Tatiane Soares de Lima

Caracterização das ações do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre funções de neutrófilos

São Paulo

2010

Índice

I. RESUMO 4
II. ABSTRACT 6
III. INTRODUÇÃO 8
1. Envenenamentos por Serpentes *Crotalus durissus terrificus* 8
2. Inflamação: Considerações Gerais 11
3. Características e Funções dos Neutrófilos 14
4. Vias de Sinalização Envolvidas nas Atividades Fagocítica e Microbicida de Neutrófilos 17
5. Veneno de *Crotalus durissus terrificus* e a Resposta Inflamatória 20
IV. CONCLUSÃO 24
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 26

Resumo

I. RESUMO

Estudos anteriores demonstraram que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) apresenta ação antiinflamatória prolongada, bem como inibe o espraiamento e a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais, sendo a crotoxina (CTX), o principal componente do VCdt, a responsável por esses efeitos. Em relação aos neutrófilos, demonstrou-se que o VCdt inibe, *in vitro* e *in vivo*, a fagocitose por essas células, porém o componente do VCdt responsável por esse efeito não foi identificado. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi identificar o componente responsável pelo efeito inibitório do VCdt sobre a fagocitose por neutrófilos, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos nessa ação. Além disso, foi também objetivo desse estudo investigar o efeito do VCdt e da CTX sobre a atividade microbicida e a produção de espécies reativas do oxigênio por essas células. Inicialmente, foi avaliado o efeito *in vitro* dos três picos do VCdt, obtidos durante a purificação da CTX (pico I; pico II, que corresponde a CTX, e pico III), sobre a atividade fagocítica de neutrófilos. A incubação dos neutrófilos com a CTX ou com os picos I ou III, em diferentes concentrações (0,02; 0,04; 0,08; 0,16 ou 0,32 µg/mL), mostrou que somente o pico II inibiu essa atividade, demonstrando que a CTX é o componente do VCdt responsável pelo seu efeito inibitório sobre a fagocitose por neutrófilos. Uma vez realizada essa identificação, foi investigado o efeito *in vivo* da CTX sobre essa função. O tratamento dos animais com a CTX (0,1 mg/kg), 2 horas, 1, 4 ou 14 dias antes ou 1 hora após a administração de carragenina inibiu a fagocitose por neutrófilos, o que demonstra que esta toxina, além do efeito direto, apresenta efeito sistêmico sobre a atividade fagocítica dessas células. Esses resultados mostraram também que a CTX apresenta efeito inibitório prolongado sobre a atividade fagocítica de neutrófilos. Ainda, com o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos nesse efeito inibitório foram realizados ensaios imunocitoquímicos para avaliar a reorganização do citoesqueleto. A incubação dos neutrófilos com o VCdt (0,5 µg/mL) ou com a CTX (0,08 µg/mL), bem como o tratamento dos animais com o VCdt (0,18 mg/kg) ou a CTX (0,1 mg/kg), 2 horas antes da administração de carragenina, inibiram a fosforilação de resíduos de tirosina e a polimerização da actina. Em relação ao efeito do VCdt e da CTX sobre outra função dos neutrófilos, foi investigado, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a atividade microbicida e a produção de espécies reativas do oxigênio por essas células. A incubação dos neutrófilos com o VCdt (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 ou 2,0 µg/mL) ou a CTX (0,02; 0,04; 0,08; 0,16 ou 0,32 µg/mL), bem como o tratamento dos animais com o VCdt (0,18 mg/kg) ou a CTX (0,1 mg/kg), 2 horas antes da administração de carragenina, não alteraram a atividade microbicida e a produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Em conclusão, a CTX é o componente do VCdt responsável por inibir a fagocitose por neutrófilos e um dos mecanismos envolvidos neste efeito é a inibição da fosforilação de proteínas sinalizadoras e a conseqüente polimerização de actina, importante evento para o início da formação do fagossoma e a completa internalização da partícula. Por outro lado, o VCdt e a CTX não alteram a atividade microbicida e a produção de espécies reativas do oxigênio por neutrófilos. Dessa forma, considerando-se o papel fundamental dessas células na inflamação, este estudo amplia os conhecimentos das ações moduladoras da CTX sobre a resposta inflamatória e, ainda, contribui para a elucidação dos mecanismos envolvidos nestas ações, particularmente, a inibição do processo de fagocitose por neutrófilos.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*, crotoxina, inflamação, neutrófilo, fagocitose, atividade microbicida.

Abstract

II. ABSTRACT

Previous studies showed that *Crotalus durissus terrificus* snake venom (CdtV) has long-lasting anti-inflammatory properties and inhibits the spreading and the phagocytic activity of peritoneal macrophages. Crotoxin (CTX), the main component of CdtV, is responsible for these effects. In addition, CdtV inhibits, in vitro and in vivo, the phagocytic activity of neutrophils, but the component of the venom responsible for this effect was not identified. In this way, the aim of this study was to investigate the CdtV component responsible for the inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils, as well as to investigate possible mechanisms involved on this effect. Besides, the aim of this study was also to investigate the effect of CdtV and CTX on the microbicidal activity and the production of reactive oxygen species by neutrophils. Initialy, it was avaliated the in vitro effect of the three peaks of CdtV, obtained during CTX purification (peak I, peak II that corresponds to CTX and peak III), on phagocytosis by neutrophils. The incubation of the cells with CTX, peak I or peak III, at different concentrations (0.02, 0.04, 0.08, 0.16 or 0.32 µg/mL), showed that just peak II inhibited this activity, so CTX is the CdtV component responsible for the inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils. Once realized this identification, it was investigated the in vivo effect of CTX on the same neutrophil function. Treating animals with CTX (0.1 mg/kg), 2 hours, 1, 4 or 14 days before or 1 hour after the administration of carrageenan inhibited the phagocytic activity of neutrophils, which demonstrates that this toxin, in addition to the direct effect, has systemic effect on phagocytosis by neutrophils. These results also show that CTX has a long-lasting inhibitory effect on the phagocytic activity of these cells. Further, to elucidate possible mechanisms involved on this inhibitoty effect, immunocytochemical assays was realized to evaluate the reorganization of the cytoskeleton. The incubation of the neutrophils with CdtV (0.5 µg/mL) or CTX (0.08 µg/mL), as well as the treatment of the animals with CdtV (0.18 mg/kg) or CTX (0.1 mg/kg), 2 hours before the carrageenan injection, inhibited the phosphorilation of tyrosine residues and actin polymerization. Regarding the effect of CdtV and CTX in other neutrophil function, it was investigated, in vitro and in vivo, the microbicidal activity and the production of reactive oxygen species by neutrophils. The incubation of the cells with CdtV (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 or 2.0 µg/mL) or CTX (0.02, 0.04, 0.08, 0.16 or 0.32 µg/mL), as well as the treatment of the animals with CdtV (0.18 mg/kg) or CTX (0.1 mg/kg), 2 hours before the carragennan injection, did not alter the microbicidal activity or the production of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. In conclusion, CTX is the CdtV component responsible for the inhibitory effect on phagocytosis by neutrophils and a mechanism involved on this effect is the inhibition of phosphorilation of signaling proteins and the consequent actin polymerization, an important event for the phagosome formation and the complete internalization of the particle. On the other hand, CdtV and CTX did not alter the microbicidal activity or the production of reactive oxygen species. Thus, considering the essential role of these cells in inflammation, this study extends the knowledge of the actions of CTX on modulating the inflammatory response and also contributes to the elucidation of the mechanisms involved in these actions, particularly the inhibition of phagocytosis by neutrophils.

Key-words: *Crotalus durissus terrificus*, crotoxin, inflammation, neutrophil, phagocytosis, microbicidal activity.

Introdução

III. INTRODUÇÃO

1. Envenenamentos por Serpentes *Crotalus durissus terrificus*

No Brasil, são notificados cerca de 25.000 acidentes ofídicos por ano (SINAN, 2008). As serpentes do gênero *Bothrops* são as de maior importância médica, sendo estas responsáveis por 90,5% dos acidentes. As serpentes peçonhentas dos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* são responsáveis por respectivamente 7,7%, 1,4% e 0,4% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (Araújo *et al.*, 2003; SINAN, 2008).

As serpentes do gênero *Crotalus*, popularmente conhecidas como cascavéis, são terrestres, robustas e pouco ágeis. Uma característica bastante marcante é a presença do chocalho ou guizo na extremidade caudal. O corpo destas serpentes apresenta um colorido de fundo castanho-claro sobre o qual existe uma fileira de manchas dorsais losangulares marrons e marginadas de branco ou amarelo (Melgarejo, 2003).

No Brasil, é encontrada apenas uma espécie de serpente do gênero *Crotalus*, a *Crotalus durissus*. Esta espécie tem ampla distribuição geográfica; habita os cerrados do Brasil Central, as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste e os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte. Esta espécie compreende cinco subespécies, sendo a *Crotalus durissus terrificus* a predominante nas regiões Sudeste e Sul **(Figura 1)**. As demais subespécies são a *Crotalus durissus cascavella* que habita caatingas; a *Crotalus durissus collilineatus* que está distribuída pelos estados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás; a *Crotalus durissus ruruima* que é típica das regiões savanas de Roraima e a *Crotalus durissus marajoensis* que é encontrada na Ilha de Marajó no Pará (Melgarejo, 2003).

Figura 1. Serpente *Crotalus durissus terrificus*.

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) contém uma grande quantidade de proteínas e polipeptídios capazes de interferir em uma série de processos fisiológicos (Azevedo-Marques *et al.*, 2003). As principais toxinas presentes neste veneno incluem a crotoxina (CTX), a crotamina, a convulxina e a giroxina (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Moura-Gonçalves & Vieira, 1950; Barrio, 1961; Prado-Franceschi & Vital-Brazil, 1981).

A crotoxina é o principal componente tóxico do veneno, representa cerca de 60% do veneno total, sendo responsável por sua elevada toxicidade (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938; Vital-Brazil, 1972). Esta toxina foi isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat, em 1938, e sua estrutura foi descrita por Fraenkel-Conrat e Singer, em 1956. A crotoxina é uma β-neurotoxina heterodimérica formada pela associação não covalente de duas subunidades: a fosfolipase A_2 (componente B, CB), uma proteína básica com atividade fosfolipásica e baixa toxicidade, e a crotapotina (componente A, CA), uma proteína ácida desprovida de atividade enzimática ou tóxica, que atua como carreadora da fosfolipase A_2, potencializando sua atividade letal ao mesmo tempo em que diminui sua atividade enzimática dentro do complexo crotoxina (Habermann & Breithaupt, 1978; Bon *et al.*, 1979; Choumet *et al.*, 1996; Sampaio *et al.*, 2010).

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

O efeito miotóxico do veneno decorre da ação da crotoxina e da crotamina, uma proteína básica de baixo peso molecular, sem atividade enzimática e que corresponde a cerca de 17% do veneno total (Ownby *et al.*, 1976; Gopalakrishnakone *et al*., 1984).

A ação coagulante do veneno é atribuída a um componente tipo trombina (thrombin-like), a giroxina, que converte o fibrinogênio em fibrina e assim aumenta o tempo de coagulação do sangue (Sano-Martins *et al*., 2001).

Assim sendo, o quadro de envenenamento humano por *Crotalus durisssus terrificus* caracteriza-se por manifestações sistêmicas, tais como: mal estar, prostração, sudorese, vômitos, sonolência ou inquietação, que são observadas nas primeiras horas após o acidente. Além disso, devido à atividade miotóxica do veneno, os pacientes acidentados por *Crotalus durissus terrificus* apresentam quadro de rabdomiólise generalizada (Azevedo-Marques, 1985; Magalhães *et al.*, 1986; Jorge & Ribeiro, 1992). Outra manifestação sistêmica importante é a incoagulabilidade sangüínea observada em cerca de 50% dos acidentes crotálicos, em humanos (Jorge & Ribeiro, 1992; Sano-

Martins *et al*., 2001), e também verificada experimentalmente em cães, que apresentam hipofibrinogenemia e ativação secundária do sistema fibrinolítico (Sousa-e-Silva *et al.*, 2003).

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

2. Inflamação: Considerações Gerais

A resposta inflamatória é uma resposta do organismo à injúria que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado. Essa resposta, independente da natureza do estimulo lesivo, é caracterizada por eventos vasculares, celulares e linfáticos, que se desenvolvem com a finalidade de eliminar o agente lesivo, restituir o tecido lesado e manter a homeostasia do organismo (Kumar *et al.*, 2005). As manifestações uniformes que caracterizam a resposta inflamatória são decorrentes da ação de mediadores químicos, liberados após o estímulo lesivo que atuam de maneira inter-relacionada em todos os eventos da resposta inflamatória (Rocha e Silva & Garcia-Leme, 1972; Ferreira & Vane, 1973; Majno & Joris, 2004). Esses mediadores podem ser originados do plasma, tais como os componentes do sistema complemento, do sistema de coagulação e as cininas ou ainda originados de células e de tecidos, tais como a histamina, a serotonina, os metabólitos do ácido araquidônico, o fator de ativação plaquetária, o óxido nítrico e as interleucinas (Rankin, 2004; Majno & Joris, 2004, Kumar *et al.*, 2005).

Particularmente, os metabólitos do ácido aracdônico são gerados por ação da enzima fosfolipase A_2, a qual degrada os fosfolipídios de membrana celular e assim libera o ácido aracdônico; este por sua vez, é degradado pela ação das enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases (Crowley, 1996). As prostaglandinas, as prostaciclinas

e os tromboxanos são os metabólitos gerados pela via das ciclooxigenases, enquanto que os leucotrienos e as lipoxinas são gerados pela via das lipoxigenases (Rankin, 2004). Sobre a atuação desses metabólitos na resposta inflamatória, as prostaglandinas e as prostaciclinas causam vasodilatação e potencializam a formação do edema inflamatório (Majno & Joris, 2004), enquanto que os leucotrienos causam vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e atuam como agentes quimiotáticos (Lewis *et al.*, 1990). Com relação às lipoxinas, estas são geradas pela ação das enzimas 12-lipoxigenase de plaquetas ou 15-lipoxigenase de macrófagos; são mediadores que possuem atividade antiinflamatória e assim participam da resolução da resposta inflamatória (Serhan & Sheppard, 1990; Levy *et al.*, 1993; Bonnans *et al.*, 2002). A lipoxina A_4 inibe a migração de neutrófilos e a liberação da interleucina 1β (IL-1β) por essas células (Godson *et al.*, 2000). Ainda, as lipoxinas estimulam a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (Godson *et al.*, 2000), porém inibem a fagocitose por neutrófilos, uma vez que reduzem a expressão de seus receptores CR3 (*complement receptor 3*) (Maderna & Godson, 2009).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâdimicas, que culminam com o extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente. Imediatamente após o estimulo lesivo, ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação observada, principalmente, nas vênulas pós-capilares. Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso caracterizadas, principalmente, pela contração da célula endotelial e abertura de junções entre essas células. Essas aberturas levam ao aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (Kowal-Vern *et al.*, 1997; Rankin, 2004), o que caracteriza o edema inflamatório (Janeway & Travers, 1994; Vane, 1994; Blake & Ridker, 2001; Tedgui & Mallat, 2001). Ainda, em

consequência ao extravasamento plasmático ocorre o aumento da viscosidade sanguínea e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à estase sanguínea, marginação leucocitária e migração destas células para o tecido extravascular (Kumar *et al.*, 2005). O processo de migração transendotelial dos leucócitos pode ocorrer através das junções das células endoteliais adjacentes (via para celular) ou ainda, em alguns casos, através do corpo celular (via transcelular) (Engelhard & Wolburg, 2004; Carman & Springer, 2004).

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

O processo de migração transendotelial dos leucócitos ocorre em diferentes fases: inicialmente, os leucócitos rolam sobre o endotélio, em seguida se aderem firmemente à superfície deste e, migram em direção ao foco inflamatório. Esses eventos são denominados, respectivamente, de *rolling*, adesão e migração e, envolvem a expressão de moléculas de adesão, entre estas, as selectinas, as integrinas, as imunoglobulinas e os seus ligantes (Springer, 1995; Rankin, 2004). A interação entre essas moléculas de adesão e seus respectivos ligantes, permite que os eventos de *rolling*, adesão e migração leucocitária ocorram de forma dinâmica no decorrer do processo inflamatório.

A migração direcionada dos leucócitos, denominada de quimiotaxia, é essencial para a resposta inflamatória. Este processo envolve uma variedade de moléculas que atuam como quimiotáticos para os leucócitos, os quais incluem: oligopeptídeos de

bactérias do tipo formilpeptideo (FMLP; Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine); proteínas desnaturadas, alguns lipídios e lipopolissacarídeos; fragmentos do sistema complemento (C5a e C3a); lipídios bioativos (leucotrieno B_4); citocinas (interleucina 8) e quimiocinas, tais como MCP-1 (Niggli, 2003; Kumar *et al.*, 2005). Os agentes quimiotáticos se ligam a receptores específicos presentes na superfície dos leucócitos, os quais desencadeiam a ativação de diversas proteínas intracelulares sinalizadoras e a consequente polimerização dos filamentos de actina, formação de pseudópodes e movimento celular direcionado (Niggli, 2003; Simon & Green, 2005**,** Kölsch, 2008).

As primeiras células a migrarem para o foco inflamatório são os leucócitos polimorfonucleares, particularmente os neutrófilos (Rankin, 2004; Kumar *et al.*, 2005). O exsudato celular é caracterizado, na fase inicial da resposta inflamatória, pela presença predominante de neutrófilos e, posteriormente, pela predominância de células mononucleares. Uma vez no sítio inflamatório, essas células iniciam o processo de fagocitose do agente lesivo e dos debris celulares (Auger & Ross, 1992).

3. Características e Funções dos Neutrófilos

Os neutrófilos são células sanguíneas que se originam na medula óssea a partir de uma célula precursora hematopoética, denominada de *stem cell*. Esta célula divide-se e, posteriormente, por processos de diferenciação e de maturação, se transforma sequencialmente em: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, neutrófilo bastonete e neutrófilo segmentado. Este último, ainda no interior da medula, sofre a completa diferenciação, e a seguir passa para o sangue periférico (Laszlo & Rundles, 1972).

Os neutrófilos segmentados são células arredondadas com 10 a 14 μm de diâmetro, possuem núcleo lobulado com dois a cinco lóbulos ligados por pontes de

cromatina e não possuem nucléolos (Laszlo & Rundles, 1972). No citoplasma dos neutrófilos são encontrados grânulos e vesículas que funcionam como reservatórios para proteínas com ação microbicida, bem como para receptores de moléculas de adesão, proteínas da matriz extracelular, produtos bacterianos e mediadores inflamatórios solúveis (Bertino & Silber, 1972; Faurschou & Borregaard, 2003).

Três tipos de grânulos diferentes são encontrados no citoplasma de neutrófilos: os azurófilos ou primários, os secundários e os terciários. Os grânulos azurófilos formam-se nos promielócitos e são ricos em mieloperoxidase (MPO), uma hemoproteína envolvida na atividade microbicida dos neutrófilos. Ainda, outros componentes com atividade microbicida estão presentes nesses grânulos: alfa-defensinas (Ganz *et al.*, 1985; Daher *et al.*, 1986; Lehrer *et al.*, 1988); proteínas bactericidas de permeabilidade aumentada e proteases, tais como, a proteinase-3, a catepsina G, a elastase, entre outras (Iovine *et al.*. 1997, Campanelli *et al.*, 1990; Faurschou & Borregaard, 2003, Kumar *et al*., 2005).

Os grânulos específicos secundários e terciários são formados a partir do estágio de mielócito e não possuem a enzima MPO, porém possuem substâncias microbicidas, tais como a lactoferrina e a lisozima, além de importantes metaloproteases: a colagenase, a gelatinase e a leucosidina (Mollinedo *et al.*, 1991; Borregaard *et al.*, 1993, Kumar *et al*., 2005).

Os neutrófilos desempenham papel fundamental no mecanismo de defesa do hospedeiro. Como citado anteriormente, são as primeiras células a migrarem para o foco inflamatório e as suas principais funções na inflamação são a fagocitose e a secreção de substâncias que atuam na degradação do agente lesivo (Ishibashi & Yamashita, 1982).

A fagocitose é um processo dinâmico desencadeado após a interação do substrato com o fagócito, essa interação é facilitada pela presença de opsoninas

(imunoglobulinas e fatores do complemento), as quais se ligam aos seus receptores específicos presentes na membrana desses fagócitos (Berger *et al.*, 1988; Neuman *et al.*, 1990). Dentre estes receptores estão, o Fcγ que reconhece o fragmento Fc da IgG, e os os receptores CR1 (*complement receptor 1*) e CR3, os quais interagem, respectivamente, com os fragmentos C3b e C3bi do complemento (Unkeless & Wrigt, 1988; Lee *et al.*, 2003).

O processo de fagocitose está associado à liberação de proteínas microbicidas contidas nos grânulos citoplasmáticos, bem como ao aumento do metabolismo oxidativo da célula, conhecido como *burst* respiratório, durante o qual são produzidas espécies reativas do oxigênio, também com potencial microbicida.

A geração de espécies reativas do oxigênio se inicia pela ativação da enzima NADPH oxidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*), presente na membrana plasmática e na membrana do fagossoma. A NADPH oxidase consiste de cinco componentes que são essenciais para a sua atividade, os quais estão distribuídos entre a membrana do fagossoma (flavocitocromo b558, p22+gp91) e o citoplasma da célula (p67, p40 e p47 e a GTPase Rac). Na presença de um estímulo, ocorre a fosforilação de p67, p40 e p47 e a ativação de Rac pela sua ligação a uma guanosina trifosfato (GTP); e a seguir, a translocação desses componentes para a membrana, o que leva a ativação da NADPH oxidase (DeLeo & Quinn, 1996; Babior *et al.*, 2001; Roos *et al.*, 2003). Essa enzima, por sua vez, catalisa a geração de ânion superóxido (O_2^-), pela transferência de um elétron para uma molécula de O_2. O ânion superóxido é convertido, pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual em altas concentrações apresenta atividade microbicida (Imlay & Linn, 1986). A maior parte do peróxido de hidrogênio reage com a mieloperoxidase, presente nos grânulos azurófilos, formando o complexo MPO-H_2O_2. Este complexo, por sua vez,

reage com os íons cloro formando o ácido hipocloroso (HOCl), principal espécie reativa do oxigênio produzida pelos neutrófilos (Klebanoff, 2005) **(Figura 2)**.

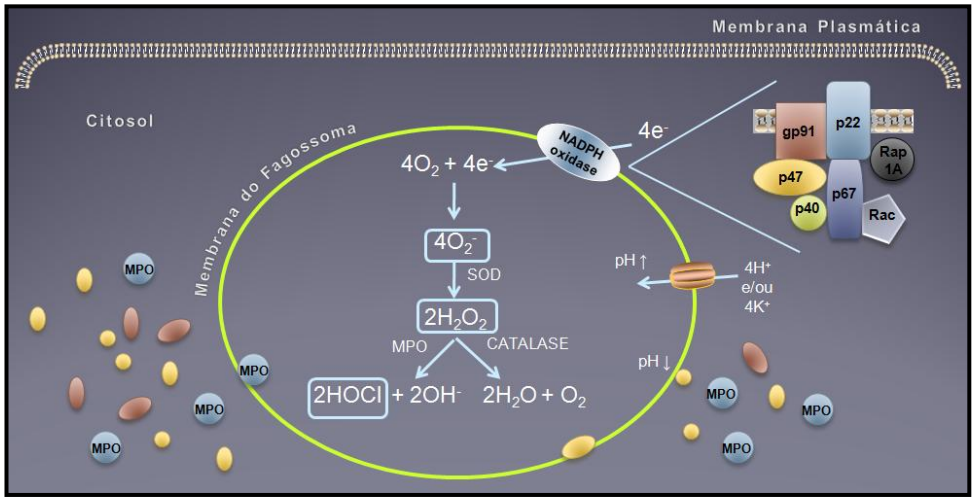

Figura 2. Ativação da enzima NAPH oxidase e consequente geração das espécies reativas do oxigênio por neutrófilos: ânion superóxido ($O2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl).

4. Vias de Sinalização Envolvidas nas Atividades Fagocítica e Microbicida de Neutrófilos

No processo de fagocitose, após a ligação da partícula ao seu receptor específico, para que a mesma seja englobada e o processo de fagocitose se complete, é necessária a reorganização do citoesqueleto da célula, com a polimerização localizada dos filamentos de actina. Alguns estudos comprovam esse fato pela utilização de drogas, como por exemplo, a citocalasina, que bloqueia a formação de F-actina (actina polimerizada) e inibe o processo de fagocitose (Zigmond & Hirsch, 1972; Axline & Reaven, 1974; Maniak *et al.*, 1995).

A dinâmica de polimerização dos filamentos de actina na célula é regulada por vias de sinalização intracelular desencadeadas após a ativação do receptor envolvido na

fagocitose (Groves *et al.*, 2008). Ao longo desta cascata de sinalização, ocorre a fosforilação de resíduos de tirosina, serina ou treonina de diversas proteínas, as quais são ativadas e passam a desempenhar suas funções como sinalizadoras ou efetoras do processo de reorganização do citoesqueleto (Walzog *et al.*, 1996; Kwiatkowska & Sobota, 1999). A proteína tirosina quinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) é um exemplo de proteína sinalizadora envolvida no processo de fagocitose por neutrófilos, mediado por receptores CR3 (Shi *et al.*, 2006) ou Fcγ (Rivas-Fuentes *et al.*, 2010).

Ainda, em relação às proteínas sinalizadoras, a literatura tem demonstrado o papel fundamental das pequenas GTPases da família Rho, tais como a Rho, a Rac e a Cdc42, na regulação da polimerização dos filamentos de actina (Tapon & Hall, 1997). Essas pequenas GTPases são ativadas quando se ligam a GTP, entretanto tornam-se inativas quando hidrolizam GTP em GDP (guanosina difosfato). A ativação das GTPases é regulada por três classes de proteínas: GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*) que promovem a troca de GDP por GTP; GAPs (*GTPases-activating proteins*) que aceleram a hidrólise de GTP em GDP e GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) que inibem a troca de GDP por GTP (Schmitz *et al.*, 2000; Fenteany & Glogauer, 2004).

As GTPases Rac e Cdc42 são essenciais para o processo de fagocitose mediado por receptores Fcγ (Massol *et al.*, 1998; Caron & Hall, 1998), enquanto que a GTPase Rho tem papel significante na fagocitose mediada por receptores CR3 (CD11b/CD218) (Caron & Hall, 1998; Le Cabec *et al.*, 2002; Chimini & Chavrier, 2000). Ainda, na fagocitose mediada por receptores CR3, é importante mencionar que a proteína tirosina quinase Syk pode ativar GEFs da família Vav, que por sua vez, são essenciais para a ativação de Rho e do complexo multifuncional organizador de actina Arp2/3 (May *et al.*, 2000; Gakidis *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2006) **(Figura 3)**.

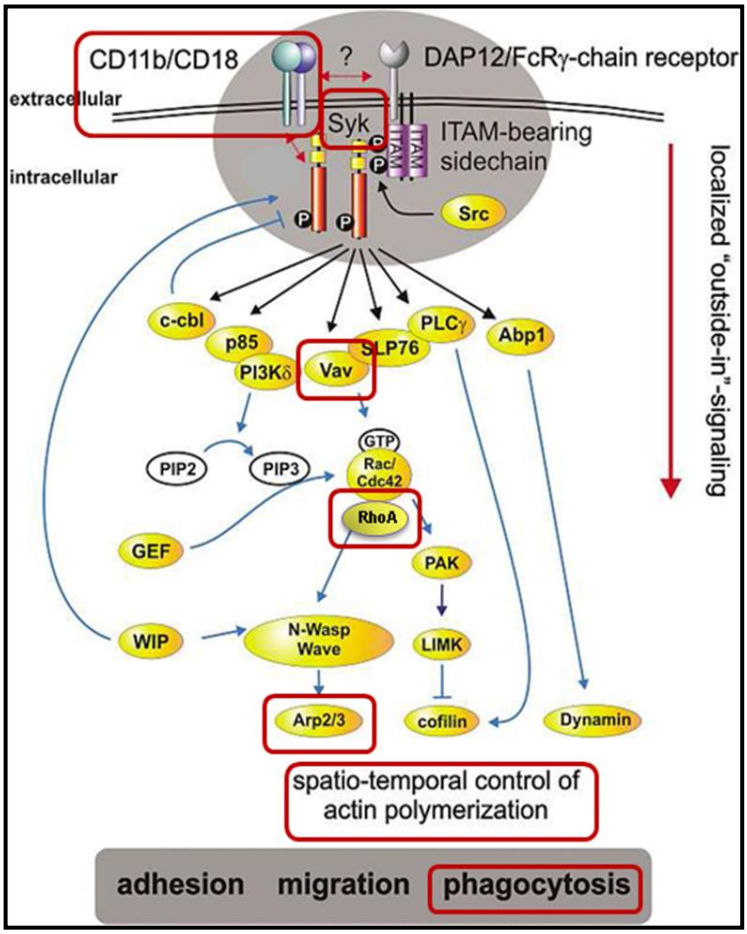

Figura 3. Sinalização intracelular envolvida da fagocitose mediada por receptores CR3 (CD11b/CD18). Após a interação do ligante (C3bi) ao receptor CR3, ocorre a ativação da proteína tirosina quinase Syk, seguida da ativação de Vav, RhoA e Arp 2/3 para a polimerização de actina e o englobamento da partícula. Fonte: Schymeinsky *et al.*, 2007, modificado.

Em relação à sinalização envolvida na atividade microbicida dos neutrófilos, a ativação da enzima NADPH oxidase depende da GTPase Rac2, independente do tipo de receptor pelo qual o processo de fagocitose se inicia (Kim & Dinauer, 2001; Werner, 2004). Além disso, Abdel-Latif e col. (2005) demonstraram o papel significante da Rac2 para a liberação de substâncias contidas nos grânulos primários de neutrófilos, tais como a elastase e a MPO. Adicionalmente, Koh e col. (2005), utilizando animais

knockout para Rac1, demonstraram a participação dessa proteína na atividade microbicida.

5. Veneno de *Crotalus durissus terrificus* e a Resposta Inflamatória

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) tem fraca atividade inflamatória e desencadeia, no local da inoculação, uma resposta inflamatória caracterizada por discreto acúmulo de leucócitos polimorfonucleares e edema de fraca intensidade, mediado principalmente por histamina (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996).

Além da baixa atividade flogística, foi demonstrado que o VCdt ou toxinas isoladas deste veneno são capazes de modular a resposta inflamatória. Assim, Landucci e colaboradores (1995) mostraram que a crotapotina, o componente A da crotoxina (CTX), inibe o edema de pata de ratos induzido por carragenina. Da mesma forma, em camundongos, a injeção de VCdt imediatamente após a administração intraperitoneal de tioglicolato, determina o decréscimo no número de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, além de causar a inibição, *in vitro* e *in vivo*, do espraiamento e da fagocitose por macrófagos peritoneais (Sousa-e-Silva *et al.*, 1996), células essenciais na resposta inflamatória.

Em continuidade a esse estudo, Sampaio *et al.*, (2001), avaliando o efeito do VCdt sobre o metabolismo de macrófagos peritoneais de ratos e a possível correlação entre as modificações deste metabolismo com as alterações funcionais destas células, demonstraram dualismo na ação deste veneno, uma vez que foi observada tanto estimulação do *burst* respiratório (geração de peróxido de oxigênio e óxido nítrico), da atividade fungicida e do metabolismo de glicose e glutamina, quanto a inibição do espraiamento e da atividade fagocítica dessas células. Além disso, foi demonstrado que a CTX, particularmente, a fosfolipase A_2, o componente B desta toxina, é a responsável

pela ação inibitória do VCdt sobre o processo de fagocitose por macrófagos (Sampaio *et al.*, 2003; 2005). Em relação a essa ação inibitória, Sampaio e col. (2006a) demonstraram que a mesma é modulada, por mediadores químicos gerados na via da lipoxigenase sendo decorrente da drástica diminuição da fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas sinalizadoras e da expressão de proteínas GTPases, RhoA e Rac (Sampaio *et al.*, 2006b).

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

Ainda, dentro dessa linha de investigação, considerando o papel fundamental dos neutrófilos na resposta inflamatória e a ausência de estudos que determinassem a ação do VCdt sobre essas células, Lima e col. (2007) mostram que, assim como observado para os macrófagos, o VCdt, *in vitro e in vivo,* inibe a fagocitose mediada por CR1/CR3, por neutrófilos obtidos no modelo de peritonite induzido pela carragenina em ratos. Nesse estudo foi observado também o efeito inibitório prolongado, uma vez que esse efeito permanece por 14 dias após a administração de uma única dose do VCdt (Lima *et al.*, 2007).

Apesar dessas evidências, ainda não foi investigado qual o componente do VCdt é responsável pela ação inibitória sobre a fagocitose por neutrófilos, bem como quais os possíveis mecanismos envolvidos nessa ação. Além disso, ainda não foi estudado e efeito do VCdt sobre a atividade microbicida e os produtos gerados pelo aumento do metabolismo oxidativo da célula, ações relevantes para o desenvolvimento e a resolução da resposta inflamatória.

Conclusão

IV. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que a CTX é o componente do VCdt responsável por inibir a fagocitose por neutrófilos, e que este efeito está relacionado ao decréscimo da fosforilação de proteínas sinalizadoras e a consequente diminuição da polimerização dos filamentos de actina nos fagossomas, o que impede a completa internalização da partícula. Por outro lado, os dados evidenciam que o VCdt e a CTX não alteram a atividade microbicida e a produção de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por neutrófilos.

Referências Bibliográficas

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, D.; STEWARS, M.; LACY, P. Neutrophil primary granule release and maximal superoxide generation depend on Rac2 in a common signaling pathway. *Can J Physiol Pharmacol*, v.83, n.1, p.69-75, 2005.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. The cytoskeleton. In: *Molecular biology of the cell*. United States of America, Garland Science, p.907-928, 2002.

ALLEN, L.A. Imunofluorescence and confocal microscopy of neutrophils. *Methods Mol Biol*, v.412, p.273-87, 2007.

AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; REZENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente (*Crotalus durissus*). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.33, n.4, p.251-255, 1991.

AMBRUSO, D.R.; KNALL, C.; ABELL, A.N.; PANEPINTO, J.; KURKCHUBASCHE, A.; THURMAN, G.; GONZALEZ-ALLER, C.; HIESTER, A.; DE BOER, M.; HARBECK, R.J.; OYER, R.; JOHNSON, G.L.; ROOS, D. Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc Nati Acad Sci USA*, v.97, n.9, p.4654-4659, 2000.

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

ARAÚJO, F.A.A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R.F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, J.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. *Acidentes peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Editora Sarvier, p.6-12, 2003.

AUGER, M.J.; ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: LEWIS, C.E.; MCGEE, J.O.D. *The natural immune system the macrophage*. Oxford, IRL press, p.3-74, 1992.

AXLINE, S.G.; REAVEN, E.P. Inhibition of phagocytosis and plasma

membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments. *J Cell Biol*, v.62, p.647-659, 1974.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S.E.; ROSSI, M.A.; LAURE, C.J. Myonecrosis myoglobinuria and acute renal failure indice by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon*, v.23, n.4, p.631-636 , 1985.

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

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E.; CUPO, P. ACIDENTE CROTÁLICO. IN: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, J.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR.,V. *Acidentes peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Editora Sarvier, p.91-98, 2003.

BABIOR, B.M.; LAMBETH, J.D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*,v.397, n.2, p.342-344, 2002.

BARRIO, A. Giroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta Physiol Latinoamericana*, v.11, p.24, 1961.

BERGER, M.; WETZLER, E.M.; WALLIS, R.S. Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increases complement receptor expression on mature human neutrophils. *Blood*, v.71, p.151, 1988.

BERTINO, J.R.; SILBER, R. Biochemistry and funtion of granulocytes. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES. *Hematology*, Blakiston, p.568-573, 1972.

BLAKE, G.J.; RIDKER, P.M. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Cir Res*, v.89, n.9, p.763-771, 2001.

BON, C.; CHANGEUX, J.P.; JENG, T.W.; FRANKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur J Biochem*, v.99, n.3, p.471-481, 1979.

BONNAS, C.; VACHIER, I.; CHAVIS, C; GODARD, P.; BOUSQUET, J.; CHANEZ, P. Lipoxins are potential endogenous anti-inflammatory mediators in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, v.165, p.1531-1535, 2002.

BORREGAARD, N.; LOLLIKE, K.; KJELDSEN, L.; SENGELOV, H.; BASTHOLM, L.; NIELSEN, M.H.; BAINTON, D.F. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol*, v.51, n.4, p.187-198, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v.72, p.248-54, 1976.

BRADLEY, T.R.; METCALF, D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Biol Med Sci*, v.44, n.3, p.287-299, 1966.

CAMPANELLI, D.; MELCHIOR, M.; FU, Y.; NAKATA, M.; SHUMAN, H.; NATHAN, C.; GABAY, J.E. Clonig of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic and autoantigen from human neutrophils. *J Exp Med*, v.172, p.1709-1715, 1990.

CAMPBELL, J.M.; CAMPBELL, J. Absorbância e sua relação com a absorção molar. In: CAMPBELL, J. *Matemática de Laboratório – Aplicações Médicas e Biológicas*. Editora Roca, 3ª edição, p.148-9, 1986.

CARMAN, C.V.; SPRINGER, T.A. A transmigratory cup in leukocyte both through individual vascular endotelial cells and between them. *J Cell Biol*, v.167, n.2, p.377-388, 2004.

CARON, E.; HALL, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, v. 282, n.5394, p.1717-1721, 1998.

CHIMINI, G.; CHAVRIER, O. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol*, v.2, n.10, p.191-196, 2000.

CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; DÉLOT, E.; FAURE, G.; SALIOU, B.; BON, C. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimeric neurotoxic phospholipase A_2 from the venom of a South-American rattlesnake. *Adv Exp Med Biol*, v.391, p.197-202, 1996.

CORAZZINI, R. Avaliação morfofisiológica de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos ao choque elétrico. 156p. Tese de mestrado em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1993.

CROWLEY, S.R. The pathogenesis of septic chock. *Heart Lung*, v.25, p.124-136, 1996.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.E. Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Trans R Soc Trop.Med Hyg*, v.82, n.6, p.924-929, 1988.

DAHER, K.A.; SELSTED, M.E.; LEHER, R.I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol*, v.60, p.1068-1074, 1986.

DE LEO, F.R.; QUINN, M.T. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leokoc Biol*, v.60, n.6, 1996.

DHARMAWARDHANE, S.; BROWNSON, D.; LENNARTZ, M.; BOKOCH, G.M. Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pseudopodia, membrane ruffles, and phagocytic cups in activated human neutrophils. *J Leukoc Biol*, v.66, n.3, p.521-527, 1999.

DYPBUKT, J.M.; BISHOP, C.; BROOKS, W.M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A.J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med*, v.39, p.1468-77, 2005.

ENGELHARDT, B.; WOLBURG, H. Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*, v.34, n.11, p.2955-2963, 2004.

ERNST, J.D. Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell Microbiol*, v.2, n.5, p.379-386, 2000.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, v.5, n.14, p.1317-1327, 2003.

FENTEANY, G.; GLOGAUER, M. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol*,v.11, n.1, p.15-24, 2004.

FERREIRA, S.H.; NG, K.K.; VANE, J.R. The continuous bioassay of the release and disappearance of histamine in the circulation. *Br J Pharmacol*, v.49, n.3, p.543-553, 1973.

FORSBERG, M.; DRUID, P.; ZHENG, L.; STENDAHL, O.; SÄRNDAHL, E. Activation of Rac2 and Cdc42 on Fc and complement receptor ligation in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, v.74, p.611-619, 2003.

FRAENKEL-CONRAT, H.; SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. *Arch Biochem Biophys*, v.60, n.1, 1956.

GAKIDIS, M.A.; CULLERE, X.; OLSON, T.; WILSBACHER, J.L.; ZHANG, B.; MOORES, S.L.; LEY, K.; SWAT, W.; MAYADAS, T.; BRUGGE, J.S. Vav GEFs are required for beta2 integrin-dependent functions of neutrophils. *J Cell Biol*, v.166, n.2, p.273-282, 2004.

GANZ, T.; SELSTED, M.E.; SZKLAREK, D.; HARWIG, S.S.; DAHER, K.; BAINTON, D.F.; LEHER, R.I. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest*, v.76, p.1427-1435, 1985.

GILL, C.D.; COOPER, D.; ROSIGNOLI, M.; PERRETTI, M.; OLIANI, S.M. Inflammation-induced modulation of cellular galectin-1 and –3 expression in a model of rat peritonitis. *Inflammation Research*, v.55, n.3, p.99-107, 2006.

GODSON, C.; MITCHELL, S.; HARVEY, K.; PETASIS, N.; HOGG, N.; BRADY, H. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*, v.164, n.4, p.1663-1667, 2000.

GOMES, R.T.; CAMARGO, R.P.F.; VIOTTI, A.P.; TAVARES, A.P.; REVELO, M.P.; FREITAS, T.V. Comparison of the biodistribution of free or liposome-entrapped *Crotalus durissus terrificus* (South Amarican rattlesnake) venom in mice. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v.131, n.3, p.295-301, 2002.

GOPALAKRISHNAKONE, P.; DEMPSSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J.; ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A_2. *Toxicon*, v.22, n.1, p.85-98, 1984.

GROVES, E.; DART, A.E.; COVARELLI, V.; CARON, E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci*, v.65, p.1957-1976, 2008.

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

HAWGOOD, B.J.; SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitter induced by the crotoxin complex and this component phospholipase A2 at the frog neuromuscular junction. *Neuroscience*, v.4, n.2, p.293-303, 1979.

IMLAY, J.A.; LINN, S. Bimodal parttern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown Escherichia coli by hydrogen peroxide. *J Bacteriol*, v.166, n.2, p.519-527, 1986.

IOVINE, N.M.; ELSBACH, P.; WEISS, J. An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeabilitty-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.94, p.10973-10978, 1997.

ISHIBASHI, Y.; YAMASHITA, T. Effects of a phagocytosis-stimulating factor derived from polymorphonuclear neutrophils on the functions of macrophages. *Infect Immum*, v.55, n.8, p.1762-1766, 1982.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. The immune system in trealth and disease. In: *Immunobiology*. New York, Ed. Current Biology, Garland Publishing, p.12-16, 1994.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus*). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, v.34, n.4, p.374-354, 1992.

KIM, C.; DINAUER, M.C. Rac2 is essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol*, v.166, n.2, p.1223-1232, 2001.

KIM, J.S.; DIEBOLDS, B.A.; KIM, J.I.; KIM, J.; LEE, J.Y. Rho is involved in superoxide formation during phagocytosis of opsonized zymosans. *J Biol Chem*, v.279, n.20, p.21589-21597, 2004.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, v.77, n.5, p.598-625, 2005.

KOBAYASHI, S.D.; VOYICH, Y.M.; DELEO, F.R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect*, v.5, n.14, p.1337-1344, 2003.

KOH,, A.L.Y.; SUN, C.X.; ZHU, F.; GLOGAUER, M. The role of Rac1 and Rac2 in bacterial killing. *Cell Immunol*, v.235, n.2, p.92-97, 2005.

KÖLSCH, V.; CHAREST, P.G., FIRTEL, R.A. The regulation of cell mobility and chemotaxis by phospholipid signaling. *J Cell Sci*, v.121, p.551-559, 2008.

KOWAL-VERN, A.; WLANGA, J.M.; SHAPR-PUCCI, M.; HOPPENSTEADT, D.; GAMELLI, R.L. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endothelial-1, and C1 esterase inhibitor. *J. Burn Care Rehabil*, v.18, n.2, p.99-103, 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: *Robbins & Cotran – Patologia*. São Paulo, Editora Elsevier, 7ª edição, p.49-89, 2005.

KWIATKOWSKA, K.; SOBOTA, A. Signaling pathways in phagocytosis. *Bioessays*, v.21, n.5, p.422-431, 1999.

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

LASZLO, J.; RUNDLES, R.W. Morphology of granulocytes. In: WILLIAMS, W.J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A.J.; RUNDLES. *Hematology*, Blakiston, p.560-567, 1972.

LE CABEC, V.; CARRÉNO, S.; MOISAND, A.; BORDIER, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I anda type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *J Immunol*, v.169, n.4, p.2003-2009, 2002.

LEE, W.L.; HARRISON, R.E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infection*, v.5, n.14, p.1299-1306, 2003.

LEHER, R.I.; GANZ, T.; SLKLAREK, D.; SELSTED, M.E. Modulation of the *in vitro* candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest*, v.81, p.1829-1835, 1988.

LEVY, B.D.; ROMAN, M.; CHAPMAN, H.A.; RELLY, J.J.; DRAZEN, J.; SERHAN, C.N. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest*, v.92, n.3, p.1572-1579, 1993.

LEWIS, R.A.; AUSTEN, K.F. Leucotrienes and other products of the 5-lipoxigenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med*, v.323, o.645-655, 1990.

LIMA, T.S.; NUNES, F.P.; SAMPAIO, S.C.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C. Efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a fagocitose por neutrófilos no modelo

de peritonite. In: *39° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, Ribeirão Preto, 2007.

MADERNA, P.; GODSON, C. Lipoxins: resolutionary road. *Br J Pharmacol*, v.158, n.4, p.947-959, 2009.

MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F., REZENDE, N.A.; AMARAL, C.F.S. Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev Inst Méd Trop São Paulo*, v.28, n.4, p.228-233, 1986.

MAJNO, G.; JORIS, I. Inflammation: The actors and their language. In: *Cells, tissues and disease*. Principles of general pathology. New York, Oxford University Press, p.307-382, 2004.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N. England J Med*, v.317, n. 11, p.687-694, 1987.

MANIAK, M.; RAUCHENBERGER, R.; ALBRECHT, R.; MURPHY, J.; GERISCH, G. Coronin involved in phagocytosis: Dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell*, v.83, p.915-924, 1995.

MASSOL, P.; MONTCOURRIERP.; GUILLEMONT, J.C.; CHAVRIER, P. Fc-receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1. *Embo J*, v.17, n.21, p.6219-6229, 1998.

MAY, R.C.; CARON, E.; HALL, A.; MACHESKY, L.M. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. *Nat Cell Biol*, v.2, n.4, 2000.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, J.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR., V. *Acidentes peçonhentos no Brasil – biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Editora Sarvier, p.33-61, 2003.

METCALF, D. Haematopoietic growth factors 1. *Lancet*, v.1, n.8642, p.825-827, 1989.

MINAKAMI, R.; MAEHARA, Y.; KAMAKURA, S.; KUMANO, O.; MIYANO, K.; SUMIMOTO, H. Membrane phospholipid metabolism during phagocytosis in human neutrophils. *Genes Cells*, v.15, n.5, 409-424, 2010.

MOLLINEDO, F.; GAJATE, C.; SCHNEIDER, D.L. Cytochrome b co-fractionates with gelatinase-containg granules in human neutrophils. *Mol Cell Biochem*, v.105, n.1, p.49-60, 1991.

MOURA-GONÇALVES, J.; VIEIRA, A. Estudo sobre veneno de serpentes brasileiras. I. Análise Eletroforética. *An Acad Bras Cienci*, v.22, p.141-150, 1950.

NAHAS, L.; MACFARLANE, R.G.; DENSON, K.W. A study of the coagulant action of eight snake venons. *Thromb Diath Haemorrh*, v.12, p.355-367, 1964.

NEUMAN, E.; HULEATT, J.W.; JACK, R.M. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor increased synthesis and expression of CR1 and CR3 by human peripheral blood neutrophils. *J Immunol*, v.145, n.10, p.3325-3332, 1990.

NIGGLI, V. Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, v.35, n.12, p.1619-1638, 2003.

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

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

PICK, E., KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*, v.38, n.1-2, p.161-70, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using na automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*, v.46, n.2, p.211-26, 1981.

OWNBY, L.C.; CAMERON, D.; TU, A.T. Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Am J Pathol*, v.85, n.1, p.149-166, 1976.

PRADO-FRANCESCHI, J.; BRAZIL, O.V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South Amerizan rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, v.19, n.6, p.875-887, 1981.

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

RANKIN, J. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, v.15, n.1, 3-17, 2004.

RIVAS-FUENTES, S.; GARCÍA-GARCÍA, E.; NIETO-CASTANEDA, G.; ROSALES, C. Fcgamma receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. *Cell Immunol*, v.263, n.1, p.114-121, 2010.

ROCHA e SILVA, M.; GARCIA-LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. Oxford: Pergamon Press, p.1-47, 1972.

ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect*,v.5, n.14, p.1307-1315, 2003.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. *Mem Inst Butantan*, v.20, p.315-28, 1947.

ROSENFELD, G. Symptomathology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: BÜRCHEL, W; BUCKLEY, E. *Venomous animals and their venoms*. New York, Academic Press, p.345-384, 1971.

RYAN, A.; GODSON, C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol*, v.10, n.2, p.166-172, 2010.

SAMPAIO, S.C.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; BORELLI, P., CURI, R., CURY,

Y. *Crotalus durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. *J Leukoc Biol*, v.70, n.4, p.551-58, 2001.

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*, v.41, n.7, p.899-07, 2003.

SAMPAIO, S.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES C.M.; CURI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A_2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon*, v.45, p.671-676, 2005.

SAMPAIO, S.C; ALBA-LOUREIRO, T.C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R.G.; DOS SANTOS, E.C.; CURI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon*, v.47, n.3, p.313-321, 2006a.

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, 2006b.

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-neurotoxin. *Toxicon*, v.55, p.1045-1060, 2010.

SANO-MARTINS, I.S.; TOMY, S.C.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M.B.; DE CASTRO, S.C.B.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; AMARAL, C.F.S.; REZENDE, M.A.; KAMIGUTI, A.S.; WARRELL, D.A.; THEAKSTON, R.D.G. Coagulopathy following lethal and non-lethal envenoming of humans by the South American rattlesnake in Brazil. *Q J M*, v.94, n.10, p.551-559, 2001.

SCHMITZ, A.A.P.; GOVEK, E.E.; BÖTTNER, B.; VAN AELST, L. Rho GTPases: Signaling, Migration and Invasion. *Exp Cell Res*,v.261, n.1, p.1-12, 2000.

SCHYMEINSKY, J.; MÓCSAI, A.; WALZOG, B. Neutrophil activation via β_2 integrins (CD11/CD18): Molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost*, v.98, p.262-273, 2007.

SERHAN, C.N. SHEPPARD, K.A. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A_4 by platelet 12-lipoxigenase in vitro. *J Clinc Invest*, v.85, n.3, p.772-780, 1990.

SHI, Y.; TOHYAMA, Y.; KADONO, T.; HE, J.; MIAH, S.M.S.; HAZAMA, R.; TANAKA, C. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood*, v.107, n.11, p.4554-4562, 2006.

SILVA, M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J. Leukoc Biol*, v.87, n.1, 2010.

SIMON, S.I.; GREEN, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*, v.7, p.151-185, 2005.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Ministério da Saúde. www.saude.gov.br/sinanweb/. Acesso em novembro de 2010, dados de 2008.

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

SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; TOMY, S.C.; TAVARES, F.L.; NAVAJAS, L.C.; LARSSON, M.H.M.A.; LUCAS, S.R.R.; KOGIKA, M.M.; SANO-MARTINS, I. S. Hematological, hemostatic and clinical chemistry disturbances induced by *Crotalus durissus terrificus* snake venom in dogs. *Hum Exp Toxicol*, v.22, n.9, p.491-500, 2003.

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

SPRINGER, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol*, v.57, p.827-872, 1995.

TAPON, N.; HALL, A. Rho, Rac and Ccd42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, v.9, n.1, p.86-92, 1997.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res*, v.88, p.877-887, 2001.

UNKELESS, J.C.; WRIGHT, S.D. Phagocytic cells: Fcy and complement receptors. In: GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* New York, Raven Press, p.343, 1988.

VANE, J.R. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*., v.343, n.1304, p.225-246, 1994.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; VOELKER, F.A. Pathway on onset, development and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Fred Proc*, v.41, n.9, p.2588-2595, 1982.

VITAL-BRAZIL, O.; EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J Physiol*, v.212, n.2, p.34-35, 1971.

VITAL-BRAZIL, O. Neurotoxins from South American rattlesnake. *J Formosan Med Assoc*, v.71, p.394-396, 1972.

WALZOG, B.; OFFERMANNS, S.; ZAKRZEWICS, A.; GAEHTGENS, P.; LEY, K. β2 integrins mediate protein tyrosine phosphorilation in human neutrophils. *J Leokoc Biol*, v.59, n.5, p.747-753, 1996.

WERNER, E. GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci*, v.117, p.143-153, 2004.

WINTERBOURN, C.C.; Hampton, B.M.; Livesey, H.J.; Kettle, J.A.. Modeling the Reactions of Superoxide and Myeloperoxidase in the Neutrophil Phagosome. *J Biol Chem*, v.281, n.52, p.39860-39869, 2006.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH. J.G. Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leucocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. *Exp Cell Res*, v.73, p.383-393, 1972.