubação de neutrófilos medulares com a CTX (0,08 µg/mL), por 24 h, não alterou a expressão total das proteínas Syk, Vav1, RhoA, Cdc42, Rac1 ou Rac2, quando comparado ao grupo controle, o qual corresponde a neutrófilos medulares incubados com meio RPMI 1640 na ausência da CTX. Entretanto, a CTX reduziu a expressão de Syk fosforilada (**Figura 15**) e Vav1 fosforilada (**Figura 16**) em 62% e 97%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Além disso, o tratamento *in vitro* dos neutrófilos com a CTX reduziu a ativação (translocação) de RhoA, Cdc42 e Rac1 (**Figura 17**) em 63%, 95% e 51%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Não foram observadas diferenças entre a ativação da Rac2 em neutrófilos controles e tratados com CTX. Ainda, os ensaios de *Western blotting* demonstraram que a CTX *in vitro* reduziu a expressão da subunidade 1B do complexo Arp2/3 (**Figura 18 A e B**) em 77%, quando comparado ao grupo controle. A **Figura 18 (C e D)** mostra que a incubação dos neutrófilos com a CTX reduziu em 66% a F-actina em neutrófilos incubados com a CTX.

Figura 15. Efeito *in vitro* da CTX sobre a expressão total e a atividade de Syk. Neutrófilos (1×10^7) isolados da medula óssea foram incubados com a CTX (0,08 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle) por 24 h. Em seguida, foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min e as proteínas totais foram extraídas em tampão de lise. (A) Expressão total de Syk. (B) Expressão de Syk fosforilada. (C) Imagem representativa do *Western blotting* de Syk, Syk fosforilada e GAPDH. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Figura 16. Efeito *in vitro* da CTX sobre a expressão total e a atividade de Vav1. Neutrófilos (1×10^7) isolados da medula óssea foram incubados com a CTX (0,08 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle) por 24 h. Em seguida, foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min e as proteínas totais foram extraídas em tampão de lise. (A) Expressão total de Vav1. (B) Expressão de Vav1 fosforilada. (C) Imagem representativa do *Western blotting* de Vav1, Vav1 fosforilada e GAPDH. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

Figura 17. Efeito *in vitro* da CTX sobre a expressão e a ativação de Cdc42, Rac1, RhoA e Rac2. Neutrófilos (4×10^7) isolados da medula óssea foram incubados com a CTX (0,08 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle) por 24 h. Em seguida, foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min. (A) Translocação das GTPases. (B) Imagem representativa do *Western blotting* das frações de membrana (M) e citosol (C) dos neutrófilos para Cdc42, Rac1, RhoA, Rac2, caveolina 1 e GAPDH. (C) Imagem representativa do *Western blotting* das proteínas totais dos neutrófilos para Cdc42, Rac1, RhoA e Rac2. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 3 animais por grupo. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ quando comparado ao respectivo grupo controle.

Figura 18. Efeito *in vitro* da CTX sobre a expressão da subunidade 1B de Arp2/3 e a expressão de F-actina. Neutrófilos (1×10^7) foram incubados com a CTX (0,08 $\mu\text{g/mL}$) ou meio de cultura RPMI 1640 (controle) por 24 h. Em seguida, foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min e as proteínas totais foram extraídas em tampão de lise. (A) Expressão total da subunidade 1B de Arp2/3. (B) Imagem representativa do *Western blotting* da subunidade 1B de Arp2/3. (C) Expressão de F-actina. (D) Imagem representativa do *Western blotting* de F-actina. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,01$ quando comparado ao respectivo grupo controle.

9. Efeito *in vivo* da crotoxina sobre a expressão total e a atividade de proteínas de sinalização intracelular envolvidas na polimerização de actina em neutrófilos isolados da medula óssea

O pré-tratamento dos animais com CTX (44 mg/kg, s.c.), 1 dia antes do isolamento dos neutrófilos medulares, não alterou a expressão total de Syk, Vav1, Cdc42, Rac2 ou Arp 2/3, quando comparado ao grupo controle, o qual corresponde a neutrófilos isolados de animais administrados apenas com salina. Entretanto, o tratamento *in vivo* com CXT reduziu a expressão de Syk fosforilada (**Figura 19**) e Vav1 fosforilada (**Figura 20**) em 46% e 84%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, a administração de CTX nos animais reduziu significativamente a ativação (translocação) da GTPase Cdc42 (**Figura 21 A e B**) e a expressão da subunidade 1B do complexo Arp2/3 (**Figura 22 A e B**) em 50% e 52%, respectivamente, quando comparado aos animais administrados com salina. Não foram observadas diferenças entre a ativação da Rac2 dos neutrófilos isolados de animais administrados com CTX, quando comparado com neutrófilos isolados dos animais controles (**Figura 21 C, D e E**). Por fim, foi observada redução da expressão de F-actina em 46% nos neutrófilos dos animais administrados com CTX (**Figura 22 C e D**).

Figura 19. Efeito *in vivo* da CTX sobre a expressão total e a atividade de Syk. Neutrófilos (1×10^7) foram isolados de animais previamente administrados com CTX (44 $\mu\text{g/kg}$), 24 h antes da coleta de células da medula óssea. Em seguida, os neutrófilos foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min e as proteínas totais foram extraídas em tampão de lise. (A) Expressão total de Syk. (B) Expressão de Syk fosforilada. (C) Imagem representativa do *Western blotting* de Syk, Syk fosforilada e GAPDH. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

Figura 20. Efeito *in vivo* da CTX sobre a expressão total e a atividade de Vav1. Neutrófilos (1×10^7) foram isolados de animais previamente administrados com CTX (44 $\mu\text{g/kg}$), 24 h antes da coleta de células da medula óssea. Em seguida, os neutrófilos foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min e as proteínas totais foram extraídas em tampão de lise. (A) Expressão total de Vav1. (B) Expressão de Vav1 fosforilada. (C) Imagem representativa do *Western blotting* de Vav1, Vav1 fosforilada e GAPDH. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,001$ quando comparado ao respectivo grupo controle.

Figura 21. Efeito *in vivo* da CTX sobre a ativação de Cdc42 e sobre a expressão e a ativação de Rac2. Neutrófilos (1×10^7 ou 4×10^7) foram isolados de animais previamente administrados com CTX (44 $\mu\text{g/kg}$), 24 horas antes da coleta de células da medula óssea. Em seguida, os neutrófilos foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min. (A) Expressão de Cdc42-GTP. (B) Imagem representativa do *Western blotting* de Cdc42-GTP e controles positivo e negativo do ensaio. (C) Translocação de Rac2. (D) Imagem representativa do *Western blotting* das frações de membrana e citosol dos neutrófilos para Rac2, caveolina e GAPDH. (E) Imagem representativa do *Western blotting* das proteínas totais dos neutrófilos para Rac2. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Figura 22. Efeito *in vivo* da CTX sobre a expressão da subunidade 1B da Arp2/3 e a expressão de F-actina. Neutrófilos (1×10^7) foram isolados de animais previamente administrados com CTX (44 $\mu\text{g/kg}$), 24 h antes da coleta de células da medula óssea. Em seguida, os neutrófilos foram estimulados com fMLP 10 μM por 3 min e as proteínas totais foram extraídas em tampão de lise. (A) Expressão da subunidade 1B do complexo Arp2/3. (B) Imagem representativa do *Western blotting* da subunidade 1B do complexo Arp 2/3. (C) Expressão de F-actina. (D) Imagem representativa do *Western blotting* de F-actina. Os valores estão expressos como a média $\pm$ SEM de 4 animais por grupo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.

Discussão

Como mencionado na Introdução, a CTX é capaz de modular a resposta inflamatória. Nesse contexto, existem evidências que demonstram sua atividade inibitória prolongada sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e sobre a atividade fagocítica dessas células (Nunes *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012).

Os neutrófilos são originados na medula óssea e representam a maior população de células diferenciadas da linhagem granulocítica, que atuam na resposta imune inata e adaptativa (Boxio *et al.*, 2004; Gaines *et al.*, 2005; Nathan, 2006; Borregaard, 2010; Zhao *et al.*, 2012). Essas células são temporariamente armazenadas no *pool* de reserva da medula óssea e, a seguir, são liberadas para a circulação sanguínea onde permanecem por aproximadamente 10 horas (Basu *et al.*, 2002). Baseado nesse fato, com o intuito de compreender o efeito inibitório prolongado da CTX sobre a atividade dos neutrófilos, no presente estudo foi investigado o efeito *in vitro* e *in vivo* da CTX sobre a funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea e alguns dos mecanismos moleculares envolvidos nesse efeito.

Inicialmente, os neutrófilos foram isolados das demais células hematopoéticas presentes na medula óssea utilizando-se uma metodologia de separação baseada em gradientes de densidade. Os dados mostraram que esse procedimento resultou em uma suspensão de células constituída de aproximadamente 80% de neutrófilos, os quais apresentaram viabilidade superior a 90%. Esse resultado demonstrou a eficiência dessa metodologia, assim, uma vez obtido sucesso no isolamento dos neutrófilos da medula óssea, o efeito da CTX, *in vitro* ou *in vivo*, foi avaliado sobre os seguintes parâmetros funcionais: quimiotaxia, adesão, fagocitose, produção de espécies reativas do oxigênio e liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos.

Estudos anteriores evidenciaram o efeito inibitório direto da CTX sobre a fagocitose por neutrófilos peritoneais após a pré-incubação das células com diferentes

concentrações dessa toxina pelo período de 1 hora (Lima *et al.*, 2012). Nesse estudo, a concentração 0,08 µg/mL foi a mais efetiva, assim, os ensaios *in vitro* para análise da funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea foram realizados utilizando essa concentração de CTX e o mesmo tempo de incubação. Por sua vez, a dose de CTX administrada pela via subcutânea nos ensaios *in vivo* foi baseada em estudos que demonstraram o efeito inibitório da CTX sobre a migração celular para a cavidade peritoneal de camundongos (Nunes *et al.*, 2010). Entretanto, o tempo de administração da CTX foi padronizado em ensaios pilotos que avaliaram o efeito da toxina sobre a atividade fagocítica dos neutrófilos da medula óssea. Esses estudos mostraram que em tempos menores do que 1 dia não se observa efeito da CTX sobre essas células.

Na vigência da resposta inflamatória, os neutrófilos utilizam diversos receptores presentes na superfície celular para detectar o microambiente inflamatório e direcionar sua resposta celular. Esses receptores incluem as selectinas, as integrinas, os receptores acoplados à proteína G, os receptores para citocinas, entre outros. Dentre os principais agonistas inflamatórios que induzem a polarização e a migração direcionada dos neutrófilos estão os agentes quimiotáticos que interagem com os seus respectivos receptores acoplados à proteína G, como por exemplo, o fMLP (Griffith *et al.*, 2014). Esse agente, o qual se liga aos receptores formil peptídeo, vem sendo amplamente utilizado para a estimulação *in vitro* dos neutrófilos e avaliação da sua funcionalidade (Selvatici *et al.*, 2006; Mócsai *et al.*, 2015). Assim, no presente estudo, o fMLP foi utilizado, nos ensaios de quimiotaxia, fagocitose e produção de espécies reativas do oxigênio, para a estimulação *in vitro* dos neutrófilos da medula óssea e amplificação de suas atividades funcionais. De fato, os resultados mostram que o fMLP aumenta a potencialidade dos neutrófilos nas funções avaliadas.

A resposta inflamatória estimula o processo de granulopoeese e, em consequência, um grande número de neutrófilos deixa a medula óssea e vai para a corrente sanguínea. O recrutamento de neutrófilos a partir da circulação periférica para o local da injúria é desencadeado por alterações no endotélio vascular e por um microambiente inflamatório, caracterizado pela presença de mediadores químicos tais como, citocinas, agentes quimiotáticos e mediadores lipídicos, os quais interagem com os seus respectivos receptores presentes na membrana celular (Futosi *et al.*, 2013; Mócsai *et al.*, 2015). Assim, o movimento direcionado dos neutrófilos estimulados por um agente quimiotático é essencial para o aumento do influxo neutrofílico ao local da lesão (Cicchetti *et al.*, 2002). Como já mencionado, a CTX inibe, por um tempo prolongado, a migração de células inflamatórias para cavidade peritoneal induzida por carragenina (Nunes *et al.*, 2010). Nesse sentido, alterações na migração direcionada dos neutrófilos da medula óssea, induzidas pela CTX, podem contribuir para essa inibição. De fato, os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a incubação dos neutrófilos com a CTX, por 1 hora, ou a administração subcutânea da CTX, 1 dia antes do isolamento dos neutrófilos da medula óssea, inibiram o processo de quimiotaxia dessas células em direção ao fMLP.

Após estimulação dos neutrófilos com os agentes quimiotáticos, como por exemplo, o fMLP, ocorrem rearranjos estruturais do citoesqueleto, os quais levam à alteração da forma e consequente polarização da célula (Servant *et al.*, 2000; Halilovic *et al.*, 2015). O neutrófilo polarizado é caracterizado por protrusões de membrana denominadas lamelipodia e por regiões conhecidas como uropodia, constituídas por feixes de F-actina e miosina, respectivamente (Ku *et al.*, 2012). Estudos anteriores demonstraram que a CTX é capaz de inibir a polimerização de filamentos de actina necessários à reorganização do citoesqueleto dos neutrófilos durante o processo de

fagocitose (Lima *et al.*, 2012). Assim, podemos sugerir que a inibição da quimiotaxia, observada no presente estudo, pode estar associada à alteração da polimerização de actina, induzida pela CTX sobre os neutrófilos. Corrobora com essa hipótese, o fato de o mesmo efeito inibitório induzido por essa toxina ser observado sobre outros processos migratórios que dependem diretamente da reorganização do citoesqueleto, como por exemplo, a migração de células endoteliais durante o processo de angiogênese (Kato, 2014).

Em relação aos receptores presentes na membrana dos neutrófilos, cabe mencionar também a importância do receptor CR3 para o desempenho funcional dessas células. O receptor CR3 (Mac-1) é uma integrina $\beta 2$ transmembrana heterodimérica formada pelas subunidades α (CD11b) e β (CD18) que apresenta uma vasta gama de ligantes e tem papel especialmente importante na funcionalidade dos neutrófilos. Esse receptor atua nos processos de migração transendotelial dos neutrófilos para o foco inflamatório, adesão à matriz extracelular e fagocitose de partículas opsonizadas por fragmentos C3b/C3bi do complemento (Futosi *et al.*, 2013; Podolnikova *et al.*, 2015). O processo de migração transendotelial dos neutrófilos está associado à mobilização de reservatórios intracelulares desse receptor e ao aumento da sua expressão na membrana da célula. A integrina Mac-1 interage com a molécula de adesão ICAM-1, presente no endotélio vascular, o que promove a firme adesão do neutrófilo à célula endotelial e sua transmigração (Phillipson *et al.*, 2006). No presente estudo, a determinação da expressão desse receptor mostrou que a CTX induz decréscimo na expressão de ambas as subunidades (CD11b e CD18). O decréscimo dessa integrina, associado à inibição das moléculas de adesão ICAM-1 e P-selectina, induzida pela CTX, pode contribuir para a inibição prolongada dessa toxina sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e para o tecido subcutâneo (Nunes *et al.*, 2010; 2012).

Além disso, o decréscimo da expressão da integrina Mac-1, induzido pela CTX, pode alterar sua interação também com outros ligantes, o que pode acarretar o comprometimento de outras funções dos neutrófilos.

Os neutrófilos, após seu extravasamento para sítios inflamatórios, apresentam um rápido e significativo aumento de suas propriedades adesivas, o que leva a maior interação com proteínas da matriz extracelular, entre essas a fibronectina, uma glicoproteína amplamente distribuída no tecido conjuntivo. Nesse sentido, avaliamos a adesão dos neutrófilos à fibronectina e os resultados obtidos demonstraram que a CTX, *in vitro* e *in vivo*, inibiu o processo de adesão celular.

A adesão dos neutrófilos à fibronectina depende da ligação de integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ a esse substrato extracelular (Wagner & Roth, 2000; Hood & Cheresch, 2002; Anceriz *et al.*, 2007). Assim, o decréscimo da integrina $\beta 2$ Mac-1 (CR3), observado nesse estudo, pode acarretar o comprometimento da ligação dos neutrófilos da medula óssea à fibronectina, o qual foi observado nos ensaios de adesão celular. Entretanto, não pode ser descartada a possibilidade dessa toxina também inibir a expressão de integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$. Após a interação das integrinas com proteínas da matriz extracelular, a formação de projeções denominadas lamelipodia, as quais são induzidas pela polimerização da actina e facilitadas pelo decréscimo localizado da tensão superficial da membrana, são importantes para garantir a adesão do neutrófilo à matriz extracelular. Baseado nesse fato, os dados indicam novamente que a redução da adesão dos neutrófilos da medula óssea à fibronectina pode ser decorrente da redução da polimerização dos filamentos de actina.

Como citado anteriormente, a CTX inibe a fagocitose de partículas opsonizadas por fragmentos C3b/C3bi por neutrófilos peritoneais. No presente estudo, o mesmo efeito inibitório foi observado, *in vitro* e 1 dia após a administração subcutânea dessa

toxina, sobre a fagocitose por neutrófilos da medula óssea. Dessa forma, esse resultado comprova a hipótese de que o efeito inibitório prolongado da CTX sobre a fagocitose por neutrófilos peritoneais é decorrente de alterações, induzidas por essa toxina, nos neutrófilos da medula óssea que os tornam funcionalmente menos competentes.

Em relação ao processo de fagocitose, o receptor CR3 (CD11b/CD18) pode mediar a internalização de partículas opsonizadas por fragmentos C3b/C3bi do complemento, sendo os domínios I ou A da subunidade CD11b essenciais para a ligação das partículas opsonizadas (Thornton *et al.*, 1996; Balsam *et al.*, 1998; Flannagan *et al.*, 2012). Essas partículas também podem ser internalizadas pelo receptor CR1 (CD35), o qual é uma glicoproteína que participa da mediação de diversas funções dos neutrófilos, incluindo a fagocitose (Lanza & Castoldi, 1992). Apesar de ter sido observado efeito inibitório da CTX sobre a expressão do receptor CR3, como mencionado, essa toxina, *in vitro*, não altera a expressão do CR1 (dados não mostrados). Assim, os dados sugerem que o decréscimo na expressão do receptor CR3 colabora também, para a inibição da atividade fagocítica dessas células.

Vale ressaltar que o mesmo efeito inibitório sobre a atividade fagocítica dos neutrófilos da medula óssea foi observado, 14 dias após a administração subcutânea de uma única dose de CTX. Considerando que os neutrófilos em diferenciação terminal e os neutrófilos maduros podem permanecer na medula óssea por até 6 dias (Dancey *et al.*, 1976), o efeito inibitório prolongado da CTX (14 dias) pode ser devido à ação dessa toxina sobre células precursoras da linhagem mieloide. Essa hipótese está sendo investigada atualmente.

O processo de fagocitose está associado à liberação de proteínas microbidas contidas nos grânulos citoplasmáticos, bem como ao aumento do metabolismo oxidativo da célula, conhecido como *burst* oxidativo, durante o qual são produzidas espécies

reativas do oxigênio, também com potencial microbica (Nauseef & Borregaard, 2014). Estudos anteriores demonstram que a CTX não interfere na atividade microbica, bem como na produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio ou ácido hipocloroso induzidos por PMA nos neutrófilos peritoneais (Lima *et al.* 2012). Da mesma forma, no presente estudo, a CTX não alterou a geração de espécies reativas do oxigênio, espontânea ou após estimulação dos neutrófilos por fMLP. Adicionalmente, essa toxina não alterou o processo de liberação das enzimas elastase e gelatinase, presentes nos grânulos primários e terciários, respectivamente, dos neutrófilos isolados da medula óssea. Esses resultados confirmam que a CTX não altera o potencial microbica dos neutrófilos, independentemente do estímulo. Apesar das espécies reativas do oxigênio serem consideradas como moléculas pró-inflamatórias e deletérias para o tecido, em estudo recente foi demonstrado seu papel predominantemente anti-inflamatório. Em modelo de doença inflamatória intestinal, foi demonstrado que a hipóxia induzida no tecido, pelo elevado consumo de oxigênio para a geração de espécies reativas do oxigênio pelos neutrófilos, aumenta a produção de resolvinas, tais como a resolvina D1 e a lipoxina A₄ (Borregaard, 2014; Campbell *et al.*, 2014). O fato de a CTX não alterar a produção de espécies reativas do oxigênio pode contribuir para sua ação anti-inflamatória.

Em relação à funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea, os resultados obtidos nesse estudo demonstram que a administração subcutânea da CTX induz efeito inibitório sobre essas células. Além disso, os dados mostram que esse efeito provavelmente é direto sobre a célula, uma vez que o mesmo efeito foi observado após a incubação dos neutrófilos com essa toxina. Entretanto, a possível participação de mediadores endógenos anti-inflamatórios, como por exemplo, a lipoxina, não pode ser descartada no efeito inibitório dessa toxina, observado *in vivo*. A lipoxina, um

eicosanóide produzido na via da lipoxigenase, é um mediador com ação anti-inflamatória que se liga a receptores FPR2/ALX (receptor formil peptídeo 2) para desempenhar suas funções biológicas. Dentre essas, a lipoxina inibe a quimiotaxia, a adesão e a transmigração dos neutrófilos, bem como a expressão do receptor CR3 nessas células (Maderna & Godson, 2009; Ryan & Godson, 2010). Corrobora para essa hipótese, o fato de a CTX induzir a liberação de lipoxina por macrófagos em cultura (Costa *et al.*, 2013) e por neutrófilos no tecido subcutâneo após administração de carragenina (Nunes *et al.*, 2015, em publicação). Adicionalmente, recentemente foi demonstrado que a CTX induz a secreção de lipoxina no tecido do cólon, após a indução da inflamação intestinal (Almeida *et al.*, 2015). Outro fato que deve ser considerado refere-se ao envolvimento dos receptores formil peptídeo na ação anti-inflamatória da CTX (Nunes *et al.*, 2010).

Em relação aos resultados obtidos nesse estudo, cabe mencionar, também, que a inibição induzida pela CTX foi observada, predominantemente, na presença dos estímulos fMLP ou PMA, o que reforça a ação inibitória dessa toxina no contexto da resposta inflamatória.

Ainda, a análise conjunta dos resultados sugere fortemente que a ação inibitória da CTX sobre a funcionalidade dos neutrófilos é decorrente da alteração da reorganização do citoesqueleto da célula. Esse processo envolve mecanismos moleculares que são ativados após a interação de receptores presentes da superfície da célula com seus respectivos ligantes, o que acarreta na polimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto.

Com o intuito de investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos na ação inibitória da CTX sobre as funções avaliadas, foi investigado o efeito dessa toxina sobre vias de sinalização intracelular envolvidas na polimerização de actina.

Como mencionado anteriormente, os receptores acoplados à proteína G estão associados com a quimiotaxia dos neutrófilos, enquanto que receptores do tipo integrina $\beta 1$ e $\beta 2$, são importantes para os processos de adesão e fagocitose por neutrófilos. Uma das principais vias de sinalização, comum a esses três receptores, inicia-se com a autofosforilação da proteína tirosina quinase Syk, a qual se torna ativa e fosforila proteínas GEFs, como por exemplo, GEFs da família Vav1, as quais têm a capacidade de induzirem a ativação de diferentes GTPases da família Rho, por ligação a GTP e translocação à membrana plasmática. Por sua vez, algumas GTPases, tais como Cdc42 e Rac1 induzem a formação do complexo polimerizador de actina Arp2/3, o qual atua na polimerização dos monômeros de actina em filamentos de F-actina (Schymeinsky *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2010). Assim, no presente estudo, foi investigado o efeito da CTX sobre a expressão total e a atividade dessas proteínas sinalizadoras.

Os resultados mostraram que a CTX inibiu a atividade de Syk e Vav1, bem como a translocação de Cdc42, Rac1 e RhoA para a membrana plasmática, porém não alterou a expressão total dessas proteínas. Adicionalmente, a CTX induziu o decréscimo da expressão da subunidade 1B do complexo Arp2/3, a qual é fundamental para a formação do complexo e a consequente formação de F-actina.

Em relação às proteínas Syk e Vav, diversos estudos mostram que a ausência dessas proteínas protege os animais, completamente, contra o desenvolvimento da artrite induzida experimentalmente (Jakus *et al.*, 2010; Elliott *et al.*, 2011; Cremasco *et al.*, 2008). Ainda, a literatura relata a importância da ativação dessas proteínas para a adesão e o extravasamento dos neutrófilos, bem como para a produção de citocinas pró-inflamatórias por essas células (Mócsai *et al.*, 2002; Elliott *et al.*, 2011). Dessa forma, a inibição das proteínas de sinalização intracelular Syk e Vav pode ser um dos mecanismos envolvidos no efeito anti-inflamatório da CTX. Essas proteínas, para sua

ativação, necessitam ser fosforiladas em seus resíduos de tirosina. Dessa forma, a redução da fosforilação de resíduos de tirosina, observada nos neutrófilos peritoneais e induzida pela CTX (Lima *et al.*, 2012) pode ser resultante, em parte, da inibição da fosforilação de Syk e Vav1.

Além disso, em relação às vias de sinalização, cabem algumas considerações. Como citado anteriormente, nos neutrófilos, a GTPase Rac1 tem papel significativo na regulação da polimerização de actina, porém não atua na ativação da enzima NADPH oxidase, fundamental para a produção de espécies reativas do oxigênio. A proteína que regula essa ativação é a Rac2, a qual tem também papel crucial no processo de desgranulação que ocorre nos neutrófilos (Ming *et al.*, 2007; Lacy & Eitzen, 2008; Petry *et al.*, 2010). Esse estudo mostrou que a CTX, apesar de inibir a GTPase Rac1, não altera a expressão total ou a atividade de Rac2. Assim, esse fato contribui para explicar por que essa toxina não altera a produção de espécies reativas do oxigênio ou a liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos por neutrófilos da medula óssea.

Em conjunto, esse estudo demonstra que a CTX altera a funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea, inibindo, *in vitro* e *in vivo*, a quimiotaxia, a adesão à matriz extracelular e a fagocitose, porém não altera a produção de espécies reativas e a liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. Ainda, o estudo demonstra que a inibição da funcionalidade dos neutrófilos está associada à redução da atividade da proteína Syk e de suas proteínas *downstream* (Vav1, RhoA, Rac1 e Cdc42), bem como à inibição da formação do complexo Arp2/3, o que resulta na redução da formação de filamentos de F-actina e no consequente comprometimento da quimiotaxia, adesão e fagocitose por neutrófilos.

Dessa forma, esse estudo comprova a hipótese de que a ação inibitória prolongada da CTX sobre a atividade dos neutrófilos circulantes e peritoneais está

associada a alterações funcionais dos neutrófilos da medula óssea e, ainda, contribui para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nessa ação inibitória. Além disso, considerando-se a participação central dos neutrófilos na resposta inflamatória aguda, esse estudo contribui para a elucidação do efeito anti-inflamatório prolongado da CTX.

Resumo dos Resultados

VIII. RESUMO DOS RESULTADOS

- A incubação dos neutrófilos da medula óssea com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 h, inibiu a quimiotaxia, a adesão à fibronectina e a atividade fagocítica dessas células.
- A incubação dos neutrófilos da medula óssea com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 h, inibiu a expressão das subunidades α e β do receptor CR3.
- Por outro lado, a incubação dos neutrófilos da medula óssea com a CTX (0,08 µg/mL), por 1 h, não alterou a produção de espécies reativas do oxigênio e a desgranulação dessas células.
- A administração de CTX nos animais (44 mg/kg, s.c.), 1 dia antes da coleta dos neutrófilos da medula óssea, inibiu a quimiotaxia, a adesão à fibronectina e a atividade fagocítica dessas células.
- A administração de CTX nos animais (44 mg/kg, s.c.), 14 dias antes da coleta dos neutrófilos da medula óssea, inibiu a atividade fagocítica dessas células.
- A incubação dos neutrófilos da medula óssea com a CTX (0,08 µg/mL), por 24 h, não alterou a expressão total de Syk, Vav1, Cdc42, RhoA, Rac1 ou Rac2, porém reduziu a expressão de Syk fosforilada e Vav1 fosforilada, bem como a ativação de Cdc42, RhoA e Rac1, e a expressão de Arp2/3 e F-actina.

-
- A administração de CTX nos animais (44 mg/kg, s.c.), 1 dia antes da coleta dos neutrófilos da medula óssea, não alterou a expressão total de Syk, Vav1, Cdc42 e Rac2, entretanto, reduziu a expressão de Syk fosforilada e Vav1 fosforilada, bem como a ativação de Cdc42 e a expressão de Arp2/3 e F-actina.

Conclusão

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que a CTX altera a funcionalidade dos neutrófilos da medula óssea, inibindo a quimiotaxia, a adesão à matriz extracelular e a fagocitose. Esse efeito inibitório está relacionado ao decréscimo da atividade da proteína sinalizadora Syk e de suas proteínas *downstream*: Vav1, RhoA, Rac1 e Cdc42, bem como à inibição da formação do complexo Arp2/3, o que resulta na redução da expressão de F-actina e impede a reorganização adequada do citoesqueleto.

Referências Bibliográficas

Aktories K, Schwan C, Papatheodorou P, Lang AE. Bidirectional attack on the actin cytoskeleton. Bacterial protein toxins causing polymerization or depolymerization of actin. *Toxicon* 2012;60:572-81.

Almeida CS, Andrade-Oliveira V, Câmara NOS, Jacysyn JF, Faquim-Mauro EL. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. *Plos One* 2015;10(4).

Amaral CFS, Magalhães RA, Rezende NA. Comprometimento respiratório secundário a acidente (*Crotalus durissus*). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991;33(4):251-55.

Amorim MF, Franco de Mello R, Saliba F. Envenenamento botrópico e crotálico. *Mem Inst Butantan* 1951;23:108.

Anceriz N, Vandal K, Tessier PA. S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of $\beta 2$ integrins. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(1):84-9.

Assis A, Conran N, Canalli AA, Lorand-Metze I, Saad STO, Costa FF. Effect of cytokines and chemokines on sickle neutrophil adhesion to fibronectin. *Acta Haematol* 2005; 113:130-6.

Azevedo-Marques MM, Cupo P, Hering SE. Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in human causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon* 1987;25(11):1163-68.

Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002;397(2):342-4.

Bainton DF, Farquhar MG. Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. *J Cell Biol* 1999;28(2):277-301.

Baldrige MT, King KY, Goodell MA. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol* 2011;32(2):57-65.

Balsam LB, Liang TW, Parkos CA. Functional mapping of CD11b/CD18 epitopes important in neutrophil-epithelial interactions: a central role of the I domain. *J Immunol* 1998;160(10):5058-65.

Barrio A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol Latinoamericana* 1961;11:24.

Basu S, Hodgson G, Katz M, Dunn AR. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 2002;100(3):854-61.

Berger M, Wetzler EM, Wallis RS. Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. *Blood* 1988;71:151.

Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Cir Res* 2001;89(9).

Bohdanowics M, Cosio G, Backer JM, Grinstein S. Class I and class II phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes. *J Cell Biol* 2010;191(5):999-1012.

Bohnsack JF, Chang J. Activation of beta 1 integrin fibronectin receptors on HL60 cells after granulocytic differentiation. *Blood* 1994;83(2):543-52.

Bon C, Changeux JP, Jeng TW, Frankel-Conrat H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur J Biochem* 1979;99(3):471-81.

Borgquist JD, Quinn MT, Swain SD. Adhesion to extracellular matrix proteins modulates bovine neutrophil responses to inflammatory mediators. *J Leukoc Biol*, 2002;71:764-74.

Borreagaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997;89:3503-21.

Borreagaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010;4(33):657-70.

Booregaard N. What doesn't kill you makes you stronger: the anti-inflammatory effect of neutrophil respiratory burst. *Immunity* 2014;40(1):1-2.

Boxio R, Bossenmyer-Pourie C, Steinckwich N, Dournon C, Nüsse O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2004;75(4):604-11.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;7(72):248-54.

Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust J Biol Med Sci* 1966;4(3):287-99.

Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003;83:581-632.

Campbell EL, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, Glover LE, McNamee EN, Bowers BE, Bayless AJ, Scully M, Saeedi BJ, Golden-Mason L, Ehrentauf SF, Curtis VF, Burgess A, Garvey JF, Sorensen A, Nemenoff R, Jedlicka P, Taylor CT, Kominsky DJ, Colgan SP. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity* 2014;40(1):66-77.

Carman CV, Springer TA. A transmigration cup in leukocyte both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 2004;167(2):377-88.

Castro FR, Farias AS, Proença PL, De La Hoz C, Langone F, Oliveira EC, Toyama MH, Marangoni S, Santos LM. The effect of treatment with crotoxin on the evolution of experimental autoimmune neuritis induced in Lewis rats. *Toxicon* 2007;49:299-305.

Catz SD. The role of Rab27a in the regulation of neutrophil function. *Cell Microbiol* 2014;16(9):1301-10.

Chilvers ER, Cadwallader KA, Reed BJ, White JF, Condliffe AM. The function and fate of neutrophils at the inflamed site: prospects for therapeutic intervention. *J R Coll Physicians Lond* 2000;34(1):68-74.

Choumet V, Bouchier C, Délot E, Faure G, Saliou B, Bon C. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A₂ from the venom of a South-American rattlesnake. *Adv Exp Med Biol* 1996;391:197-202.

Cicchetti G, Allen PG, Glogauer M. Chemotatic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002;13:220-8

Costa ES, Faiad OJ, Landgraf RG, Ferreira AK, Brigatte P, Curi R, Cury Y, Sampaio SC. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumor cells. *Toxicon* 2013;74:167-78.

Cremasco V, Graham DB, Novack DV, Swat W, Faccio R. Vav/Phospholipase C γ 2-mediated control of a neutrophil-dependent murine model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:2712-2722.

Cupo P, Azevedo-Marques MM, Hering SE. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans R Soc Trop.Med Hyg* 1988;82(6):924-29.

Cura JE, Blanzaco DP, Brisson C. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA₂, NSC-624244) in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1033-41.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 2008;112:935-45.

Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest* 1976;58(3):705-15.

De Leo FR, Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol* 1996;60(6):677-91.

Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I-domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* 1993;120(4):1031-43.

Edwards SW. The development and structure of mature neutrophils. In: Biochemistry and physiology of the neutrophil. Cambridge University Press, 2005:33-74.

Elliott ER, Van Ziffle JA, Scapini P, Sullivan BM, Locksley RM, Lowell CA. Deletion of Syk in neutrophils prevents immune complex arthritis. *J Immunol* 2011;187:4319-4330.

Engelhardt B, Wolburg H. Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 2004;34(11):2955-63.

Faure G, Bon C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. *Biochemistry* 1988;27:730-38.

Faure G, Xu H, Saul FA. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. *J Mol Biol*. 2011;412(2):176-91.

Faure G, Saul F. Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and ammodytoxin, potent β -neurotoxins from *Viperidae* venom. *Toxicon* 2012;60:531-38.

Favoretto BC, Ricardi R, Silva SR, Jacysyn JF, Fernandes I, Takehara HA, Faquim-Mauro EL. Immunomodulatory effects of crotoxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom in mice immunized with human serum albumin. *Toxicon* 2011;57:600-7.

Ferreira SH, Ng KK, Vane JR. The continuous bioassay of the release and disappearance of histamine in the circulation. *Br J Pharmacol* 1973;49(3):543-53.

Fiedler K, Sindrilaru A, Terszowski G, Kokai E, Feyerabend TB, Bullinger L, Rodewald H, Brunner C. Neutrophil development and function critically depend on Bruton tyrosine kinase in a mouse model of X-linked agammaglobulinemia. *Blood*, 2011;117:1329-1339.

Flannagan RS, Jaumouillé V, Gristein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 2012;7:61-98.

Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 2013;17(3):638-50.

Gaines P, Chi J, Berliner N. Heterogeneity of functional responses in differentiated myeloid cell lines reveals EPRO cells as a valid model of murine neutrophil functional activation. *J Leukoc Biol*. 2005;77(5):669-79.

Gakidis MA, Cullere X, Olson T, Wilsbacher JL, Zhang B, Moores SL, Ley K, Swat W, Mayadas T, Brugge JS. Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J Cell Biol* 2004;166(2):273-82.

Ginis I, Faller DV. Protection from apoptosis in human neutrophils is determined by the surface of adhesion. *Am J Physiol* 1997;272:295-309.

Goley ED, Welch MD. The Arp2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7(10):713-26.

Gomes RT, Camargo RPF, Viotti AP, Tavares AP, Revelo MP, Freitas TV. Comparison of the biodistribution of free or liposome-entrapped *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom in mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;131(3):295-301.

Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ. Innate immunity and aging. *Exp Gerontol* 2008;43(8):718-28.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 2014;32:659-702.

Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1957-76.

Habermann E, Breithaupt H. The crotoxin complex - an example of biochemical and pharmacological protein complementation. *Toxicon* 1978;16(1):19-30.

Halilovic I, Wu J, Alexander M, Lin F. Neutrophil migration under spatially-varying chemoattractant gradient profiles. *Biomed Microdevices* 2015;17(3).

Hawgood BJ, Santana de Sá S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and this component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience* 1979;4(2):293-303.

Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002;2(2):91-100.

Imlay JA, Linn S. Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 1986;166(2):519-527.

Itou T, Collins LV, Thorén FB, Dahlgren C, Karlsson A. Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: a comparison of bone marrow and peritoneal exsudate PMN. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(5):575-583.

Jakus Z, Simon E, Balázs B, Mócsai A. Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1899-1910.

Janeway CA, Travers P. The immune system in health and disease. In: *Immunobiology*. New York, Ed. Current Biology, Garland Publishing, 1994:12-16.

Johnson JL, Monfregola J, Napolitano G, Kiosses WB, Catz SD. Vesicular trafficking through cortical actin during exocytosis is regulated by the Rab27a effector JFC1/Slp1 and the RhoA-GTPase-activating protein GEF-interacting protein. *Mol Biol Cell* 2012;23(10):1902-16.

Kim H, Skokos EA, Myer DJ, Agaba P, Gonzalez AL. $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin regulation of respiratory burst in fibrinogen adherent human neutrophils. *Cell Mol Bioeng* 2014;7(2):231-42.

Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005;77(5):598-625.

Kölsch V, Charest PG, Firtel RA. The regulation of cell mobility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci* 2008;121:551-59.

Kowal-Vern A, Wlanga JM, Shapr-Pucci M, Hoppensteadt D, Gamelli RL. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endothelial-1, and C1 esterase inhibitor. *J Burn Care Rehabil* 1997;18(2):99-103.

Ku C, Wang Y, Weiner OD, Altschuler SJ, Wu LF. Network crosstalk dynamically changes during neutrophil polarization. *Cell* 2012;149(5):1073-83.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins & Cotran – Bases patológicas das doenças. São Paulo. Editora Elsevier, 8ª edição, 2010.

Kwiatkowska K, Sobota A. Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays* 1999;21(5):422-31.

Lacy P, Eitzen G. Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front Biosci* 2008;13:5559-70.

Ladoux B, Nicolas A. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep Prog Phys* 2012;75(11):1-25.

Landucci ECT, Aantunes E, Donato JL, Faro R, Hyslop S, Marangoni S, Oliveira B, Cirino G, De Nucci G. Inhibition of carrageenan-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *Br J Pharmacol* 1995;114(3):578-83.

Lanza F, Castoldi G. Complement receptor 1 (CR1) expression in chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 1992;8:35-41.

Laszlo J, Rundles RW. Morphology of granulocytes. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Rundles. Hematology, Blakiston, 1972:560-67.

Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infection*, 2003;5(14):1299-1306.

Li JL, Ng LG. Peeking into the secret life of neutrophils. *Immunol Res* 2012;53:168-81.

Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994;15(84):1737-46.

Lima TS, Cataneo SC, Iritus ACC, Sampaio SC, Della-Casa MS, Cirillo MC. Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. *Exp Biol Med* 2012;237:1219-30.

Lôbo-de-Araújo A, Radvanyi F. Determination of phospholipase A4 activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon* 1987;25(11):1181-8.

Maderna P, Godson C. Lipoxins: resolutionary road. *Br J Pharmacol* 2009;158(4):947-59.

Majno G, Joris I. Inflammation: The actors and their language. In: Cells, tissues and disease. Principles of general pathology. New York, Oxford University Press, 2004:307-82.

Mantovani A, Cassatella MA, Costatini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11(8):519-31.

Martins PF. *Crotalus durissus terrificus*. Contagem, Minas Gerais, Brasil. 2011. Foto disponível em <https://www.flickr.com/photos/phm22/6801797795>. Acesso em 06 de julho de 2015.

May RC, Caron E, Hall A, Machesky LM. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol* 2000;2(4):246-8.

Mayani H, Guilbert LJ, Janowska-Wieczorek A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol* 1992;49(5):225-33.

Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 1989;339:27-30.

Ming W, Li S, Billadeau D, Quilliam LA, Dinanuer MC. The Rac effector p67phox regulates phagocyte NADPH oxidase by stimulating Vav1 guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell Biol* 2007;27(1):312-23.

Mitchell T, Lo A, Logan MR, Lacy P, Eitzen G. Primary granule exocytosis in human neutrophils is regulated by Rac-dependent actin remodeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295(5):1354-65.

Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002;16:547-58.

Mócsai A, Walzog B, Lowell CA. Intracellular signaling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc Res* 2015.

Moura-Gonçalves J, Vieira A. Estudo sobre veneno de serpentes brasileiras. I. Análise Eletroforética. *An Acad Bras Cienci* 1950;22:141-150.

Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol* 1995;128:589-98.

Muller WA. Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes. *Circ Res* 2009;105:223-30.

Nahas L, Macfarlane RG, Denson KW. A study of the coagulant action of eight snake venoms. *Thromb Diath Haemorrh* 1964;12:355-67.

Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014;15(7):602-11.

Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(3):173-82.

Neuman E, Huleatt JW, Jack RM. Granulocyte - Macrophage colony-stimulating factor increased synthesis and expression of CR1 and CR3 by human peripheral blood neutrophils. *J Immunol* 1990;145(10):3325-32.

Niggli V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(12):1619-38.

Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol* 2011;90(2):271-84.

Nunes FP, Sampaio SC, Santoro ML, Sousa-e-Silva MC. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*, 2007;49(8):1090-8.

Nunes FP, Zychar BC, Della-Casa MS, Sampaio SC, Gonçalves LR, Cirillo MC. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon* 2010;55:1100-6.

Nunes FPB, Della-Casa M, Cirillo M.C. Inhibition of secretion of pro-inflammatory cytokines contributes to the long-lasting anti-inflammatory properties of crotoxin: a natural toxin from rattlesnake venom. *Inflamm Res* 2011;60:111.

Nunes FPB, Ferreira SS, Santoro ML, Sampaio SC, Lima TS, Spadacci-Morena DD, Della-Casa MS, Cirillo MC. CTX induces a long-lasting increase of endogenous anti-inflammatory mediators and down modulates proinflammatory parameters. *Toxicon, em submissão*.

Padmanabhan J, Gonzalez AL. The effects of extracellular matrix proteins on neutrophil-endothelial interaction – a roadway to multiple therapeutic opportunities. *Yale J Biol Med* 2012;85(2):167-85.

Park H, Chan MM, Iritani BM. Hem-1: Putting the “WAVE” into actin polymerization during an immune response. *FEBS Letters* 2010;584:4923-32.

Petry A, Weitnauer M, Görlach A. Receptor activation of NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal* 2010;13(4):467-87.

Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med* 2006;203(12):2569-75.

Pillay J, Den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, De Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. *In vivo* labeling with H₂O₂ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010;116(4):625-27.

Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000;275(29):21785-88.

Podolnikova NP, Podolnikov AV, Haas TA, Lishko VK, Ugarova, TP. Ligand recognition specificity of leukocyte integrin $\alpha M\beta 2$ (Mac-1, CD11b/CD18) and its functional consequences. *Biochemistry* 2015;54(6):1408-20.

Pollard TD. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2007;36:457-77.

Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 2009;326:1208-12.

Prado-Franceschi J, Brazil OV. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 1981;19(6):875-87.

Rangel-Santos A, Dos-Santos EC, Lopes-Ferreira M, Lima C, Cardoso DF, Mota I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 2004;43:801-10.

Rankin J. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues* 2004;15(1):3-17.

Renkawitz J, Sixt M. Mechanisms of force generation and force transmission during interstitial leukocyte migration. *Embo Rep* 2010;11(10):744-50.

Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell* 2011;145(7):1012-22.

Rocha e Silva M, Garcia-Leme J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. Oxford: Pergamon Press, 1972:1-47.

Roos D, Van Bruggen R, Meischl, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect* 2003;5(14):1307-15.

Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan* 1947;20:315-328.

Rosenfeld G. Symptomathology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: Büchel W, Buckley E. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, 1971:345-84.

Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(2):166-72.

Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessie PA. Proinflammatory activities of S100 proteins: S100A8, S100A9 and S10A8/S100A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003;170:3233-42.

Sampaio SC, Sousa-e-Silva MCC, Borelli P, Curi R, Cury Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J Leukoc Biol*, 2001;70(4):551-58.

Sampaio SC, Brigatte P, Sousa-e-Silva MCC, Dos-Santos EC, Rangel-Santos AC, Curi R, Cury Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon* 2003;41(7):899-907.

Sampaio SC, Rangel-Santos AC, Peres CM, Curi R, Cury Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon* 2005;45:671-76.

Sampaio SC, Alba-Loureiro TC, Brigatte P, Landgraf RG, Dos Santos EC, Curi R, Cury Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon* 2006a;47(3):313-21.

Sampaio SC, Santos MF, Costa EP, Rangel-Santos AC, Carneiro SM, Curi R, Cury Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. *Toxicon* 2006b;47(8):909-19.

Sampaio SC, Hyslop S, Fontes MRM, Prado-Francesqui J, Zambelli VO, Magro AJ, Brigatte P, Gutierrez V, Cury Y. Crotoxin: novel activities for a classic β -neurotoxin. *Toxicon* 2010;55:1045-60.

Sample AK, Czuprynski CJ. Priming and stimulation of bovine neutrophil by recombinant human interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha. *J Leukoc Biol* 1991;49(2):107-15.

Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost* 2007;98(2):262-73.

Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 2006; 534(1-3):1-11.

Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 2000;287(5455):1037-40.

Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2005;7:151-85.

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

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76-85.

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

Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827-72.

Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(1):86-92.

Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res* 2001;88:877-87.

Umanskiy K, Robinson C, Cave C, Williams MA, Lentsch AB, Cuschieri J, Solomkin JS. NADPH oxidase activation in fibronectin adherent neutrophils: a potential role for beta 1 integrin ligation. *Surgery* 2003;134(2):378-83.

Unkeless JC, Wright SD. Phagocytic cells: Fcγ and complement receptors. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. Inflammation: basic principles and clinical correlates. New York, Raven Press, 1988:343.

Vane J.R. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994;343:225-46.

Vital-Brazil O, Excell BJ. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J Physiol* 1971;212(2):34-35.

Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*, 2000;52:349-74.

Walzog B, Offermanns, Zakrzewics A, Gaehtgens P, Ley K. β2 integrins mediate protein tyrosine phosphorylation in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1996;59(5):747-53.

Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;18:247-88.

Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol* 2010;17(1):9-17.

Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 2010;49:1618-31.

Yagi M, Kantarci A, Iwata T, Omori K, Ayilavarapu S, Ito K, Hasturk H, Van Dyke TE. PDK1 regulates chemotaxis in human neutrophils. *J Dent Res* 2009;88(12):1119-24.

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

Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G, Zou W. Bone marrow and the control of immunity. *Cell Mol Immunol* 2012;9(1):11-9.