LUCIANA DE ARAÚJO PIMENTA

Investigação do processo de reconhecimento molecular da crotoxina em macrófagos: avaliação da interação toxina-bicamada e receptores peptídeo formil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni

Co-orientadora: Dra. Kerly Fernandes Mesquita

Pasqualoto

Versão Corrigida

RESUMO

PIMENTA, L.A. Investigação do processo de reconhecimento molecular da crotoxina em macrófagos: avaliação da interação toxina-bicamada e receptores peptídeo formil. 2021. 132f. Tese (Doutorado em: Farmacologia) — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Vários estudos têm demonstrado que a Crotoxina (CTX), principal toxina do veneno da serpente Crotalus durissus terrificus, possui ações antitumoral, anti-inflamatória, antiviral e imunomoduladora em modelos in vivo e in vitro. Em macrófagos, atividades biológicas, como crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, endocitose, migração e secreção são processos relacionados à sinalização mediada por receptores expressos na superfície da membrana dessas células. Em relação às atividades imunomoduladoras, a CTX estimula, em particular, o metabolismo energético dos macrófagos e a produção de citocinas e Lipoxina A4 (LXA₄) e seu análogo estável 15-Epi-LXA₄ (15-Epi-LXA₄), mediadores lipídicos com potente efeito imunomodulador. Sobre diferentes processos fisiopatológicos, estas ações da CTX são bloqueadas em sua totalidade por Boc-2, um antagonista do receptor peptídeo formil peptídeo (FPR). Além dos FPRs, essas atividades biológicas também envolvem processos como abertura e fechamento de canais iônicos, geração de curvatura de membrana e formação de poros. Apesar dessas evidências, ainda não se sabe se os FPRs estariam envolvidos e se também participam da entrada da toxina nos macrófagos, e ainda, de que forma esta toxina interage com diferentes moléculas da membrana. No presente estudo, foi investigado se o silenciamento dos FPRs 1 e 2 nos monócitos THP-1 ou macrófagos THP-1 poderia comprometer a entrada da CTX, por meio da técnica de nucleofecção para o silenciamento e imunofluorecências para observação da entrada da toxina nas células utilizando ou não inibidores como Boc-2 (FPRs 1 e 2). Foram realizados ensaios para avaliar atividade biológica como dosagem de peróxido, espraiamento, fagocitose e técnica de western blotting. Em ensaios termo-estruturais, foram utilizados lipídio neutro, como DPPC e aniônicos, como DPPG e DPPS que são mais abundantes na membrana celular dos macrófagos e técnicas como DSC, EPR e vazamento de carboxifluoresceína. Dos resultados, tanto a técnica de silenciamento de siRNA de FPR-1, bem como o ensaio farmacológico, usando Boc-2 (FPRs 1 e 2) demonstrou claramente a participação crucial de FPRs 1 e 2 e sua interação com a cascata de sinalização a jusante para tirosina quinase em ações imunomoduladoras da CTX sobre as funções de macrófagos humanos. Por outro lado, os FPRs não estão envolvidos com a entrada na toxina em macrófagos humanos, sugerindo que esses receptores são fundamentais para acionar as ações parácrinas e autócrinas de LXA4 e seu análogo 15-Epi-LXA4 induzidas por CTX em macrófagos. Foi demonstrado também que CTX pode além de penetrar nas células THP-1, induzir poros apenas nas membranas lipídicas aniônicas, em especial vesículas compostas por DPPS. Considerando que a seletividade da composição lipídica varia em diferentes tecidos e órgãos do corpo humano, os estudos termoestruturais aqui apresentados são extremamente importantes para abrir novas investigações sobre as atividades biológicas descritas para CTX em diferentes sistemas biológicos reais.

Palavras-chave: Crotoxina. Macrófagos. Receptores Peptídeo Formil. Imunomodulação. Estudo Termo-Estrutural.

ABSTRACT

PIMENTA, L.A. Investigation of the process of molecular recognition of crotoxin in macrophages: evaluation of the toxin-bilayer interaction and formyl peptide receptors. 2021. 132f. Ph. D. these (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Several studies have shown that Crotoxin (CTX), the main toxin in the Crotalus durissus terrificus snake venom, has antitumor, anti-inflammatory, antiviral and immunomodulatory actions in in vivo and in vitro models. In macrophages, biological activities such as growth, differentiation, activation, recognition, endocytosis, migration and secretion are processes related to signaling mediated by receptors expressed on the membrane surface of these cells. Regarding immunomodulatory activities, CTX stimulates, in particular, the energy metabolism of macrophages and the production of cytokines and Lipoxin A₄ (LXA₄) and its stable analogue 15-Epi-LXA₄ (15-Epi-LXA₄), lipid mediators with potent immunomodulatory effect. On different pathophysiological processes, these actions of CTX are blocked in their entirety by Boc-2, a formyl peptide receptor (FPR) antagonist. In addition to FPRs, these biological activities also involve processes such as opening and closing ion channels, generating membrane curvature and pore formation. Despite this evidence, it is still unknown whether FPRs would be involved and if they also participate in the entry of the toxin into macrophages, and also how this toxin interacts with different molecules of the membrane. In the present study, it was investigated whether the silencing of FPRs 1 and 2 in THP-1 monocytes or THP-1 macrophages could compromise the entry of CTX, through the nucleofection technique for silencing and immunofluorescence to observe the entry of the toxin into cells using or not inhibitors such as Boc-2 (FPRs 1 and 2). Assays were carried out to evaluate biological activity such as peroxide dosage, spreading, phagocytosis and western blotting technique. In thermostructural assays, neutral lipids, such as DPPC and anionics, such as DPPG and DPPS, which are more abundant in the cell membrane of macrophages, and techniques such as DSC, EPR and carboxyfluorescein leakage, were used. From the results, both the FPR-1 siRNA silencing technique as well as the pharmacological assay using Boc-2 (FPRs 1 and 2) clearly demonstrated the crucial participation of FPRs 1 and 2 and their interaction with the a signaling cascade, for tyrosine kinase in CTX immunomodulatory actions on human macrophage functions. On the other hand, FPRs are not involved with toxin entry into human macrophages, suggesting that these receptors are critical to trigger the CTX-induced paracrine and autocrine actions of LXA4 and its 15-Epi-LXA4 analogue in macrophages. It was also demonstrated that CTX can, in addition to penetrating THP-1 cells, induce pores only in anionic lipid membranes, especially vesicles composed of DPPS. Considering that the selectivity of the lipid composition varies in different tissues and organs of the human body, the thermostructural studies presented here are extremely important to open new investigations on the biological activities described for CTX in different real biological systems.

Keywords: Crotoxin. Macrophages. Formyl Peptide Receptors. Immunomodulation. Thermostructural Study.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os estudos de caracterização da composição e das propriedades biológicas de venenos animais ampliaram-se de maneira importante, em diferentes áreas da Ciência da Vida. Em relação aos venenos de serpente, do ponto de vista fisiológico, suas principais atividades são a autodefesa e a captura de presas. Esses venenos apresentam vários componentes tóxicos (toxinas), responsáveis por diversos efeitos biológicos, tais como distúrbios na coagulação sanguínea, hemólise, hemorragia local e sistêmica, hipertensão, efeitos neurotóxicos, necrose tecidual, entre outros (IWANAGA; SUZUKI, 1979; MARKLAND, 1998; WALTER; BILDEN; GIBLY, 1999; TANEN et al., 2001). Além da grande variedade de toxinas, em sua maioria peptídeos e proteínas, os venenos apresentam misturas complexas de substâncias inorgânicas e orgânicas. Os constituintes inorgânicos incluem cálcio, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, cobre e zinco (FRIEDERICH; TU, 1971). Os componentes orgânicos são representados principalmente por proteínas com propriedades enzimáticas, peptídeos biologicamente ativos e algumas moléculas não proteicas que agem isolada ou sinergisticamente, interferindo em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares específicos (LEE, 1979).

Apesar da toxicidade, vários trabalhos da literatura têm demonstrado a importância de compostos derivados de venenos de serpentes para o tratamento de diferentes processos fisiopatológicos. Isto se deve ao fato de milhões de anos de evolução terem conferido a estas substâncias, duas características importantes para o desenvolvimento de um fármaco: especificidade e seletividade a seus alvos (celulares e moleculares, como canais iônicos, receptores, enzimas, membranas celulares ou vias metabólicas) (BAILEY; WILCE, 2001; LEWIS; GARCIA, 2003; CURY; PICOLO, 2006).

Como exemplo dessas atividades, estudos realizados no início da década de 30, envolveram o emprego de venenos ofídicos como analgésicos, mostrando a eficácia do veneno de *Naja tripudians* e *Naja naja* em diminuir a dor de pacientes portadores de carcinoma e em retardar a evolução de algumas neoplasias Monaelesser; Tague, 1933*, *apud on* Brazil (1950).

Estes trabalhos repercutiram no meio médico brasileiro e nesta mesma década, os primeiros estudos epidemiológicos e estudos clínicos utilizando doses homeopáticas do veneno

^{* *}MONAELESSER; TAGUE. Trailement des algies et des tumeurs, par el venin de cobra. **Bull. De I'Acd. De Médicine**, p371, 1933.

das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) foram iniciados em pacientes portadores de algias, principalmente de origem neoplásicas (BRAZIL, 1934, 1950).

O gênero *Crotalus* (família *Viperidae*) inclui as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis, causadoras de aproximadamente 9,4% dos acidentes ofídicos no Brasil (Sinan, 2016), sendo estes acidentes causados principalmente pela subespécie *Crotalus durissus terrificus*. O veneno desta espécie pode levar o indivíduo a óbito devido às pronunciadas atividades neurotóxica, miotóxica e coagulante, induzindo paralisias musculares, insuficiência respiratória, mioglobinúria e insuficiência renal aguda com comprometimento dos néfrons (ROSENFELD, 1971; CUPO; AZEVEDO-MARQUES; HERING, 1988; AMARAL; MAGALHÃES; DE REZENDE, 1991; AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003). Apesar destes efeitos sistêmicos importantes, não são observados, nestes envenenamentos, sinais inflamatórios significativos no local da picada (BRAZIL, 1934; AMORIM; FRANCO DE MELLO; SALIBA, 1951) e são relatados ainda, ausência de dor ou dor de pequena intensidade, seguida de parestesia local (ROSENFELD, 1971).

As principais toxinas presentes neste veneno incluem a crotoxina, crotamina, convulxina, giroxina (ALEXANDER et al., 1988) e recentemente a intercro (IC), uma nova toxina isolada do veneno (VIEIRA et al., 2013). A elevada toxicidade do veneno é atribuída à crotoxina (CTX), seu principal componente tóxico (BRAZIL, 1972), contribuindo com cerca de 80% da letalidade induzida pelo veneno total. Além da sua atividade neurotóxica, caracterizada pelo bloqueio da transmissão neuromuscular, a CTX exibe ainda atividades fosfolipásica e miotóxica (BRAZIL, 1972; GOPALAKRISHNAKONE et al., 1984; STOCKER, 1990; MEIER; STOCKER, 2018).

Além da atividade tóxica, diversos estudos experimentais têm mostrado que a CTX modula as respostas inflamatória e imune (SAMPAIO et al., 2010, para revisão) e apresenta ações antitumoral, antiangiogênica e imunomoduladora, tanto em ensaios *in vivo* (FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, 2011; BRIGATTE et al., 2016), quanto em ensaios *in vitro* (COSTA et al., 2013; KATO, 2013; DE-OLIVEIRA et al., 2018; DE ARAÚJO PIMENTA et al., 2019). Apesar dos numerosos estudos que demonstram as atividades biológicas e farmacológicas do complexo CTX, em particular sobre células do sistema imune, não foram descritos, até o momento, de que forma e em qual(is) sítio(s) a CTX interage na membrana dessas células para disparar suas ações imunomoduladoras.

1.1 Crotoxina e suas atividades biológicas

Diversos estudos demonstraram que a CTX apresenta atividades biológicas clássicas, tais como a neurotoxicidade, miotoxicidade, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade. Além dessas atividades, esta toxina apresenta ações antitumoral, anti-inflamatória, antiviral e imunomoduladora (SAMPAIO et al., 2010; LIMA et al., 2012; COSTA et al., 2013; DE ALMEIDA et al., 2015; BRIGATTE et al., 2016; DE ARAÚJO PIMENTA et al., 2019). Em relação aos efeitos sobre o sistema imune, foi evidenciado que o veneno crotálico ou a CTX apresentam papel supressor sobre a resposta imunológica humoral e celular (CARDOSO; MOTA, 1997; CARDOSO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2003; ZAMBELLI et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2015; FREITAS et al., 2018).

Em relação à resposta inflamatória, Nunes e colaboradores (2010) mostraram que a ação inibitória de longa duração da CTX sobre os componentes vascular e celular da resposta inflamatória induzida pela carragenina, sendo mais efetiva quando comparado a antiinflamatórios clássicos, caracterizando assim, o efeito anti-inflamatório sugerido para o veneno total (NUNES et al., 2007). A ação anti-inflamatória da CTX está associada à diminuição da expressão de moléculas de adesão, em neutrófilos da secreção de citocinas e aumento da secreção de mediadores lipídicos resolutivos, tais como lipoxina A₄ e 15-Epi-LXA₄, com importante envolvimento de receptores para peptídeo formil sobre a migração de leucócitos (NUNES; DELLA-CASA; CIRILLO, 2011). Ainda, esta toxina inibe a capacidade de fagocitose tanto de neutrófilos (LIMA et al., 2012), como macrófagos (SAMPAIO et al., 2003). Neste sentido, foi demonstrado que a CTX inibe drasticamente a fosforilação de tirosina quinase e a expressão das proteínas GTPases em neutrófilo e macrófagos, interferindo assim, com a eficiência do citoesqueleto na captação das partículas a serem fagocitadas (SAMPAIO et al., 2006b; LIMA et al., 2012). Adicionalmente, foi evidenciado o dualismo na ação desta toxina, sobre macrófagos, uma vez que foi observada tanto inibição de alguns parâmetros funcionais, tais como espraiamento e fagocitose (SAMPAIO et al., 2003), quanto estimulação do "burst" respiratório (geração de peróxido de oxigênio), da geração de óxido nítrico e do metabolismo de glicose e glutamina destas células (FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, 2011). O incremento deste metabolismo foi demonstrado por meio da determinação da influência da CTX sobre a atividade máxima de enzimas-chave do metabolismo de glicose e glutamina (hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, citrato sintase e glutaminase dependente de fosfato) e da oxidação destes substratos (FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, 2011).

Tanto as ações inibitórias quanto estimulatórias são de rápida instalação, observadas, in vitro, logo nos primeiros cinco minutos de incubação (SAMPAIO et al., 2003) e in vivo após 1

hora e após tempo prolongado, observadas por até 14 dias após uma única dose (NUNES et al., 2010; FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, 2011; LIMA et al., 2017).

Em relação aos mecanismos envolvidos com a ação antitumoral da CTX, nosso grupo investigou a importância da ação moduladora da toxina sobre macrófagos durante a progressão tumoral. Nestes estudos, células de carcinoma de ratos (Walker 256) foram injetadas no flanco de ratos e, após o surgimento da massa tumoral (5º dia da injeção das células tumorais), a injeção subcutânea da CTX restabelece a atividade secretória dos macrófagos peritoneais, uma vez que esta é reduzida pelo tumor. Neste sentido foi observado que a CTX aumenta a capacidade dessas células em secretar mediadores pró-inflamatórios, tais como NO, H₂O₂ e citocinas, e tornando-as funcionalmente semelhantes aos macrófagos M1 (inflamatórios). Estas alterações foram acompanhadas do incremento do metabolismo, induzido pela CTX sobre a atividade máxima de enzimas-chave do metabolismo de glicose (hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase e citrato sintase) e da oxidação de glicose e glutamina. Estas ações estimulatórias da CTX sobre a função e metabolismo de macrófagos são de longa duração, sendo observadas por até 14 dias após a administração de uma única dose da toxina, acompanhadas de significativa inibição do crescimento do tumor (FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, 2011).

Em continuidade a esse estudo, em ensaios in vitro, macrófagos pré-tratados com CTX e co-cultivados na presença das células tumorais da linhagem tumoral do tumor de Walker (LLC WRC 256), provenientes de adenocarcinoma da glândula mamária de rato, apresentaram aumento da produção de reativos do oxigênio (H₂O₂) e do nitrogênio (NO), e da secreção de IL-1β por macrófagos. Ainda, neste mesmo estudo foi observado aumento da produção de mediadores lipídicos Lipoxina A4 e análogo mais estável 15-epi-LXA4, que resultou no decréscimo da proliferação das células tumorais (COSTA et al., 2013). Em adição, macrófagos previamente tratados com CTX inibem, in vitro, os eventos-chave envolvidos com a angiogênese tumoral (DE ARAÚJO PIMENTA et al., 2019). A importância da atividade moduladora induzida pela CTX sobre macrófagos foi evidenciada também em modelos de cocultura com neutrófilos. Neste estudo, neutrófilos co-cultivados com macrófagos previamente incubados com a CTX apresentam produção aumentada de H₂O₂ e HOCl, bem como aumento da sua atividade fungicida de leveduras de Candida albicans (DE-OLIVEIRA et al., 2018). Esta atividade metabólica aumentada de macrófagos pela CTX foi importante também para a capacidade microbicida de macrófagos infectados com as promastigotas de Leishmania amazonensis (FARIAS et al., 2017).

1.2 Crotoxina, características bioquímicas e estruturais – Estado da Arte

A CTX foi a primeira proteína do veneno a ser isolada e cristalizada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938). Posteriormente, sua estrutura foi descrita por Fraenkel-Conrat e Singer (1956), sendo uma β-neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não covalente de duas diferentes subunidades: uma ácida que é denominada como CA (Crotoxina A) ou crotapotina e uma básica, denominada CB (Crotoxina B) ou fosfolipase A₂-FLA₂-CB (**Figura** 1). Esta toxina é a majoritária do veneno e corresponde a 60% do veneno total. O seu peso molecular é de 24 a 26 kDa e seu ponto isoelétrico (pI) de 4,7.

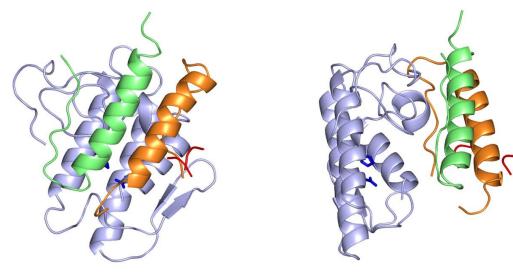


Figura 1. Estrutura cristalográfica do complexo heterodimérico não-covalente da Crotoxina isolada do veneno de Crotalus durissus terrificus (isoforma CA₂CB_b). Diagrama mostra a estrutura global do complexo CA₂CB_b. A subunidade CB_b básica (azul) é mostrada na orientação frente-face canônica do grupo estruturas IIA FLA2. As cadeias polipeptídicas ligadas por dissulfeto α , β e γ da subunidade ácida CA2 são mostradas em laranja, verde e vermelho, respectivamente. A cristalografia mostra uma estrutura de suporte único da associação de suas subunidades. As duas principais hélices da subunidade CA2 do complexo Crotoxina apresentam giro de 180° e 90° respectivamente em relação ao eixo principal (FAURE; XU; SAUL, 2011).

Foi demonstrado, por meio de estudos de caracterização e sequenciamento, que a subunidade CA é formada por três cadeias polipeptídicas, α (39 resíduos), β (35 resíduos) e γ (14 resíduos), totalizando 88 resíduos de aminoácidos, unidas por sete pontes dissulfeto (AIRD et al., 1986; FAURE et al., 1991). Esta subunidade é uma chaperona, ou seja, acompanhante, sendo envolvida no reconhecimento de alvo e de ligação específica do complexo para as membranas alvo. A subunidade CA possui peso molecular de 8,9 kDa, ponto isoelétrico de 3,4, características ácidas, sendo desprovida de atividade enzimática e tóxica. Com relação à CB (FLA₂), ela apresenta cerca de 14 kDa, ponto isoelétrico 9,7, sendo constituída por uma cadeia única polipeptídica contendo 122 resíduos de aminoácidos, formando estruturas globulares associadas por sete pontes dissulfeto.

Por meio de técnicas cromatográficas, foi possível identificar 16 isoformas de CTX, formadas a partir de associação randômica de diversas subunidades de CA e CB (Faure e Bon, 1987; 1988). Destas subunidades, quatro isoformas de CA (CA₁, CA₂, CA₃, CA₄) e quatro isoformas de CB (CB_{a2}, CB_b, CB_c, CB_d) foram purificadas, sendo que as quatro isoformas de CA e duas de CB (CB_{a2} e CB_c) foram completamente sequenciadas (FAURE et al., 1991, 1993, 1994; NEMECZ et al., 2020).

Um estudo comparativo das propriedades das isoformas da CTX revelou que há duas diferentes classes de complexos CTX: classe I (CBb, CBc, CBd e as isoformas de CA), cuja principal característica é sua alta toxicidade, mas é enzimaticamente menos ativa, e classe II (CBa₂ e as isoformas de CA), que é o inverso da classe I, ou seja, é menos tóxica, porém sua atividade enzimática é mais pronunciada (FAURE et al., 1993; NEMECZ et al., 2020). A diversidade dessas isoformas é resultante das modificações pós-transcricionais dos diferentes RNAs mensageiros que cada serpente apresenta (FAURE et al., 1994). É interessante apontar que diferenças na estrutura primária das isoformas de CA não afetam a atividade tóxica e o potencial letal da CTX, porém, em contraste, a variação de poucos resíduos de aminoácidos na estrutura primária das diversas isoformas de CB modifica as propriedades tóxicas e enzimáticas do complexo CTX (FAURE et al., 1991; NEMECZ et al., 2020). Ainda, pequenas diferenças de resíduos expostos na superfície e na interface entre as subunidades têm um papel importante na determinação nas especificidades funcionais das diferentes isoformas (FAURE; XU; SAUL, 2011; FAURE; SAUL, 2012).

Neste sentido, vale ressaltar que, as combinações randômicas destas isoformas determinam a formação de diferentes complexos, responsáveis pelas propriedades farmacológicas e biológicas significativamente diferentes descritas para a CTX (FAURE; XU; SAUL, 2011; NEMECZ et al., 2020). É interessante mencionar que estudos farmacocinéticos demonstraram que duas horas após a administração intramuscular da CTX em camundongos já é observado decréscimo de 52% da sua concentração plasmática e, após 24 horas é observada eliminação de mais de 90% desta toxina em órgãos, tais como rins, baço e cérebro (CURA et al., 2002).

Em relação à ação neurotóxica da CTX, foi demonstrado que fibras pré-sinápticas das junções neuromusculares são os principais locais de ação desta toxina, levando ao bloqueio neuromuscular (SAMPAIO et al., 2010, para revisão). Apesar dos mecanismos moleculares da neurotoxocidade pré-sináptica da CTX não ser totalmente conhecida, diversos estudos demonstraram o sinergismo entre os componentes CA e CB. Nesse sentido, tem sido proposto na literatura que essa interação pode ocorrer das seguintes formas: (a) participação em conjunto da CA com a CB, na ligação da CTX a receptores localizados nas junções neuromusculares, formando um complexo terciário transitório, seguido pela liberação de CA; (b) prevenção da formação do dímero CB reativo e (c) diminuição da absorção da CB pelos fosfolipídios de membrana (BON et al., 1989; HAWGOOD; BON, 1991; CHOUMET et al., 1996; SANTOS et al., 2007).

Pereañez e colaboradores (2012) propuseram em seu estudo que por meio de interações hidrofóbicas, há um impedimento da adsorção interfacial do CB na interface lipídio/água, bloqueando parte da face da PLA₂ (**Figura 2**). No entanto, nesta proposta sugere-se que a CTX deixaria a vesícula e hidrolisaria o substrato na solução aquosa. Este fato poderia explicar as diferenças quanto à atividade enzimática entre diferentes complexos de CTX em comparação com o CB. Além disso, o modelo 3D da CTX mostrou regiões expostas ao solvente de CA que poderiam se ligar ao receptor expresso em células-alvo.

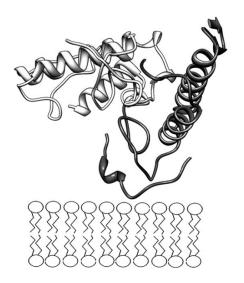


Figura 2. Modelo de complexo de crotoxina na interface lipídio / água. CB e CA são brancos e cinza, respectivamente. Neste modelo proposto, é interessante notar que CA impede a ativação interfacial do CB. Imagem adaptada de (PEREAÑEZ; GÓMEZ; PATIÑO, 2012)

Estudos mais recentes da estrutura cristalográfica da CTX revelam melhor este sítio de interação CA-CB hidrofóbico e mostram que a subunidade CA obstrui fisicamente a superfície de ligação interfacial hidrofóbica (*interfacial binding suface*-IBS) da CB. Ainda, os resíduos de triptofano da CTX estão localizados na interface CA/CB potencializando a obstrução de CB (FERNANDES et al., 2017). Baseados nessas evidências, os autores propuseram um mecanismo de ação tóxica da CTX, envolvendo, primeiramente, a interação da região N-terminal do CB com o aceptor, antes da dissociação da subunidade CA (FERNANDES et al., 2017). Esses estudos enfocam a atividade neurotóxica. Portanto, apesar dessas evidências, os aspectos moleculares da interação do complexo com outros sistemas (tecidos, células, etc) e suas ações farmacológicas não foram evidenciados até o momento.

Assim, caracterizar o processo de reconhecimento molecular da CTX em diferentes sistemas, em especial em macrófagos, é crucial para compreender como esta toxina é capaz de acarretar as diferentes atividades sobre o metabolismo e a função dessas células, de maneira rápida e prolongada.

1.3 Macrófagos

O termo "macrófago" foi primeiramente usado no final do século dezenove, por Elie Metchnikoff, para descrever as grandes células mononucleares com capacidade fagocitária e somente a partir de estudos de Mackaness (1970), a atividade secretória desta célula adquiriu importância.

Os macrófagos são caracterizados por serem células grandes, geralmente de formas irregulares que medem entre 25-50 µm de diâmetro. Eles têm muitas vezes o núcleo excentricamente posicionado, redondo ou em forma de rim, com um ou dois nucléolos e cromatina dispersa. O macrófago apresenta um complexo de Golgi bem desenvolvido em posição justanuclear, em um abundante citoplasma contendo múltiplos grânulos finos e azurófilos. Além disso, apresenta um número variável de vesículas de endocitose e superfície de membrana irregular (DOUGLAS; HASSAN, 1990; DOUGLAS; HO, 2003).

Atualmente, diversos estudos utilizam células de linhagem monocíticas que podem, também *in vitro*, ser diferenciadas em vários tipos de macrófagos ou em células dendríticas com diferentes agentes indutores, como forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), 1α,25-di-hidroxivitamina D3 (vD3) ou fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). A linhagem THP-1, por exemplo, é uma linhagem celular leucêmica monocítica humana, que tem sido amplamente utilizada para estudar funções, mecanismos, vias de sinalização e transporte de nutrientes e drogas de monócitos/macrófagos. Esta linhagem tornou-se um modelo comum para estimar a modulação das atividades de monócitos e macrófagos (CHANPUT; MES; WICHERS, 2014).

Os macrófagos pertencem a um amplo sistema de células com diferenciadas características fisiológicas (GORDON, 1998). Em diferentes tecidos os macrófagos podem receber nomes especiais designando localizações específicas, como por exemplo, no sistema nervoso central são conhecidos como microglias, no fígado são chamados de células de Küpffer, nas vias pulmonares de macrófagos alveolares, e os fagócitos multinucleados no osso são denominados de osteoclastos (ABBAS, 2012).

A ativação de macrófagos refere-se a um estado aumentado de metabolismo celular, mobilidade, atividade da enzima lisossômica e a capacidade citotóxica (ADAMS; HAMILTON, 1984). A atividade secretória dos macrófagos inclui mais de cem substâncias biologicamente ativas, tais como enzimas, proteínas plasmáticas, hormônios, substâncias que regulam a função e crescimento de outras células (TAKEMURA; WERB, 1984; NATHAN, 1987; RAPPOLEE; WERB, 1988). A secreção dessas substâncias fator determinante para funcionalidade dos macrófagos e para sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, entre esses: a hematopoese, hemostasia, inflamação, resposta imune, cicatrização, controle do desenvolvimento tumoral. Além disso, possuem um comportamento quase paradoxal como mediador anti-inflamatório da reparação tecidual, mas ainda assim sendo células pró-inflamatórias em modelos de infecção ou inflamação. A diversidade funcional é uma característica fundamental do macrófago, sendo este capaz de responder a diversos sinais

do microambiente por expressar uma variedade de fenótipos funcionais (BISWAS; MANTOVANI, 2012; WILLIAMS et al., 2018).

Os primeiros estudos sobre o macrófago enfatizavam a atividade fagocítica como sua função primordial. A fagocitose é um processo dinâmico, desencadeado após a interação do substrato a ser fagocitado, como o fagócito. Esse processo inicia-se com o espraiamento da célula, em que há alteração da forma (arredondada para achatada) e redistribuição das organelas citoplasmáticas (RABINOVITCH; MANEJIAS; NUSSENZWEIG, 1975; URIBE-QUEROL; ROSALES, 2020). Essas alterações aumentam a área de contato da membrana plasmática do fagócito com o substrato. Os macrófagos *in vitro*, espraiam-se rapidamente quando entram em contato com superfície de vidro (**Figura 3**) e na presença de certos agentes indutores de espraiamento (Mg⁺⁺, adenosina e algumas proteases) (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973).

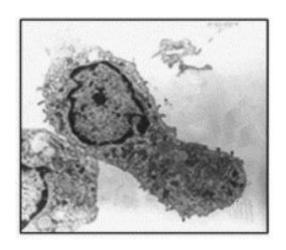


Figura 3. Morfologia de Macrófagos. Morfologia de macrófagos peritoneais de ratos espraiados em lamínulas de vidro no período de 2 horas de ensaio. Imagem adaptada de (SAMPAIO et al., 2003).

A fagocitose ocorre geralmente, por interações sequenciais entre receptores da superfície de macrófagos e ligantes opsônicos presentes na superfície das partículas a serem fagocitadas. O aumento da polimerização de filamentos de actina, próximo à membrana plasmática, acarreta a formação de pseudopodes, que se extendem ao redor das partículas, formando os fagossomos e macropinossomos (GREENBERG, 1995; ADEREM; UNDERHILL, 1999).

O processo de fagocitose está associado ao aumento do metabolismo oxidativo, conhecido como "burst" respiratório. Os produtos dessa reação, os metabólitos reativos de oxigênio, fazem parte dos mecanismos microbicidas utilizados por esses fagócitos. Estes metabólitos incluem o íon superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil (VAN FURTH et al., 1980; LEWIS, 1986; BOSCÁ et al., 2015) e, durante sua produção, promovem elevado consumo de oxigênio, daí o processo ser denominado "burst" oxidativo (BABIOR,

1984). Este processo pode ser estimulado pela ocupação de receptores para Fc de IgG, resíduos manose/fucose e diretamente pelo ester de forbol (PMA) (NATHAN; ROOT, 1977; JOHNSTON; CHADWICK; COHN, 1981).

As atividades biológicas desempenhadas por macrófagos, tais como crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, endocitose, migração e secreção são processos relacionados à sinalização mediada por receptores expressos na superfície da membrana dessas células. Além dos receptores, essas atividades biológicas envolvem também processos de abertura e fechamento de canais de íons, geração de curvatura da membrana e a formação de poros de toxinas (ZIMMERBERG; MCLAUGHLIN, 2004; GALLOP et al., 2006; SUETSUGU; TOYOOKA; SENJU, 2010; ANTONNY, 2011; YAMASHITA et al., 2011; WANG; CHENG; SINE, 2012; WU et al., 2012).

1.4 Características da membrana celular e sua importância na interação fármacomembrana

As membranas celulares são estruturas dinâmicas, constituídas por componentes lipídicos e proteicos. Os componentes lipídicos formam a barreira de permeabilidade, ou seja, obstáculos que impedem o extravasamento de moléculas geradas no interior das células. Já os componentes proteicos atuam como sistema de transporte de bombas e canais que conferem à membrana uma permeabilidade seletiva (BERG JM, TYMOCZKO JL, 2002). Portanto, os lipídios, em conjunto com proteínas, são cruciais para a biologia da membrana, permitindo o fluxo interno-externo de diferentes substâncias, através da membrana.

É importante salientar que a composição lipídica (e também a composição das proteínas) de diferentes membranas biológicas é específica para diferentes tipos de células e até mesmo para as diferentes organelas dentro de uma célula e isso varia consideravelmente. Isto é verdadeiro tanto para a composição do grupo de cabeça dos lipídios como para a composição da cadeia (HEIMBURG, 2007). Os glicerofosfolípides representam aproximadamente 70% do conteúdo lipídico total das células de mamíferos e, entre os fosfolipídios, a fosfatidilcolina (PC) é a mais prevalente e representa 40% a 50% do total, enquanto fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e ácido fosfatídico (PA) estão presentes em quantidades menores.

A PC é responsável por desempenhar importante papel na transdução de sinal e na geração de moléculas bioativas. No que diz respeito aos macrófagos e PC, sabe-se que a hidrólise de PC produz ácidos graxos, prostaglandinas, fatores ativadores de plaquetas e

diacilgliceróis, que participam da sinalização inter e intracelular e afetam a resposta dessas células (ZHANG; ZHAO; DONG, 2001; MELENDEZ; ALLEN, 2002).

Grando e colaboradores (2009) demonstraram em ensaios in vitro que a incorporação de diferentes ácidos graxos ao PC pelos macrófagos peritoneais pode ser uma via importante para a alteração da atividade dessas células e que este efeito depende do estado de ativação celular, da saturação de ácidos graxos e da concentração de PC. Ainda sobre macrófagos e PC, Petkevicius e colaboradores (2019) demonstraram importante relação entre a regulação e síntese de PC, *turnover* de macrófagos e fluidez de membrana em modelo inflamação em casos de obesidade.

Em contrapartida, PS é restrita em grande parte ao folheto interno da membrana plasmática e sob condições fisiológicas, PS quando externalizada funciona como um sinal imunossupressor dominante que promove a tolerância e impede a ativação imune local e sistêmica. Em condições fisiopatológicas, PS externalizada é utilizada por inúmeros vírus, microrganismos e parasitas para facilitar a infecção e, em muitos casos, estabelecer a latência da infecção. Ainda, sua sinalização é altamente desregulada no microambiente tumoral e em doenças autoimunes (BIRGE et al., 2016). Em macrófagos, PS é funcionalmente significativo para a fagocitose das células alvo que expressam PS (CALLAHAN; WILLIAMSON; SCHLEGEL, 2000).

Especificamente, sobre a membrana celular de macrófagos peritoneais Felippe e colaboradores (1997), demonstraram que os principais lipídios neutros totais destas células que fazem parte de sua composição são: ácido palmítico (34%), ácido oleico (26%), e ácido esteárico (19%). Outro dado interessante é a alta taxa de *turnover* (33 minutos) de fosfolipídio em macrófagos, provavelmente devido às suas várias atividades endocíticas e exocíticas (STEINMAN; BRODIE; COHN, 1976).

Além disso, Khan & Heuvel (2003), demonstraram que os ácidos graxos presentes na membrana regulam a expressão gênica, via interação com receptores nucleares e receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Assim, os ácidos graxos que formam as membranas são importantes para mecanismos de sinalização, bem como processos catalíticos por enzimas associadas a membranas. Portanto, mudanças no padrão de ácidos graxos da membrana podem impactar as vias de sinalização celular e as enzimas associadas à membrana, via modulação da fluidez da membrana.

Sob condições fisiológicas, a maioria das membranas celulares tem carga negativa devido à presença de grupos de cabeça lipídica ácida. Em vista da importância potencial do

caráter negativo da membrana em muitos processos biológicos, os fosfolipídios aniônicos têm sido amplamente utilizados como sistemas modelo (LAMY-FREUND; RISKE, 2003).

As membranas lipídicas exibem diferentes fases: a fase sólida-ordenada, muitas vezes chamada de "fase gel" e a fase desordenada por líquido que é frequentemente chamada de "fase fluida". Esses termos descrevem os dois processos de ordenação diferentes em membranas, como observado na **Figura 4**.

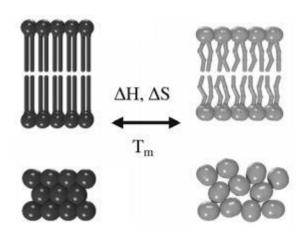


Figura 4. Esquema demonstrando a transição de fase gel (ordenada) para fase fluida (desordenada) (HEIMBURG, 2007).

As características dinâmicas das membranas celulares são fundamentais para diversas funções celulares. Neste sentido, substâncias tais como os fármacos podem atuar na membrana, ligando-se a receptores ou atravessando-a para atingir o alvo intracelular. Essas interações podem ser responsáveis pela toxicidade dos fármacos ou mesmo explicar seus mecanismos de ação (STILLWELL; WASSALL, 2003; WASSALL; STILLWELL, 2008).

A compreensão dos mecanismos envolvidos na interação de fármacos com os componentes de membrana é fundamental para entender a biodisponibilidade e a biodistribuição destas moléculas no organismo. É importante mencionar que essas interações não dependem apenas das propriedades físico-químicas dos fármacos, mas, também, das características da própria membrana, determinadas pela sua composição. (DE SOUSA, 2006).

A alta complexidade e heterogeneidade dos fatores envolvidos nos fenômenos que ocorrem na membrana celular, muitas vezes impossibilita o estudo das características físico-químicas em ensaios *in vivo*. Assim, em um primeiro momento, utilizar sistemas *in vitro* mais simplificados e que mimetizem pequenas partes destes sistemas mais complexos propicia maior controle sobre componentes específicos que podem influenciar estes sistemas (DE SOUSA, 2006).

Das características físico químicas, transições de fusão de fases de fluidez de membrana podem ser medidas com muitos meios, incluindo o método de calorimetria diferencial de

varredura (do inglês differential scanning calorimeter DSC) e vários outros métodos espectroscópicos. A técnica de DSC consiste em uma análise térmica que mensura como as propriedades físicas de uma amostra se alteram a partir de parâmetros físicos, tais como: entalpia de transição, cooperatividade entre moléculas e temperatura de transição de fase. Em outras palavras, é uma técnica na qual se mede a diferença de energia fornecida à uma amostra de interesse e uma amostra de referência (no caso, tampão ou água), enquanto elas são submetidas a uma variação contínua de temperatura (HAINES; READING; WILBURN, 1998; GILL; MOGHADAM; RANJBAR, 2010).

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica ou de ressonância de spin eletrônico (RPE, ou EPR, do inglês *electron paramagnetic resonance* ou ainda ESR, do inglês *electron spin resonance*) é outra técnica muito utilizada que emprega marcadores de spin hidrofóbicos para monitorar do ponto de vista termo estrutural, a bicamada lipídica. É possível obter informações detalhadas de parâmetros quantitativos de mobilidade, ordem e polaridade da bicamada analisando os espectros obtidos pelo aparelho (**Figura 5**) (ROZENFELD et al., 2017).

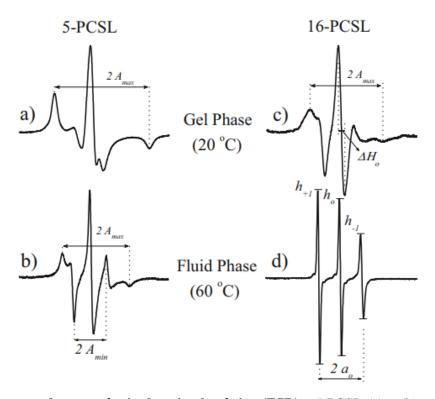


Figura 5. Espectros de ressonância de spin eletrônico (ESR) - 5-PCSL (a) e (b) espectros de 16-PCSL nas fases de gel (20 °C) (c) e fluido (60 °C) (d) (Figura adaptada de: Rozenfeld (2017).

Também é interessante mencionar que, dentre as diferentes proteínas específicas que medeiam funções da membrana, estão as proteínas formadoras de poros, que participam em diferentes atividades celulares as quais envolvem a plasticidade da bicamada lipídica. Formação de poro na membrana e fusão/fissão da membrana são fenômenos correlatos que envolvem o remodelamento da bicamada lipídica, quando a mesma é perturbada para a abertura de canais ou processos que levam à geração de dois compartimentos ligados à membrana, a partir de um único compartimento (GILBERT, 2016). Proteínas ou peptídeos formadores de poros agem em seus alvos na camada lipídica das membranas para aumentar a permeabilidade celular, levando à formação de estruturas em anéis, discretas e bem definidas (GILBERT et al., 2014).

Embora, os estudos *in vitro* de bicamadas lipídicas que interagem com proteínas não consigam ainda mimetizar a estrutura completa de uma membrana celular biológica, eles complementam dados de sistemas sintéticos com evidência biológica autêntica (GILBERT et al., 2014). Ainda, as avaliações de propriedades físicas da membrana, são parâmetros possíveis de serem aferidos, graças a estudos termo estruturais da interação bicamada lipídica com proteínas (WU et al., 2012). Portanto, a maneira pela qual proteínas/toxinas podem gerar mudanças estruturais na membrana lipídica contribui para elucidar as suas funções biológicas, em diferentes tipos celulares.

1.5 Receptores peptídeo formil

Receptores ligados à proteína G (do inglês, G - protein coupled receptor - GPCR) são amplamente expressos por macrófagos e estão envolvidos com a resposta imune inata e adaptativa dessas células (LIU et al., 2013). Dentre os GPCRs, os receptores peptídeo formil (FPR) são um pequeno grupo de sete domínios transmembrana de receptores acoplados à proteína G (Figura 6) (LI; YE, 2013), expressos principalmente por leucócitos fagocíticos, importantes na defesa do hospedeiro e em processos inflamatórios (SHOWELL et al., 1976; EDWARDS et al., 2006; YE et al., 2009). Os FPRs desempenham um papel crítico nas respostas imunes inatas eficazes através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, por exemplo, de infectar bactérias) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs, por ex. moléculas liberadas por células danificadas) (PERRETTI; GODSON, 2020; MACIUSZEK et al., 2021). Esses receptores interagem com seus ligantes pró e anti-inflamatórios, estruturalmente diversos, para regular diferentes processos, tais como inflamação, Alzheimer, diabetes e câncer (LI; YE, 2013).

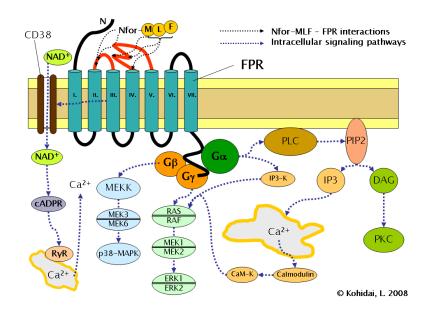


Figura 6. Diagrama esquemático do FPR. O diagrama mostra os sete domínios transmembranicos que estão representados em verde, e em vermelho estão representados os loops extracelulares para FPR1 responsáveis pela ligação para fMLF. A ligação dos agonistas ao receptor leva à dissociação das subunidades Gβ da Gγ da proteína heterotrimérica Gi acoplada ao receptor. A subunidade Gα liberada ativa as vias de sinalização *downstream* que envolve GEFs para a família das Rho GTPases, PLC e IP3-K, cruciais para as funções celulares (LI; YE, 2013).

Em humanos, foram identificados três diferentes tipos de FPR (FPR1, FPR2 e FPR3) que partilham sequência significativa homóloga e são codificados por genes agrupados. Embora estes três membros da família de FPR sejam relativamente semelhantes em termos de identidade de sequência e estrutura do receptor, eles são bastante divergentes no que diz respeito à seletividade ao agonista, bem como sua distribuição celular e no tecido, indicando uma variedade de funções biológicas (MIGEOTTE; COMMUNI; PARMENTIER, 2006; YE et al., 2009; SOUTHGATE; YE, 2012; WINTHER; DAHLGREN; FORSMAN, 2018). Nos leucócitos, os receptores FPR1 e FPR2, agem como um sítio de ligação de alta e baixa afinidade, respectivamente, para um ligante quimioatrativo, o FMLP ou FMLF (N-formyl-methionylleucyl-phenylalanine), um peptídeo N-formil sintético bem conhecido, que induz a transdução da sinalização de FPR1 na ativação de neutrófilos e células semelhantes a neutrófilos (SHOWELL et al., 1976; HE; YE, 2017). As cascatas de sinalização intracelular desencadeadas por FPRs incluem a ativação de diferentes proteínas quinases e fosfatase, bem como a transativação de receptores de tirosina quinase. As proteínas quinases e fosfatases agem de forma coordenada e qualquer prejuízo em sua ativação ou regulação representa uma das causas mais comuns de várias doenças humanas (ANNUNZIATA et al., 2020).

Cada vez mais é despertado o interesse sobre o estudo mais aprofundado sobre os receptores FPR2, identificado por (FIORE S, RYEOM SW, WELLER PF, 1992) como um receptor ligante tanto de peptídeos como de lipídios. O FPR2/ALX é uma proteína de 351 aminoácidos, com alta homologia entre humanos, camundongos e ratos, sendo esta homologia de até 74% para nucleotídeos e de 65% para a sequência de aminoácidos (WINTHER; DAHLGREN; FORSMAN, 2018). Esta homologia preservada entre as espécies faz desse receptor um importante sítio de reconhecimento de ligantes acopladores de proteína G. Ainda, o FPR2/ALX, possui um importante envolvimento com a transdução de sinais antiinflamatórios (MADERNA et al., 2010; CASO et al., 2021), sendo este receptor descrito como o ligante específico para lipoxina A₄ (LXA₄). Esse efeito anti-inflamatório pode ser explicado como tentativa de manter a homeostase do sistema biológico, visto que, o aumento da expressão gênica para FPR2 está associado à regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF-α ou IL-1 (SERHAN; SAVILL, 2005; CASO et al., 2021), e esse aumento de receptores FPR2 contribui para potentes efeitos anti-inflamatórios, uma vez que a lipoxina, ligante deste receptor, é um importante mediador endógeno para a resolução da inflamação. A interação LXA4-receptor FPR2/ALX regula negativamente a produção de quimiocinas e citocinas, receptores de fatores de crescimento (como receptor de VEGF) em leucócitos humanos, para a resolução do processo inflamatório (SERHAN; SAVILL, 2005). Essa interação pode ser bloqueada por antagonista da família de receptores peptídeo formil, como Boc-1 e Boc-2 (butoxycarbonyl-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe), em concentrações na ordem de micromolar, inibem parcial ou totalmente os receptores FPR2/ALX (DUFTON et al., 2010). Diversos estudos demonstraram que vários agonistas destes receptores FPR2 demonstraram ter eficácia em modelos experimentais de doença incluindo: isquemia-reperfusão miocárdica, complicações diabéticas, fibrose renal, síndrome do olho seco, sepse, artrite reumatóide, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, neuroinflamação ou doença inflamatória do intestino (MACIUSZEK et al., 2021).

* * *

Em conjunto, os dados da literatura têm demonstrado as importantes ações farmacológicas da CTX sobre as células do sistema imune, em particular, os macrófagos, e a importante participação dos mesmos para o controle de diferentes processos fisiopatológicos. Portanto, elucidar de que forma esta toxina interage com diferentes moléculas na membrana,

tais como receptores, canais e lipídios dessas células favorecerá, de maneira importante, a compreensão dos mecanismos envolvidos com suas atividades biológicas, podendo vir a propiciar sua aplicabilidade terapêutica.

6 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados obtidos nesta tese demonstraram que apesar da importância de FPRs-1 e 2 para as atividades imunomoduladoras da CTX sobre macrófagos, eles não participam da entrada da toxina na célula.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme sumarizado na **Figura 30**, a CTX não causa nenhum efeito na membrana neutra e causa importantes alterações no comportamento térmico da transição gel-fluido, dos lipídios com carga negativa, o que é muito interessante quando correlacionado às atividades antitumorais da toxina e considerando que a seletividade da composição lipídica varia em diferentes tecidos e órgãos do corpo humano, os estudos termo estruturais atualmente apresentados são extremamente importantes para abrir novas investigações sobre as atividades biológicas descritas para CTX em diferentes sistemas biológicos reais.

Ainda, o presente projeto de pesquisa abre novas perspectivas de estudos do nosso grupo de pesquisa que buscar caracterizar a expressão das proteínas envolvidas com as vias de sinalização fundamentais para as funções de macrófagos, como demonstradas acima, bem como o estágio de reprogramação dos macrófagos e estudar mais a fundo a importância dos diferentes tipos de FPRs (1 e 2) para as atividades imunomoduladoras propiciadas pelos mediadores lipídicos gerados pela CTX.

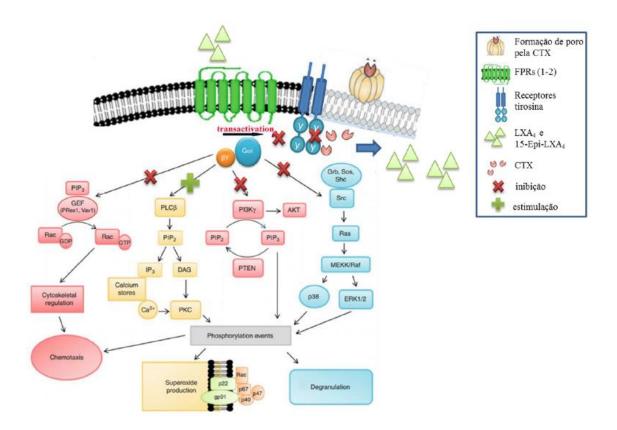


Figura 30. Representação hipotética da interação CTX e membrana de macrófagos. A CTX, por meio de formação de poros, é rapidamente (a partir de 1 min) internalizada. Uma vez no meio intracelular, inibe a fosforilação dos resíduos tirosina quinase1, levando à inibição transaminação da conversa cruzada entre FPR2 e receptores tirosina quinase (TykR), importante para a fosforilação de resíduos críticos de tirosina, que fornecem locais de ancoragem para recrutamento e desencadeamento de Ras/ERK e via Jak/STAT e geração de superóxido dependente de NADPH oxidase e pela ativação de c-Src. A inibição das proteínas da família das Rho GTPases, pela CTX, é responsável pela inibição da formação de F-actinas, comprometendo o rearranjo do citoesqueleto para a formação de fagossomas durante a fagocitose e protrusões durante o espraiamento dos fagócitos. Simultaneamente, há o disparo da formação de mediadores lipídicos, tais como prostaglandina A2 (PGE2), precursora da formação de lipoxina A₄ (LXA₄) e seu análogo estável 15-Epi-LXA₄. As LXAs, por sua vez, ligam-se aos receptores peptídeo formil (FPRs), levando à inibição da dissociação das subunidades Gα e βy da proteína heterodimárica Gi, acoplada aos FPRs, responsáveis pela via de sinalização downstream das proteínas Rho GTPases. Portanto, a inibição total da fosforilação dos TykR pela CTX pode levar à inibição da cascata de sinalização envolvidos com os FPRs-2, envolvendo a inibição das vias PI3Ky/Akt, da Src e da via PIP3, envolvidas com a desgranulação e regulação de citoesqueleto. Por outro lado, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio pela CTX, dependente de FPRs, pode necessitar do envolvimento dos FPRs-1, por meio da via de sinalização do IP3 e PKC, justificando a importância dos diferentes tipos de FPRs para a ação dual da CTX. Esquema construído baseados nos artigos científicos (SOUTHGATE; YE, 2012; CATTANEO; PARISI; AMMENDOLA, 2013; LIU; LIEBERMAN, 2017; TSAI et al., 2019).

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. Imunologia celular e molecular 7a edição. [s.l.] Elsevier Brasil, 2012.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The Cell Biology of Macrophage Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, n. 1, p. 283–318, abr. 1984.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. **Mechanisms of phagocytosis in macrophagesAnnual Review of Immunology**Annu Rev Immunol, , 1999. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10358769/>. Acesso em: 10 jun. 2021.

AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 249, n. 2, p. 296–300, 1986.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of Crotalus durissus terrificus, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953–960, 1988.

AMARAL, C. F.; MAGALHÃES, R. A.; DE REZENDE, N. A. [Respiratory involvement secondary to crotalid ophidian bite (Crotalus durissus)]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 33, n. 4, p. 251–255, 1991.

AMORIM, M. de F.; FRANCO DE MELLO, R.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. **Mem Inst Butantan**, v. 23, p. 63–108, 1951.

ANNUNZIATA, M. C.; PARISI, M.; ESPOSITO, G.; FABBROCINI, G.; AMMENDOLA, R.; CATTANEO, F. Phosphorylation sites in protein kinases and phosphatases regulated by formyl peptide receptor 2 signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, 1 jun. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32471307/. Acesso em: 7 jun. 2021.

ANTONNY, B. Mechanisms of Membrane Curvature Sensing. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, n. 1, p. 101–123, 7 jul. 2011.

_

^{*} De acordo com:

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

AZEVEDO-MARQUES, M.; CUPO, P.; HERING, S. Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas Medicina, , 2003. .

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytesJournal of Clinical Investigation, 1984. .

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active moleculesEmergency Medicine, 2001. .

BERG JM, TYMOCZKO JL, S. L. **Biochemistry**. 5th editio ed. New York: New York: W H Freeman, 2002.

BERLINER, L. J. Spin Labeling, Theory and Applications. [s.l.] Academic Press, 1976.

BERLINER, L. J. Spin Labeling II: Theory and Applications. [s.l.] Academic Press, 1979.

BERLINER, L. J.; REUBEN, J. **Biological Magnetic Resonance**. Plenum Pre ed. [s.l.] Spin Labeling, Theory and Applications, 1989.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank / Biopython. **Presentation**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000. Disponível em: http://nar.oxfordjournals.org/content/28/1/235. Acesso em: 9 jan. 2020.

BIRGE, R. B.; BOELTZ, S.; KUMAR, S.; CARLSON, J.; WANDERLEY, J.; CALIANESE, D.; BARCINSKI, M.; BREKKEN, R. A.; HUANG, X.; HUTCHINS, J. T.; FREIMARK, B.; EMPIG, C.; MERCER, J.; SCHROIT, A. J.; SCHETT, G.; HERRMANN, M. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancerCell Death and DifferentiationNature Publishing Group, , 1 jun. 2016. . Disponível em: <www.nature.com/cdd>. Acesso em: 6 maio. 2021.

BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Orchestration of metabolism by macrophagesCell Metabolism, 4 abr. 2012. .

BOGGS, J. M.; RANGARAJ, G. Phase transitions and fatty acid spin label behavior in interdigitated lipid phases induced by glycerol and polymyxin. **BBA - Biomembranes**, v. 816, n. 2, p. 221–233, 27 jun. 1985.

BOKOCH, G. M. Chemoattractant signaling and leukocyte activationBlood, 1995. .

BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S.; LAMBEZ AT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A2 neurotoxin. **Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana**, v. 39, n. 4, p. 439–448, 1989.

BOSCÁ, L.; GONZÁLEZ-RAMOS, S.; PRIETO, P.; FERNÁNDEZ-VELASCO, M.; MOJENA, M.; MARTÍN-SANZ, P.; ALEMANY, S. Metabolic signatures linked to macrophage polarization: From glucose metabolism to oxidative phosphorylation. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, p. 740–744, 1 ago. 2015.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRAZIL, O. V. Neurotoxins from the South American rattle snake venom. **Taiwan yi xue hui za zhi. Journal of the Formosan Medical Association**, v. 71, n. 6, p. 394–400, 1972.

BRAZIL, V. Do emprego da peçonha em terapêuticaSão PauloBiologia Medica, , 1934. .

BRAZIL, V. **Do emprego da peçonha em terapêutica** Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia, , 1950. .

BRIGATTE, P.; FAIAD, O. J.; FERREIRA NOCELLI, R. C.; LANDGRAF, R. G.; PALMA, M. S.; CURY, Y.; CURI, R.; SAMPAIO, S. C. Walker 256 tumor growth suppression by crotoxin involves formyl peptide receptors and lipoxin A4. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.

CALLAHAN, M. K.; WILLIAMSON, P.; SCHLEGEL, R. A. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. **Cell Death and Differentiation**, v. 7, n. 7, p. 645–653, 27 jun. 2000. Disponível em: <www.nature.com/cdd>. Acesso em: 6 maio. 2021.

CAMBIAGHI, T. D. Estudo do controle traducional de PPARB durante o processo de

diferenciação de macrófagos. 2010. Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42137/tde-25032010-145009/pt-br.php.

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

CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of Crotalus venom on the humoral and cellular immune response. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 35, n. 4, p. 607–12, abr. 1997. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9133715>. Acesso em: 9 jan. 2020.

CASO, V. M.; MANZO, V.; CIMMINO, T. P.; CONTI, V.; CASO, P.; ESPOSITO, G.; RUSSO, V.; FILIPPELLI, A.; AMMENDOLA, R.; CATTANEO, F. **Regulation of inflammation and oxidative stress by formyl peptide receptors in cardiovascular disease progressionLife**MDPI AG, , 1 mar. 2021. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33804219/». Acesso em: 12 jun. 2021.

CATTANEO, F.; PARISI, M.; AMMENDOLA, R. Distinct signaling cascades elicited by different formyl peptide receptor 2 (FPR2) agonistsInternational Journal of Molecular SciencesMDPI AG, , 2013. . Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23549262/. Acesso em: 7 jun. 2021.

CAVAGLIERI FELIPPE, C. R.; CALDER, P. C.; VECCHIA, M. G.; CAMPOS, M. R.; MANCINI-FILHO, J.; NEWSHOLME, E. A.; CURI, R. Fatty acid composition of lymphocytes and macrophages from rats fed fiber-rich diets: A comparison between oat branand wheat bran-enriched diets. **Lipids**, v. 32, n. 6, p. 587–591, jun. 1997.

CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. **THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approachInternational Immunopharmacology**Elsevier, , 2014. . Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>. Acesso em: 19 fev. 2020.

CHOI, S. Encyclopedia of Signaling Molecules. 2. ed. [s.l.] Springer International Publishing,

2018.

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. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 391, p. 197–202, 1996.

COSTA, E. S.; FAIAD, O. J.; LANDGRAF, R. G.; FERREIRA, A. K.; BRIGATTE, P.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, S. C. Involvement of formyl peptide receptors in the stimulatory effect of crotoxin on macrophages co-cultivated with tumour cells. **Toxicon**, v. 74, p. 167–178, nov. 2013.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Clinical and laboratory features of south american rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) envenomation in children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 6, p. 924–929, 1 nov. 1988.

CURA, J. E.; BLANZACO, D. P.; BRISSON, C.; CURA, M. A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J. C.; SILVEIRA, J. S.; THEILLER, E.; DE ROODT, A. R.; VIDAL, J. C. Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA2, NSC-624244) in patients with advanced cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1033–1041, 1 abr. 2002.

CURY, Y.; PICOLO, G. Animal toxins as analgesics - An overviewDrug News and Perspectives, set. 2006. .

DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K. B. B.; DOCKRELL, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8668, 13 jan. 2010. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20084270. Acesso em: 9 jan. 2020.

DE-OLIVEIRA, R.; KATO, E.; CIRILLO, M.; DE-LIMA, T.; ALBA-LOUREIRO, T.; CURI, R.; SAMPAIO, S. Crotoxin-Treated Macrophages Stimulate ROS Production and Killing

Activity in co-cultured Neutrophils. **Journal of Applied Microbiological Research**, v. 1:1, 2018. Disponível em: http://innovationinfo.org/journal-of-applied-microbiological-research/article/Crotoxin-Treated-Macrophages-Stimulate-ROS-Production-and-Killing-

DE ALMEIDA, C. S.; ANDRADE-OLIVEIRA, V.; CÂMARA, N. O. S.; JACYSYN, J. F.; FAQUIM-MAURO, E. L. Crotoxin from Crotalus durissus terrificus is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 8 abr. 2015.

DE ARAÚJO PIMENTA, L.; DE ALMEIDA, M. E. S.; BRETONES, M. L.; CIRILLO, M. C.; CURI, R.; SAMPAIO, S. C. Crotoxin promotes macrophage reprogramming towards an antiangiogenic phenotype. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

DE SOUSA, C. T. **Avaliação do efeito de alguns fármacos na fluidez da membrana celular**. 2006. Universidade do Porto, 2006.

DOUGLAS, S. .; HASSAN, N. . **Morphology of monocytes and macrophages**. [s.l.] Haematology, 1990.

DOUGLAS, S. D.; HO, W. Z. Williams manual of hematology. 2003.

Activity-in-co-cultured-Neutrophils#pdf>.

DUFTON, N.; HANNON, R.; BRANCALEONE, V.; DALLI, J.; PATEL, H. B.; GRAY, M.; D'ACQUISTO, F.; BUCKINGHAM, J. C.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J. Anti-Inflammatory Role of the Murine Formyl-Peptide Receptor 2: Ligand-Specific Effects on Leukocyte Responses and Experimental Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2611–2619, 1 mar. 2010.

EDWARDS, B. S.; YOUNG, S. M.; OPREA, T. I.; BOLOGA, C. G.; PROSSNITZ, E. R.; SKLAR, L. A. Biomolecular screening of formylpeptide receptor ligands with a sensitive, quantitative, high-throughput flow cytometry platform. **Nature Protocols**, v. 1, n. 1, p. 59–66, jun. 2006.

ENOKI, T. A.; MOREIRA-SILVA, I.; LORENZON, E. N.; CILLI, E. M.; PEREZ, K. R.; RISKE, K. A.; LAMY, M. T. Antimicrobial Peptide K0-W6-Hya1 Induces Stable Structurally

Modified Lipid Domains in Anionic Membranes. Langmuir, v. 34, n. 5, p. 2014–2025, 6 fev. 2018.

FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, S. C. Crotoxin stimulates glucose metabolism in peritoneal macrophages during tumor progression. [s.l.] XIII Annual Scientific Meeting, 2011.

FANG, F. C.; VAZQUEZ-TORRES, A. Nitric oxide production by human macrophages: There's NO doubt about it. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, v. 282, n. 5 26-5, p. L941-3, maio 2002. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943657>. Acesso em: 19 fev. 2020.

FARIAS, L. H. S.; RODRIGUES, A. P. D.; COÊLHO, E. C.; SANTOS, M. F.; SAMPAIO, S. C.; SILVA, E. O. Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during Leishmania amazonensis infection. **Parasitology**, v. 144, n. 11, p. 1458–1467, 1 set. 2017.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. -L; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of Crotalus durissus terrificus. European Journal of Biochemistry, v. 223, n. 1, p. 161–164, 1994.

FAURE, G.; HARVEY, A. L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADVANYI, F.; BON, C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. European Journal of Biochemistry, v. 214, n. 2, p. 491–496, 1993.

FAURE, G.; SALIOU, B.; BON, C.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L. Multiplicity of Acidic Subunit Isoforms of Crotoxin, the Phospholipase A2 Neurotoxin from Crotalus durissus terrificus Venom, Results from Posttranslational Modifications. **Biochemistry**, v. 30, n. 32, p. 8074-8083, 1 ago. 1991.

FAURE, G.; SAUL, F. Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and ammodytoxin, potent β-neurotoxins from Viperidae venomToxicon, 15 set. 2012. .

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved

in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, n. 2, p. 176–191, 16 set. 2011.

FERNANDES, C. A. H.; PAZIN, W. M.; DREYER, T. R.; BICEV, R. N.; CAVALCANTE, W. L. G.; FORTES-DIAS, C. L.; ITO, A. S.; OLIVEIRA, C. L. P.; FERNANDEZ, R. M.; FONTES, M. R. M. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. **Scientific Reports**, v. 7, 3 mar. 2017.

FIORE S, RYEOM SW, WELLER PF, S. C. Lipoxin Recognition Sites. Specific Binding of Labeled Lipoxin A4 With Human Neutrophils - PubMed. **J Biol Chem**, v. 267(23), p. 16168–16176, 1992. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1322894/. Acesso em: 3 jul. 2020.

FOTIADIS, D.; JASTRZEBSKA, B.; PHILIPPSEN, A.; MÜLLER, D. J.; PALCZEWSKI, K.; ENGEL, A. Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptorsCurrent Opinion in Structural Biology, abr. 2006. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567090>. Acesso em: 27 fev. 2020.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Archives** of Biochemistry and Biophysics, v. 60, n. 1, p. 64–73, 1956.

FREITAS, A. P.; FAVORETTO, B. C.; CLISSA, P. B.; SAMPAIO, S. C.; FAQUIM-MAURO, E. L. Crotoxin Isolated from Crotalus durissus terrificus Venom Modulates the Functional Activity of Dendritic Cells via Formyl Peptide Receptors. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, 2018.

FRIEDERICH, C.; TU, A. T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, 1971.

GALLOP, J. L.; JAO, C. C.; KENT, H. M.; BUTLER, P. J. G.; EVANS, P. R.; LANGEN, R.; MCMAHON, H. T. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. **EMBO Journal**, v. 25, n. 12, p. 2898–2910, 21 jun. 2006.

GILBERT, R. J. C. Protein-lipid interactions and non-lamellar lipidic structures in

membrane pore formation and membrane fusionBiochimica et Biophysica Acta - BiomembranesElsevier B.V., , 1 mar. 2016. .

GILBERT, R. J. C.; SERRA, M. D.; FROELICH, C. J.; WALLACE, M. I.; ANDERLUH, G. Membrane pore formation at protein-lipid interfacesTrends in Biochemical SciencesElsevier Ltd., 2014.

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. **Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscienceJournal of Biomolecular Techniques**, dez. 2010.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSTER, D. W.; HAWGOOD, B. J.; ELDER, H. Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, v. 22, n. 1, p. 85–98, 1984. GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. In: Research in Immunology, 7–8, **Anais**...Elsevier Masson SAS, 10 set. 1998.

GRANDO, F. C. C.; FELÍCIO, C. A.; TWARDOWSCHY, A.; PAULA, F. M.; BATISTA, V. G.; FERNANDES, L. C.; CURI, R.; NISHIYAMA, A. Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 7, p. 599–605, 2009. Disponível em: <www.bjournal.com.br>. Acesso em: 6 maio. 2021.

GREENBERG, S. Signal transduction of phagocytosisTrends in Cell Biology, 1995. .

HAINES, P. J.; READING, M.; WILBURN, F. W. Chapter 5 Differential Thermal Analysis and Differential Scanning Calorimetry. In: **Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry**. [s.l.] Elsevier, 1998. 1p. 279–361.

HARDING, P. J.; ATTRILL, H.; BOEHRINGER, J.; ROSS, S.; WADHAMS, G. H.; SMITH, E.; ARMITAGE, J. P.; WATTS, A. Constitutive dimerization of the G-Protein coupled receptor, neurotensin receptor 1, reconstituted into phospholipid bilayers. **Biophysical Journal**, v. 96, n. 3, p. 964–973, 4 fev. 2009. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19186134>. Acesso em: 27 fev. 2020.

HAWGOOD, B.; BON, C. Snake venom presynaptic toxins. **Handbook of natural toxins:** reptile venoms and toxins, v. 5, p. 3ą52, 1991.

HE, H. Q.; YE, R. D. The formyl peptide receptors: Diversity of ligands and mechanism for recognitionMoleculesMDPI AG, , 1 mar. 2017. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28335409/». Acesso em: 7 jun. 2021.

HEIMBURG, T. Lipid–Protein Interactions. In: **Thermal Biophysics of Membranes**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2007. p. 141–163.

HUBBELL, W. L.; MCCONNEL, H. M. Molecular Motion in Spin-Labeledla Phospholipids and Membranes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 2, p. 314–326, 1 jan. 1971.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in Snake Venom. In: LEE, C. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1979. p. 61–158.

JOHNSON, F.; GALLICK, G. Src Family Nonreceptor Tyrosine Kinases as Molecular Targets for Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 651–659, 13 maio 2008.

JOHNSTON, R. B.; CHADWICK, D. A.; COHN, Z. A. Priming of macrophages for enhanced oxidative metabolism by exposure to proteolytic enzymes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 153, n. 6, p. 1678–1683, 1981.

JUNG, J. Y.; MADAN-LALA, R.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J.; SOHASKEY, C. D.; BANGE, F. C.; ROBINSON, C. M. The intracellular environment of human macrophages that produce nitric oxide promotes growth of mycobacteria. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 9, p. 3198–3209, set. 2013. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774601>. Acesso em: 19 fev. 2020.

KATO, E. E. Crotoxin, a toxin from rattlesnake venom, inhibits endothelial cells function

stimulated by tumor cell conditioned medium: in vivo assayXII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/ VII Internacional Symposium on Extracellular Matrix, , 2013. .

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; OLIVEIRA, E. B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEREIRA, L. V.; YAMANE, T. Crotamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake Crotalus durissus terrificus. FASEB Journal, v. 18, n. 12, p. 1407–1409, set. 2004.

KERKIS, I.; HAYASHI, M. A. F.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; PEREIRA, A.; DE SÁ JÚNIOR, P. L.; ZAHARENKO, A. J.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, A.; YAMANE, T. State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnakeBioMed Research International, 2014. .

KHAN, S. A.; VANDEN HEUVEL, J. P. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acLabels (review)J.Nutr.Biochem.Department of Veterinary Science and Center for Molecular Toxicology and Carcinogenesis, Penn State University, University Park, PA 16802, USA, out. 2003. .

KOHRO, T.; TANAKA, T.; MURAKAMI, T.; WADA, Y.; ABURATANI, H.; HAMAKUBO, T.; KODAMA, T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 11, n. 2, p. 88–97, 2004.

KORCHAK, H. M.; WILKENFELD, C.; RICH, A. M.; RADIN, A. R.; VIENNE, K.; RUTHERFORD, L. E. Stimulus response coupling in the human neutrophil. Differential requirements for receptor occupancy in neutrophil responses to a chemoattractant. The Journal of biological chemistry, v. 259, n. 12, p. 7439–45, 25 jun. 1984. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6330057>. Acesso em: 19 fev. 2020.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LAMY-FREUND, M. T.; RISKE, K. A. The peculiar thermo-structural behavior of the anionic lipid DMPG. Chemistry and Physics of Lipids, v. 122, n. 1–2, p. 19–32, jan. 2003. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12598035/>. Acesso em: 23 maio. 2021.

LANGE, A.; MARSH, D.; WASSMER, K. H.; MEIER, P.; KOTHE, G. Electron Spin Resonance Study of Phospholipid Membranes Employing a Comprehensive Line-Shape Model. **Biochemistry**, v. 24, n. 16, p. 4383–4392, 1 jul. 1985.

LE, W.; CHEN, B.; CUI, Z.; LIU, Z.; SHI, D. Detection of cancer cells based on glycolytic-regulated surface electrical charges. **Biophysics Reports**, v. 5, n. 1, p. 10–18, 1 fev. 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s41048-018-0080-0>. Acesso em: 6 maio. 2021.

LEE, C.-Y. Snake Venoms. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1979.

LEWIS, G. P. **Mediators of inflammation**. [s.l: s.n.]

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptidesNature Reviews Drug DiscoveryEuropean Association for Cardio-Thoracic Surgery, , 2003. .

LI, Y. H.; YU, C. Y.; LI, X. X.; ZHANG, P.; TANG, J.; YANG, Q.; FU, T.; ZHANG, X.; CUI, X.; TU, G.; ZHANG, Y.; LI, S.; YANG, F.; SUN, Q.; QIN, C.; ZENG, X.; CHEN, Z.; CHEN, Y. Z.; ZHU, F. Therapeutic target database update 2018: Enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1121–D1127, 1 jan. 2018.

LI, Y.; YE, D. Molecular biology for formyl peptide receptors in human diseasesJournal of Molecular Medicine, jul. 2013. .

LIMA, T. S.; CATANEO, S. C.; IRITUS, A. C. C.; SAMPAIO, S. C.; DELLA-CASA, M. S.; CIRILLO, M. C. Crotoxin, a rattlesnake toxin, induces a long-lasting inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 10, p. 1219–1230, out. 2012.

LIMA, T. S.; NEVES, C. L.; ZAMBELLI, V. O.; LOPES, F. S. R.; SAMPAIO, S. C.; CIRILLO, M. C. Crotoxin, a rattlesnake toxin, down-modulates functions of bone marrow

neutrophils and impairs the Syk-GTPase pathway. **Toxicon**, v. 136, p. 44–55, 15 set. 2017.

LINDGREN, M.; HÄLLBRINK, M.; PROCHIANTZ, A.; LANGEL, U. Cell-penetrating peptides. Trends in pharmacological sciences, v. 21, n. 3, p. 99–103, mar. 2000. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689363>. Acesso em: 9 jan. 2020.

LIU, X.; LIEBERMAN, J. A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection. In: Advances in Immunology. [s.l.] Academic Press Inc., 2017. 135p. 81-117.

LIU, Y.; CHEN, K.; WANG, C.; GONG, W.; YOSHIMURA, T.; LIU, M.; WANG, J. M. Cell surface receptor FPR2 promotes antitumor host defense by limiting M2 polarization of macrophages. Cancer Research, v. 73, n. 2, p. 550–560, 15 jan. 2013.

MACIUSZEK, M.; CACACE, A.; BRENNAN, E.; GODSON, C.; CHAPMAN, T. M. Recent advances in the design and development of formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALX) agonists as pro-resolving agents with diverse therapeutic potential European Journal of Medicinal Chemistry Elsevier Masson s.r.l., , 5 mar. 2021. . Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33486199/. Acesso em: 7 jun. 2021.

MACKANESS, G. B. The mechanism of macrophage activation. In: MUDD, S. (Ed.). **Infectious agents and host reactions.** [s.l.] Philadelphia London: W. B. Saunders Co., 1970. p. 61.

MADERNA, P.; COTTELL, D. C.; TOIVONEN, T.; DUFTON, N.; DALLI, J.; PERRETTI, M.; GODSON, C. FPR2/ALX receptor expression and internalization are critical for lipoxin A4and annexin-derived peptide-stimulated phagocytosis. **FASEB Journal**, v. 24, n. 11, p. 4240–4249, nov. 2010.

MAESS, M. B.; WITTIG, B.; LORKOWSKI, S. Highly efficient transfection of human THP-1 macrophages by nucleofection. **Journal of Visualized Experiments**, n. 91, p. e51960, 2 set. 2014. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25226503. Acesso em: 12 fev. 2020.

MARKLAND, F. S. **Snake venoms and the hemostatic systemToxicon**Toxicon, , dez. 1998. . Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9839663/>. Acesso em: 23 maio. 2021.

MARSH, D. Handbook of Lipid Bilayers. 2. ed. [s.l.] CRC Press, 2013.

MEIER, J.; STOCKER, K. F. Biology and Distribution of Venomous Snakes of Medical Importance and The Composition of Snake Venoms. In: **Handbook of: Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. [s.l.] CRC Press, 2018. p. 367–412.

MELENDEZ, A. J.; ALLEN, J. M. Phospholipase D and immune receptor signalling. **Seminars in Immunology**, v. 14, n. 1, p. 49–55, 1 fev. 2002.

MIGEOTTE, I.; COMMUNI, D.; PARMENTIER, M. Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responsesCytokine and Growth Factor ReviewsCytokine Growth Factor Rev, , dez. 2006. . Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17084101/>. Acesso em: 22 fev. 2021.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophagesJournal of Clinical Investigation, 1987. .

NATHAN, C. F.; ROOT, R. K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: Dependence on sequential activation and triggering*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 6, p. 1648–1662, 1 dez. 1977.

NEMECZ, D.; OSTROWSKI, M.; RAVATIN, M.; SAUL, F.; FAURE, G. Crystal Structure of Isoform CBd of the Basic Phospholipase A2 Subunit of Crotoxin: Description of the Structural Framework of CB for Interaction with Protein Targets. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 22, 13 nov. 2020. Disponível em:

NUNES, F. P. B.; DELLA-CASA, M. S.; CIRILLO, M. C. Inhibition of secretion of proinflammatory cytokines contributes to the long-lasting anti-inflammatory properties of crotoxin: a natural toxin from rattlesnake venom. In: INFLAMMATION RESEARCH, **Anais**...BIRKHAUSER VERLAG AG VIADUKSTRASSE 40-44, PO BOX 133, CH-4010 BASEL, SWITZERLAND, 2011.

NUNES, F. P. B.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R. C.; CIRILLO, M. C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of Crotalus durissus terrificus snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100–1106, 1 jun. 2010.

PANARO, M. A.; BRANDONISIO, O.; ACQUAFREDDA, A.; SISTO, M.; MITOLO, V. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. **Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders**, v. 3, n. 3, p. 210–221, set. 2003. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871028. Acesso em: 19 fev. 2020.

PANETTA, R.; GREENWOOD, M. T. **Physiological relevance of GPCR oligomerization and its impact on drug discoveryDrug Discovery Today**Elsevier Ltd, , dez. 2008. . Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18824244>. Acesso em: 27 fev. 2020.

PEREAÑEZ, J. A.; GÓMEZ, I. D.; PATIÑO, A. C. Relationship between the structure and the enzymatic activity of crotoxin complex and its phospholipase A 2 subunit: An in silico approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 35, p. 36–42, maio 2012.

PERES, C. M.; CURI, R.; PAFFARO, A. M. do A.; MARTINS, A. K. A.; PIMENTA, A.; GONÇALVES, C. R.; POMPÉIA, C.; MARTINS, C. R.; COSTA, C. A. da; ALMEIDA, D. C. G. de; MARTINS, E. F.; SILVA, É. P. P.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; LIMA, F. B.; MELLO, F. E. P. de; SORIANO, F. G.; OLIVEIRA, H. R. de; TIMENETSKY, J.; GAZZOLA, J.; MALUF, L. M. P.; LIMA, M. M. R.; MONTANO, M. A. E.; BIZINOTTO, M. C.; BOAVENTURA, M. F. C.; OLIVEIRA, M. C. X. de; LÉO, P.; BORELLI, P.; GORJÃO, R.; BAZOTTE, R. B.; OTTON, R.; VERLENGIA, R.; ANDREOTTI, S.; SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; LIMA, T. M. de; WILLIAM JUNIOR, W. N. Como cultivar células. [s.l.] Guanabara-Koogan, 2005.

PERRETTI, M.; GODSON, C. Formyl peptide receptor type 2 agonists to kick-start resolution pharmacologyBritish Journal of PharmacologyJohn Wiley and Sons Inc, , 1 out. 2020. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32954491/>. Acesso em: 7 jun. 2021.

PETKEVICIUS, K.; VIRTUE, S.; BIDAULT, G.; JENKINS, B.; ÇUBUK, C.; MORGANTINI, C.; AOUADI, M.; DOPAZO, J.; SERLIE, M.; KOULMAN, A.; VIDAL-PUIG, A. **Accelerated phosphatidylcholine turnover in macrophages promotes adipose tissue inflammation in obesitybioRxiv**bioRxiv, , 8 maio 2019. Disponível em: https://doi.org/10.1101/631408>. Acesso em: 6 maio. 2021.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, n. 2, p. 211–226, 30 out. 1981.

QIN, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculatureAtherosclerosisAtherosclerosis, , mar. 2012.

Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21978918/. Acesso em: 23 maio. 2021.

RABIET, M. J.; HUET, E.; BOULAY, F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while Listeria monocytogenes-derived peptides preferentially activate FPR. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 8, p. 2486–2495, ago. 2005. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16025565>. Acesso em: 18 fev. 2020.

RABINOVITCH, M.; DESTEFANO, M. J. Manganese stimulates adhesion and spreading of mouse sarcoma i ascites cells. **Journal of Cell Biology**, v. 59, n. 1, p. 165–176, 1 out. 1973. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4584725/>. Acesso em: 23 maio. 2021.

RABINOVITCH, M.; MANEJIAS, R. E.; NUSSENZWEIG, V. Selective phagocytic paralysis induced by immobilized immune complexes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 142, n. 4, p. 827–838, 1975. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1185106/>. Acesso em: 23 maio. 2021.

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.;

CARDOSO, D. F.; 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**, v. 43, n. 7, p. 801–810, jun. 2004.

RAPPOLEE, D. A.; WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 1, n. 1, p. 47–55, 1988. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3077299>. Acesso em: 19 fev. 2020.

RIGONI, M.; PAOLI, M.; MILANESI, E.; CACCIN, P.; RASOLA, A.; BERNARDI, P.; MONTECUCCO, C. Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34013–34020, 5 dez. 2008. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809685. Acesso em: 19 fev. 2020.

RISKE, K. A.; BARROSO, R. P.; VEQUI-SUPLICY, C. C.; GERMANO, R.; HENRIQUES, V. B.; LAMY, M. T. Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1788, n. 5, p. 954–963, maio 2009. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19366598/. Acesso em: 23 maio. 2021.

ROSENFELD, G. Symptomatology, Pathology, and Treatment of Snake Bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 345–384.

ROZENFELD, J. H. K.; DUARTE, E. L.; OLIVEIRA, T. R.; LAMY, M. T. **Structural insights on biologically relevant cationic membranes by ESR spectroscopyBiophysical Reviews**Springer Verlag, , 1 out. 2017. .

SAMPAIO, S. C.; ALBA-LOUREIRO, T. C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R. G.; SANTOS, E. C. D.; 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**, v. 47, n. 3, p. 313–321, 1 mar. 2006a.

SAMPAIO, S. C.; BRIGATTE, P.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; DOS-SANTOS, E. C.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CURI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory

effect of Crotalus durissus terrificus snake venom on macrophage function. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 41, n. 7, p. 899–907, jun. 2003. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782091>. Acesso em: 9 jan. 2020.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: Novel activities for a classic β-neurotoxinToxicon, 1 jun. 2010.

SAMPAIO, S. C.; SANTOS, M. F.; COSTA, E. P.; RANGEL-SANTOS, A. C.; CARNEIRO, S. M.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin induces actin reorganization and inhibits tyrosine phosphorylation and activity of small GTPases in rat macrophages. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 909–919, 15 jun. 2006b.

SAMPAIO, S. C.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism and function. **Journal of leukocyte biology**, v. 70, n. 4, p. 551–8, out. 2001. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11590191>. Acesso em: 9 jan. 2020.

SANTOS, K. F.; MURAKAMI, M. T.; CINTRA, A. C. O.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; FORRER, V. P.; BRANDÃO NETO, J. R.; POLIKARPOV, I.; ARNI, R. K. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the heterodimeric crotoxin complex and the isolated subunits crotapotin and phospholipase A2. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, n. 4, p. 287–290, 2007.

SCHNEEMANN, M.; SCHOEDON, G. **Species differences in macrophage NO production are important (multiple letters)Nature Immunology**, fev. 2002. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11812978>. Acesso em: 19 fev. 2020.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. **Resolution of inflammation: The beginning programs the endNature Immunology**Nature Publishing Group, , 17 dez. 2005. Disponível em: https://www.nature.com/articles/ni1276. Acesso em: 3 jul. 2020.

SHOWELL, H. J.; FREER, R. J.; ZIGMOND, S. H.; SCHIFFMANN, E.; ASWANIKUMAR, S.; CORCORAN, B.; BECKER, E. L. The structure-activity relations of synthetic peptides as

chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 143, n. 5, p. 1154–1169, 1 maio 1976. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1262785. Acesso em: 19 fev. 2020.

SILVIUS, J. R. Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins. In: JOST PC, G. O. (Ed.). **Lipid-Protein Interactions**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1982. p. 239–281.

SIMPSON, L. M.; TADDESE, B.; WALL, I. D.; REYNOLDS, C. A. **Bioinformatics and molecular modelling approaches to GPCR oligomerizationCurrent Opinion in Pharmacology**, fev. 2010. . Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015686>. Acesso em: 27 fev. 2020.

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

SMITH, H. K.; GIL, C. D.; OLIANI, S. M.; GAVINS, F. N. E. Targeting formyl peptide receptor 2 reduces leukocyteendothelial interactions in a murine model of stroke. **FASEB Journal**, v. 29, n. 5, p. 2161–2171, 1 maio 2015. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25690650/. Acesso em: 23 jun. 2021.

SOUTHGATE, E. L.; YE, R. D. Formyl Peptide Receptor. In: CHOI, S. (Ed.). **Encyclopedia** of Signaling Molecules. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 650–656.

STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. **AMPK in health and diseasePhysiological Reviews**, jul. 2009. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584320. Acesso em: 27 fev. 2020.

STEINMAN, R. M.; BRODIE, S. E.; COHN, Z. A. Membrane flow during pinocytosis: A stereologic analysis. **Journal of Cell Biology**, v. 68, n. 3, p. 665–687, 1 mar. 1976. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1030706/>. Acesso em: 23 maio. 2021.

STILLWELL, W.; WASSALL, S. R. Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a

unique fatty acidChemistry and Physics of LipidsElsevier Ireland Ltd, , 2003. . Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14580707/. Acesso em: 23 maio. 2021.

STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: RATON, B. (Ed.). **Medical Use of Snake Venom**. [s.l: s.n.]p. 33–56.

SUETSUGU, S.; TOYOOKA, K.; SENJU, Y. Subcellular membrane curvature mediated by the BAR domain superfamily proteinsSeminars in Cell and Developmental BiologyElsevier Ltd, , 2010.

SUMMY, J. M.; GALLICK, G. E. Src family kinases in tumor progression and metastasis Cancer and Metastasis Reviews, dez. 2003.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **The American journal of physiology**, v. 246, n. 1 Pt 1, p. C1-9, jan. 1984. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6364825. Acesso em: 19 fev. 2020.

TANEN, D. A.; RUHA, A. M.; GRAEME, K. A.; CURRY, S. C.; FISCHIONE, M. A. Rattlesnake envenomations: Unusual case presentations. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, n. 3, p. 474–479, 12 fev. 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11176775/>. Acesso em: 23 maio. 2021.

TSAI, Y. F.; YANG, S. C.; CHANG, W. Y.; CHEN, J. J.; CHEN, C. Y.; CHANG, S. H.; HWANG, T. L. Garcinia multiflora inhibits FPR1-Mediated neutrophil activation and protects against acute lung injury. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 2776–2793, 1 jan. 2019. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30562761/>. Acesso em: 7 jun. 2021.

TSUCHIYA, S.; KOBAYASHI, Y.; GOTO, Y.; OKUMURA, H.; NAKAE, S.; KONNO, T.; TADA, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. **Cancer research**, v. 42, n. 4, p. 1530–6, abr. 1982. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6949641. Acesso em: 9 jan. 2020.

TSUCHIYA, S.; YAMABE, M.; YAMAGUCHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KONNO, T.; TADA,

URIBE-QUEROL, E.; ROSALES, C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological ProcessFrontiers in ImmunologyFrontiers Media S.A., , 2 jun. 2020. . Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 10 jun. 2021.

VAN FURTH, R.; MARTINA M.C. DICSSELHOFF-DEN DULK, M. M. C.; RAEBURN, J. A.; VAN ZWET, T. L.; CROFTON, R.; BLUSSE VAN OUD ALBLAS, A. Characteristics, Origin and Kinetics of Human and Murine Mononuclear Phagocytose. In: **Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects**. London: Martinus Nijhoff Publishers by, The Hague, 1980. p. 279–298.

VIEIRA, L. F.; MAGRO, A. J.; FERNANDES, C. A. H.; DE SOUZA, B. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; PALMA, M. S.; ROSA, J. C.; FULY, A. L.; FONTES, M. R. M.; GALLACCI, M.; BUTZKE, D. S.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A2 from Crotalus durissus terrificus snake venom. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2365–2375, dez. 2013.

WALTER, F. G.; BILDEN, E. F.; GIBLY, R. L. Envenomations. **Critical Care Clinics**, v. 15, n. 2, p. 353–386, 1999. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331133/. Acesso em: 23 maio. 2021.

WANG, H. L.; CHENG, X.; SINE, S. M. Intramembrane proton binding site linked to activation of bacterial pentameric ion channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 9, p. 6482–6489, 24 fev. 2012.

WASSALL, S. R.; STILLWELL, W. Docosahexaenoic acid domains: the ultimate non-raft membrane domain. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 153, n. 1, p. 57–63, 1 maio 2008. WEISS, A.; SCHLESSINGER, J. Switching signals on or off by receptor dimerization. **Cell**, v. 94, n. 3, p. 277–80, 7 ago. 1998. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9708728. Acesso em: 27 fev. 2020.

WILLIAMS, J. W.; GIANNARELLI, C.; RAHMAN, A.; RANDOLPH, G. J.; KOVACIC, J. C. Macrophage Biology, Classification, and Phenotype in Cardiovascular Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 1)Journal of the American College of CardiologyElsevier USA, , 30 out. 2018. Disponível em: https://europepmc.org/articles/PMC6209330. Acesso em: 10 jun. 2021.

WINTHER, M.; DAHLGREN, C.; FORSMAN, H. Formyl Peptide Receptors in Mice and Men: Similarities and Differences in Recognition of Conventional Ligands and Modulating LipopeptidesBasic and Clinical Pharmacology and ToxicologyBlackwell Publishing Ltd, , 1 fev. 2018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28881079/. Acesso em: 7 jun. 2021.

WISHART, D. S.; FEUNANG, Y. D.; GUO, A. C.; LO, E. J.; MARCU, A.; GRANT, J. R.; SAJED, T.; JOHNSON, D.; LI, C.; SAYEEDA, Z.; ASSEMPOUR, N.; IYNKKARAN, I.; LIU, Y.; MACIEJEWSKI, A.; GALE, N.; WILSON, A.; CHIN, L.; CUMMINGS, R.; LE, Di.; PON, A.; KNOX, C.; WILSON, M. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1074–D1082, 1 jan. 2018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29126136/. Acesso em: 22 fev. 2021.

WU, M.; HOLOWKA, D.; CRAIGHEAD, H. G.; BAIRD, B. Visualization of plasma membrane compartmentalization with patterned lipid bilayers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 38, p. 13798–13803, 21 set. 2004. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356342. Acesso em: 27 fev. 2020.

WU, P. L.; CHIU, C. R.; HUANG, W. N.; WU, W. G. The role of sulfatide lipid domains in the membrane pore-forming activity of cobra cardiotoxin. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 5, p. 1378–1385, maio 2012.

XU, J.; WANG, F.; VAN KEYMEULEN, A.; HERZMARK, P.; STRAIGHT, A.; KELLY, K.; TAKUWA, Y.; SUGIMOTO, N.; MITCHISON, T.; BOURNE, H. R. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 201–14, 25 jul. 2003. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887922. Acesso em: 19 fev. 2020.

YAMASHITA, K.; KAWAI, Y.; TANAKA, Y.; HIRANO, N.; KANEKO, J.; TOMITA, N.; OHTA, M.; KAMIO, Y.; YAO, M.; TANAKA, I. Crystal structure of the octameric pore of staphylococcal γ-hemolysin reveals the β-barrel pore formation mechanism by two components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 42, p. 17314–17319, 18 out. 2011.

YE, R. D.; BOULAY, F.; JI, M. W.; DAHLGREN, C.; GERARD, C.; PARMENTIER, M.; SERHAN, C. N.; MURPHY, P. M. International union of basic and clinical pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) familyPharmacological ReviewsAmerican Society for Pharmacology and Experimental Therapy, , jun. 2009. . Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19498085. Acesso em: 19 fev. 2020.

ZAMBELLI, V. O.; SAMPAIO, S. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; GRECO, K.; BRITTO, L. R. G.; ALVES, A. S.; ZYCHAR, B. C.; GONÇALVES, L. R. C.; SPADACCI-MORENA, D. D.; OTTON, R.; DELLA-CASA, M. S.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357–1367, 15 jun. 2008.

ZHANG, B. B.; ZHOU, G.; LI, C. **AMPK: An Emerging Drug Target for Diabetes and the Metabolic SyndromeCell Metabolism**, 6 maio 2009. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19416711. Acesso em: 27 fev. 2020.

ZHANG, F.; ZHAO, G.; DONG, Z. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and D in stimulation of RAW264.7 mouse macrophage-like cells by lipopolysaccharide. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 7, p. 1375–1384, 1 jul. 2001.

ZIMMERBERG, J.; MCLAUGHLIN, S. Membrane curvature: How BAR domains bend bilayersCurrent BiologyCell Press, , 23 mar. 2004. .