

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

LUCIANA DE ARAÚJO PIMENTA

**INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE RECONHECIMENTO MOLECULAR DA
CROTOXINA EM MACRÓFAGOS: AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO TOXINA-
BICAMADA E RECEPTORES PEPTÍDEO FORMIL**

São Paulo
2021

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

São Paulo
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Araujo Pimenta, Luciana
Investigação do processo de reconhecimento
molecular da crotoxina em macrófagos: avaliação da
interação toxina-bicamada e receptores peptídeo
formil / Luciana de Araujo Pimenta; orientador
Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni; coorientador Kerly
Fernandes Mesquita Pasqualoto. -- São Paulo, 2021.
132 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Crotoxina. 2. Macrófagos. 3. Receptores
Peptídeo Formil. 4. Imunomodulação. 5. Estudo Termo-
Estrutural. I. Coccuzzo Sampaio Vessoni, Sandra,
orientador. II. Fernandes Mesquita Pasqualoto,
Kerly, coorientador. III. Título.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana de Araújo Pimenta

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

Orientador (a): Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **823/2016** referente ao projeto intitulado: "*Investigação do processo de reconhecimento molecular da Crotoxina em macrófagos: Avaliação da interação toxina-bicamada e receptores peptídeo formil*" sob a responsabilidade de *Luciana de Araújo Pimenta* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni*, do Departamento de Farmacologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 17 de agosto de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

Dedico não só meu doutorado, mas todas as etapas dos meus estudos aos meus pais Marly Almeida e Victor Pimenta, que me incentivaram, me ensinaram a nunca desistir e me deram uma quantidade de amor e carinho que jamais técnica nenhuma do mundo conseguiria mensurar. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me orientou para eu conseguir finalizar mais uma etapa na minha vida.

Aos meus pais Victor Pimenta de Almeida e Marly Evangelista de Almeida, não há teses, dissertações, livros e palavras no mundo que bastam para expressar a gratidão que sinto por vocês. Obrigada por acreditarem em mim quando eu mesma não acreditei, por me darem amor e carinho todos os dias da minha vida. Vocês, Simba e Logan são minha Ohana que tanto amo: “Ohana quer dizer família. Família quer dizer nunca abandonar ou esquecer.”.

Ao meu noivo e futuro marido Lucas dos Santos Vieira por tanta paciência e amor dedicados a mim. Citando Antoine de Saint-Exupéry, “Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativa. [...] Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante...”, você dedicou tempo ao nosso amor, e ele só cresce a cada dia que passa. Eu te amo muito.

À minha orientadora Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni que vem fazendo parte da minha vida por tantos anos. Desde 2012 a escalada começou pela iniciação científica, passando pelo mestrado e finalizando (até o momento) no doutorado. No ano de 2020, você me proporcionou outra escada e cá estou eu, subindo os degraus da vida profissional. Serei eternamente grata e nunca esquecerei da paixão pela ciência.

À minha co-orientadora Kerly Fernandes Mesquita Pasqualoto cuja disciplina de Modelagem Molecular, tão temida, me fez abrir os olhos para uma área totalmente nova e que me apaixonei desde então. E aqui menciono que passei com louvor, com A.

Aos colaboradores Dra. Maria Teresa Lamy Moura, por abrir as portas de seu laboratório para nós, por me orientar em todos os ensaios físicos e ao Dr. Evandro Luiz Duarte que além de também orientar e me ensinou desde o começo com toda a paciência do mundo todas as técnicas físicas e conceitos de vesículas lipídicas, e por acreditar na potência de 0,1% da minha toxina.

Ao colaborador Dr. Marcos Roberto Mattos Fontes que me auxiliou nos conceitos da estrutura da crotoxina.

À professora Ana Cláudia Sobral pelo ensinamento da técnica de marcação da toxina e pelas conversas sobre a pesquisa e cromatografias.

À Dra. Eliana Faquim por ceder gentilmente o aparelho AKTA para purificação da toxina e à mestra Bianca de Carvalho Lins Fernandes Távora pelos auxílios na purificação e nos géis da toxina.

À minha amiga Ana Tereza Sachetto por me ajudar tantas vezes na vida de laboratório, mas acima de tudo por me ajudar fora dele. Foram tantos cafés na Kopenhagen, tantas pérolas, tantos choros, raivas, risadas. Algumas citações ficarão em nossas lembranças para sempre como: “the ceiling is falling”, ou ainda “pelo menos nós corroboramos nossos dados”. Obrigada por sua amizade.

Ao técnico de Microscopia Confocal, Alexsander Seixas de Souza, pela paciência no microscópio confocal, pelas risadas sobre o mundo dos quadrinhos e pela confiança nas técnicas de fluorescência

Ao meu grupo de pesquisa CROMIRG, Camila Neves, Patrícia Traldi, Ellen Kato e Luiz Aurélio Crispin pelo companheirismo e ajuda nos ensaios.

À todos do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan que fizeram parte da minha vida por tantos anos.

À pós graduação do Instituto de Ciências Biomédicas e todos os envolvidos

Às secretárias do Departamento de Farmacologia do ICB, Mônica Nunes e Camila Trindade, e à secretária do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, Neusa Picon por todo apoio técnico, pelo auxílio e pela disposição em sempre ajudar.

Ao apoio financeiro CNPq (301685/2017-7) e FAPESP (Auxílio 2017/11161-6) e bolsa CNPq 158259/2018-1.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, fica o meu MUITO OBRIGADA!

“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and, above all, confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something, and that this thing, at whatever cost, must be attained.”- Marie Curie

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 imunofluorescências 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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura cristalográfica do complexo heterodimérico não-covalente da Crotoxina isolada do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (isoforma CA ₂ CB _b)	21
Figura 2: Modelo de complexo de crotoxina na interface lipídio / água	24
Figura 3: Morfologia de Macrófagos.	26
Figura 4: Esquema demonstrando a transição de fase gel (ordenada) para fase fluida (desordenada)	29
Figura 5: Espectros de ressonância de spin eletrônico (ESR)	30
Figura 6: Diagrama esquemático do FPR	32
Figura 7: Desenho esquemático da técnica de silenciamento pelo método de nucleofecção	39
Figura 8: Estrutura química dos lipídios e marcadores de spin utilizados.	44
Figura 9: Diferenciação de células THP-1 com agente indutor éster de acetato forbol miristato (PMA)	50
Figura 10: Visualização da CTX marcada com FITC em macrófagos peritoneais de ratos após 1 minuto, 2 e 24 horas de incubação	52
Figura 11: Visualização da CTX marcada com FITC células THP-1 após 1 min, 2 e 24 hrs de incubação.....	54
Figura 12: Visualização da CTX marcada com FITC células THP-1 após 1 min, 2 e 24 hrs de incubação após incubação prévia com Boc-2, antagonista seletivo de FPR	55
Figura 13: Visualização da CTX marcada com FITC em células THP-1 após 2 hrs de incubação em planos ortogonais.....	56
Figura 14: Expressão de receptores FPR em células THP-1 (monócitos)	58
Figura 15: Expressão de receptores FPR em células THP-1 (diferenciadas em macrófagos)	59
Figura 16: Efeito da CTX em produção de H ₂ O ₂ em células THP-1 em situações basais e estimuladas com PMA	61
Figura 17: Efeito da CTX em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e silenciadas sobre a atividade de espraiamento	63

Figura 18: Efeito da CTX em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e silenciadas sobre a atividade fagocítica	65
Figura 19: Efeito da CTX na expressão e ativação de receptores peptídeo formil	67
Figura 20: Participação dos receptores peptídeo formil na entrada da toxina marcada em células THP-1 não diferenciadas	69
Figura 21: Participação dos receptores peptídeo formil na entrada da toxina marcada em células THP-1 diferenciadas	70
Figura 22: Participação dos receptores peptídeo formil na entrada da toxina marcada em células THP-1 diferenciadas e incubadas com BOC-2	71
Figura 23: Perfis de capacidade de calor (ΔC_p) de DPPC, DPPG e DPPS, na ausência ou presença de CTX	73
Figura 24: Cinética de vazamento de CF através de LUVs compostos de diferentes lipídios nas fases gel e fluida na ausência ou presença de CTX	76
Figura 25: Perfis dos espectros de EPR do marcador de spin 5-PCSL incorporado em bicamadas lipídicas de: DPPC, DPPG e DPPS nas fases gel (20 °C) e fluida (60 °C) na ausência e presença de CTX.....	78
Figura 26: Espectros de EPR das amostras de DPPC, DPPS e DPPG na ausência e presença da crotoxina, monitoradas na região próxima a cabeça polar pelo marcador de spin, 5-PCSL, em função da temperatura	79
Figura 27: Perfis dos espectros de EPR do marcador de spin 16-PCSL incorporado em bicamadas lipídicas de: DPPC, DPPG e DPPS nas fases gel (20 °C) e fluida (60 °C) na ausência e presença de CTX.....	83
Figura 28: Espectros de EPR das amostras de DPPC, DPPS e DPPG na ausência e presença da crotoxina, monitoradas na região do centro da bicamada pelo marcador de spin, 16-PCSL / temperatura.....	84
Figura 29: Parâmetros empíricos hiperfinos obtidos dos diferentes marcadores e lipídios na ausência e presença de CTX.....	88
Figura 30: Representação hipotética da interação CTX e membrana de macrófagos.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros térmicos calculados para a técnica de DSC	74
Tabela 2: Fármacos similares à cadeia α da subunidade CA	92
Tabela 3: Fármacos similares à cadeia β da subunidade CA	93
Tabela 4: Fármacos similares à cadeia γ da subunidade CA.....	94
Tabela 5: Fármacos similares à subunidade CB.....	95
Tabela 6: Similaridade de receptores entre FPR e FPR1	97

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Crotoxina e suas atividades biológicas	18
1.2 Crotoxina, características bioquímicas e estruturais – Estado da Arte	21
1.3 Macrófagos	24
1.4 Características da membrana celular e sua importância na interação fármaco-membrana	27
1.5 Receptores peptídeo formil	31
2 OBJETIVO	35
2.1 Estratégia experimental do projeto de pesquisa	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Estudo biológico	37
3.1.1 Obtenção da CTX.....	37
3.1.1.1 Purificação da CTX.....	37
3.1.1.2 Análise Eletroforética em SDS-PAGE para comprovação da pureza da CTX.....	37
3.1.2 Culturas celulares	38
3.1.2.1 Linhagem de monócitos humanos THP-1 (<i>Human acute monocytic leukemia cell line</i>)	38
3.1.2.2 Diferenciação da THP-1 em macrófagos.....	38
3.1.2.3 Macrófagos peritoneais de ratos.....	38
3.1.3 Silenciamento das células THP-1 para receptor peptídeo formil	39
3.1.4 Ensaio de marcação da toxina	40
3.1.5 Incubação com Boc-2, antagonista de receptor para peptídeo formil	40
3.1.6 Ensaio de imunocitoquímica das células incubadas com CTX marcada.....	40
3.1.7 Avaliação das funções dos MØFPRs+/+ e MØFPRs-/-	41
3.1.7.1 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos	41
3.1.7.2 Espriamento dos macrófagos	41
3.1.7.3 Fagocitose dos macrófagos.....	42
3.1.8 Expressão dos Receptores Peptídeo Formil e Ativação	42
3.1.9 Análise estatística.....	43
3.2 Estudo termo-estrutural	43
3.2.1 Preparação das dispersões lipídicas.....	43
3.2.2 Tratamento das vesículas lipídicas com CTX	44
3.2.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	45
3.2.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	45
3.2.5 Ensaio de vazamento.....	46

3.3 Estudo <i>in silico</i>	47
4 RESULTADOS	49
4.1 Diferenciação das células TPH-1	49
4.2 Visualização da CTX marcada com FITC em macrófagos peritoneais de ratos em diferentes tempos.....	51
4.3 Visualização da CTX marcada com FITC em células THP-1 após 1 minuto, 2 e 24 horas de incubação	53
4.4 Silenciamento do receptor FPR1 em THP-1 diferenciadas ou não.....	57
4.5 Efeito da CTX sobre a liberação de H ₂ O ₂ , por células THP-1 silenciadas para receptores peptídeo formil	60
4.6 Efeito da CTX sobre o espriamento de células THP-1 diferenciadas em macrófagos silenciadas para receptores peptídeo formil	62
4.7 Efeito da CTX sobre a fagocitose de células THP-1 silenciadas para receptores peptídeo formil	64
4.8 Expressão e Ativação do Receptor de Peptídeo Formil	66
4.9 Avaliação da permeabilidade à membrana - Marcação fluorescente da crotoxina	68
4.10 Comportamento térmico (DSC) de diferentes lipídios na presença ou ausência de CTX	72
4.11 Avaliação da permeabilidade da membrana em diferentes lipídios na presença ou na ausência de CTX.....	75
4.12 Avaliação das interações lipídio/proteína – marcadores de spin próximos à superfície da bicamada (5-PCSL).....	77
4.13 Avaliação das interações lipídio/proteína – marcadores de spin próximos ao centro da bicamada (16-PCSL).....	82
4.14 Análise dos diferentes parâmetros empíricos hiperfinos obtidos dos diferentes marcadores e lipídios na ausência e presença de CTX	87
4.15 Análise de banco de dados <i>DrugBank</i> e TTD.....	91
5 DISCUSSÃO	98
6 CONCLUSÃO	108
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
REFERÊNCIAS	110

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, 1933¹, *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

¹ *MONAELESSER; TAGUE. *Trailement des algies et des tumeurs, par el venin de cobra*. **Bull. De l'Acad. De Médecine**, 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 neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes, induzindo paralisias musculares, insuficiência respiratória, mioglobulinúria 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 crotóxina, crotamina, convulxina, giroxina (ALEXANDER et al., 1988) e recentemente a intercrocina (IC), uma nova toxina isolada do veneno (VIEIRA et al., 2013). A elevada toxicidade do veneno é atribuída à crotóxina (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 Crotóxina 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 anti-inflamatórios 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 espriamento 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-1 β 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 co-cultura 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).

Em conjunto, esses estudos demonstram a importância da ação imunomoduladora da CTX para o controle de diferentes processos fisiopatológicos. É importante mencionar que em linhagem monocítica humana (THP-1) foi observada a ação estimulatória da CTX sobre o metabolismo energético (DE-OLIVEIRA et al., 2018), além da ação moduladora sobre a secreção de mediadores angiogênicos, levando a redução expressiva da formação de novos vasos em microambiente tumoral (DE ARAÚJO PIMENTA et al., 2019). Esses fatos evidenciam o potencial translacional desses estudos. Paralelamente, em todos esses modelos, ao usar, em concentrações na ordem de micromolar, antagonistas da família de receptores peptídeo formil, como Boc-1 e Boc-2 (Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe), as ações da CTX sobre o metabolismo de macrófagos são parcialmente ou totalmente bloqueadas evidenciando a importância desses receptores, que serão melhor descritos posteriormente, para o efeito da toxina (COSTA et al., 2013; BRIGATTE et al., 2016; DE-OLIVEIRA et al., 2018; FREITAS et al., 2018; DE ARAÚJO PIMENTA et al., 2019).

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.

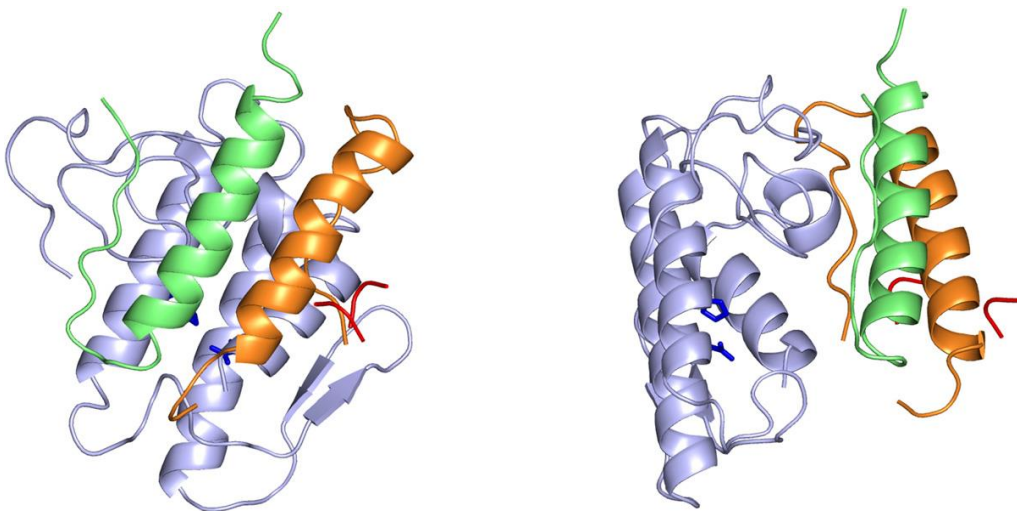


Figura 1. Estrutura cristalográfica do complexo heterodimérico não-covalente da Crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (isoforma CA₂CB_b). Diagrama mostra a estrutura global do complexo CA₂CB_b. A subunidade CB_b básica (azul) é mostrada na orientação frente-face canônica do grupo 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 (CB_b, CB_c, CB_d e as isoformas de CA), cuja principal característica é sua alta toxicidade, mas é enzimaticamente menos ativa, e classe II (CB_{a2} 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.

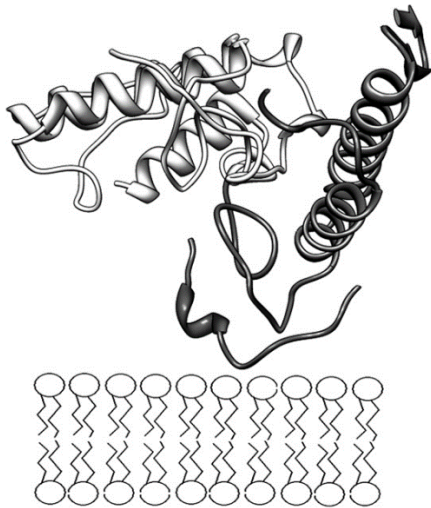


Figura 2. Modelo de complexo de crotoxina na interface lipídio / água. CB e CA são brancos e cinza, respectivamente. Neste modelo proposto, é interessante notar que CA impede a ativação interfacial do CB. Imagem adaptada de (PEREAÑEZ; GÓMEZ; PATIÑO, 2012)

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 surface-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), $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 ($v\text{D}3$) 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 espriamento 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*, espriam-se rapidamente quando entram em contato com superfície de vidro (**Figura 3**) e na presença de certos agentes indutores de espriamento (Mg^{++} , adenosina e algumas proteases) (RABINOVITCH; DESTEFANO, 1973).

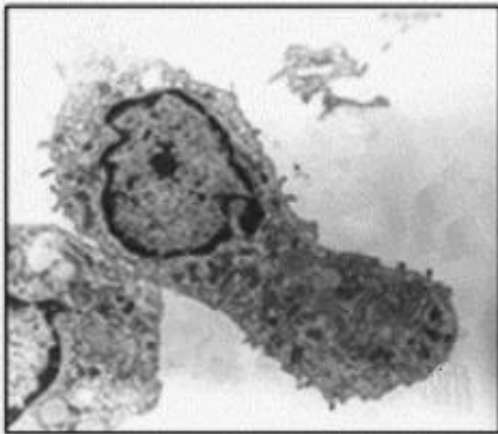


Figura 3. Morfologia de Macrófagos. Morfologia de macrófagos peritoneais de ratos espriados em lâminulas de vidro no período de 2 horas de ensaio. Imagem adaptada de (SAMPAIO et al., 2003).

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 pseudópodes, que se estendem ao redor das partículas, formando os fagossomos e macropinosomos (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; BOSCAÍ 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 fármaco-membrana

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 glicerofosfolípidos 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 Felipe 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**.

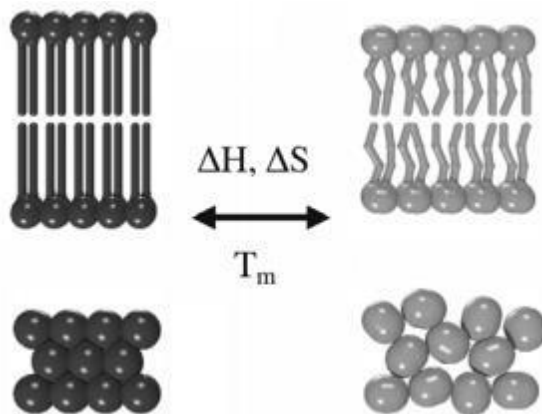


Figura 4. Esquema demonstrando a transição de fase gel (ordenada) para fase fluida (desordenada) (HEIMBURG, 2007).

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).

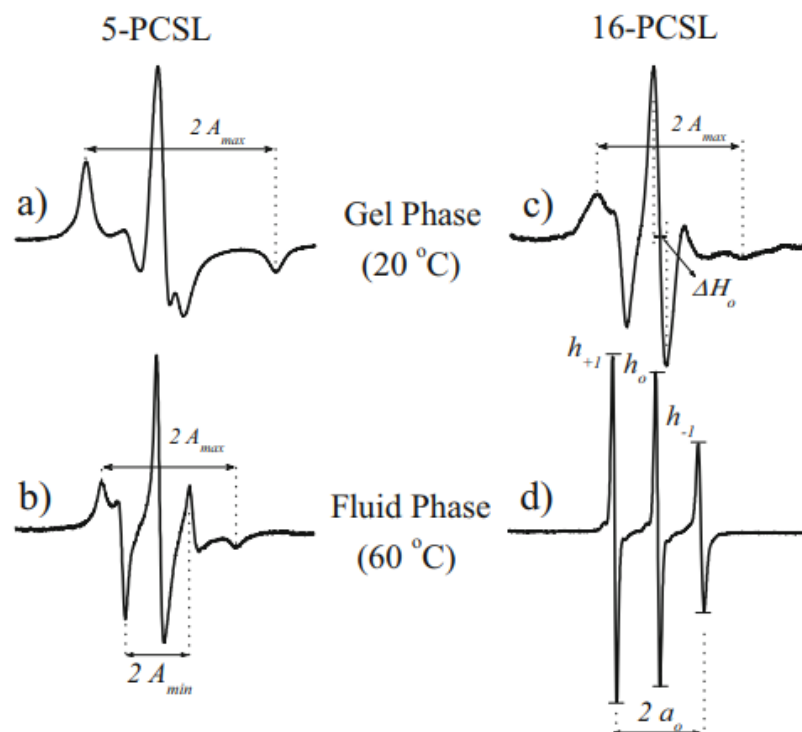


Figura 5. Espectros de ressonância de spin eletrônico (ESR) - 5-PCSL (a) e (b) espectros de 16-PCSL nas fases de gel (20 °C) (c) e fluido (60 °C) (d) (Figura adaptada de: Rozenfeld (2017).

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).

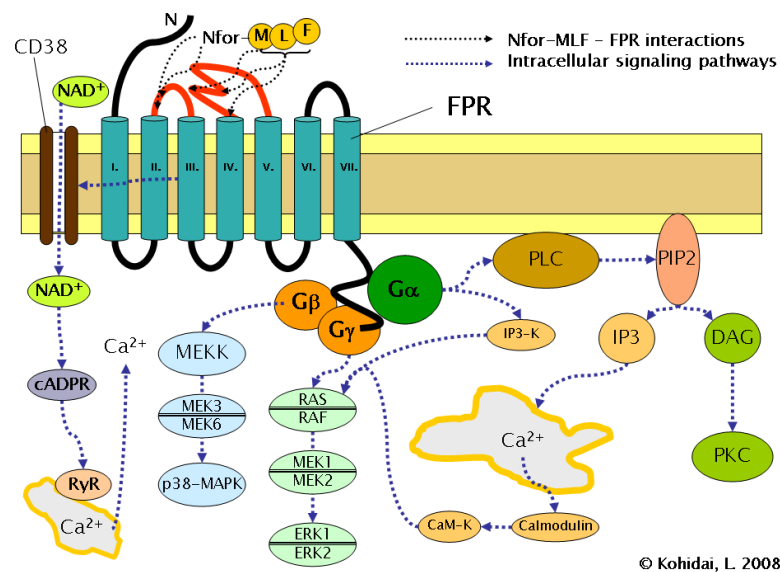


Figura 6. Diagrama esquemático do FPR. O diagrama mostra os sete domínios transmembrânicos que estão representados em verde, e em vermelho estão representados os loops extracelulares para FPR1 responsáveis pela ligação para fMLF. A ligação dos agonistas ao receptor leva à dissociação das subunidades $G\beta$ da $G\gamma$ da proteína heterotrimérica G_i acoplada ao receptor. A subunidade $G\alpha$ 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-methionyl-leucyl-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 anti-inflamatórios (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.

2 OBJETIVO

Avaliar a interação do complexo CTX com estruturas da membrana celular de macrófagos, tais como receptor peptídeo formil e os domínios lipídicos envolvidos com estrutura da membrana e com formação de poros, fundamentais para a transdução da sinalização e funções das células.

2.1 Estratégia experimental do projeto de pesquisa

Para estes estudos, foram utilizadas as células THP-1, uma linhagem de monócitos humanos. Estas células foram incubadas com diferentes concentrações da CTX, as quais foram determinadas a partir dos estudos que evidenciaram suas propriedades farmacológicas. Após as incubações, serão realizados estudos para determinar o processo de reconhecimento molecular da CTX em macrófagos, divididos em duas fases:

Fase I- Atividades Biológicas: que compreenderam os ensaios experimentais que visam demonstrar a importância de receptores FPRs, para as atividades farmacológicas da CTX sobre os macrófagos. Nesta fase, utilizamos a célula THP-1, uma célula de linhagem monocítica, que já foi demonstrada ser bom modelo experimental *in vitro* para avaliar funções de macrófagos, além de expressar FPRs, receptores de interesse em nosso estudo. Estas células foram diferenciadas em macrófagos, utilizando um agente indutor (Phorbol Myristate Acetate-PMA), por 12 horas. Logo após a diferenciação foram silenciadas para a expressão de FPRs, por meio da técnica de eletroporação com a tecnologia de nucleofecção, por kits e equipamento 4D-Nucleofactor™ System (Lonza®). O silenciamento tanto do siRNA para FPR1, quanto para FPR2 foi realizado. Após o silenciamento, a CTX, em diferentes concentrações (12,5nM; 25nM e 50nM), foi marcada com auxílio de uma sonda fluorescente e incubada nas culturas de macrófagos siRNA para FPR1 e FPR2 (M ϕ FPRs^{-/-}) ou macrófagos controles, sem o silenciamento (M ϕ FPRs^{+/+}), submetidas ao ensaio de *Time-Lapse*, em microscópio confocal, por 2 horas. O objetivo deste ensaio foi avaliar se houve interação entre a CTX e a membrana das células, bem como se a toxina é internalizada pelos macrófagos e se em células silenciadas observa-se o mesmo comportamento da molécula. Sobre as atividades funcionais, tais como a fagocitose de partículas de zimosan e a liberação e produção de liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a produção de óxido, foi avaliado se o silenciamento do FPRs interfere com o efeito da CTX sobre esses parâmetros. Caso macrófagos siRNA para FPR1 e FPR2 apresentem alterações das atividades funcionais induzidos pela CTX, demonstrando assim a

importância desses receptores, experimentos de *Western Blotting* foram realizados com o intuito de verificar se a incubação com a CTX induziria aumento na expressão dos FPR1 e FPR2 e quais as proteínas envolvidas com as vias de sinalização dos FPRs apresentam-se moduladas pela CTX. Para tanto, as proteínas Rac1, IP3, AKT e SRC, cruciais para a cascata de sinalização desses receptores foram quantificadas.

Fase II- Fase Termo-Estrutural: nesta fase, lipossomas ou vesículas sintéticas, formados a partir de lipídios sintéticos, neutros e carregados, mais abundantes na membrana celular dos macrófagos foram utilizadas em ensaios de interações CTX-membrana. Esses ensaios permitiram avaliar quais os tipos de interações com a membrana CTX é capaz de realizar. Geralmente, a bicamada lipídica sofre alterações em sua estrutura física quando interage fortemente com outras moléculas, podendo apresentar modificações em sua transição de fase gel-fluido, no grau de rigidez destas fases e até mesmo na polaridade da bicamada. Neste contexto, duas importantes ferramentas que podem ser utilizadas para este estudo, são a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e a Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), além da técnica de Vazamento de Carboxifluoresceína (CF). É importante ressaltar que estas técnicas da física são bem estabelecidas e aplicadas frequentemente na química, bioquímica, biologia celular, biotecnologia, farmacologia e na nanociência (Gill et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo biológico

3.1.1 Obtenção da CTX

3.1.1.1 Purificação da CTX

A purificação do complexo CTX, a partir do veneno total obtido de diversas serpentes *Crotalus durissus terrificus* adultas, foi realizada segundo o método descrito por Rangel e colaboradores (2004). Uma alíquota contendo 10 mg do veneno foi ressuspensa em 2 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,3) e centrifugada a 10.000 g por 10 minutos (Ultra-Centrífuga Eppendorf) para a remoção do material insolúvel. O sobrenadante obtido foi submetido à cromatografia de troca aniônica em uma coluna MONO-Q HR 5/5 de 5 ml, em sistema FPLC (*fast-performance liquid chromatography*, Pharmacia) utilizando o Äkta Purifier (GE Healthcare, Chicago, Illinois - USA), em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,3, para o isolamento da CTX. As proteínas adsorvidas à resina foram eluídas por um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl, tamponado com o tampão de equilíbrio. Foram obtidos 3 picos principais (Picos I, II e III), onde o Pico III corresponde à eluição da crotoxina (SAMPAIO et al., 2001, 2003). Frações de 1 ml por tubo foram coletadas e a eluição foi acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm. As frações contendo a CTX foram testadas quanto à homogeneidade por eletroforese em gel de poliacrilamida e a atividade de fosfolipase A₂ foi analisada em substrato cromogênico. Os tubos correspondentes à CTX foram reunidos e concentrados em coluna de 10 kDa Vivaspín® (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) e a sua concentração foi determinada pelo método de Bradford (1976).

3.1.1.2 Análise Eletroforética em SDS-PAGE para comprovação da pureza da CTX

A análise da pureza do complexo CTX foi realizada submetendo as amostras à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). O gel preparado na concentração de 12,5% de acrilamida, foi montado em placas de vidro 8 x 5 cm, unidas por espaçadores de 1,0 mm de espessura (Sistema BIO-RAD, Mini Protean II). As amostras do veneno e da CTX foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 125 mM, pH 6,9, contendo 2,5% (p/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 4 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 0,05% de azul de bromofenol) e fervidas por 5 minutos. O material foi aplicado em gel de empilhamento 4% e submetido à corrente de 20 mA por 2 horas. Após a corrida o gel foi corado por *comassie*

blue. As alíquotas de CTX consideradas isentas de contaminantes, foram estocadas a -20 °C até o momento do uso.

3.1.2 Culturas celulares

3.1.2.1 Linhagem de monócitos humanos THP-1 (*Human acute monocytic leukemia cell line*)

Adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro para este estudo. Seguindo a metodologia para cultivo celular de Peres e Curi (2005), para garantir a homogeneidade das características morfofisiológicas, as células THP-1 foram mantidas em cultura, não mais do que 4 semanas. Amostras destas células foram mantidas em nitrogênio líquido, descongeladas e restabelecidas às condições de cultura, em garrafas pequenas, próprias para cultivo, com meio de cultura RPMI contendo soro fetal bovino (SFB) a 10%, acrescido com 2-mercaptoetanol [50 µM] (Sigma Aldrich®), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) [24 mM], Hepes [9,2 mM], L-glutamina [200 mM]. Foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm² em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, durante sete dias consecutivos, com adição de meio de cultura a cada 3-4 dias. A fim de manter as células em fase Log de crescimento foram realizados repiques, e a confluência celular foi mantida nas concentrações de 4x10⁵ a 1x10⁶ de células/ml, para a realização dos ensaios. A manutenção das células foi realizada com as células que estavam em alta densidade por meio da adição de meio e diluição do número de células.

3.1.2.2 Diferenciação da THP-1 em macrófagos

Para promover a diferenciação das células THP-1 de monócitos para macrófagos, foi utilizado como agente indutor o éster de acetato forbol miristato (PMA). O protocolo de diferenciação foi adaptado de Tsuchiya et al. (1982); Kohro et al. (2004); Cambiaghi (2010); Daigneault et al. (2010). As células THP-1 foram plaqueadas na proporção de 1x10⁶ células/ml em placas de 6 poços, ou em garrafas de cultura, em seguida foram incubadas com o agente indutor (PMA), em meio RPMI na concentração de 10 ng/ml, por um período de 3 dias, em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, as células THP-1 diferenciadas foram tripsinizadas e uma suspensão de células foi diluída na proporção 1:1 (v:v), com Azul de Tripán e a contagem total das células foi realizada em Hemocitômetro de Neubauer. Um total de 100 células viáveis, ou seja, sem o corante incorporado, foi contado com o auxílio de microscopia ótica de luz, utilizando-se objetiva de imersão.

3.1.2.3 Macrófagos peritoneais de ratos

Com o intuito de certificar que a CTX teria comportamento semelhante em células de roedores e humanos, macrófagos peritoneais foram utilizados nos ensaios preliminares com a toxina FITC-marcada. Estas células foram obtidas de animais cedidos a partir do protocolo CEUAIB 1052/13. Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Em seguida, a pele da região abdominal foi removida e 20 ml de PBS foram injetados na cavidade peritoneal. Após a massagem do abdômen, o fluido peritoneal foi colhido com o auxílio de pipeta Pasteur de polietileno.

3.1.3 Silenciamento das células THP-1 para receptor peptídeo formil

A técnica aplicada foi o silenciamento por eletroporação, baseado na tecnologia de nucleofecção. Para tanto, as células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos, como descrito no **item 3.1.2.2**, coletadas, preparadas para a nucleofecção com base no protocolo do fabricante dos reagentes Lonza® e adicionado o siRNA de FPR1 de espécie humana (ThermoFisher Scientific®). A amostra foi transferida para uma cubeta específica para o aparelho 4D-Nucleofactor™ System para a eletroporação das células. Ao final do processo, a cubeta foi lavada com meio de cultura, e a amostra transferida para placas de cultura. A expressão é detectada de 3-8 horas após a nucleofecção. O silenciamento foi confirmado avaliando a expressão dos receptores, por meio da técnica de *western blotting*, conforme descrito no item 3.1.8. Como controle da indução do receptor, os MØFPRs^{+/+} e MØFPRs^{-/-} foram incubados por 2 horas na presença de FMLP (10 µM) antes do tratamento com a toxina.

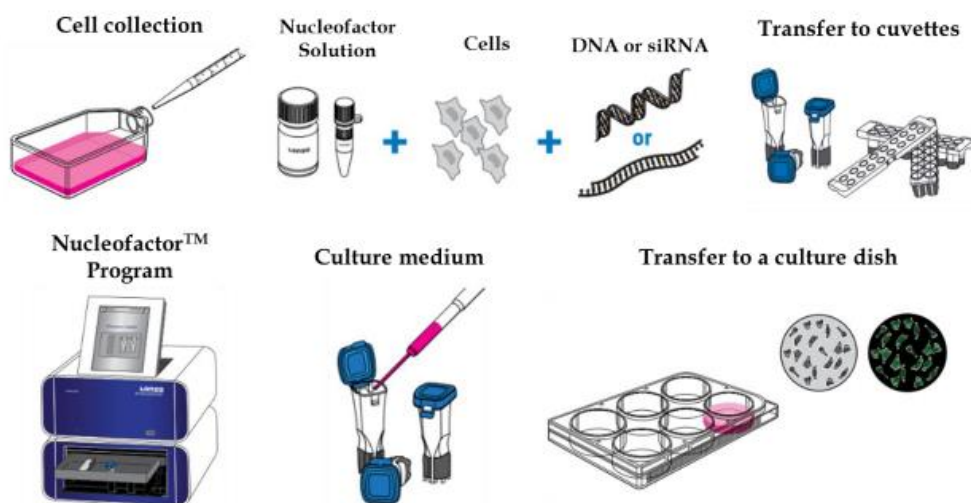


Figura 7. Desenho esquemático da técnica de silenciamento pelo método de nucleofecção. Processo da técnica de silenciamento representado pelas etapas de coleta de células, seguido de solução de

nucleofecção e siRNA; transferência para as cubetas; inserção das cubetas no equipamento de nucleofecção; seleção do programa para células THP-1; incubação com meio de cultura seguido para transferência para placa ou garrafa de cultura celular. Adaptado do fabricante Lonza.

3.1.4 Ensaio de marcação da toxina

A marcação da crotoxina foi realizada utilizando método desenvolvido a partir do trabalho de Rigoni e colaboradores (2008), com auxílio da pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, professora Ana Cláudia Martins Sobral.

Foram ressuspensos aproximadamente 50 µl de toxina purificada em 150 µl de Hepes 10 nM, pH 7,0. O pH do tampão Hepes foi também ajustado para 8,3 por adição de bicarbonato de sódio para lavagens posteriores da toxina. Foram adicionados 50 e 100 µl de isotiocianato de fluoresceína (FITC) à solução de toxina. A reação foi realizada no escuro à temperatura ambiente durante 3 horas sob agitação contínua e foi interrompida pela adição de cloreto de amônio 50 mM. O excesso de corante foi removido por centrifugação em coluna Vivaspin 10 kDa, com lavagens de Hepes 10 nM, pH 7,0. O conjugado foi coletado posteriormente às lavagens restando cerca de 20 µl de toxina marcada na concentração aproximada de 20 µg. Foram realizadas marcações de diferentes concentrações (1:1; 1:2 e 1:5) de fluoróforo para toxina. Para os ensaios com macrófagos foram testadas as duas primeiras concentrações, enquanto que nos ensaios com as células THP-1 diferenciadas foi utilizada a última concentração.

3.1.5 Incubação com Boc-2, antagonista de receptor para peptídeo formil

Após a diferenciação das células THP-1, conforme descrito no **item 3.1.2.2**, as células foram lavadas e incubadas em placas de cultura de 24 poços na presença de 100 µM/ml de Boc-2, antagonista seletivo de FPR, por 15 minutos a 37 °C (Costa *et al.*, 2013). Após este período, as células foram lavadas com PBS e foi realizada a incubação com CTX (12,5 nM), pelos diferentes tempos a 37 °C e 5% de CO₂ para a realização dos ensaios de imunocitoquímica descritos no **item 3.1.6**.

3.1.6 Ensaio de imunocitoquímica das células incubadas com CTX marcada

Os macrófagos peritoneais de ratos ou macrófagos diferenciados a partir da THP-1 (2,5 x 10⁵ células/poço) foram aderidos lamínulas de vidro em placas de 24 poços, por 2 horas. Após

o período de adesão destas células, as células foram incubadas com CTX FITC-marcada (**item 3.1.4**), em diferentes tempos. Para a fixação destas células, foi realizada lavagem com salina tamponada com fosfato (PBS 1x concentrado) e posteriormente, 1 ml de solução permeabilizante (PFA + Sacarose + Triton X 100) foi adicionado por 5 minutos. Foi retirada esta solução para que 1 ml de solução fixadora, contendo PFA e sacarose, pudesse ser adicionada em cada poço, durante 15 minutos. As lamínulas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com PHEM + glicina. Posteriormente, foi adicionado 70µL/poço de Rodamina Faloídina (1:500) para evidenciar os filamentos de actina, e DAPI (4',6'-diamindini-2-fenilindol) (1:500) para visualização dos núcleos, por período de 30 minutos à temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas com PHEM + glicina 2 vezes por um período de 10 minutos por lavagem. Em seguida, as lamínulas foram montadas com algumas gotas de *Antifade Mounting Medium* - Vectashield® (Peterborough, PE2 6XS, UK).

3.1.7 Avaliação das funções dos MØFPRs^{+/+} e MØFPRs^{-/-}

3.1.7.1 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos

A determinação da produção de H₂O₂ foi realizada segundo a técnica descrita por Pick e Mizel (1981). Após o silenciamento e incubação das células THP-1 (4x10⁵/poço), em placas de 96 poços, as células foram lavadas e incubadas na presença de meio de cultura RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino contendo CTX na concentração de 12,5 nM, por um período de 2 horas, a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Para a realização dos ensaios de H₂O₂, foi adicionada aos poços a solução de fenol vermelho. Como controle, foram as células foram incubadas na presença de PMA (10 ng/poço), como controles positivos da indução de H₂O₂. Após esse período a reação foi interrompida pela adição de hidróxido de sódio 1N (NaOH). Os ensaios foram realizados em quadruplicata, e simultaneamente as amostras sem estímulo de CTX ou PMA foram avaliadas para aquilatar a produção espontânea de H₂O₂. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 620 nm obtendo-se a densidade óptica (D.O.) e calculando-se os resultados em nM de H₂O₂ por 4x10⁵ células.

3.1.7.2 Espriamento dos macrófagos

Após 24 horas da cultura dos MØFPRs^{+/+} ou MØFPRs^{-/-} (2x10⁵/poço), em placas de 24 poços, contendo lamínula de vidro, as células foram lavadas e incubadas em meio de cultura RPMI 1640, sem soro fetal bovino, contendo CTX (12,5 nM), por 2 horas, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% CO₂. Após 2 horas, as lamínulas foram novamente lavadas em PBS e as células

foram incubadas por 4 horas e meia em meio RPMI 1640, sem soro fetal bovino, a 37 °C em atmosfera úmida a 5% de CO₂. Após este período, as lamínulas foram lavadas e coradas e fixadas em solução de Rosenfeld por 10 min. As lamínulas foram então montadas em lâminas e a porcentagem de células espalhadas foi determinada para cada amostra de 100 células, em microscopia de contraste de fase.

3.1.7.3 Fagocitose dos macrófagos

As células THP-1 (sem diferenciação) foram incubadas e tratadas conforme descrito no **item 3.1.5**. Após 4 horas do ensaio de espalhamento, as células foram incubadas com 1 ml de meio de cultura RPMI 1640, sem soro fetal bovino, contendo as partículas de zimosan (2×10^6 por poço) e incubadas por 1 hora. Após este ensaio, as lamínulas foram lavadas em PBS e corante Rosenfeld. As lamínulas foram montadas em lâminas, com o auxílio do Entellan[®]. Foram contadas 100 células totais, e a porcentagem de fagocitose foi determinada por score a partir do número de monócitos que não fagocitaram e os que fagocitaram as partículas (uma, duas, três ou mais).

3.1.8 Expressão dos Receptores Peptídeo Formil e Ativação

As expressões de FPR1, Rac1, PI3K, AKT e SRC foram avaliadas. Após o preparo, as amostras foram submetidas à técnica de *western blotting*. As células (1×10^6) tratadas ou não com CTX ou FMLP foram ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 25 mM, pH 7,2; NaCl 150 mM; MgCl₂ 5 mM; NCl-5 mM; NP-40 a 1%; glicerol a 5%, inibidores de protease e fosfatase 1: 300, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e incubadas em gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas (16000 g, 15 min, 4 °C) e a quantificação do total das proteínas foi realizada usando o método BCA (ácido bicinonínico) (Smith et al., 1985). Em seguida, as amostras foram aplicadas a um gel de poliacrilamida a 10% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com TBS-T 5% BSA por 1 h, à temperatura ambiente e incubadas durante a noite, a 4 °C, com um dos anticorpos primários: Anticorpo anti-FPR1 (ab113531-Abcam[®]), anti-Rac1 (phospho S71); anti-SRC (fosfo-Y418); Subunidade catalítica anti-PI3 quinase gama / anticorpo gama PI3K [Y388] (ab32089) (Abcam). O anticorpo anti-GAPDH 1: 10000 (Abcam) foi utilizado para controlar a concentração de proteínas aplicadas ao gel. Todos os anticorpos primários foram diluídos em TBS-T 5% BSA. No dia seguinte, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários por 2 h em temperatura ambiente. Todos os anticorpos secundários

foram diluídos em 5% de TBS-T. A detecção das bandas foi realizada por quimioluminescência, utilizando o kit de desenvolvimento ECL (substrato quimioluminescente aprimorado, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) e em um documentador fotográfico (UVITEC Cambridge, Reino Unido). A análise quantitativa das imagens obtidas foi realizada no software Image J (National Institutes of Health, EUA).

3.1.9 Análise estatística

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

3.2 Estudo termo-estrutural

3.2.1 Preparação das dispersões lipídicas

Para a preparação das vesículas os lipídios abaixo (**Figura 8**) foram dispersos em tampão PBS 1mM, na concentração lipídica final de 5 mM: DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine); DPPS (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine); DPPG (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)) (Avanti Polar Lipids, Inc[®] - Alabaster, AL 35007, EUA). Sendo o primeiro de carga total neutra e os dois últimos carregados com carga negativa.

Inicialmente os lipídios em pó foram pesados e dissolvidos em clorofórmio, adicionados ou não de metanol para melhor solubilização, sob agitação mecânica, até obter uma solução transparente. Posteriormente o clorofórmio foi evaporado com um fluxo de N₂ gasoso, formando um filme no fundo do tubo. Este foi mantido sob baixa pressão por um período mínimo de 2 horas, para remover todos os traços do solvente orgânico.

Em seguida, foi adicionado 1ml do solvente de interesse (solução tampão fosfato (PBS) na concentração de 10 mM em pH: 8,1), para a preparação das dispersões. O tubo com a solução + lipídio foi aquecido em banho maria a uma temperatura acima de 50 °C e agitado vigorosamente por cerca de 1 minuto em vórtex, em intervalos de 5 minutos até se obter uma mistura homogênea.

Com o intuito de obtermos vesículas unilamelares (LUVs) e com baixa polidispersão, ou seja, de tamanho relativamente bem determinado e similares umas às outras, todas as amostras lipídicas passaram por um processo de extrusão, utilizando um mini-extrusor (Avanti Polar Lipids, Inc®) acoplado a um sistema “*home made*”, que permite controlar a temperatura, velocidade e número de ciclos de extrusão, conferindo à todas as amostras o mesmo padrão neste protocolo. A solução lipídica foi passada 31 vezes por um filtro de policarbonato com poros de 100 nm. As temperaturas para extrusão foram padronizadas em 55 °C para DPPC e DPPG e 65 °C para DPPS, escolhidas com bases nas temperaturas de transição de fase. É importante salientar que o tamanho das vesículas unilamelares foi checado por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz e os resultados nos mostraram, como previsto, a existência de vesículas de 100nm de diâmetro, com polidispersão abaixo de 10%.

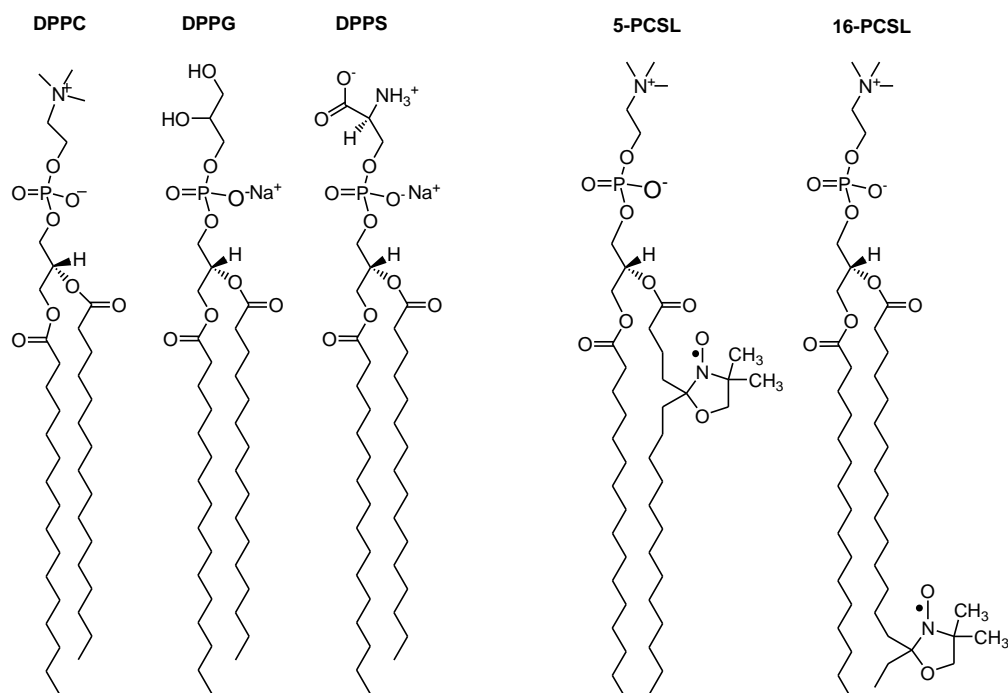


Figura 8. Estrutura química dos lipídios e marcadores de spin utilizados. Foram utilizados lipídio neutro (DPPC) e lipídios negativos (DPPG e DPPS), além de marcadores de spin 5-PCSL e 16-PCSL.

3.2.2 Tratamento das vesículas lipídicas com CTX

Para os ensaios termo-estruturais foi padronizada a concentração de 0,1% da concentração utilizada do lipídio (5 mM), ou seja, a concentração utilizada da CTX foi de 5 μ M.

Após a extrusão das amostras ressuspensas com 1ml de PBS (**item 3.2.1**), foi adicionado ao volume final da solução lipídica o volume de CTX que foi utilizado para as medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) e para as medidas de EPR.

3.2.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Termogramas de DSC foram obtidos por um microcalorímetro da Microcal MC-2 do Laboratório de BioMembranas do Departamento de Física Geral do Instituto de Física da USP. As medidas foram realizadas no intervalo de temperatura de 20 a 70 °C (aquecimento) com uma velocidade de varredura de 20 °C/h. Essas temperaturas inicial e final foram escolhidas com base nas temperaturas de transição de fase dos lipídios utilizados.

Para cada amostra uma duplicata foi feita para obtermos as variações estatísticas envolvidas no processo experimental. Nesta técnica uma célula do aparelho foi preenchida com o solvente PBS (referência) e a outra célula com a dispersão desejada (tratadas ou não), sendo que cada célula possui um volume de 530 µL e ambas estão sob isolamento térmico e mantidas a uma mesma pressão. Os dois compartimentos são submetidos a uma taxa constante de aquecimento e a diferença de potência fornecida entre os dois compartimentos é registrada em função de temperatura e a partir desta diferença obtêm-se a capacidade calorífica a pressão constante.

Para remover a linha de base de cada curva e obter a área sob cada pico (RISKE et al., 2009) foi utilizado o programa Microcal Origin 7.0 com um pacote adicional para a análise dos dados de DSC, fornecido pela Microcal.

3.2.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR foram obtidos no Laboratório de BioMembranas do Dpto de Física Geral do Instituto de Física da USP, por um espectrômetro Bruker EMX em banda-X. Após preparação da dispersão lipídica com ou sem CTX (**itens 3.2.1 e 3.2.2**), cerca de 70 µL de amostra foi inserida em um capilar, posteriormente selado em bico de Bunsen. As amostras foram colocadas numa cavidade ressonante retangular, por onde passou nitrogênio gasoso para controle da temperatura, realizado por um dispositivo de temperatura variável Bruker BVT-2000. Uma amplitude de modulação de 1 G e potência máxima de microondas de 10 mW foram utilizadas. Os espectros de EPR foram obtidos em função da temperatura no intervalo de 20 °C a 70 °C.

A técnica de EPR consiste na utilização de uma sonda paramagnética (radical nitróxido ligado a uma posição específica da cadeia parafínica de um lipídio específico chamado de marcador de spin ou do inglês: *spin label*), incorporada, por exemplo, a proteínas ou membranas lipídicas, cujo espectro de ressonância paramagnética pode fornecer informações de caráter estrutural e dinâmico da região sondada pelo marcador de spin (BERLINER, 1976, 1979; BERLINER; REUBEN, 1989). Para tanto, foram utilizados os marcadores de spin 16-PC e 5-PCSL (Avanti Polar Lipids, Inc), considerando a possibilidade de uma diferente distribuição no sistema em estudo.

O parâmetro de ordem efetivo, S_{eff} , foi calculado a partir da expressão (BOGGS; RANGARAJ, 1985)

$$S_{eff} = \frac{A_{//} - A_{\perp}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \frac{a_o'}{a_o}$$

onde, $a_o' = (1/3)(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$, $a_o = (1/3)(A_{//} + 2A_{\perp})$, $A_{//}$ ($= A_{max}$) é o desdobramento

hiperfino máxima medido diretamente no espectro e $A_{\perp} = A_{min} + 1.4 \left[1 - \frac{A_{//} - A_{min}}{A_{zz} - (1/2)(A_{xx} + A_{yy})} \right]$

, A_{min} é o desdobramento hiperfino mínimo medido e A_{xx} , A_{yy} and A_{zz} são os principais valores do tensor hiperfino (HUBBELL; MCCONNEL, 1971).

3.2.5 Ensaio de vazamento

Para este ensaio, filmes lipídicos (6 mM) foram hidratados com tampão (HEPES 10 mM, pH 7,4 com EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) contendo 50 mM de carboxifluoresceína (CF). A dispersão lipídica foi extrusada, como descrito acima. Para remover CF não retida, a suspensão de LUVs foi eluída através de uma coluna média Sephadex-G25 (1,2 cm x 10 cm) e adição gradual de tampão HEPES 10 mM, pH 7,4 com EDTA 1 mM, NaCl 100 mM e glicose 150 mM. Vesículas com CF aprisionado (CF-LUVs) foram coletadas. Após a eluição através da coluna Sephadex, obtivemos uma diluição de 4 a 5 vezes. A concentração lipídica final foi determinada por ensaio de fosfato inorgânico.

As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo (1,0 x 1,0 cm, 2,0 ml) e a emissão fluorescente medida com um espectrômetro de fluorescência (Varian Cary Eclipse, Santa Clara, CA), com temperatura controlada por um termostato Carry Peltier. As medições de vazamento de CF foram realizadas sob agitação constante. Na cubeta, foram colocados cerca de 100 μ L da

dispersão lipídica, a fim de obter uma concentração lipídica final de 100 μM . A emissão de fluorescência da CF aprisionado nos lipossomos é auto suprimida na concentração usada aqui (50 mM). À medida que a CF é liberada para a solução gradativamente, devido à permeabilização da membrana causada pela adição de proteína ou detergente, o fluoróforo é diluído e seu sinal fluorescente aumenta. A emissão de CF foi registrada continuamente no tempo (uma medição por segundo), a 25 °C, $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$. Posteriormente, 0,1% molar de CTX foi adicionado às dispersões LUV a 100 segundos. No final de cada experimento (2000 segundos), foi adicionado Triton X-100 (~10 μL de 10% p/v) para promover vazamento total de FC. A porcentagem de vazamento de FC, (%) vazamento, foi determinada de acordo com:

$$(\%) \text{ vazamento } (t) = [(I(t) - I_0) / (I_{\text{total}} - I_0)] \times 100$$

Onde: $I(t)$ é a intensidade da fluorescência no tempo t , I_0 é a fluorescência inicial, antes da adição da CTX, e I_{total} é a fluorescência máxima, obtida após a adição do Triton X-100. As análises cinéticas foram realizadas com vesículas de DPPC, DPPG, DPPS e apenas na fase gel, a 25 °C. O procedimento experimental a 50 °C foi considerado não confiável, pois o vazamento de FC ocorreu consideravelmente nas vesículas, mesmo na ausência de proteína. Para mimetizar a fase fluida das membranas dipalmitoil, vesículas de POPC, POPG, POPS foram preparadas de maneira semelhante e usadas a 25 °C.

3.3 Estudo *in silico*

Identificou-se na literatura e em bancos de dados *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (Berman *et al.*, 2000) as sequências FASTA e estruturas tridimensionais das subunidades da CTX. Após a identificação, procedeu-se a pesquisa em banco de dados como *DrugBank* 5.1.0 (<http://www.drugbank.ca>) (WISHART *et al.*, 2018) e *Therapeutic Targets Database* (TTD) (<https://db.idrblab.org/ttd>) (LI *et al.*, 2018), a fim de verificar tanto a similaridade química com substâncias em investigação e fármacos já no mercado, como os respectivos alvos moleculares identificados e validados para os compostos e fármacos depositados nos bancos de dados.

O banco de dados *DrugBank* é amplamente utilizado pela indústria farmacêutica por sua lista abrangente de substâncias ativas em investigação, fármacos já no mercado e candidatos retirados do mercado por alguma restrição no processo de desenvolvimento tanto para humanos

como para uso veterinário. A última versão do *DrugBank* (versão 5.1.0, lançada em 2018-04-02) contém 11.145 entradas de medicamentos, sendo estes fármacos aprovados e fármacos experimentais (WISHART et al., 2018). Realizou-se uma busca por estrutura química, priorizando a similaridade no limiar de 0,7, sem parâmetros de máximo e mínimo de peso e buscando todos os fármacos do banco, tanto os aprovados como em fase investigacional ou de experimentação.

O *Therapeutic Targets Database* (TTD) é um banco de dados que fornece informações sobre os alvos proteicos e de ácidos nucleicos terapêuticos conhecidos e explorados, a doença alvo, a informação da via e os fármacos correspondentes direcionados a cada um desses alvos (LI et al., 2018). O TTD também fornece consulta de similaridade de sequência alvo para procurar sequências similares contra todos os alvos terapêuticos com informações de sequência disponíveis. O grau de similaridade desses alvos identificados é avaliado pelo programa BLAST e os alvos identificados são listados na ordem de seu valor (*e-value*) (do menor para o maior).

As sequências dos alvos dos fármacos obtidos por similaridade à estrutura da crotoxina foram buscadas no TTD e comparadas à similaridade do receptor em estudo, peptídeo formil e ao receptor peptídeo formil específico do tipo I. Foram considerados todos os *e-value*, quando comparadas as sequências dos FPR com os receptores encontrados no *DrugBank*.

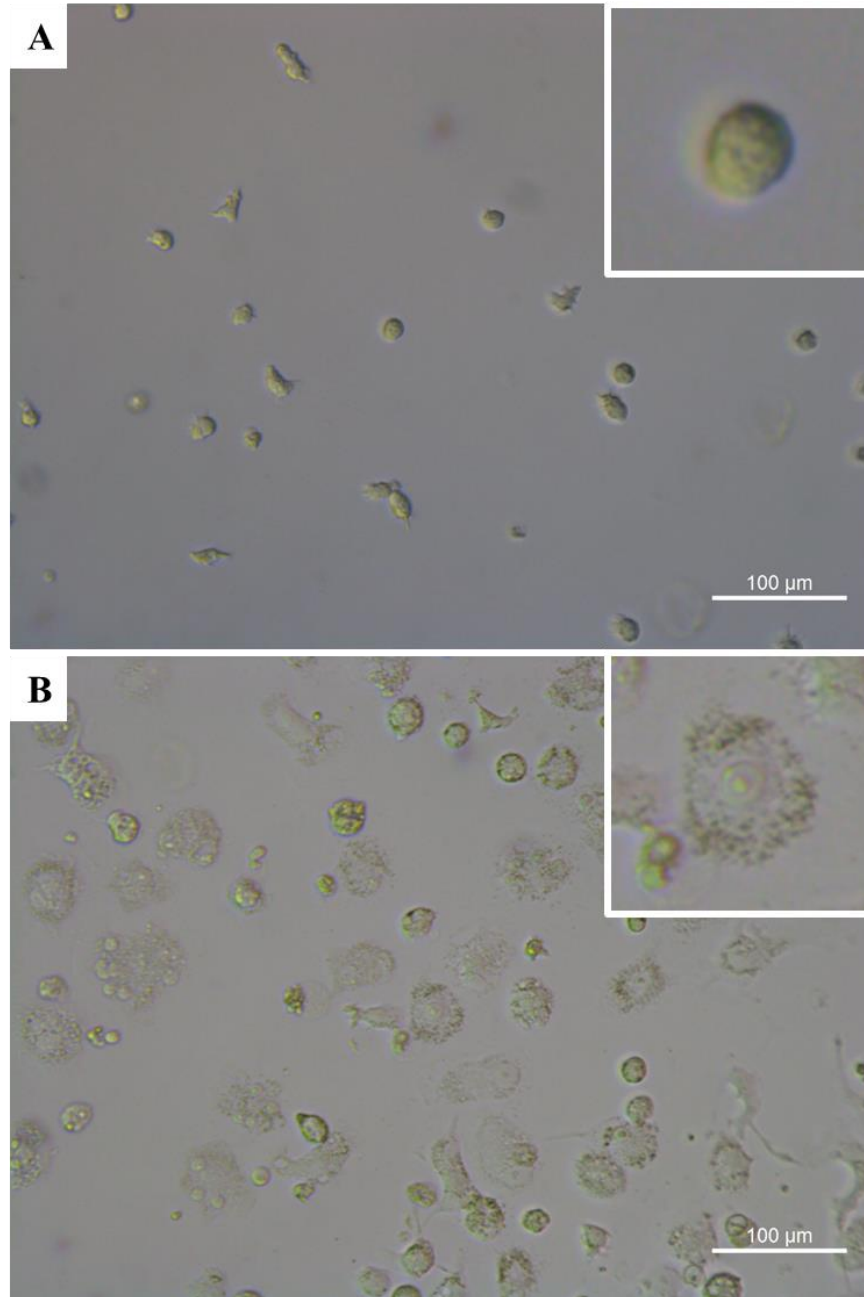
4 RESULTADOS

4.1 Diferenciação das células TPH-1

Após promover a diferenciação das células THP-1 de monócitos para macrófagos, com agente indutor éster de acetato forbol miristato (PMA), foi verificada a viabilidade e morfologia das células.

É possível observar na **Figura 9A** as células em suspensão, sendo possível notar um halo ao redor das células, e na **Figura 9B** já diferenciadas e aderidas. Em ambos os casos as células estão viáveis e com morfologia descrita pela literatura (TSUCHIYA et al., 1982; DAIGNEAULT et al., 2010).

Figura 9: Diferenciação de células THP-1 com agente indutor éster de acetato forbol miristato (PMA)



Células THP-1 (1×10^6) foram incubadas com meio de cultura RPMI-1640 e na presença do agente indutor éster de acetato forbol miristato (PMA) em garrafas de cultura para diferenciação celular. **A** - Células THP-1 em sua forma monocítica em suspensão. **B** - Células THP-1 diferenciadas, aderidas na presença apenas de meio de cultivo RPMI-1640.

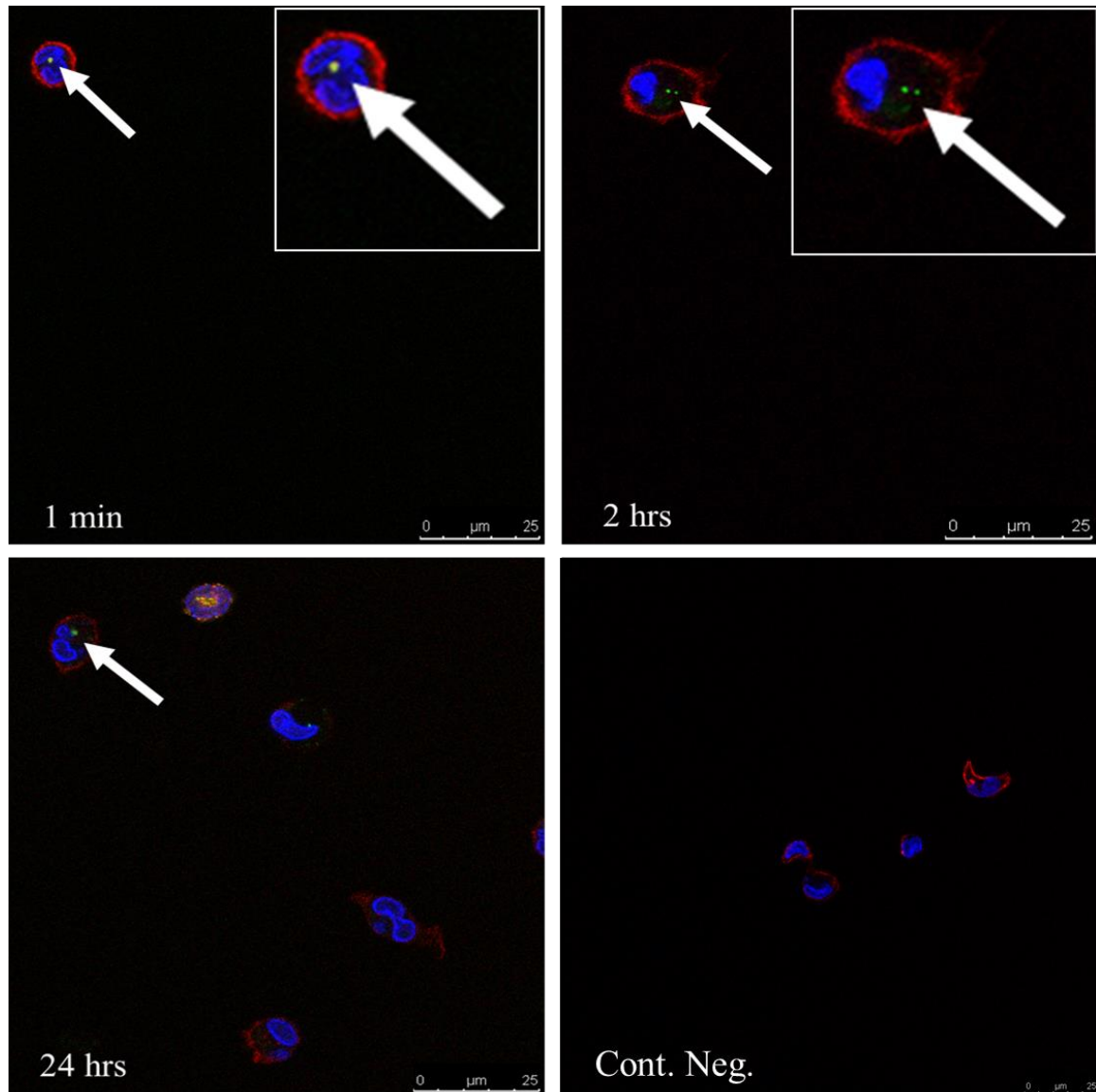
4.2 Visualização da CTX marcada com FITC em macrófagos peritoneais de ratos em diferentes tempos

Uma vez que todos os ensaios funcionais realizados nos diferentes estudos do nosso grupo foram realizados com macrófagos peritoneais de ratos, utilizamos essa célula para comparar o reconhecimento com a membrana de macrófagos obtidos dos roedores e por macrófagos diferenciados de células humanas da linhagem THP-1.

Inicialmente foram testadas duas concentrações diferentes da CTX nas proporções de 1:1 e 1:2 de FITC. Foi observado que a concentração de 1:2 o sinal do fluoróforo era melhor, reduzindo o *background*. Foram também testados os tempos de 1 minuto, 2 horas e 24 horas de cultura das células em contato com a toxina marcada.

Conforme mostra a **Figura 10**, a toxina FITC-marcada após 1 minuto de incubação pode ser observada no interior das células, e o mesmo padrão foi observado para os tempos de 2 horas e 24 horas. O controle negativo foi realizado incubando-se apenas o fluoróforo, sem conjugação com a toxina. Neste caso, não houve observação da marcação do fluoróforo no interior dos macrófagos, em nenhum dos períodos avaliados.

Figura 10: Visualização da CTX marcada com FITC em macrófagos peritoneais de ratos após 1 minuto, 2 e 24 horas de incubação



Macrófagos peritoneais de ratos ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram aderidos lamínulas de vidro em placas de 24 poços, por 2 horas. Após o período de adesão destas células, as células foram incubadas com CTX FITC-marcada, em diferentes tempos (**1 minuto, 2 horas e 24 horas**), e foi realizado um controle negativo sem FITC representativo do período de 24 horas. Para a fixação destas células, utilizou-se solução permeabilizante e Rodamina conjugada com Faloidina (1:500) foi utilizado para evidenciar os filamentos de actina, e DAPI (4',6'-diamidini-2-fenilindol) foi utilizado para visualização dos núcleos. Imagens obtidas em microscopia confocal, objetiva de 45x.

4.3 Visualização da CTX marcada com FITC em células THP-1 após 1 minuto, 2 e 24 horas de incubação

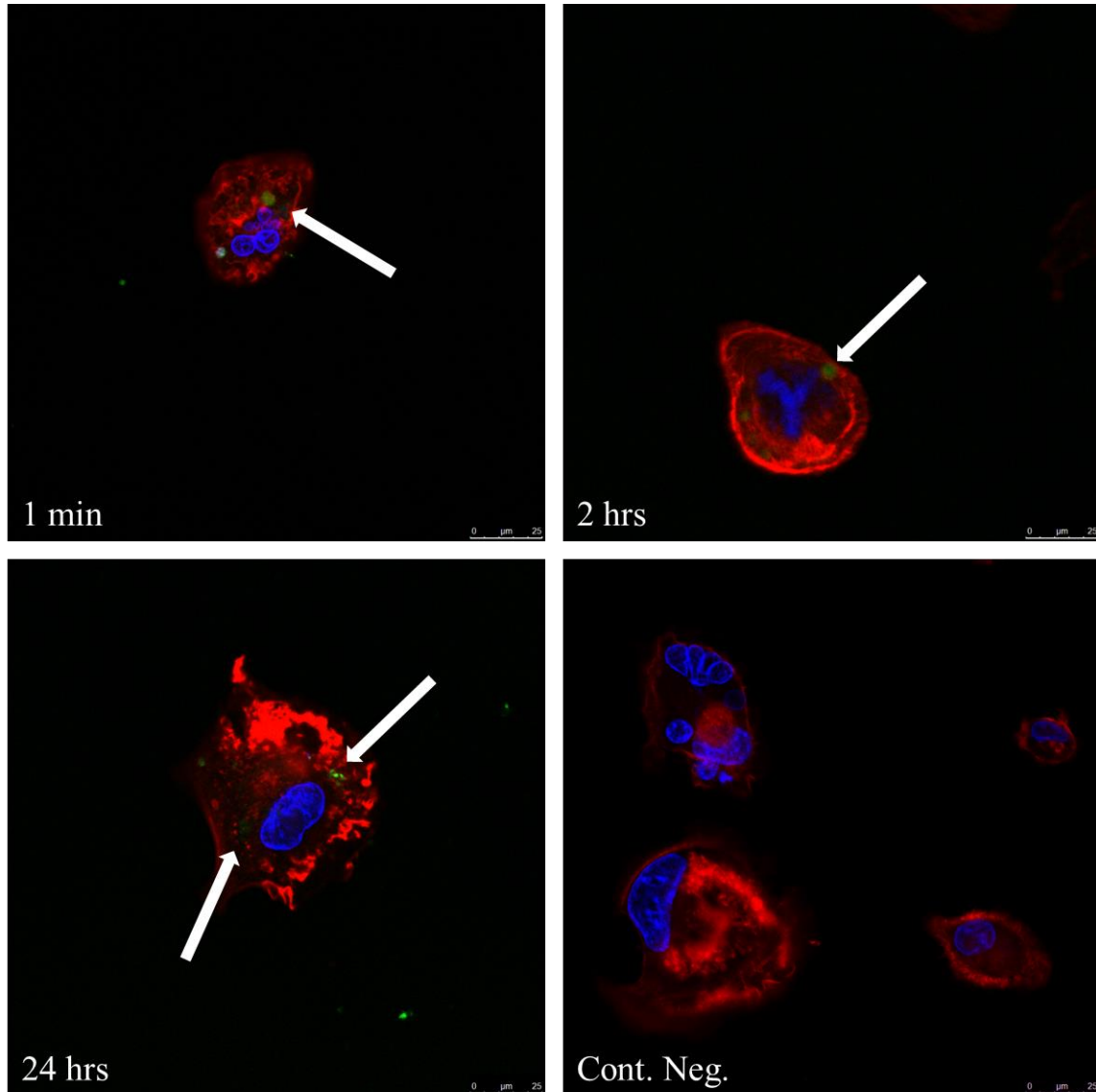
Com o objetivo de confirmarmos se a marcação da toxina funcionaria em linhagem celular humana, o mesmo ensaio de marcação com os macrófagos peritoneais foi realizado com macrófagos diferenciados a partir de células THP-1. Conforme observado na **Figura 11**, a toxina também se encontra dentro da célula, após 1 minuto, 2 horas e 24 horas de incubação e após lavagem com meio de cultura. Novamente foi realizado o controle negativo para verificar a ausência da toxina e de autofluorescência em todos os períodos avaliados.

Influência do Boc-2 na interação CTX FITC-marcada com macrófagos diferenciados a partir de THP-1

Com o intuito de avaliar a importância de receptores peptídeo formil no reconhecimento molecular da CTX por macrófagos, utilizamos Boc-2, antagonista seletivo de FPR, inicialmente na concentração 100 μ M por 15 minutos. Após essa incubação, as células foram tratadas com CTX (12,5 nM), por 1 min, 2 horas e 24 horas.

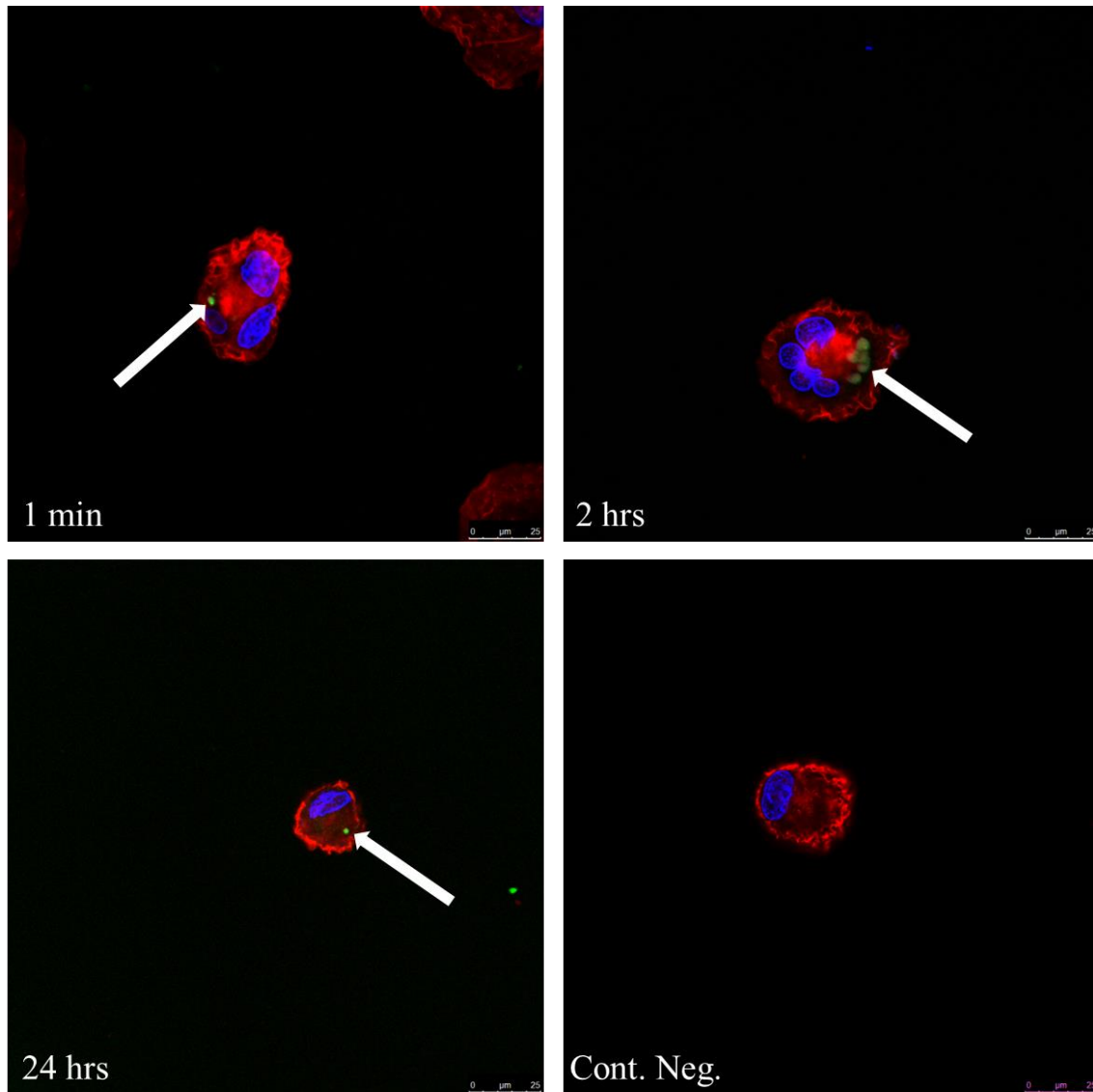
A **Figura 12** evidencia a entrada da toxina nas células mesmo com o tratamento prévio com Boc-2 nos diferentes períodos avaliados. Para confirmação de que de fato a toxina se encontrava no interior das células, as células foram lavadas e a captura de imagem foi realizada em 3D e em plano ortogonal em microscópio confocal (**Figura 13**).

Figura 11: Visualização da CTX marcada com FITC células THP-1 após 1 min, 2 e 24 hrs de incubação



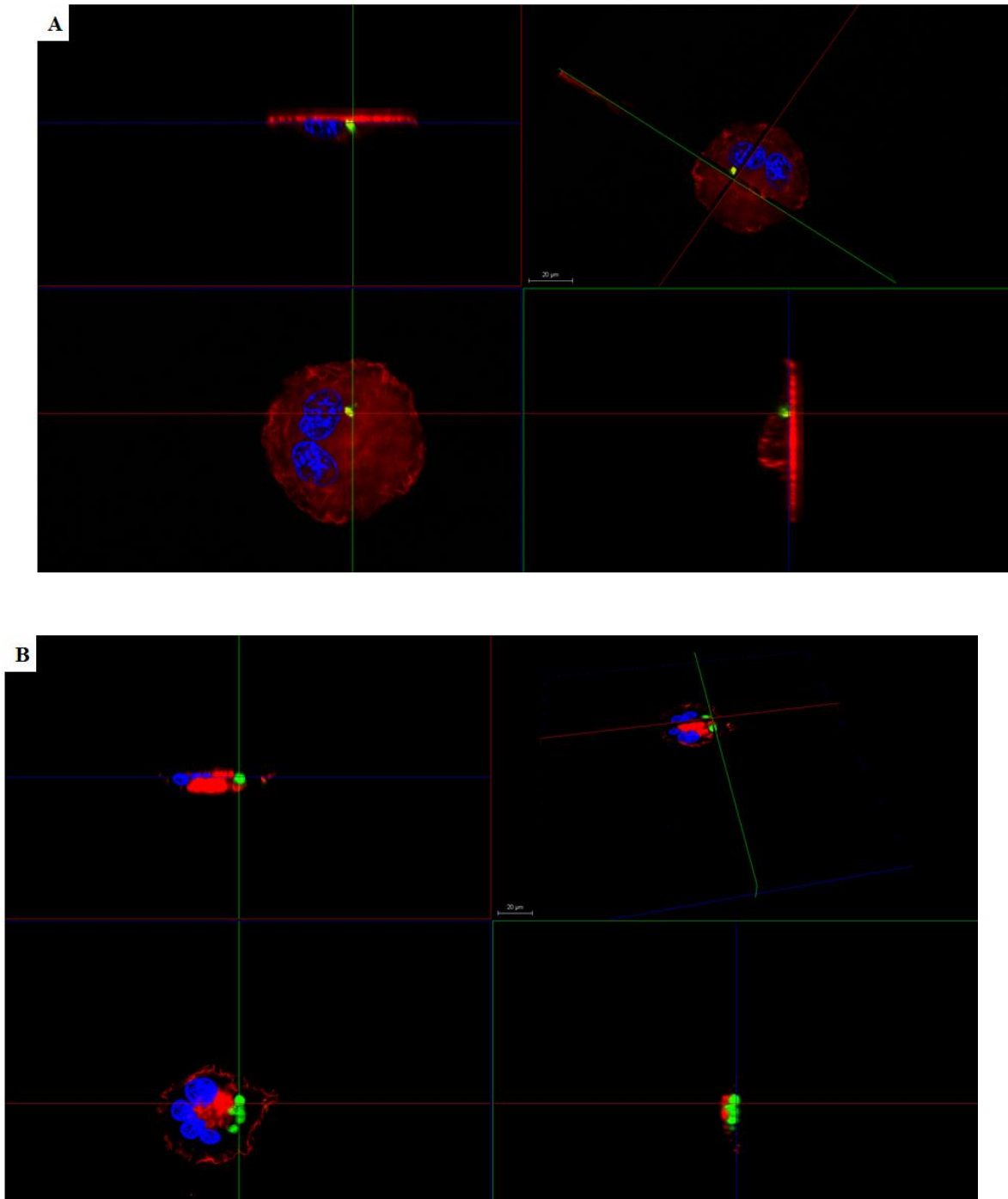
Células THP-1 diferenciadas em macrófagos ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram aderidas lamínulas de vidro em placas de 24 poços, por 2 horas. Após o período de adesão destas células, as células foram incubadas com CTX FITC-marcada, em diferentes tempos (**1 minuto, 2 horas e 24 horas**), e foi realizado um controle negativo sem FITC representativo do período de 24 horas. Para a fixação destas células, utilizou-se solução permeabilizante e Rodamina conjugada com Faloídina (1:500) foi utilizado para evidenciar os filamentos de actina, e DAPI (4',6'-diamindini-2-fenilindol) foi utilizado para visualização dos núcleos. Imagens obtidas em microscopia confocal, objetiva de 45x.

Figura 12: Visualização da CTX marcada com FITC células THP-1 após 1 min, 2 e 24 hrs de incubação após incubação prévia com Boc-2, antagonista seletivo de FPR



Células THP-1 diferenciadas em macrófagos ($2,5 \times 10^5$ células/poço) foram aderidas lamínulas de vidro em placas de 24 poços, por 2 horas. Após o período de adesão destas células, as células foram incubadas com CTX FITC-marcada, em diferentes tempos (**1 minuto, 2 horas e 24 horas**), e foi realizado um controle negativo sem FITC representativo do período de 24 horas. Para a fixação destas células, utilizou-se solução permeabilizante e Rodamina conjugada com Faloídina (1:500) foi utilizado para evidenciar os filamentos de actina, e DAPI (4',6'-diamidini-2-fenilindol) foi utilizado para visualização dos núcleos. Imagens obtidas em microscopia confocal, objetiva de 45x.

Figura 13: Visualização da CTX marcada com FITC em células THP-1 após 2 hrs de incubação em planos ortogonais



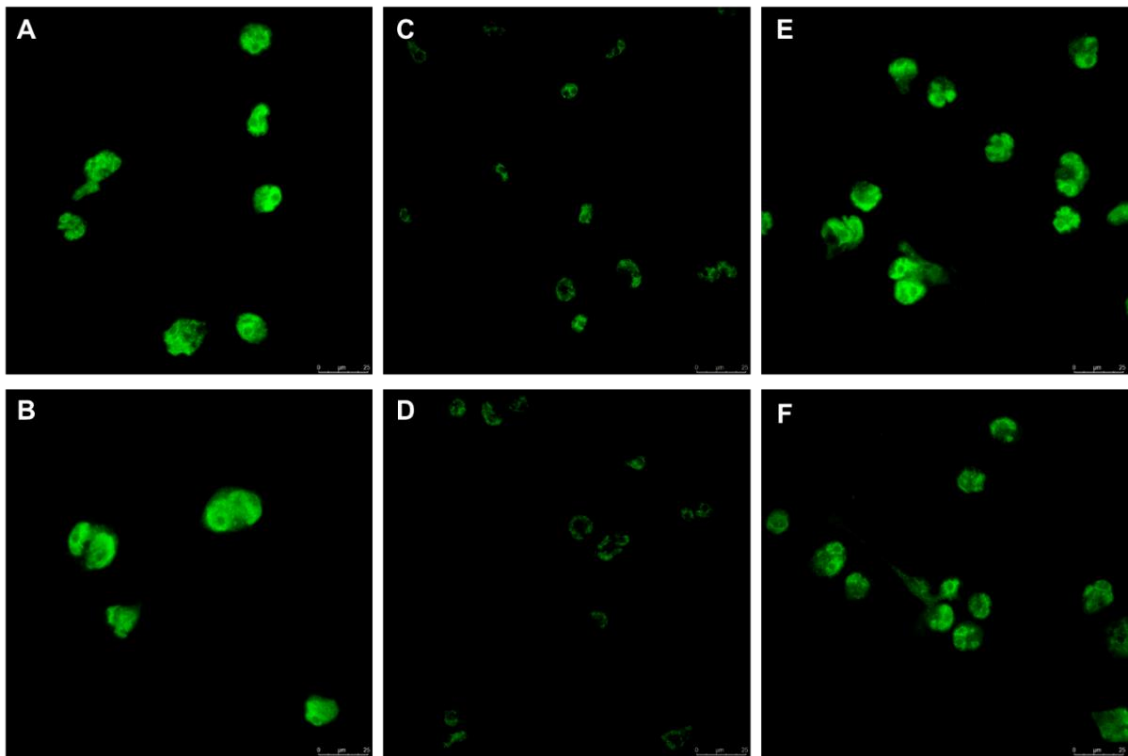
Em **A**: Células THP-1 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) aderidos lamínulas de vidro, incubados com CTX FITC-marcada por **2 horas**, em plano ortogonal e 3D. Imagens obtidas em microscopia confocal. Em **B**: Células THP-1 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) aderidos lamínulas de vidro, incubados previamente com Boc-2, com CTX marcada com FITC em **2 horas** em plano ortogonal e 3D. Imagens obtidas em microscopia confocal.

4.4 Silenciamento do receptor FPR1 em THP-1 diferenciadas ou não

Para confirmar se o receptor foi silenciado ou não em células THP-1 (monócitos ou diferenciadas), foram realizadas imunofluorescências marcando o receptor FPR. É possível observar nas **Figuras 14 e 15 (C e D)** uma redução na fluorescência do marcador FITC mostrando consequentemente a redução de receptores de FPR nos monócitos (**Figura 14**) e macrófagos (**Figura 15**).

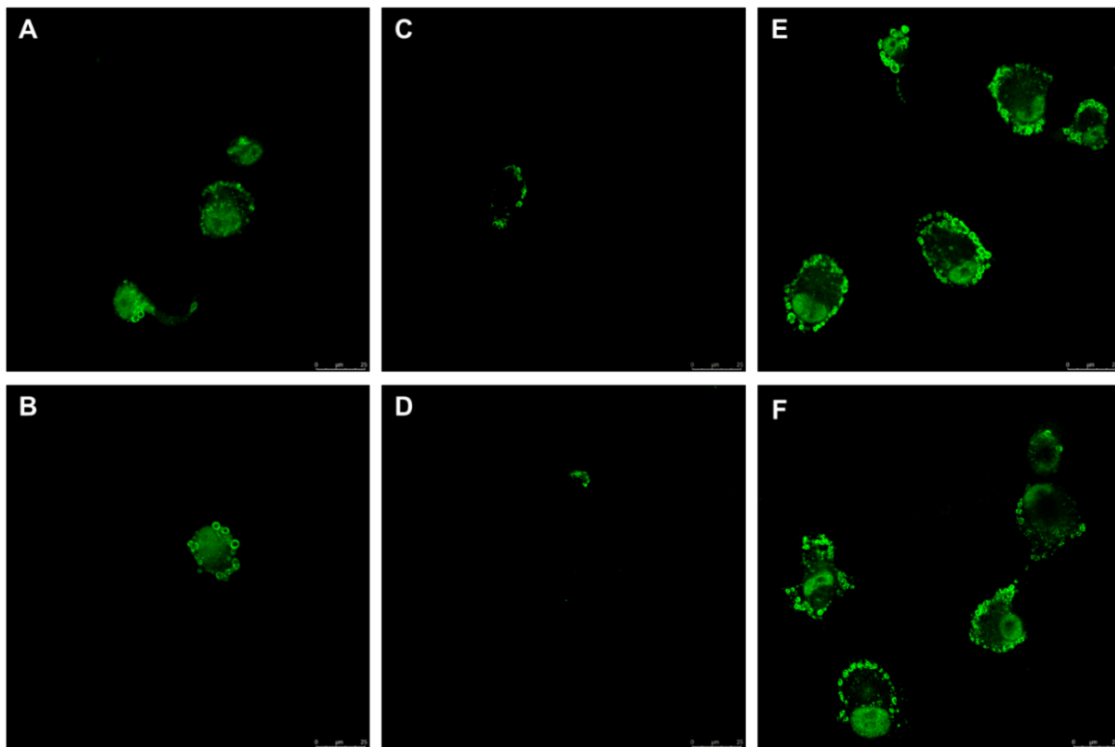
É importante notar que, para esse experimento, todas as imagens foram obtidas com o mesmo ganho, para garantir que o que estava sendo reduzido fosse de fato a quantidade de receptores disponíveis nas células.

Figura 14: Expressão de receptores FPR em células THP-1 (monócitos)



Receptor peptídico de formil silenciado de células THP-1 não diferenciadas em diferentes tratamentos. A- grupo controle; B-CTX (12,5 nM); Silenciado em C para o receptor FPR; D- silenciado para receptor FPR e tratado com CTX; E- estimulado com FMLP e F- estimulado com FMLP e tratado com CTX.

Figura 15: Expressão de receptores FPR em células THP-1 (diferenciadas em macrófagos)



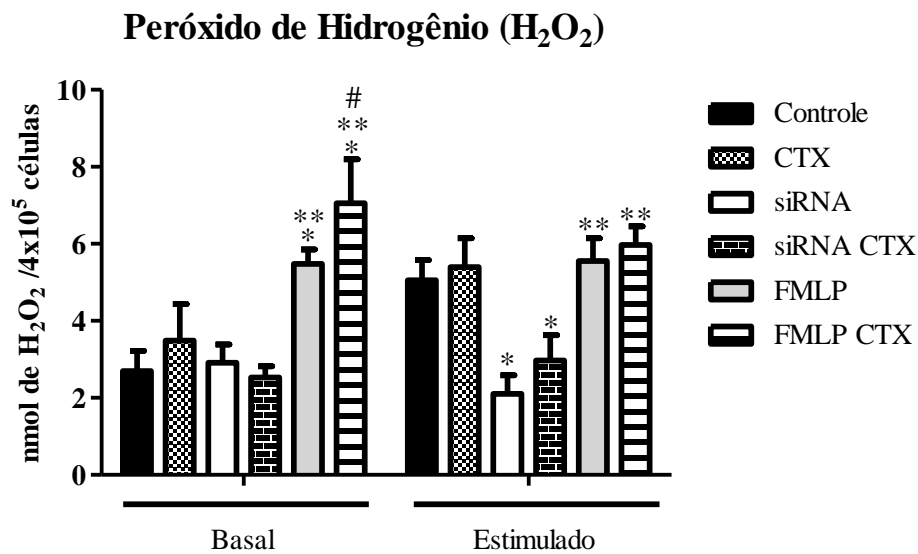
Células THP-1 diferenciadas em macrófagos silenciados para receptor de peptídeo formil em diferentes tratamentos. A- grupo controle; B-CTX (12,5 nM); silenciado em C para o receptor FPR; D- silenciado para receptor FPR e tratado com CTX; E- estimulado com FMLP e F- estimulado com FMLP e tratado com CTX.

4.5 Efeito da CTX sobre a liberação de H_2O_2 , por células THP-1 silenciadas para receptores peptídeo formil

É possível notar que em células THP-1 não diferenciadas, observamos o mesmo modelo que a literatura demonstra, ou seja, um aumento de H_2O_2 nas células tratadas com CTX tanto na linha de base quanto estimuladas com PMA, e em diferentes grupos (**Figura 16**).

Ainda na **Figura 16**, nas células silenciadas estimuladas com PMA, observamos um ligeiro aumento de H_2O_2 quando tratadas com CTX. Nos grupos controle e FMLP tratado, observamos um aumento de H_2O_2 quando tratados com CTX, tanto na situação basal quanto na estimulada. Também é possível observar que nos grupos estimulados com PMA, as células entram em um platô, sem diferença significativa entre o controle e o FMLP.

Figura 16: Efeito da CTX em produção de H₂O₂ em células THP-1 em situações basais e estimuladas com PMA



Efeito da CTX na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pelas células THP-1 silenciadas e estimuladas com FMLP em situações basais e estimuladas em diferentes grupos. A média \pm e.p.m. para 3 amostras por grupo e representativo de 3 ensaios separados. * p < 0,05 comparado com os respectivos grupos de controle. ** p < 0,05 comparado com os respectivos grupos siRNA. # p < 0,05 em comparação com outros grupos basais.

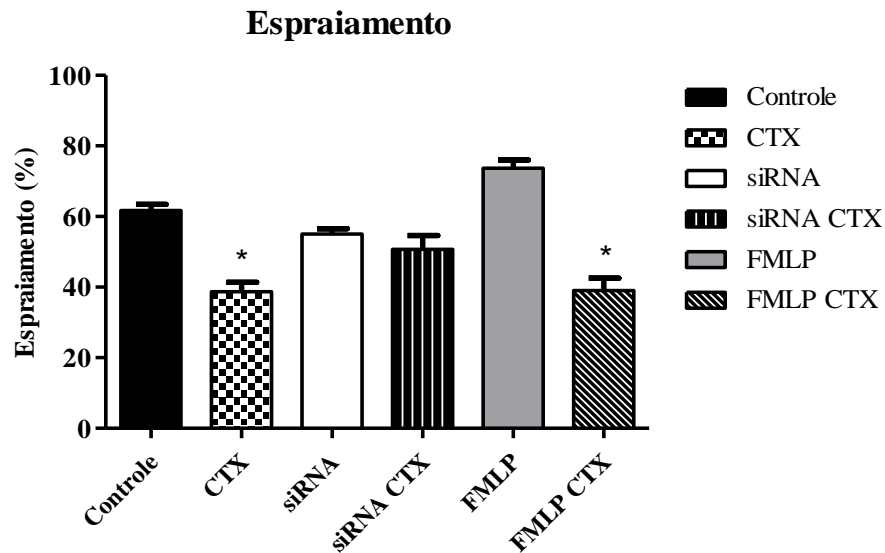
4.6 Efeito da CTX sobre o espraiamento de células THP-1 diferenciadas em macrófagos silenciadas para receptores peptídeo formil

Com relação às atividades da CTX na função de espraiamento das células, podemos observar na **Figura 17 A** que as células THP-1 diferenciadas em macrófagos e tratadas com CTX reduzem o percentual de espraiamento em 35% quando comparado ao controle. No grupo estimulado com FMLP, a redução é ainda maior, atingindo cerca de 47% de inibição. Nos grupos silenciados, a porcentagem de espraiamento das células é muito semelhante, sem diferença entre o grupo tratado com CTX e o grupo controle.

Analisando o perfil qualitativo, na **Figura 17 B**, é possível observar mostram as protuberâncias durante a disseminação das células, correspondendo a lamelipódios (protrusões anteriores) e filópodes (protrusões posteriores) representadas pelas setas vermelhas. As setas verdes demonstram o aumento das estruturas do vacúolo no interior das células, característico do aumento da atividade metabólica induzida pela CTX.

Figura 17: Efeito da CTX em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e silenciadas sobre a atividade de espraiamento

A



B

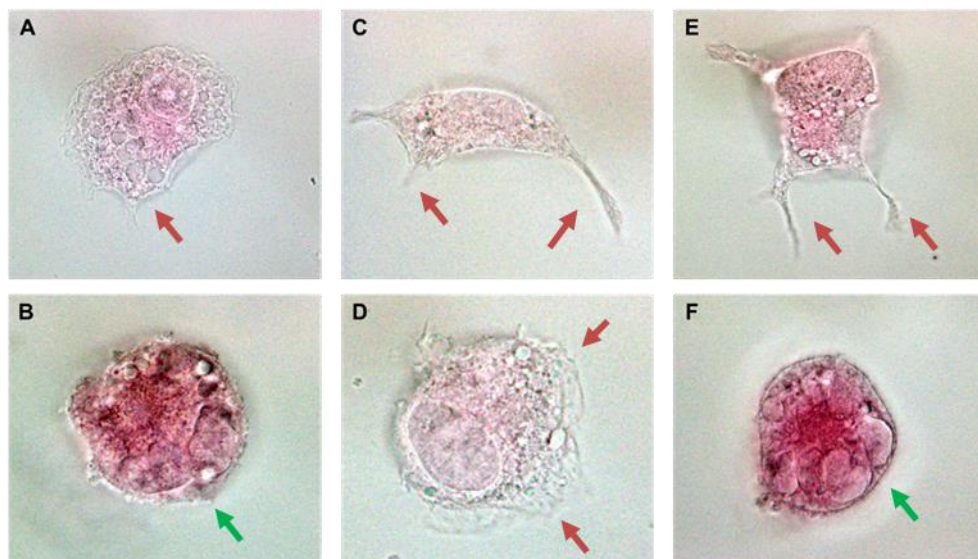


Gráfico representativo do efeito da CTX na atividade de espalhamento por células THP-1 diferenciadas em controle, silenciadas e estimuladas com grupos FMLP. O painel de células é representativo dos resultados do gráfico acima, sendo: A- Grupo controle; B- CTX (12,5 nM); silenciado em C para o receptor FPR; D- silenciado para receptor FPR e tratado com CTX; E- estimulado com FMLP e F- estimulado com FMLP e tratado com CTX. As setas vermelhas mostram as protuberâncias durante a disseminação das células, correspondendo a lamelipódios (protrusões anteriores) e filópodes (protrusões posteriores). As setas verdes demonstram o aumento das estruturas do vacúolo no interior das células. A média \pm e.p.m. para 3 amostras por grupo e representa 3 ensaios distintos. * $p < 0,05$ comparado com os respectivos grupos de controle.

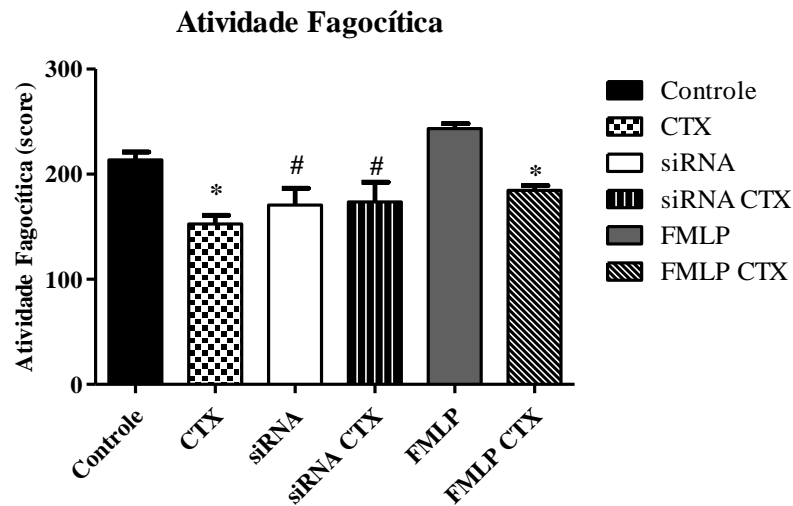
4.7 Efeito da CTX sobre a fagocitose de células THP-1 silenciadas para receptores peptídeo formil

Semelhante ao efeito no espriamento, porém em células não diferenciadas, na atividade de fagocitose, também observamos uma redução no *score* de partículas fagocitadas no grupo tratado com CTX em comparação ao grupo controle (29%) (**Figura 18**). No grupo estimulado com FMLP a redução é de 24% e nos grupos silenciados não houve diferenças significativas entre controle e CTX, mas houve diferença entre silenciado e controle estimulado com FMLP (aumento de aproximadamente 42%).

Ainda na **Figura 18 B**, é possível observar qualitativamente o perfil dessas células nos diferentes grupos e detalhando as partículas de zimosan fagocitadas pelas células representadas pelas setas vermelhas e o aumento das estruturas do vacúolo no interior das células, representado pelas setas verdes, perfil característico do aumento da atividade metabólica induzida pela CTX

Figura 18: Efeito da CTX em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e silenciadas sobre a atividade fagocítica

A



B

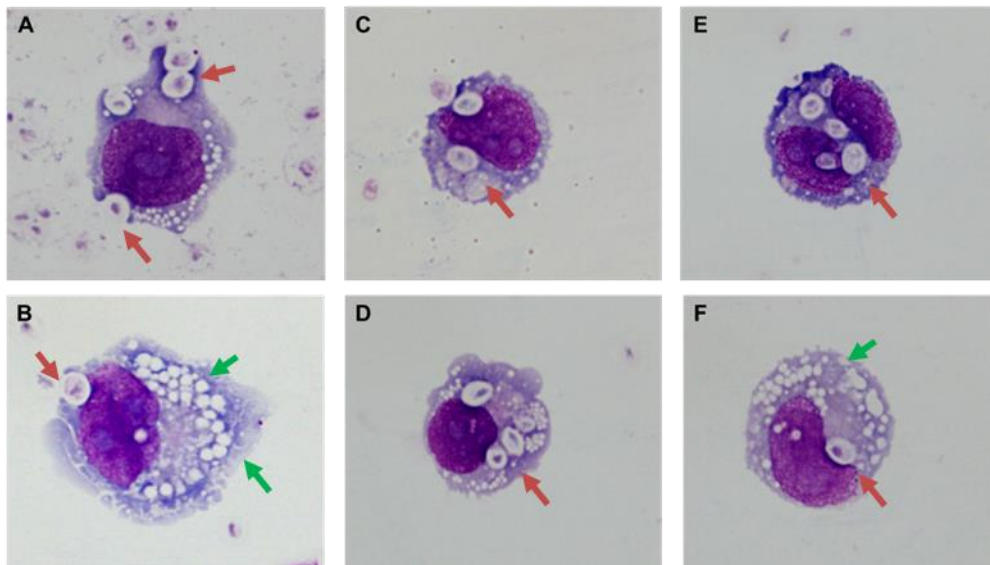


Gráfico representativo do efeito da CTX na atividade fagocítica pelas células THP-1 no controle, silenciadas e estimuladas com grupos FMLP. O painel de células é representativo dos resultados do gráfico acima, sendo: A- Grupo controle; B-CTX (12,5 nM); silenciado em C para o receptor FPR; D- silenciado para receptor FPR e tratado com CTX; E- estimulado com FMLP e F- estimulado com FMLP e tratado com CTX. As setas vermelhas mostram as partículas de zimozan fagocitadas pelas células. As setas verdes demonstram o aumento das estruturas do vacúolo no interior das células. A média \pm e.p.m. para 3 amostras por grupo e representa 3 ensaios distintos. * $p < 0,05$ comparado com os respectivos grupos de controle. # $p < 0,05$ em comparação com o grupo de controle de siRNA.

4.8 Expressão e Ativação do Receptor de Peptídeo Formil

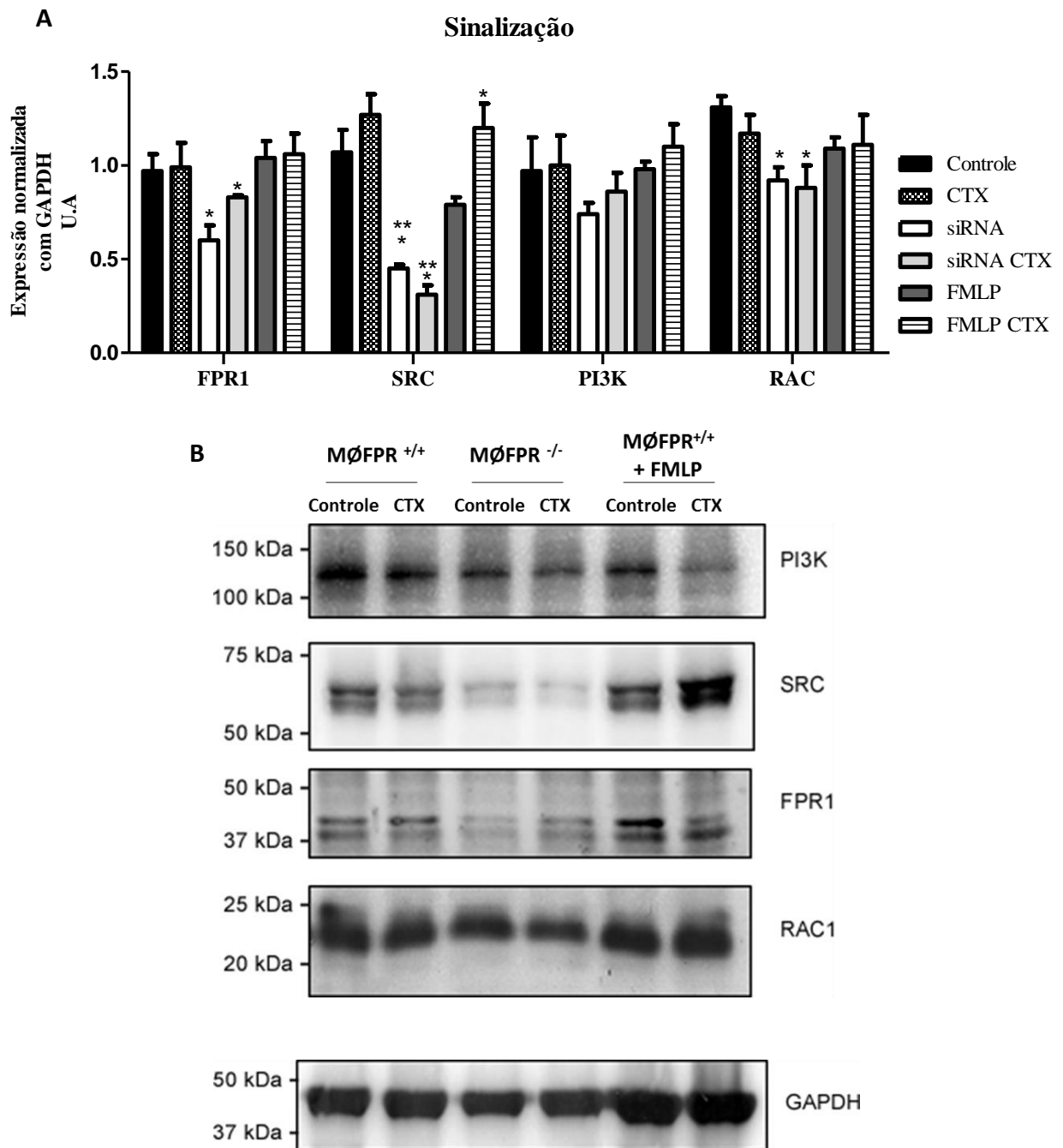
Para melhor entendimento das alterações nas atividades funcionais induzidas por CTX (12,5 nM) em células silenciadas para o receptor de peptídeo formil, foram realizados ensaios de *western blotting* para verificar se a incubação com CTX foi capaz de induzir um aumento na expressão dos receptores de FPR e quais as proteínas envolvidas com as vias de sinalização dos receptores são moduladas pela CTX.

Podemos observar que a expressão dos receptores FPR1 foi reduzida em cerca de 38% sem tratamento com CTX e, após o tratamento, é possível observar que a expressão desses receptores aumenta, com diferença entre os grupos controle e silenciados apenas 14% (**Figura 19**).

A expressão nos níveis de PI3K foi muito semelhante em todos os grupos, sem diferenças estatísticas significativas entre eles. Por outro lado, podemos ver ainda na **Figura 19** que houve uma redução de 33% em RAC nos grupos silenciados em comparação ao grupo controle e 19% quando comparado ao grupo estimulado com FMLP. Em relação aos tratamentos com CTX, podemos observar uma ligeira redução de RAC quando comparado aos grupos controle nas células não silenciadas e silenciadas.

Também foi observada uma redução de 58% na expressão de Src quando as células foram silenciadas para FPR e 71% quando foram silenciadas e tratadas com CTX. Também podemos notar um aumento de Src ao comparar o grupo não silenciado e o grupo controle (18%). Nos grupos estimulados com FMLP, essa diferença entre tratados com CTX e controle é ainda maior (51%).

Figura 19: Efeito da CTX na expressão e ativação de receptores peptídeo formil



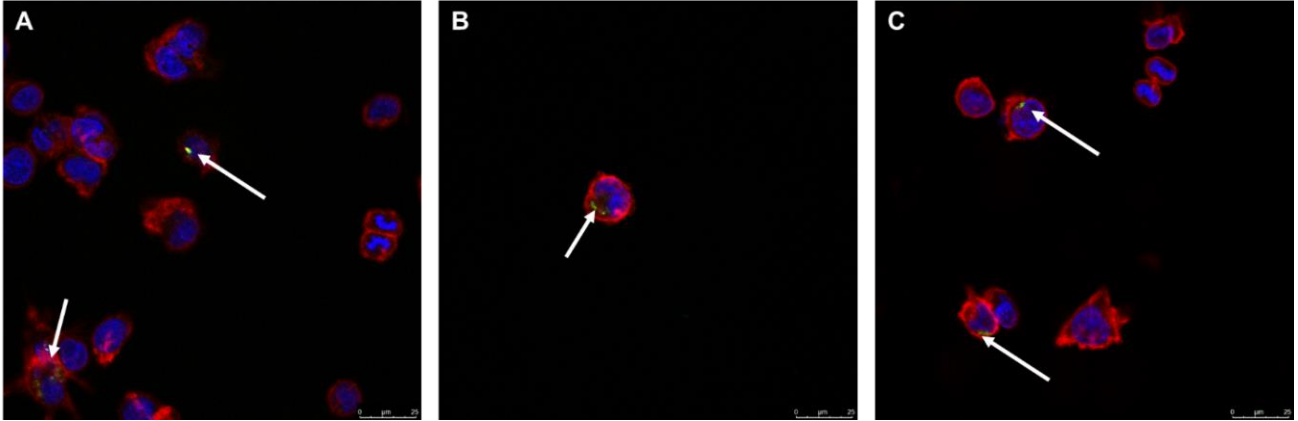
Efeito da CTX na expressão de receptores e proteínas (FPR1, RAC1, SRC e PI3K). Os valores são normalizados pela expressão de GAPDH e apresentados como intensidades das bandas PI3K, SRC, FPR1, RAC1 (A) e quantificados por densitometria dos *western blots* homogeneizados (B). A média \pm e.p.m. para 3 amostras por grupo e representa 3 ensaios distintos. * $p < 0,05$ comparado com os respectivos grupos de controle. ** $p < 0,05$ em comparação com todos os outros grupos relacionados à proteína SRC.

4.9 Avaliação da permeabilidade à membrana - Marcação fluorescente da crotoxina

Nas **Figuras 20** e **21**, foi possível observar a entrada de toxina nas células estando silenciadas ou não. Independentemente também da diferenciação, a entrada foi observada em um modelo de células não diferenciadas, ou seja, monócitos (**Figura 20**) e diferenciadas em macrófagos das células THP-1 (**Figura 21**).

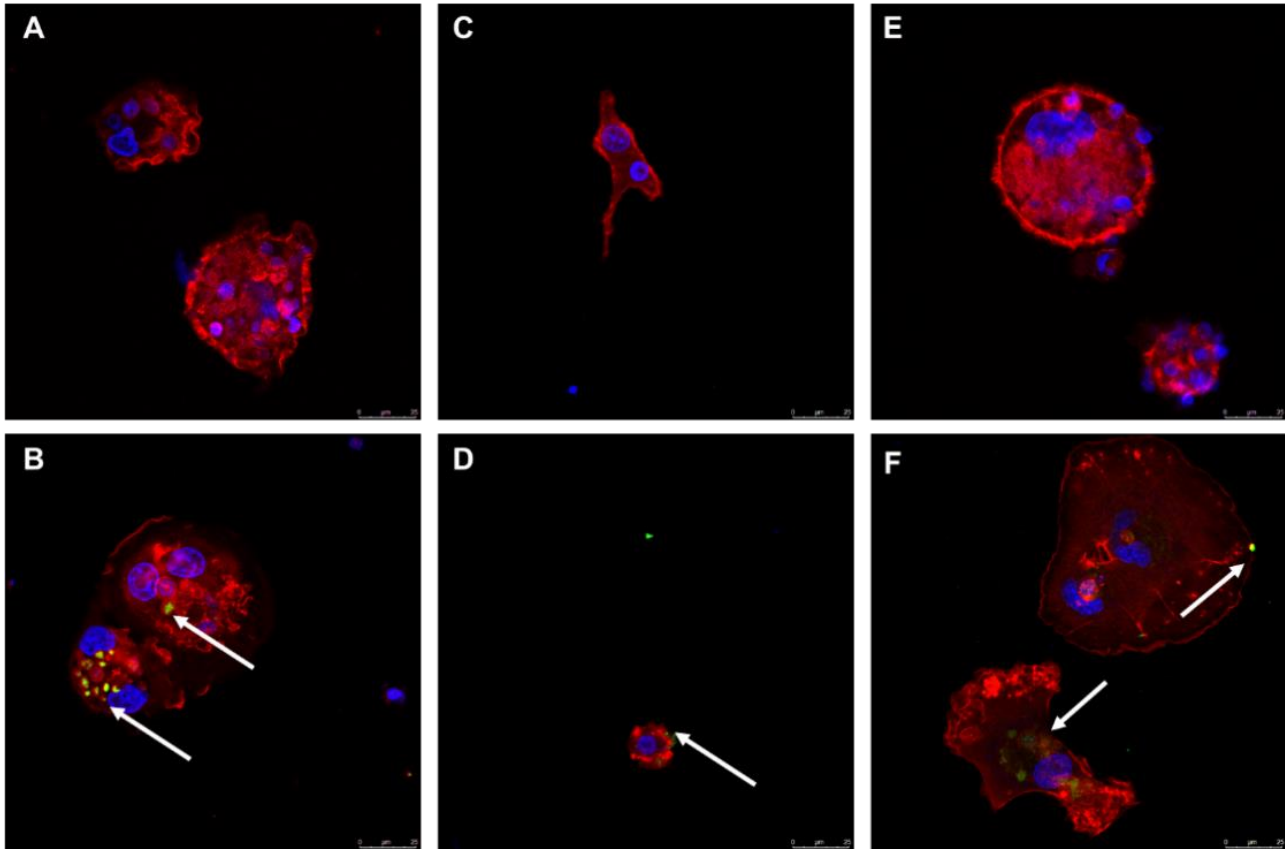
Ainda, na **Figura 22** é possível observar que o uso de diferentes concentrações de Boc-2 (50 ou 100 μ M, por 40 min) não interferiu na entrada de CTX nos macrófagos, significando que o FPR-2 (principalmente) não é crucial para a entrada da toxina no ambiente intracelular.

Figura 20: Participação dos receptores peptídeo formil na entrada da toxina marcada em células THP-1 não diferenciadas



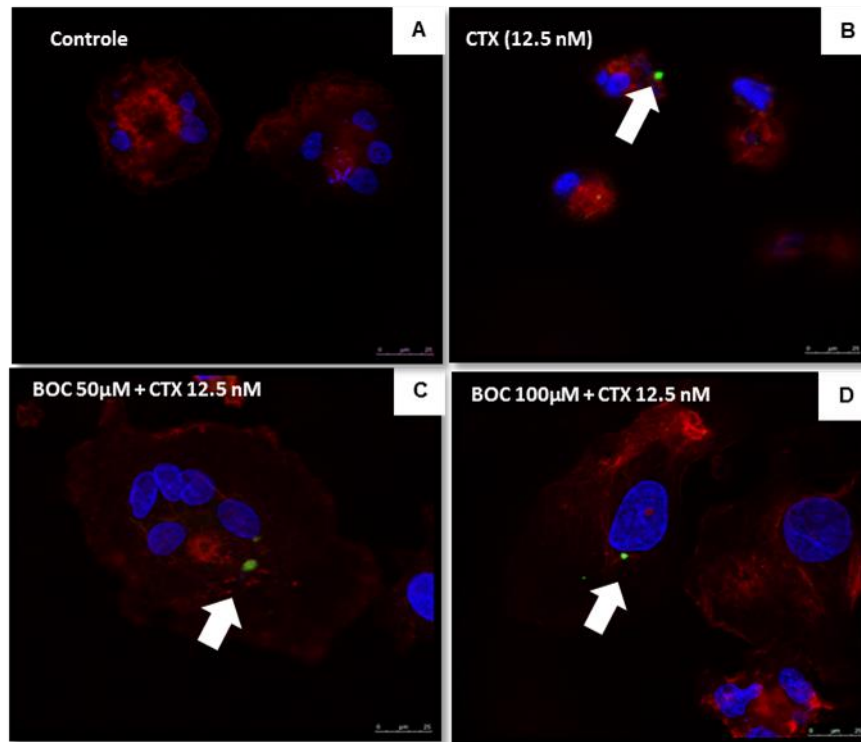
Visualização de CTX marcada com FITC (verde) em células não diferenciadas THP-1 após 2 horas de incubação. **A-** CTX (12,5 nM); **B-** silenciado para receptor FPR e tratado com CTX; **C-** estimulado com FMLP e tratado com CTX. É possível observar os filamentos de actina em vermelho e o núcleo celular em azul. Imagens obtidas em microscópio confocal em objetiva de 45x.

Figura 21: Participação dos receptores peptídeo formil na entrada da toxina marcada em células THP-1 diferenciadas



Visualização de CTX marcada com FITC (verde) em macrófagos diferenciados de células THP-1 após 2 horas de incubação. **A**- grupo controle; **B**- CTX (12,5 nM); Silenciado em **C** para o receptor FPR; **D**- silenciado para receptor FPR e tratado com CTX; **E**- estimulado com FMLP e **F**- estimulado com FMLP e tratado com CTX. É possível observar os filamentos de actina em vermelho e o núcleo celular em azul. Imagens obtidas em microscópio confocal em objetiva de 45x.

Figura 22: Participação dos receptores peptídeo formil na entrada da toxina marcada em células THP-1 diferenciadas e incubadas com BOC-2



Visualização de CTX-FITC marcado em macrófagos diferenciados de células THP-1, após incubação anterior com diferentes concentrações de Boc-2, um antagonista seletivo de FPR-2. Em **A**: células THP-1 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) aderidas às lamínulas de vidro, incubadas com meio RPMI contendo FITC (controle) ou **B**: CTX-FITC marcada (12,5 nM), por 2 horas. Em **C**, **D**: células THP-1 ($2,5 \times 10^5$ células/poço) aderiram às lamínulas de vidro, previamente incubadas com Boc-2 (50 ou 100 μM , respectivamente), por 40 min. Em seguida, as células foram incubadas com CTX-FITC marcada (12,5 nM). FITC (verde) e citoesqueleto de actina visualizados com a marca Rodamina (vermelho). Imagens obtidas em objetiva 40x em microscopia confocal.

4.10 Comportamento térmico (DSC) de diferentes lipídios na presença ou ausência de CTX

Para este ensaio, foram utilizados 3 lipídios diferentes para avaliar o comportamento térmico da crotoxina com as vesículas lipídicas.

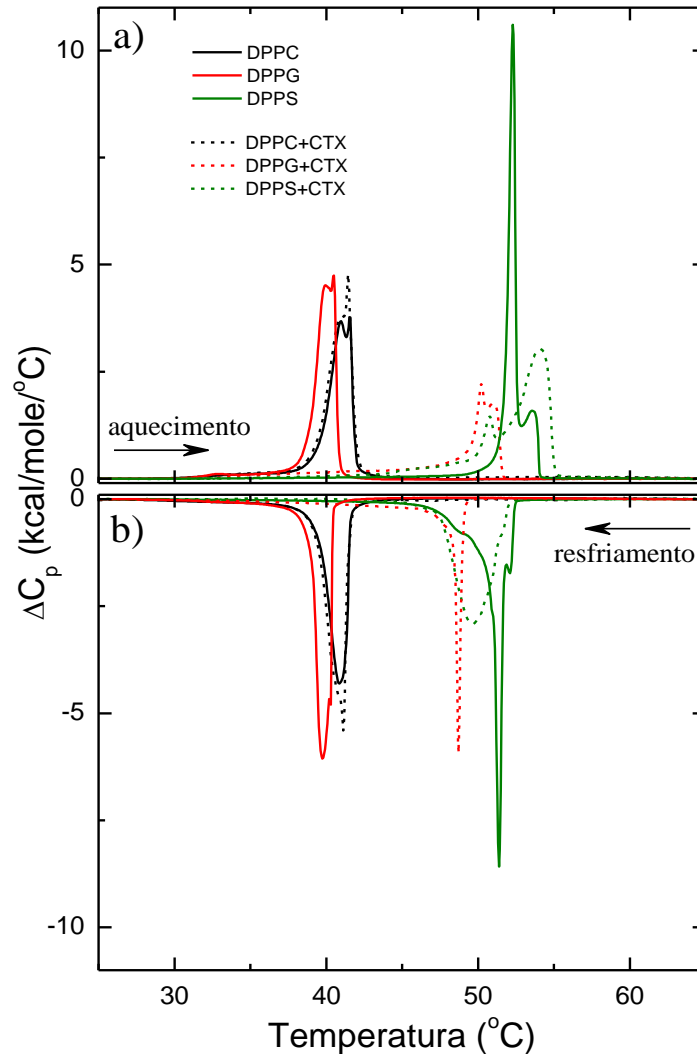
Conforme demonstrado na **Figura 23**, todos os LUVs dos lipídios puros apresentaram comportamento térmico esperado, sendo um uma pré-transição suave (dado que são vesículas extrusadas) seguida de uma transição principal. A transição principal dos lipídios DPPC (linhas pretas) e DPPG (linhas vermelhas), ocorre em $\sim 41,5$ °C e $40,5$ °C, respectivamente, e o DPPS (linhas verdes), apresenta a transição principal a $52,2$ °C aproximadamente. Já com a adição da CTX, em DPPC, não foi observada qualquer variação nas temperaturas da pré-transição ou transição principal. O que indica que a proteína não está provocando nenhum efeito sobre a estrutura das vesículas de DPPC.

Em DPPG (**Figura 23**) a transição principal com a adição da CTX, ocorre a ~ 50 °C, ou seja, 10 °C acima da temperatura de transição principal do lipídio puro.

No que diz respeito à interação da toxina com DPPS, a transição principal sofre um forte alargamento. É conhecido na literatura que um comportamento como este pode ser observado quando a proteína interage com ambas as fases lipídicas (HEIMBURG, 2007).

Todas essas diferenças de transições, são possíveis de serem observadas numericamente na **tabela 1**.

Figura 23: Perfis de capacidade de calor (ΔC_p) de DPPC, DPPG e DPPS, na ausência ou presença de CTX



Perfis típicos de excesso de capacidade de calor (ΔC_p) de 5 mM DPPC (preto), DPPG (vermelho) e DPPS (verde), na ausência (linha contínua) e presença (linha pontilhada) de 0,1 mol% CTX em relação a de concentração de lipídios: (a) aquecimento e (b) ciclos de resfriamento.

Tabela 1. Parâmetros térmicos calculados para a técnica de DSC

Amostras	<i>up scan</i>			<i>down scan</i>		
	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
DPPC	41.5 (1)	8.5 (5)	1.6 (2)	41.1 (2)	8.3 (6)	1.4 (2)
DPPC + CTX	41.4 (1)	9.0 (3)	1.7 (1)	41.1 (2)	9.0 (2)	1.4 (1)
DPPG	40.5 (1)	8 (1)	1.3 (1)	39.7 (2)	8.6 (6)	1.1 (1)
DPPG + CTX	49.8 (3)	7 (1)	1.1 (5)	48.5 (2)	5 (1)	0.29 (2)
DPPS	52.2 (1)	8.8 (2)	0.42 (3)	51.3 (1)	9.0 (5)	0.4 (1)
DPPS + CTX	54.1 (1)	10 (1)	3 (1)	49.6 (1)	8.7 (3)	2.7 (1)

Parâmetros térmicos calculados a partir dos dados calorimétricos da Figura 23. Temperatura de transição principal (T_m), variação de entalpia (ΔH) e largura a meia altura da transição principal ($\Delta T_{1/2}$), para o pico endotérmico (ciclo de aquecimento) e pico exotérmicos (ciclo de resfriamento). Os desvios padrão estimados referem-se à análise de duas amostras diferentes do mesmo sistema (M1 e M2).

4.11 Avaliação da permeabilidade da membrana em diferentes lipídios na presença ou na ausência de CTX

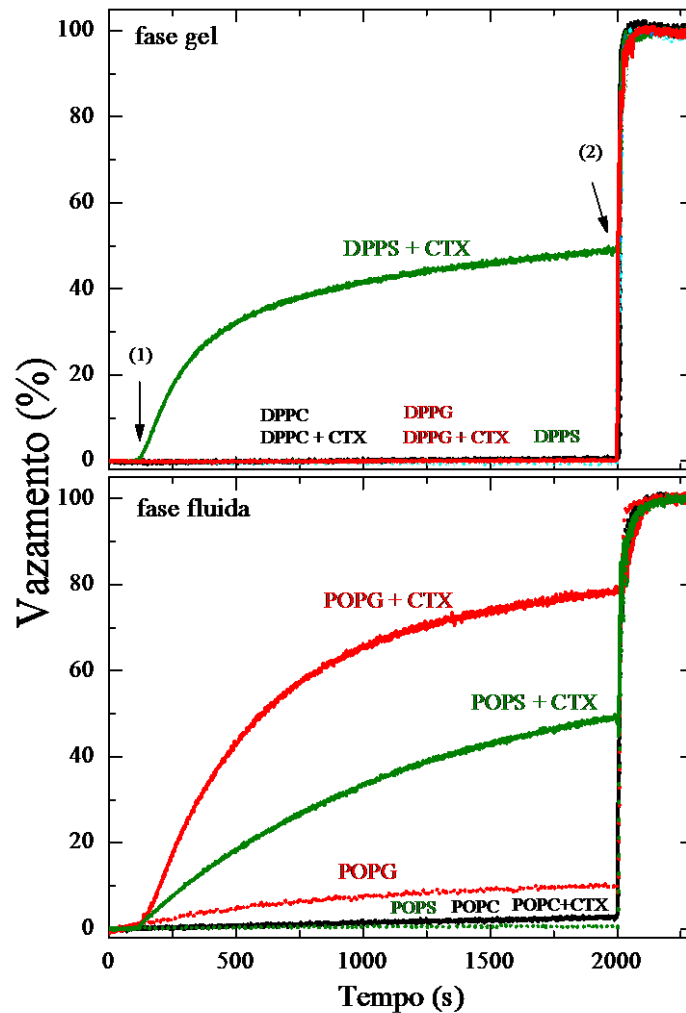
Neste experimento, confinamos o fluoróforo, carboxifluoresceína (CF), à alta concentração, no interior da membrana lipídica, de tal forma, que a fluorescência da CF se auto suprime e nenhuma emissão fluorescente pode ser observada em função do tempo. Durante o experimento, a molécula de interesse, neste caso a crotoxina, é adicionada à dispersão de vesículas com CF e caso a interação provoque alguma modificação na membrana, tal que, esta, se torna permeável, a CF que se encontrava no interior da vesícula passa pela membrana e vai para o ambiente externo (ENOKI et al., 2018).

Este experimento, quando realizado com vesículas dos lipídios puros estudados neste trabalho DPPC (linhas pretas), DPPG (linhas vermelhas) e DPPS (linhas verdes) na fase gel ($T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$), nenhum deles apresentaram fluorescência quando medidos durante 2000s. Com a adição da CTX, somente a membrana de DPPS apresenta emissão de fluorescência logo após a adição da proteína, portanto, indicando que a CTX causa vazamento do conteúdo interno da vesícula (**Figura 24**).

Este tipo de experimento não nos permite elevar a temperatura acima da transição de fase do DPPC, DPPG e DPPS, uma vez que durante o processo de aquecimento, os lipídios puros já apresentam forte vazamento espontâneo. Neste contexto, para observarmos a interação destas cabeças polares (PC, PG e PS) com a CTX, utilizamos lipídios que já apresentassem características da fase fluida à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), mesmas cabeças polares e cadeias hidrocarbônicas de tamanhos semelhantes as estudadas neste trabalho POPC (linhas pretas), POPG (linhas vermelhas) e POPS (linhas verdes) (ENOKI et al., 2018).

É possível observar na **Figura 24** que os lipídios puros POPC e POPS não apresentam nenhum vazamento espontâneo, somente o POPG apresenta um pequeno vazamento espontâneo abaixo de 10%, no período da medida. Porém, quando se adiciona a CTX, tanto o POPG quanto POPS, apresentam um forte vazamento.

Figura 24: Cinética de vazamento de CF através de LUVs compostos de diferentes lipídios nas fases gel e fluida na ausência ou presença de CTX



Cinética de vazamento de CF através de LUVs compostos por 100 μM de DPPC, DPPG e DPPS, na fase gel, e POPC, POPG e POPS na fase fluida, na ausência e presença de 0,1 mol% de CTX em relação a concentração do lipídio. Todos os experimentos foram realizados a 25 $^{\circ}\text{C}$. A seta (1) indica o momento em que a proteína foi injetada e a seta (2) o momento em que o surfactante foi adicionado.

4.12 Avaliação das interações lipídio/proteína – marcadores de spin próximos à superfície da bicamada (5-PCSL)

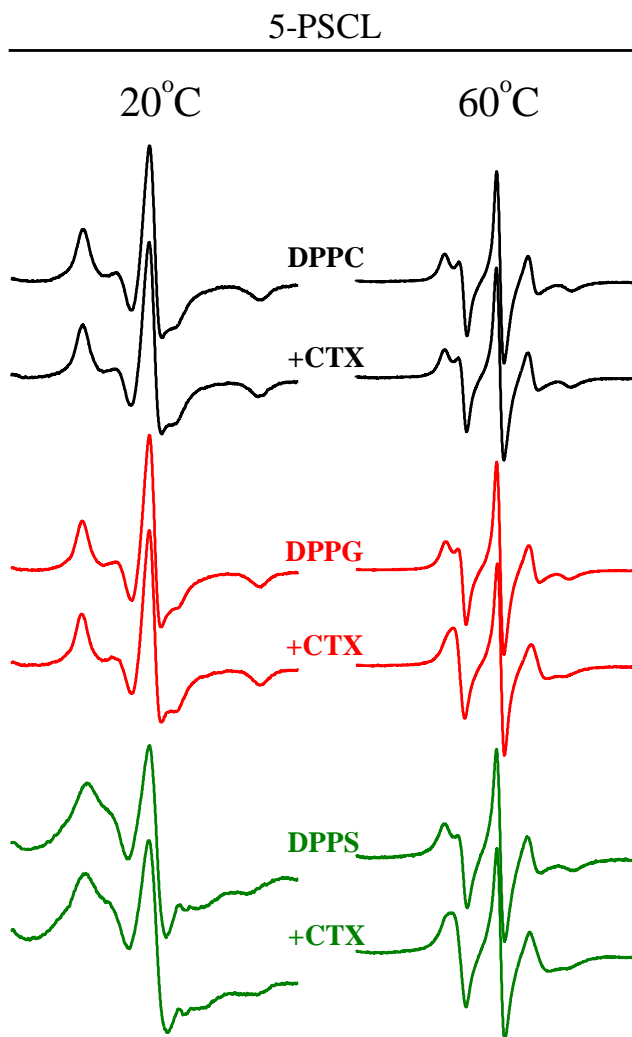
Os espectros obtidos do marcador de spin 5-PCSL (próximo à cabeça polar) em membranas de DPPC (linhas pretas) demonstraram que não há diferenças significativas na ausência ou na presença de CTX, tanto na fase gel (20 °C), quanto na fase fluida (60 °C) (**Figura 25**).

O mesmo pode ser observado nos espectros deste marcador em DPPG (linhas vermelhas), na fase gel em presença e ausência da proteína, portanto nenhuma mudança significativa foi observada. Porém, muito interessante, é que a bicamada de DPPG, na presença de CTX, apresenta uma forte perda da ordem, alterando a característica do espectro a 60 °C, ou seja, fase fluida, comparando na ausência e presença da CTX (**Figura 25**).

Finalmente, para o 5-PCSL inserido em membranas de DPPS (linhas verdes) puro, nitidamente o marcador de spin apresenta um efeito de troca, isto é, é possível que o marcador de spin não esteja se distribuindo homogeneamente na bicamada lipídica e o mesmo ocorre com a adição de CTX, em DPPS, um forte efeito de troca.

Os espectros deste marcador nos diferentes lipídios DPPC, DPPG e DPPS, podem ser observados nas temperaturas de 20 °C à 70 °C na **Figura 26** (A, B, C).

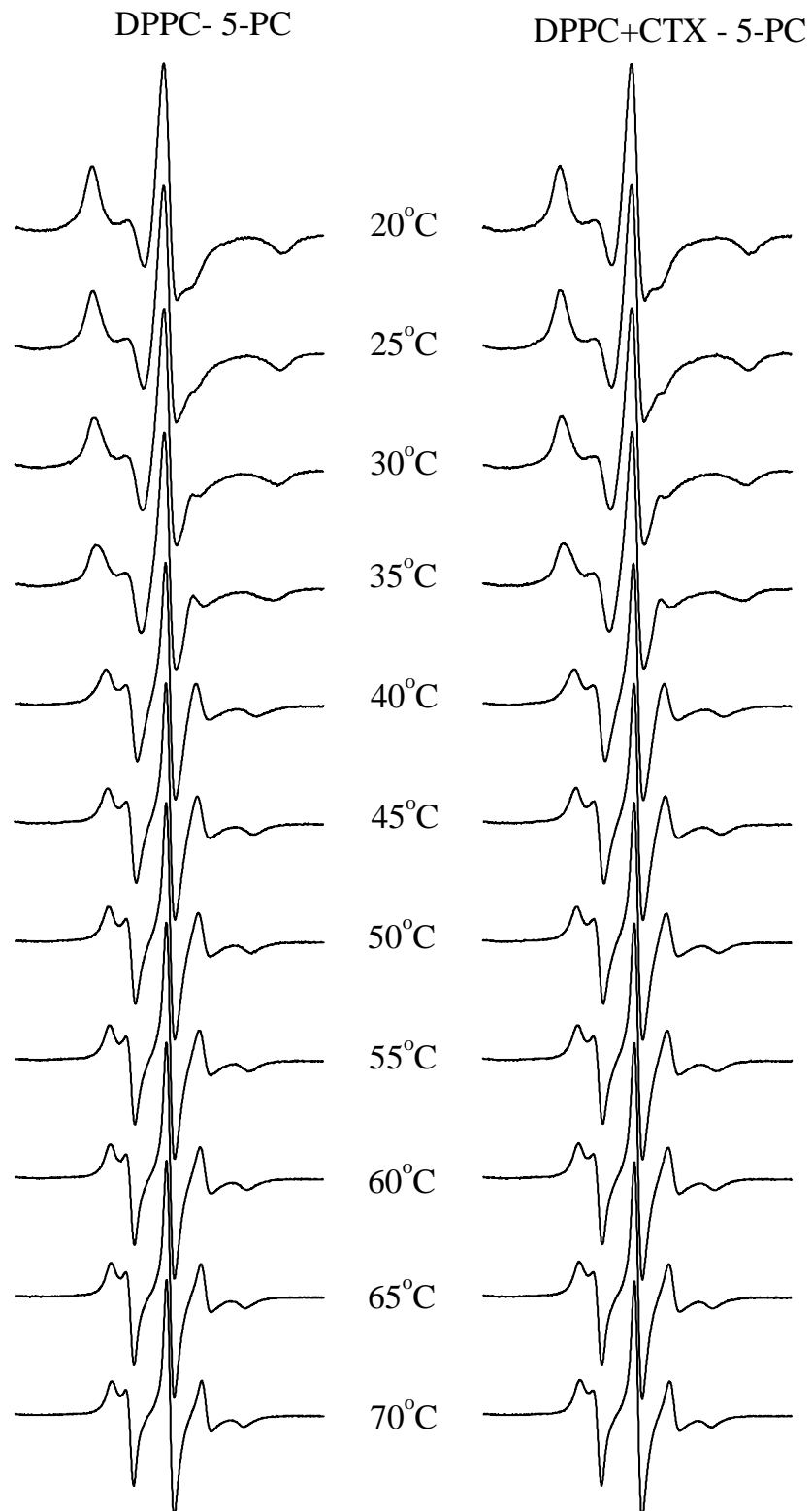
Figura 25: Perfis dos espectros de EPR do marcador de spin 5-PCSL incorporado em bicamadas lipídicas de: DPPC, DPPG e DPPS nas fases gel (20 °C) e fluida (60 °C) na ausência e presença de CTX



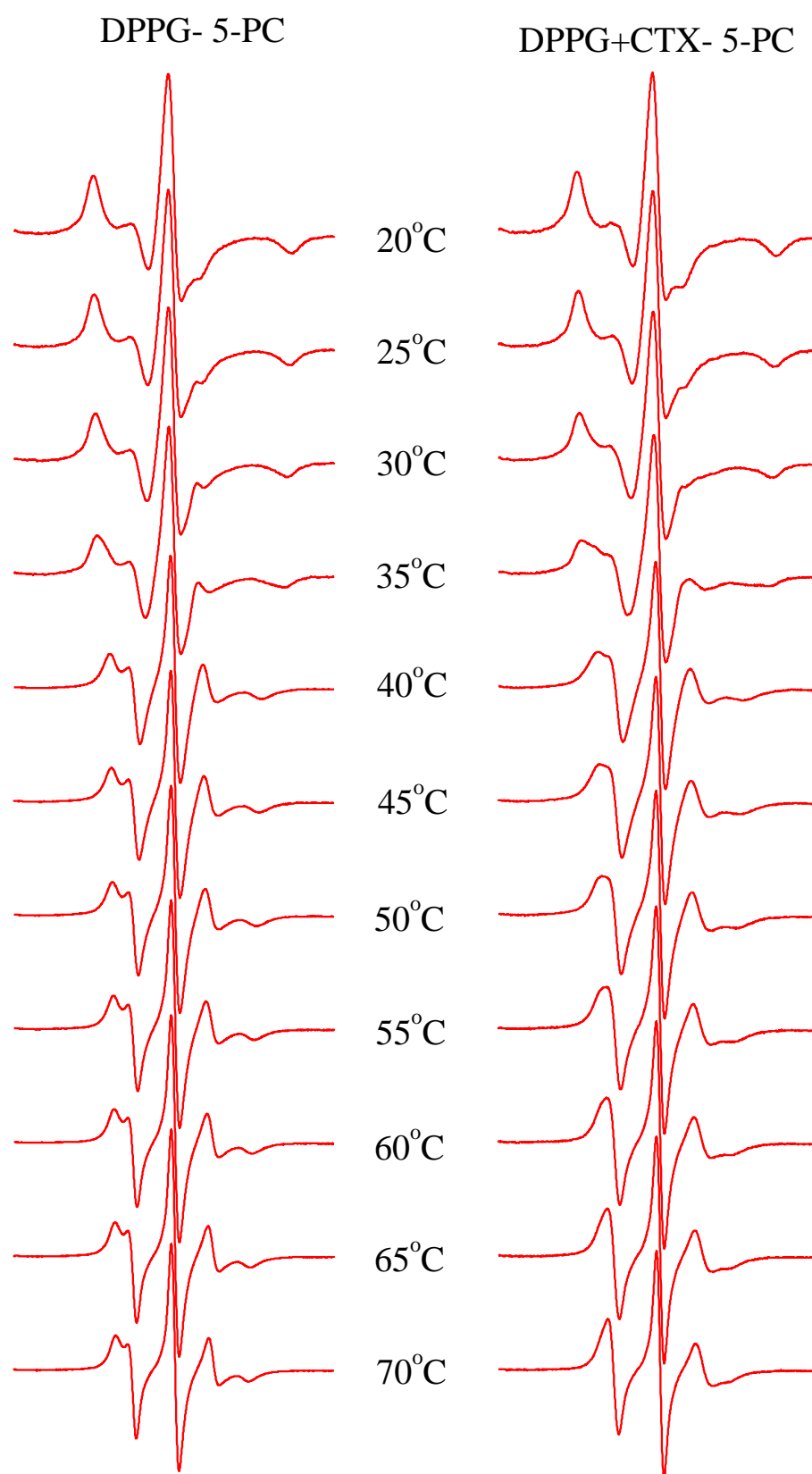
Espectros de EPR do marcador de spin, 5-PCSL incorporado em bicamadas lipídicas de: DPPC, DPPG e DPPS à 5 mM, solubilizados em tampão PBS na concentração 10 mM, pH 8.1, na ausência e presença de 0,1mol% de CTX, relativo à concentração do lipídio. Os espectros apresentados correspondem a fase gel (20 °C) e a fase fluida (60 °C) dos lipídios e sua largura total é de 100G.

Figura 26: Espectros de EPR das amostras de DPPC, DPPS e DPPG na ausência e presença da crotoxina, monitoradas na região próxima a cabeça polar pelo marcador de spin, 5-PCSL, em função da temperatura

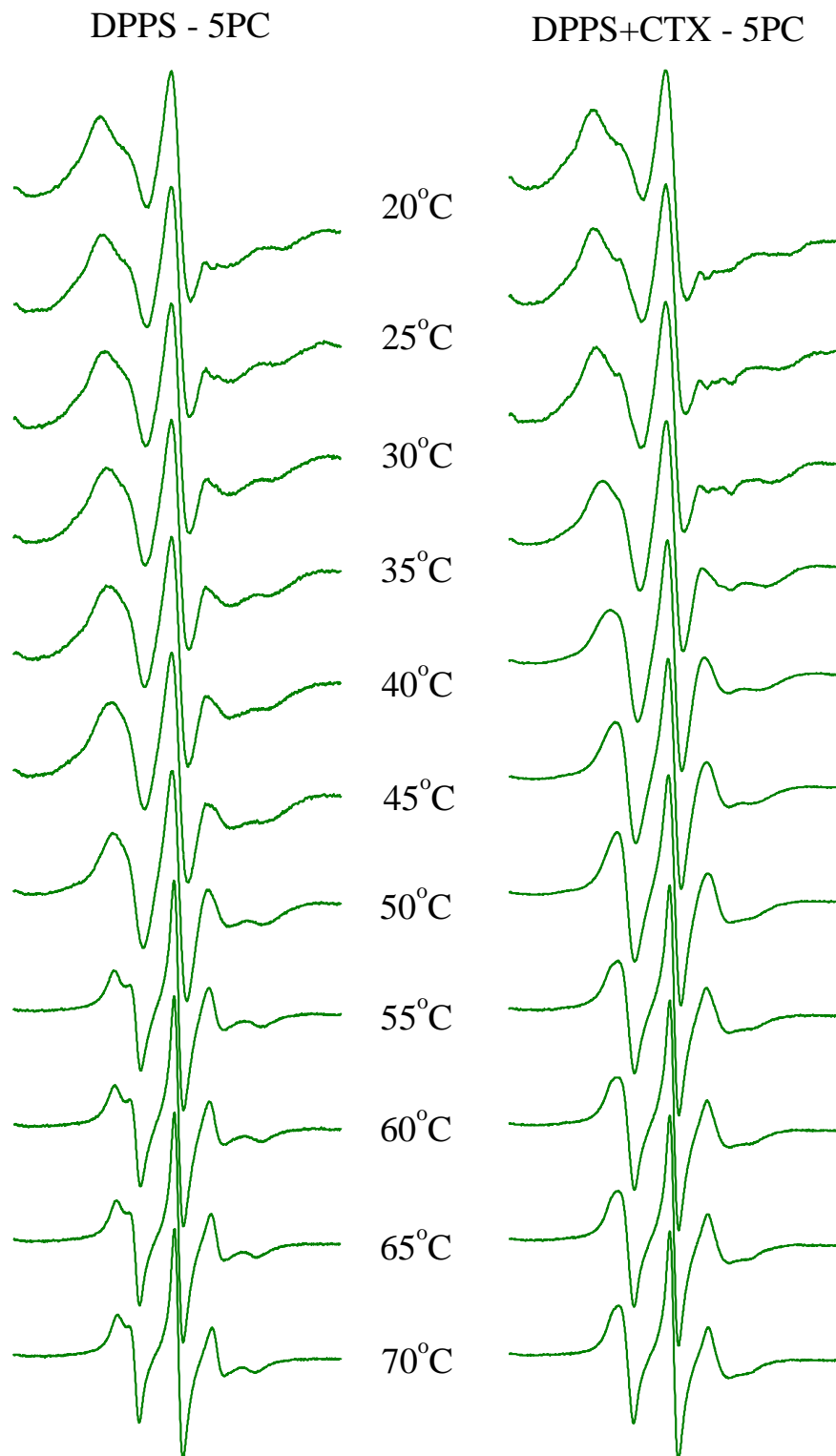
A



B



C



Dispersões lipídicas com DPPC (A), DPPG (B), DPPS (C) na concentração de 5mM foram diluídas em 10 mM de PBS incubadas na presença ou ausência de CTX e monitoradas na região próxima a cabeça polar pelo marcador de spin, 5-PCSL, em função de diferentes temperaturas.

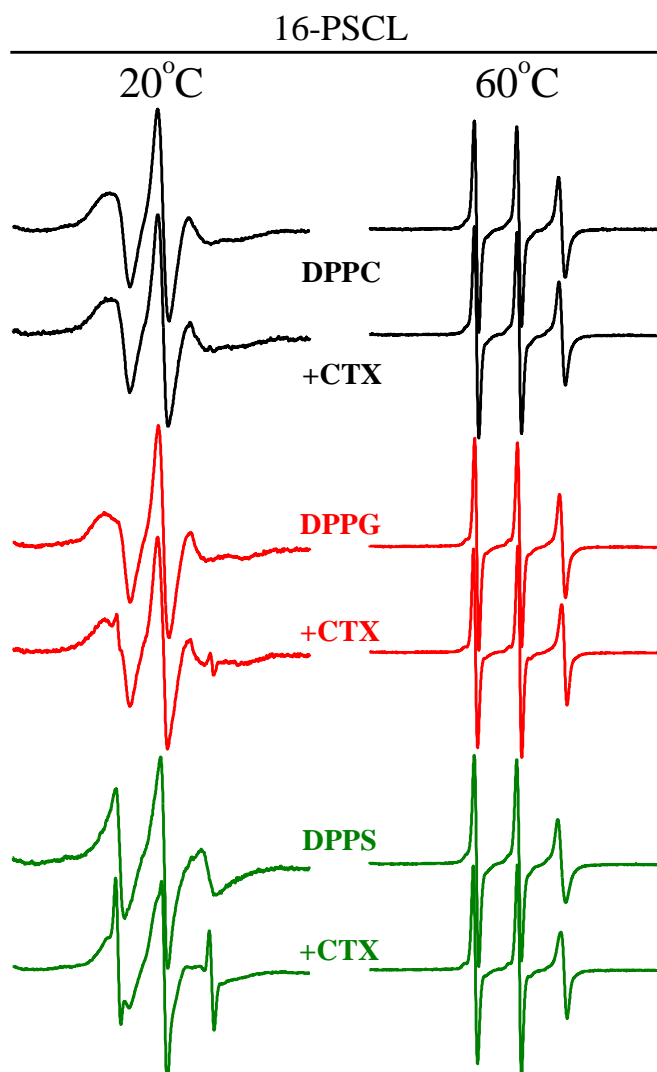
4.13 Avaliação das interações lipídio/proteína – marcadores de spin próximos ao centro da bicamada (16-PCSL)

Espectros do marcador de spin 16-PCSL (próximo ao centro da bicamada) inseridos em membranas de DPPC tanto na fase gel (20 °C), quanto na fluida (60 °C), na ausência ou presença da CTX, são bastante semelhantes, como se a interação proteína/lipídio, não causasse qualquer efeito sobre a estrutura/mobilidade da membrana, representado pelas linhas pretas na **Figura 27**. Os espectros deste marcador nos diferentes lipídios DPPC, DPPG e DPPS, podem ser observados nas temperaturas de 20 °C à 70 °C na **Figura 28 (A, B, C)**.

Em DPPG é observado efeito um pouco diferente na presença da CTX. O espectro do marcador 16-PCSL apresenta dois sinais simultaneamente, um deles, anisotrópico semelhante ao DPPG puro e um segundo sinal bastante móvel, efeito representado pelas setas na **Figura 28 B**. Na fase fluida de DPPG, os espectros sondados pelo marcador 16-PCSL não apresentam diferenças significativas, sendo necessário extrair os parâmetros empíricos hiperfinos para uma análise quantitativa.

O marcador de spin 16-PCSL em membranas de DPPS puro, parece sondar uma região mais móvel quando comparado aos outros lipídios na fase gel. Com a adição da CTX, um componente mais móvel se torna claro no espectro a 20 °C. Como se a interação da CTX aumentasse a fluidez das regiões mais fluidas da membrana de DPPS. Já na fase fluida do DPPS, os espectros tanto do lipídio puro quanto em presença da proteína, apresentam um alto grau de mobilidade. Curiosamente, o marcador de spin parece monitorar dois sítios distintos na bicamada de DPPS, um sítio com maior e outro com menor mobilidade, como indicado com círculos vermelhos. Este efeito é claramente observado na fase gel deste lipídio até 55 °C, quando ocorre a transição de fase. Na fase gel do DPPS + CTX, é possível observar um efeito mais pronunciado, também com dois sítios, onde, em um dos sítios o marcador de spin sonda uma região bastante móvel (indicado com setas, **Figura 28 C**) e um outro sítio com menor mobilidade. Com o aumento da temperatura os dois sítios se tornam um único na fase fluida como esperado.

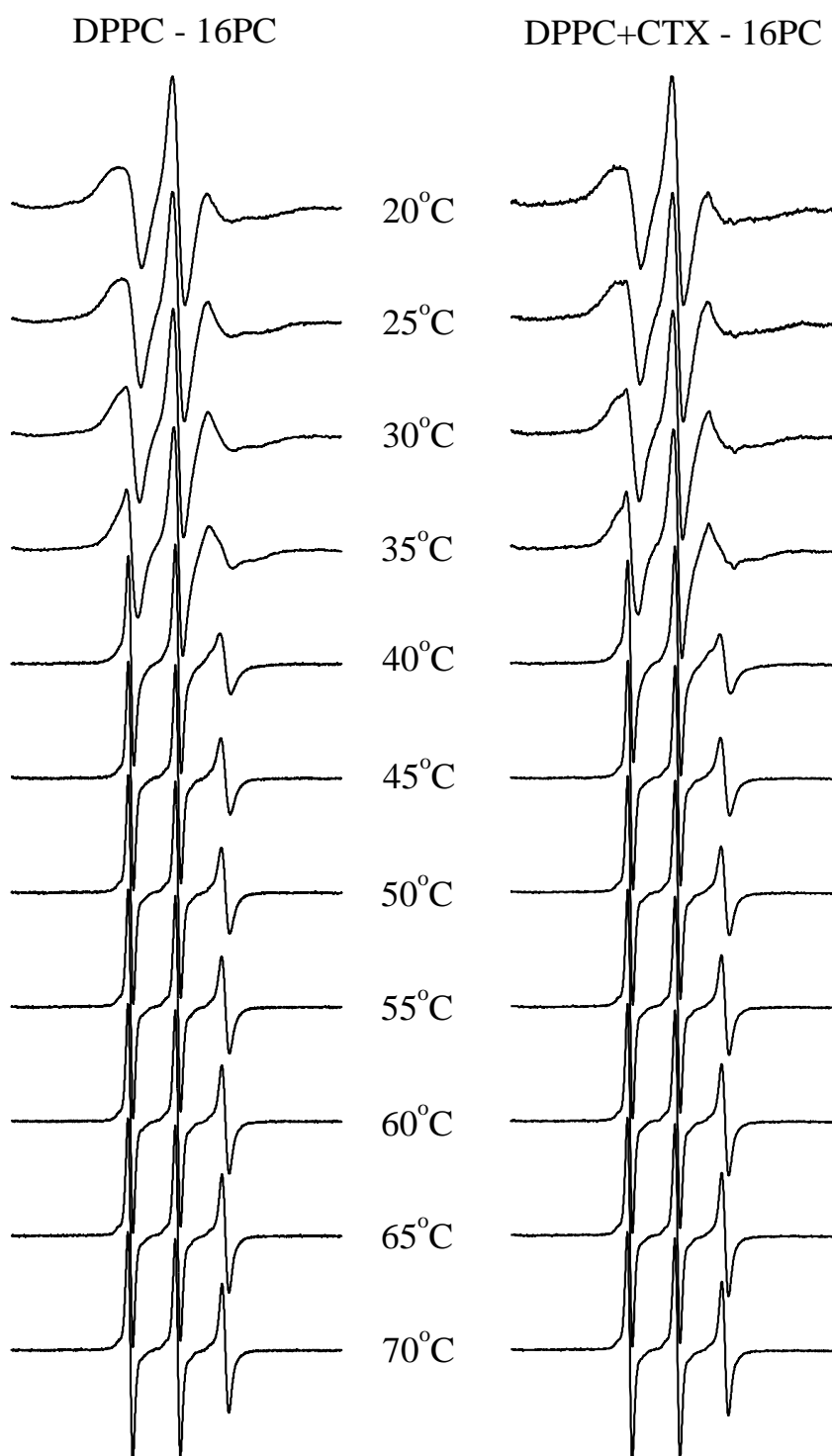
Figura 27: Perfis dos espectros de EPR do marcador de spin 16-PCSL incorporado em bicamadas lipídicas de: DPPC, DPPG e DPPS nas fases gel (20 °C) e fluida (60 °C) na ausência e presença de CTX



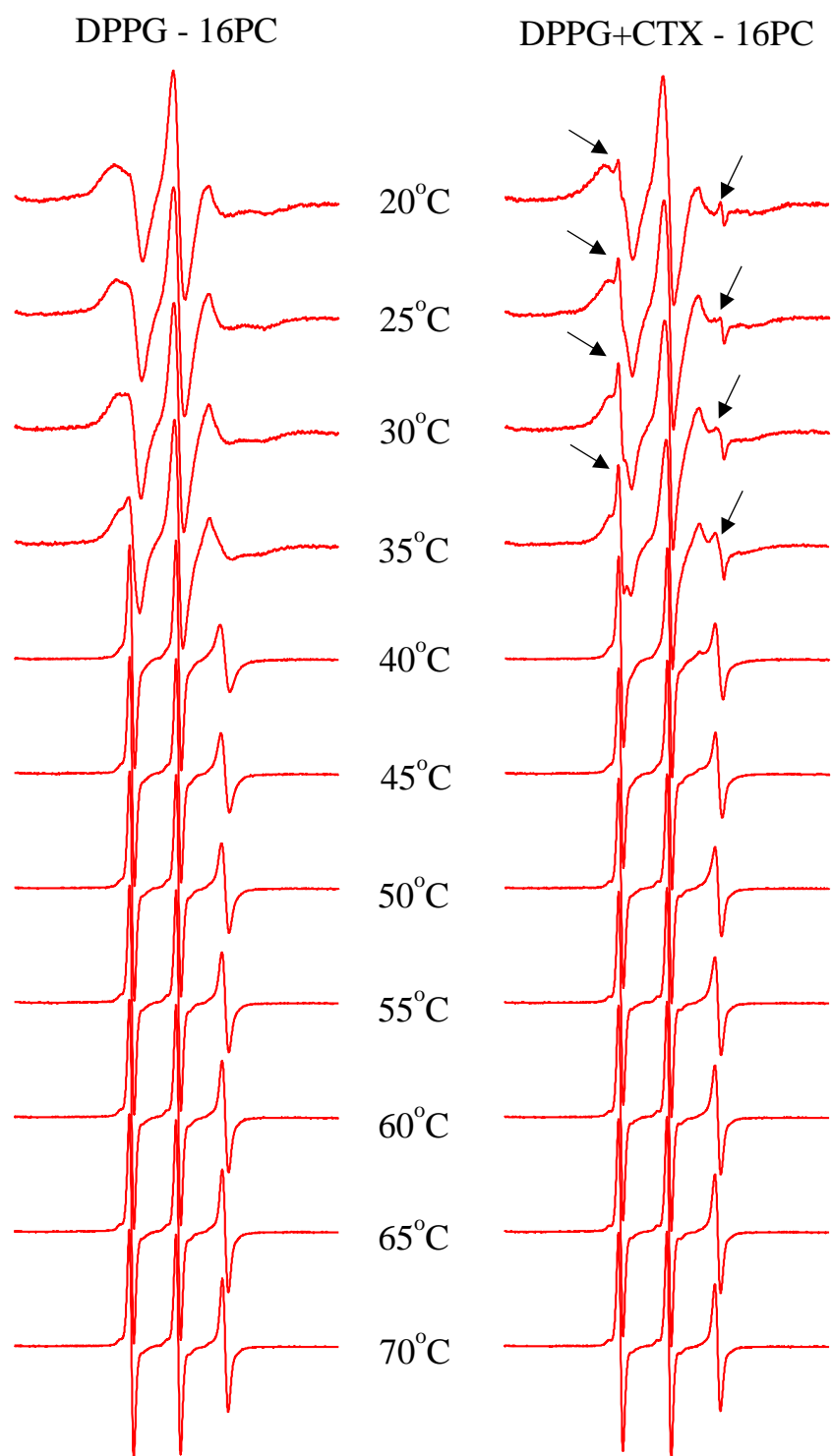
Espectros de EPR do marcador de spin, 5-PCSL incorporado em bicamadas lipídicas de: DPPC, DPPG e DPPS à 5 mM, solubilizados em tampão PBS na concentração 10 mM, pH 8.1, na ausência e presença de 0,1 mol% de CTX, relativo à concentração do lipídio. Os espectros apresentados correspondem a fase gel (20 °C) e a fase fluida (60 °C) dos lipídios e sua largura total é de 100G.

Figura 28. Espectros de EPR das amostras de DPPC, DPPS e DPPG na ausência e presença da crotoxina, monitoradas na região do centro da bicamada pelo marcador de spin, 16-PCSL / temperatura

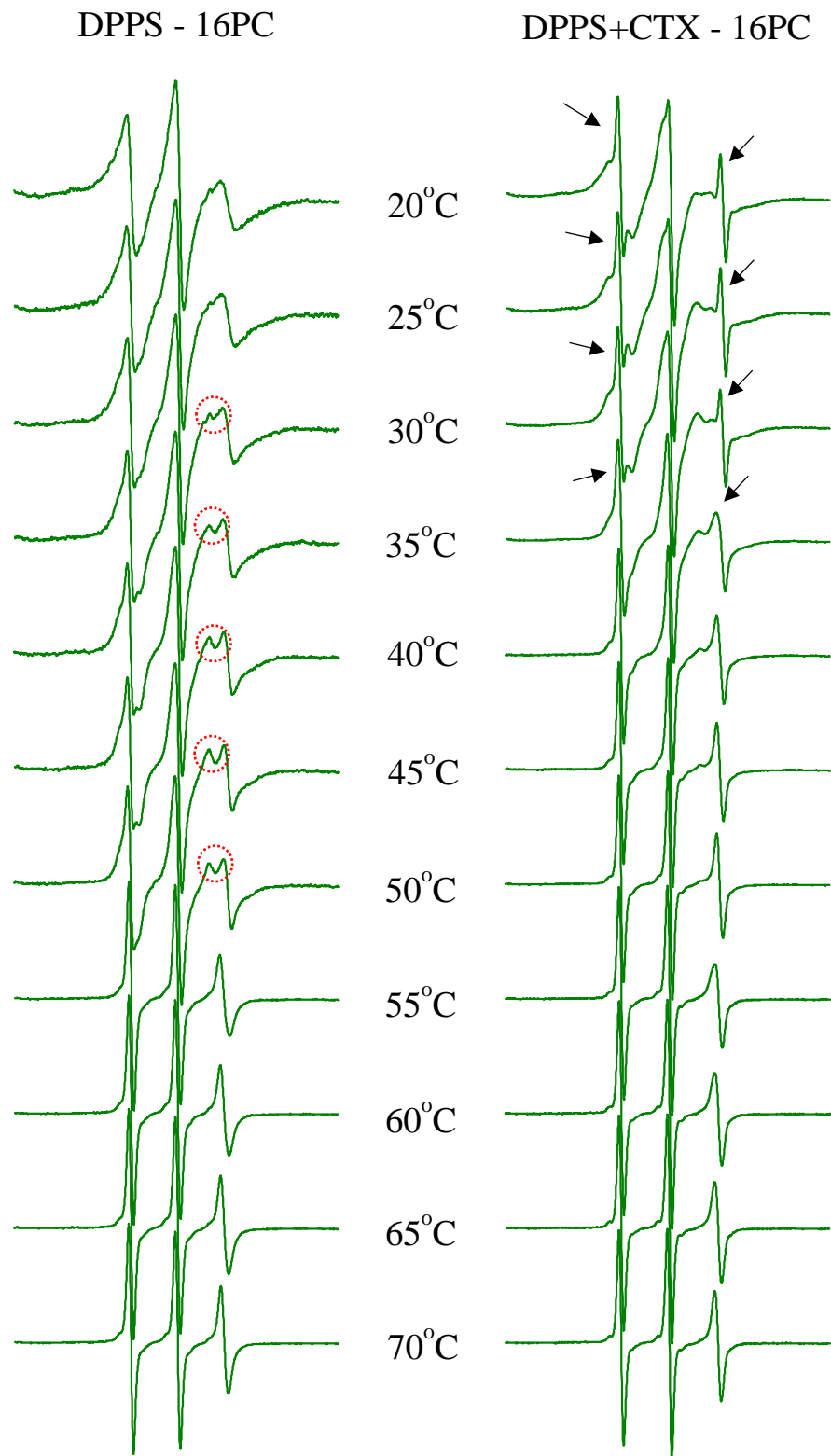
A



B



C



Dispersões lipídicas com DPPC (A), DPPG (B), DPPS (C) na concentração de 5 mM foram diluídas em 10 mM de PBS incubadas na presença ou ausência de CTX e monitoradas na região do centro da bicamada pelo marcador de spin, 16-PCSL, em função de diferentes temperaturas.

4.14 Análise dos diferentes parâmetros empíricos hiperfinos obtidos dos diferentes marcadores e lipídios na ausência e presença de CTX

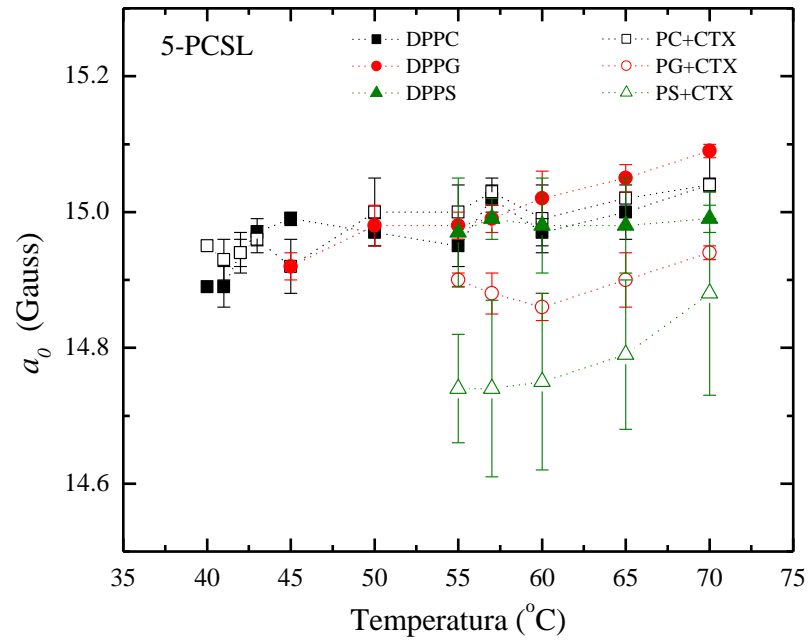
Foram extraídos e calculados diferentes parâmetros empíricos hiperfinos nos diferentes lipídios na ausência ou presença de CTX. Destes parâmetros, foram extraídos, a_0 de 5-PCSL e a_0 de 16-PCSL (fase fluída) (**Figuras 29 A e B**, respectivamente); S_{eff} de 5-PCSL (fase fluída) (**Figura 29 C**); A_{max} de 5-PCSL (fase gel) (**Figura 29 D**); h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 de 16-PCSL (**Figuras 29 E e F**, respectivamente).

Como esperado, de acordo com os perfis qualitativos dos espectros, não houve diferença no lipídio neutro DPPC, na ausência ou presença de CTX, tanto na fase gel, quanto fluída, em ambos marcadores de spin (5-PCSL e 16-PCSL).

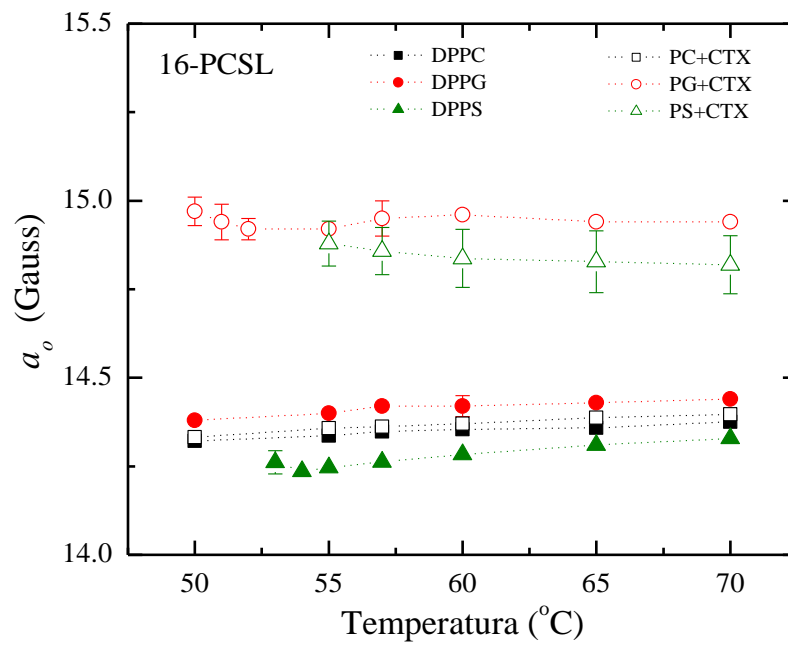
Em contrapartida, nos lipídios negativos DPPG e DPPS, foi possível observar algumas diferenças que corroboram com os espectros obtidos acima descritos e que serão melhor discutidos posteriormente.

Figura 29: Parâmetros empíricos hiperfinos obtidos dos diferentes marcadores e lipídios na ausência e presença de CTX

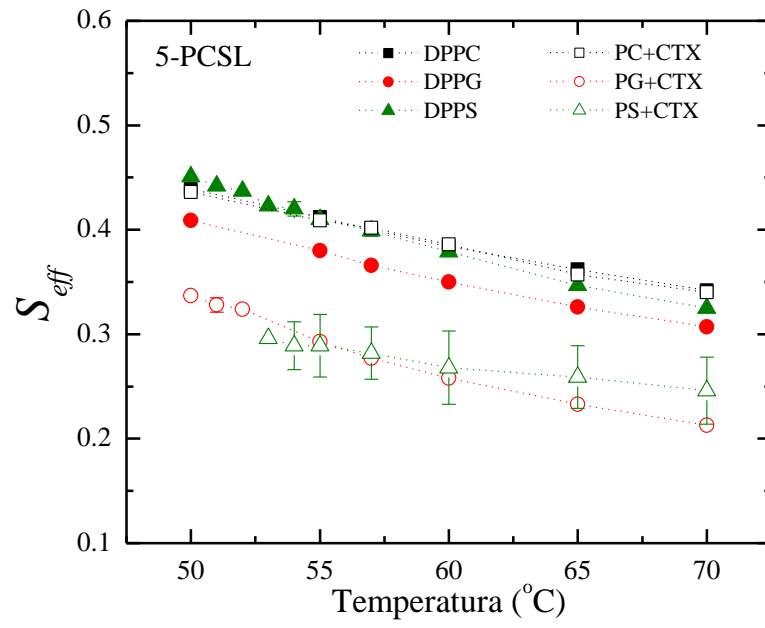
A



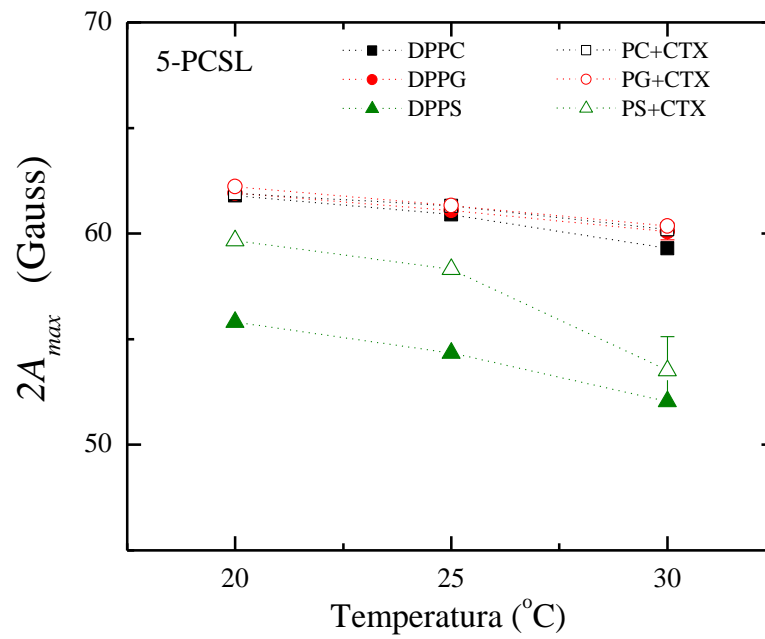
B



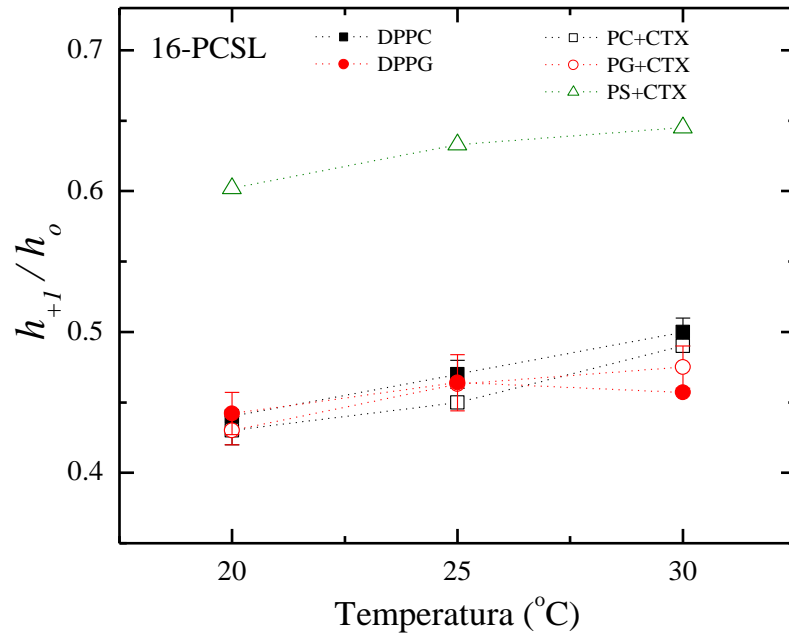
C



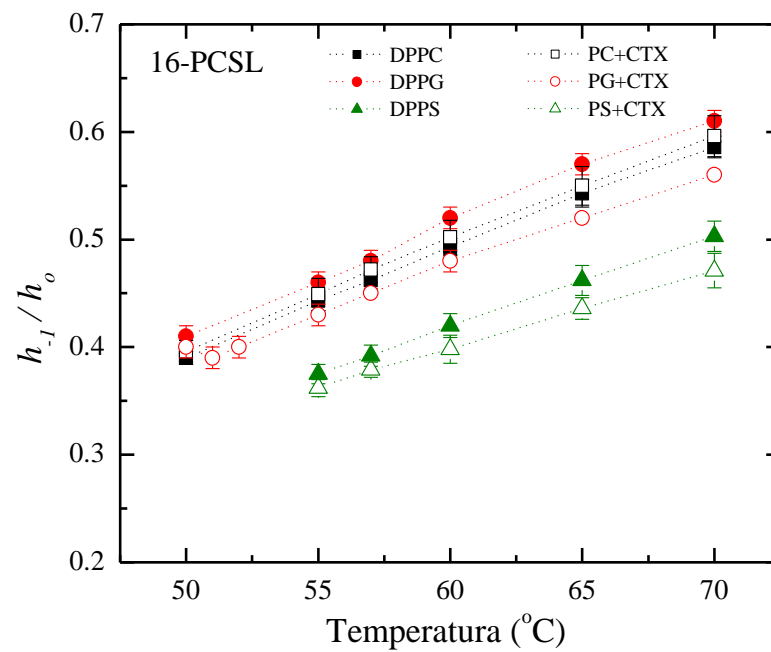
D



E



F



Parâmetros empíricos hiperfinos nos diferentes lipídios na ausência ou presença de CTX. **A-** a_0 (5-PCSL); **B-** a_0 (16-PCSL); **C-** S_{eff} (5-PCSL); **D-** A_{max} (5-PCSL); **E-** h_{+1}/h_0 (16-PCSL); **F-** h_{-1}/h_0 (16-PCSL).

4.15 Análise de banco de dados *DrugBank* e TTD

Apesar da toxina ter entrado mesmo com o bloqueio do receptor peptídeo formil, este dado não descarta que outros receptores do tipo proteína G possam estar envolvidos no processo toxina/bicamada lipídica. Baseado nesses fatos, utilizando bancos de dados bem estabelecidos, foi realizado o estudo *in silico* paralelamente aos ensaios biológicos, para melhor entendimento do que aconteceria com fragmentos que já estão descritos e depositados e se haveria uma associação com outros receptores.

No banco de dados *DrugBank* há uma limitação do número da sequência de aminoácidos utilizada, o que impossibilita, portanto, a utilização da sequência da CTX íntegra (CA e CB). A partir desta limitação, foram utilizadas as sequências das cadeias α , β , γ de CA e a CB dividida em 2 partes.

A sequência utilizada para o estudo *in silico* foi depositada no PDB (BERMAN, 2000) com o código de identificação, PDB ID: 3R0L (FAURE; XU; SAUL, 2011).

A partir dos dados adquiridos foi possível gerar 4 tabelas com compostos bioativos ou fármacos similares à estrutura da CTX (subunidades CA e CB). Nas tabelas foram adicionados os principais compostos/fármacos selecionados seja por *score* (semelhança à crotoxina) ou por indicações semelhantes às ações já descritas para a toxina. No total foram obtidos 27 resultados para a cadeia α de CA, 11 resultados para a cadeia β de CA, 12 resultados para a cadeia γ de CA e 61 resultados para CB.

Do total de compostos/fármacos foram destacados 7 para a cadeia α de CA (**tabela 1**), 8 para a cadeia β de CA (**tabela 2**), 8 para a cadeia γ de CA (**tabela 3**) e 25 resultados para CB (**tabela 4**).

Na **tabela 5** é possível observar as semelhanças dos diferentes alvos encontrados no banco de dados *DrugBank* em comparação aos receptores peptídeo formil e peptídeo formil do tipo I, com base nas informações do banco de dados TTD.

Tabela 2* – Fármacos similares à cadeia α da subunidade CA

CA - Chain α					
Similarity	Name	Chemical Formula	Groups	Targets	Indication
Score: 0.902	Semaglutide	C ₁₈₇ H ₂₉₁ N ₄₅ O ₅₉	approved; investigational	Glucagon-like peptide 1 receptor	Indicated to improve glycemic control in adults with type 2 diabetes mellitus as an adjunct of diet and exercise.
Score: 0.895	CZEN 002	C ₇₇ H ₁₀₉ N ₂₁ O ₁₉ S	Investigational	Melanocyte-stimulating hormone receptor	Investigated for use/treatment in candidiasis and vaginitis.
Score: 0.856	Triptorelin	C ₆₄ H ₈₂ N ₁₈ O ₁₃	approved; vet_approved	Gonadotropin-releasing hormone receptor	Indicated for the palliative treatment of advanced prostate, breast and salivary gland cancer.
Score: 0.82	Aclerastide	C ₄₂ H ₆₄ N ₁₂ O ₁₁	Investigational	Not Available	Investigated for the treatment of diabetic foot, diabetic foot ulcers, and foot ulcer, diabetic.
Score: 0.805	Angiotensin 1-7	C ₄₁ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁	Investigational	Not Available	Bone Cancer / Chondrosarcomas / Clear Cell Sarcoma of the Kidney / Metastatic Osteosarcoma / Ovarian Sarcoma / Adult Soft Tissue Sarcoma / Uterine Sarcoma
Score: 0.745	Lutetium Lu 177 dotatate	C ₆₅ H ₈₇ LuN ₁₄ O ₁₉ S ₂	approved; investigational	Somatostatin receptor types 1,2,3,4,5	Indicated for the treatment of somatostatin receptor-positive gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs), including foregut, midgut, and hindgut neuroendocrine tumors in adults
Score: 0.725	Daptomycin	C ₇₂ H ₁₀₁ N ₁₇ O ₂₆	approved; investigational	Bacterial outer membrane (Incorporation into and destabilization) / Lipoteichoic acid synthesis (Inhibitor)	For the treatment of complicated skin and skin structure infections caused by susceptible strains of Gram-positive microorganisms / Sepsis.

* Tabela transcrita integralmente como expressa no banco de dados DrugBank

Tabela 3* – Fármacos similares à cadeia β da subunidade CA

CA - Chain β					
Similarity	Name	Chemical Formula	Groups	Targets	Indication
Score: 0.806	Bivalirudin	C ₉₈ H ₁₃₈ N ₂₄ O ₃₃	approved; investigational	Prothrombin	Indicated for treatment of heparin-induced thrombocytopenia and for the prevention of thrombosis.
Score: 0.853	Ularitide	C ₁₄₅ H ₂₃₄ N ₅₂ O ₄₄ S ₃	investigational	Atrial natriuretic peptide receptor 1	Investigated for use/treatment in congestive heart failure.
Score: 0.802	Corticotrelin ovine triflutate	C ₂₀₅ H ₃₃₉ N ₅₉ O ₆₃ S	approved	Corticotropin - releasing factor receptor 1	Indicated for use in differentiating pituitary and ectopic production of ACTH in patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome. / Pituitary neoplasms.
Score: 0.74	Cilengitide	C ₂₇ H ₄₀ N ₈ O ₇	investigational	Not Available	Used in trials studying the treatment of sarcoma, gliomas, lymphoma, leukemia, and lung cancer, among others.
Score: 0.719	Atosiban	C ₄₃ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₂ S ₂	approved; investigational	Not Available	Atosiban is an inhibitor of the hormones oxytocin and vasopressin. It is used as an intravenous medication as a labour repressant (tocolytic) to halt premature labor.
Score: 0.712	Carbetocin	C ₄₅ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₂ S	approved; investigational	Oxytocin receptor	Used to control postpartum hemorrhage and bleeding after giving birth.
Score: 0.709	T131	C ₈₆ H ₁₄₀ N ₃₂ O ₁₈ S ₂	investigational	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Investigated for use/treatment in diabetes mellitus type 2.
Score: 0.705	Tifuvirtide	C ₂₃₅ H ₃₄₁ N ₅₇ O ₆₇	investigational	Plasma serine protease inhibitor	Investigated for use/treatment in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and aids-related infections and HIV infection.

* Tabela transcrita integralmente como expressa no banco de dados DrugBank

Tabela 4* – Fármacos similares à cadeia γ da subunidade CA

CA - Chain γ					
Similarity	Name	Chemical Formula	Groups	Targets	Indication
Score: 0.77	Bradykinin	C ₅₀ H ₇₃ N ₁₅ O ₁₁	investigational	Not Available	Investigated for the basic science and treatment of hypertension and diabetes type 2.
Score: 0.765	Bivalirudin	C ₉₈ H ₁₃₈ N ₂₄ O ₃₃	approved; investigational	Prothrombin	Indicated for treatment of heparin-induced thrombocytopenia and for the prevention of thrombosis.
Score: 0.736	T131	C ₈₆ H ₁₄₀ N ₃₂ O ₁₈ S ₂	investigational	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	Investigated for use/treatment in diabetes mellitus type 2.
Score: 0.735	Terlipressin	C ₅₂ H ₇₄ N ₁₆ O ₁₅ S ₂	approved; investigational	Vasopressin V1a, V1b and V2 receptor	Commonly used to stop bleeding of varices in the food pipe (oesophagus).
Score: 0.732	Desmopressin	C ₄₆ H ₆₄ N ₁₄ O ₁₂ S ₂	approved	Vasopressin V1a, V1b and V2 receptor	Indicated for the treatment of nocturia due to nocturnal polyuria/ Indicated as antidiuretic replacement therapy in the management of central cranial diabetes / Indicated for patients with hemophilia A with factor VIII coagulant activity levels greater than 5%
Score: 0.729	Atosiban	C ₄₃ H ₆₇ N ₁₁ O ₁₂ S ₂	approved; investigational	Not Available	Atosiban is an inhibitor of the hormones oxytocin and vasopressin. It is used as an intravenous medication as a labour repressant (tocolytic) to halt premature labor.
Score: 0.721	Ularitide	C ₁₄₅ H ₂₃₄ N ₅₂ O ₄₄ S ₃	investigational	Atrial natriuretic peptide receptor 1	Investigated for use/treatment in congestive heart failure.
Score: 0.716	Selepressin	C ₄₆ H ₇₃ N ₁₃ O ₁₁ S ₂	investigational	Not Available	Used in trials studying the treatment of septic shock.

* Tabela transcrita integralmente como expressa no banco de dados DrugBank

Tabela 5* – Fármacos similares à subunidade CB

CB					
Similarity	Name	Chemical Formula	Groups	Targets	Indication
Score: 0.929	Tetracosactide	C ₁₃₆ H ₂₁₀ N ₄₀ O ₃₁ S	approved	Adrenocorticotropic hormone receptor	Used as a diagnostic agent in the screening of patients presumed to have adrenocortical insufficiency.
Score: 0.918	CZEN 002	C ₇₇ H ₁₀₉ N ₂₁ O ₁₉ S	investigational	Melanocyte-stimulating hormone receptor	Investigated for use/treatment in candidiasis and vaginitis.
Score: 0.876	Tifuvirtide	C ₂₃₅ H ₃₄₁ N ₅₇ O ₆₇	investigational	Plasma serine protease inhibitor	Investigated for use/treatment in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and aids-related infections and HIV infection.
Score: 0.864	Afamelanotide	C ₇₈ H ₁₁₁ N ₂₁ O ₁₉	approved; investigational	Melanocyte-stimulating hormone receptor	Investigated for use/treatment in actinic keratosis, keratoses, skin cell studies, and skin infections/disorders.
Score: 0.859	Semaglutide	C ₁₈₇ H ₂₉₁ N ₄₅ O ₅₉	approved; investigational	Glucagon-like peptide 1 receptor	Indicated to improve glycemic control in adults with type 2 diabetes mellitus as an adjunct of diet and exercise.
Score: 0.854	Corticotropin-releasing factor receptor 1	C ₂₀₅ H ₃₃₉ N ₅₉ O ₆₃ S	approved	Corticotropin-releasing factor receptor 1	Indicated for use in differentiating pituitary and ectopic production of ACTH in patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome. / Pituitary Neoplasms
Score: 0.807	Triptorelin	C ₆₄ H ₈₂ N ₁₈ O ₁₃	approved; vet_approved	Gonadotropin-releasing hormone receptor	Indicated for the palliative treatment of advanced prostate cancer. / Breast Cancer / Salivary Gland Cancers
Score: 0.786	Aclerastide	C ₄₂ H ₆₄ N ₁₂ O ₁₁	investigational	Not Available	Investigated for the treatment of Diabetic Foot, Diabetic Foot Ulcers, and Foot Ulcer, Diabetic.
Score: 0.784	Ularitide	C ₁₄₅ H ₂₃₄ N ₅₂ O ₄₄ S ₃	investigational	Atrial natriuretic peptide receptor 1	Investigated for use/treatment in congestive heart failure.
Score: 0.783	Somatostatin	C ₇₆ H ₁₀₄ N ₁₈ O ₁₉ S ₂	approved; investigational	Somatostatin receptor types 1, 2, 3, 4, 5	Indicated for the symptomatic treatment of acute bleeding from esophageal varices.
Score: 0.775	Lanreotide	C ₅₄ H ₆₉ N ₁₁ O ₁₀ S ₂	approved	Somatostatin receptor type 2 / type 5	Indicated for treatment of neuroendocrine tumours and acromegaly.
Score: 0.771	Angiotensin 1-7	C ₄₁ H ₆₂ N ₁₂ O ₁₁	investigational	Not Available	Bone Cancer / Chondrosarcomas / Clear Cell Sarcoma of the Kidney / Metastatic Osteosarcoma / Ovarian Sarcoma / Adult Soft Tissue Sarcoma / Uterine Sarcoma
Score: 0.768	Pentagastrin	C ₃₇ H ₄₉ N ₇ O ₉ S	approved	Gastrin/cholecystokinin type B receptor	Used as a diagnostic aid for evaluation of gastric acid secretory function
Score: 0.762	Tesamorelin	C ₂₁₆ H ₃₆₀ N ₇₂ O ₆₃ S	approved; investigational	Growth hormone-releasing hormone receptor	Tesamorelin acetate is a synthetic analogue of human hypothalamic Growth Hormone Releasing Factor (hGRF) indicated to induce and maintain a reduction of excess abdominal fat in HIV-infected patients with lipodystrophy.

* Tabela transcrita integralmente como expressa no banco de dados DrugBank

Score: 0.762	TAK-448	C ₅₈ H ₈₀ N ₁₆ O ₁₄	investigational	Not Available	Used in trials studying the treatment of Prostate Cancer, Low Testosterone, Prostatic Neoplasms, and Hypogonadotropic Hypogonadism
Score: 0.755	TT-232	C ₄₅ H ₅₈ N ₁₀ O ₉ S ₂	investigational	Not Available	Tln 232 is under investigation in clinical trial NCT00422786 (Phase II Study of CAP-232 in Patients With Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma)
Score: 0.749	BQ-123	C ₃₁ H ₄₂ N ₆ O ₇	investigational	Not Available	Investigated for the basic science and treatment of Coronary Artery Disease, Aorto-coronary Bypass Grafting, and ST-Elevation Myocardial Infarction
Score: 0.74	Pentetreotide	C ₆₃ H ₈₇ N ₁₃ O ₁₉ S ₂	approved; investigational	Not Available	Pentetreotide has been used in trials studying the diagnostic of cushing syndrome.
Score: 0.739	Daptomycin	C ₇₂ H ₁₀₁ N ₁₇ O ₂₆	approved; investigational	Bacterial outer membrane (Incorporation into and destabilization) / Lipoteichoic acid synthesis (Inhibitor)	Indicated for the treatment of complicated skin and skin structure infections caused by susceptible strains of Gram-positive microorganisms. / Sepsis
Score: 0.733	Bivalirudin	C ₉₈ H ₁₃₈ N ₂₄ O ₃₃	approved; investigational	Prothrombin	Indicated for treatment of heparin-induced thrombocytopenia and for the prevention of thrombosis.
Score: 0.73	Ularitide	C ₁₄₅ H ₂₃₄ N ₅₂ O ₄₄ S ₃	investigational	Atrial natriuretic peptide receptor 1	Investigated for use/treatment in congestive heart failure.
Score: 0.73	Lixisenatide	C ₂₁₅ H ₃₄₇ N ₆₁ O ₆₅ SV	approved	Glucagon-like peptide 1 receptor	Used as an antihyperglycemic agent in the treatment of T2DM.
Score: 0.73	Setmelanotide	C ₄₉ H ₆₈ N ₁₈ O ₉ S ₂	investigational	Not Available	Investigated for the treatment of Obese and Overweight.
Score: 0.728	Octreotide	C ₄₉ H ₆₆ N ₁₀ O ₁₀ S ₂	approved; investigational	Somatostatin receptor type 1 / type 5/ type 2	Indicated for treatment of acromegaly and reduction of side effects from cancer chemotherapy
Score: 0.725	Somatoprim	C ₆₀ H ₇₄ N ₁₂ O ₁₀	investigational	Not Available	Somatoprim is under investigation for the treatment of Acromegaly.

Tabela 6** – Similaridade de receptores entre FPR e FPR1

Target Name	E-value (FPR)	E-value (FPR1)
FMLP receptor	0.0	4e-176
FMLP-related receptor I	4e-176	0.0
Glucagon-like peptide 1 receptor	-	-
Melanocyte-stimulating hormone receptor	0.007	0.14
Gonadotropin-releasing hormone receptor	0.008	7e-06
Somatostatin receptor type 1	2e-40	6e-39
Somatostatin receptor type 2	3e-40	2e-35
Somatostatin receptor type 3	6e-22	2e-25
Somatostatin receptor type 4	3e-35	1e-32
Somatostatin receptor type 5	2e-30	1e-31
Prothrombin	-	-
Atrial natriuretic peptide receptor 1	-	-
Corticotropin - releasing factor receptor 1	-	-
Oxytocin receptor	7e-09	2e-11
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	-	-
Plasma serine protease inhibitor	-	-
Vasopressin V1a receptor	4e-12	1e-16
Vasopressin V1b receptor	4e-07	5e-10
Vasopressin V2 receptor	4e-06	9e-09
Adrenocorticotrophic hormone receptor	0.35	0.26
Gastrin/cholecystokinin type B receptor	2e-13	1e-11
Growth hormone-releasing hormone receptor	-	-

** Tabela transcrita integralmente como expressa no banco de dados TTD

5 DISCUSSÃO

Sobre a atividade biológica

O presente estudo investigou a importância dos FPRs e dos domínios lipídicos envolvidos com estrutura da membrana e com formação de poros para a interação do complexo CTX. Essas estruturas são fundamentais para a transdução da sinalização e funções dos macrófagos. Para esta avaliação, as células monocíticas da linhagem THP-1, bem como macrófagos diferenciados a partir dessas células foram utilizados. Os resultados demonstraram que estas células (monócitos ou macrófagos diferenciados) apresentaram a mesma capacidade responsiva às ações moduladoras da CTX, tais como a inibição sobre espriamento e fagocitose e aumento na liberação de H₂O₂, por estas células, conforme demonstrado em macrófagos de roedores (SAMPAIO et al., 2003, 2006b, 2006a; FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, 2011; COSTA et al., 2013).

Inicialmente, foi estabelecido o protocolo de silenciamento para o receptor peptídeo formil-1 (FPRs-1). A transfecção com siRNA ou DNA plasmídico é uma ferramenta eficiente e amplamente utilizada para o estudo da função de macrófagos, e embora existam muitas abordagens diferentes disponíveis para a transfecção de células, apenas poucos permitem a transfecção eficiente de macrófagos. O protocolo escolhido e utilizado neste estudo fornece um método para transfectar de forma confiável macrófagos e monócitos THP-1 humanos, garantindo viabilidade celular e boa eficiência de transfecção (QIN, 2012; MAESS; WITTIG; LORKOWSKI, 2014). Os resultados obtidos evidenciaram importante redução da marcação dos FPRs-1, demonstrando que a célula THP-1 apresentou-se como um bom modelo para a proposta do estudo.

Após a adequação do modelo celular, foi investigado se o silenciamento dos FPRs-1 (siRNA-FPRs-1) inferiria com as ações moduladoras da CTX sobre as funcionalidades das células THP-1. Assim, células controles (MØFPRs^{+/+}) e células silenciadas (MØFPRs^{-/-}) foram incubadas com diferentes concentrações da CTX. Vale ressaltar que a concentração de 12,5 nM, foi a concentração que induziu mais significativamente a modulação sobre os parâmetros funcionais investigados. Os dados obtidos dos ensaios funcionais demonstraram que, diferentemente das células THP-1 controles (MØFPRs^{+/+}), as células MØFPRs^{-/-} não responderam às ações da CTX, tanto as inibitórias como as estimulatórias, evidenciando que os FPRs-1 são importantes para os efeitos imunomoduladores da toxina. Ainda, foram utilizadas as células THP-1 estimuladas e FMLP (controle positivo para o FPRs-1), demonstrando que

sob este estímulo as células THP-1 intensificam suas respostas funcionais, significativamente inibidas pela CTX, confirmando a importância desses receptores para o efeito da CTX.

Os FPRs-1 desempenham importante função sobre as atividades funcionais de fagócitos, tendo sua expressão rapidamente aumentada em resposta a estímulos inflamatórios, gerando espécies reativas de oxigênio e algumas citocinas (CASO et al., 2021, para revisão).

Da mesma forma, o FPR-2 foi bloqueado farmacologicamente, utilizando para isso, o Boc-2, um antagonista de FPRs-1 e FPRs-2 (preferencialmente) (SMITH et al., 2015). Novamente observou-se o bloqueio da modulação da CTX sobre as funções de espraiamento, fagocitose e liberação de H₂O₂ de células THP-1, previamente incubadas com o antagonista, mostrando que os FPRs-2 são igualmente envolvidos com as ações imunomoduladoras da CTX. Os FPRs-2 promovem a resolução da inflamação, principalmente pela interação com resolvinas, LXA₄ e 15-Epi-LXA₄. De fato, as ações inibitórias e estimulatórias da CTX demonstradas sobre macrófagos obtidos de roedores envolvem a produção de LXA₄ e seu análogo 15-Epi-LXA₄ (SAMPAIO et al., 2006a; FAIAD, O. J.; CURTI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, 2011; COSTA et al., 2013; BRIGATTE et al., 2016). Vale salientar que, dentre as funções analisadas, procurou-se determinar a produção do óxido nítrico (NO). Entretanto, no nosso modelo, não foi possível medir os níveis de NO em monócitos e macrófagos diferenciados a partir de células THP-1. Os diferentes estudos encontrados na literatura evidenciam achados contraditórios em relação à capacidade das células THP-1, diferenciadas ou não, em produzir o NO (FANG; VAZQUEZ-TORRES, 2002; SCHNEEMANN; SCHOEDON, 2002; PANARO et al., 2003; JUNG et al., 2013). Alguns estudos mostram que os macrófagos humanos não são produtores robustos de NO em condições *in vitro* em comparação com células de roedores. Estes fatos justificam, pelo menos em parte, os dados presentemente obtidos para esta função.

Para ampliar a caracterização dos mecanismos envolvidos com a participação dos FPRs nas ações da CTX sobre as atividades funcionais de monócitos THP-1 ou macrófagos diferenciados a partir de células THP-1, ensaios de *western blotting* foram realizados para evidenciar a expressão dos FPRs-1 e quais proteínas envolvidas com as vias de sinalização dos receptores estariam moduladas por CTX. Em células controle (MØFPRs^{+/+}), a expressão de FPRs-1 apresentou-se mais significativa, quando comparada às células MØFPRs^{-/-}.

Como mencionado anteriormente, os FPRs têm vias de sinalização distintas para processos ativadas pelo FPR-1, como quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, além da desgranulação em neutrófilos, por exemplo (KORCHAK et al., 1984). A ligação de um agonista ao receptor leva à dissociação das subunidades $G\alpha$ e $\beta\gamma$ da proteína heterotrimérica G_i que se une ao receptor. Quando as subunidades $\beta\gamma$ são liberadas, elas ativam

as vias de sinalização que envolvem GEFs (do inglês *Guanine Exchange Factors*) para a família Rho, PLC β e PI3K γ , essenciais para as funções celulares. Além disso, a subunidade α está envolvida na regulação de outras vias a jusante do receptor ativado (BOKOCH, 1995; CHOI, 2018). A subunidade $\beta\gamma$ ativa PI3K γ , o que aumenta a concentração de PIP3 na membrana e ajuda a distinguir a borda anterior do neutrófilo quimiotático da borda posterior, gerando assim o início do processo de quimiotaxia. O aumento e a geração do PIP3 estão envolvidos no *feedback* positivo envolvendo RAC. Por sua vez, quando ativado, tem sido associado à formação de filamentos de actina, auxiliando na quimiotaxia (XU et al., 2003; ANNUNZIATA et al., 2020). Nos resultados obtidos, a expressão nos níveis de PI3K foi muito semelhante em todos os grupos, sem diferenças estatísticas significativas entre eles. Por outro lado, houve redução na expressão de RAC nos grupos silenciados, em comparação ao grupo controle e ao grupo estimulado com FMLP. Em relação aos tratamentos com CTX, podemos observar uma ligeira redução na expressão de RAC, quando comparado aos grupos controle nas células não silenciadas e silenciadas.

O movimento celular direcionado também tem sido associado a vias alternativas para a regulação do FPR-1. Sugere-se que um dos caminhos envolvidos possa ser o caminho Src. Quando ocorre a primeira dissociação da subunidade $\beta\gamma$ que ativa PI3K, também pode haver um aumento na atividade das quinases do tipo Src. Curiosamente, as Src quinases interagem com muitas proteínas celulares citosólicas, nucleares e de membrana, modificando essas proteínas pela fosforilação dos resíduos de tirosina (RABIET; HUET; BOULAY, 2005). Além disso, desempenha papéis críticos em várias vias de transdução de sinal celular, regulando processos tão diversos quanto a divisão celular, motilidade, adesão e angiogênese (SUMMY; GALLICK, 2003; JOHNSON; GALLICK, 2008). No presente estudo, observamos redução significativa na expressão de Src em células M ϕ FPRs^{-/-}, sendo esta redução mais significativa quando tratadas com CTX. Também podemos observar aumento na expressão da Src nos M ϕ FPRs^{+/+}, ao comparar o grupo M ϕ FPRs^{-/-} controle, mostrando que o siRNA-FPRS *per se* interfere com a expressão dessa proteína. Nos grupos estimulados com FMLP (agonista de FPRs-1) essa diferença entre tratados com CTX e controle é ainda mais evidente.

Baseado nas evidências que tanto o FPR-2 (ligante de LXA₄ e seu análogo), como os FPRs-1 são importantes para as ações da CTX sobre as células THP-1, avaliou-se se os FPRs seriam importantes também para a entrada da CTX nestas células. Os nossos resultados obtidos por meio de análises em microscopia confocal mostram que independentemente da diferenciação e do bloqueio do FPRs, seja por silenciamento ou por intervenção farmacológica, a entrada da toxina foi observada. Vale salientar que, em relação ao FPR-2, diferentes

concentrações de Boc-2 (antagonista de FPRs) não interferiram com a entrada de CTX nos macrófagos, o que significa que os FPRs não são cruciais para a entrada da toxina no ambiente intracelular. É importante mencionar que esta mesma observação foi obtida nos ensaios utilizando macrófagos peritoneais de ratos, confirmando assim que os dados ora obtidos estão em consonância às observações em estudos anteriores.

Os FPRs-1 e FPRs-2 são receptores homólogos que são ativados pela ligação à N-formilmetionina e estes possuem padrões de reconhecimento muito próximos. O FMLF ou FMLP, como mencionado na introdução, induz a transdução da sinalização de FPR1 na ativação de neutrófilos e células semelhantes a neutrófilos, neste caso, células como THP-1. Nesse sentido, várias vias de sinalização são transduzidas pelo FPR-1, incluindo cAMP/PKA, mobilização de cálcio, sinalização MAPK e Akt (STEINBERG; KEMP, 2009; ZHANG; ZHOU; LI, 2009; CASO et al., 2021, para revisão). Estudos com CTX mostraram que esta toxina inibe a fosforilação de resíduos de tirosina, bem como a cascata de sinalização, envolvendo proteínas GTPases, tanto em macrófagos quanto em neutrófilos (SAMPAIO et al., 2006b; LIMA et al., 2017). Os resíduos de tirosina atuam como locais de ligação de alta afinidade para outras proteínas intracelulares (proteínas adaptadoras), que contêm um domínio SH2, formando o próximo passo na cascata de transdução de sinal, permitindo o controle de uma série de funções celulares. Os eventos que ocorrem quando a proteína que contém o domínio SH2 se liga ao receptor fosforilado variam amplamente, dependendo do receptor envolvido. Muitas proteínas SH2 são enzimas, como proteínas quinases ou fosfolipases. Os receptores desencadeiam uma cascata de quinases, que normalmente envolve a dimerização do receptor, seguida pela autofosforilação dos resíduos de tirosina. A dimerização do receptor é frequentemente o primeiro passo na indução de sinais intracelulares após a ligação do ligante (WEISS; SCHLESSINGER, 1998; WU et al., 2004). Além disso, mesmo na ausência de estimulação extracelular, muitos receptores têm sido propostos para formar dímeros, incluindo vários receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (FOTIADIS et al., 2006; PANETTA; GREENWOOD, 2008; HARDING et al., 2009; SIMPSON et al., 2010).

Nossos resultados demonstraram que, apesar dos efeitos observados nas células de siRNA-FPRs, a toxina ainda é capaz de entrar nas células por outros meios, abrindo mais possibilidades de interação com a membrana do que o receptor e adicionalmente, tanto em células de roedores, como humanas, a ação dual da CTX é abolida pela utilização do antagonista de FPRs. Nosso grupo também demonstrou que o Zileuton, um inibidor da 5-lipoxigenase (5-LO), aboliu o efeito dual da CTX sobre macrófagos (SAMPAIO et al., 2006b), sugerindo que a função de macrófagos é regulada pela produção de mediadores derivados de lipoxigenase

induzida pela toxina, ou seja, de fato, a CTX induz um aumento na produção de LXA₄ e 15-Epi-LXA₄ (SAMPAIO et al., 2006a; COSTA et al., 2013; BRIGATTE et al., 2016).

Portanto, FPRs 1 e 2 são importantes para as atividades imunomoduladoras da CTX sobre macrófagos, por serem ligantes de lipoxinas e seus análogos, mediadores lipídicos disparados pela toxina e que apresentam grande potencial imunomoduladora. Entretanto, não participam da entrada da toxina na célula.

Sobre o estudo Termo-Estrutural

Em continuidade à caracterização dos mecanismos envolvidos com a entrada da CTX nos macrófagos, estudos termo-estruturais foram realizados. Para a entrada de proteínas nas células, estas são adsorvidas, gerando pressão lateral nas membranas lipídicas, o que pode levar à inserção de proteínas, tanto por as ligações proteicas às superfícies da membrana, como por penetração das proteínas nas membranas. Apesar dessa característica comum, na adsorção da proteína a superfície total da membrana permanece constante. Por outro lado, a inserção da proteína aumenta a superfície da membrana, levando a interações entre as cadeias lipídicas hidrofóbicas e os peptídeos. Portanto, pode ser menos favorável do que a inserção em baixas concentrações.

Neste sentido, estudos anteriores mostraram que a internalização de peptídeos obtidos a partir de venenos de serpentes ocorre em alguns minutos (LINDGREN et al., 2000; KERKIS et al., 2004). Esse comportamento foi observado para a crotamina, por exemplo, uma das toxinas também presentes no veneno de *Crotalus durissus terrificus* (KERKIS et al., 2004, 2014). É interessante mencionar que esses autores observaram a entrada desse peptídeo em diferentes células, dentre elas fibroblastos humanos primários, células linfoblásticas, células embrionárias murinas (pluripotentes e diferenciadas) e células endoteliais (KERKIS et al., 2004), de maneira semelhante à aquela observada para CTX (próximo à membrana ou próximo ao núcleo, por até 48 horas após um único contato).

Para entender de que forma a CTX poderia interferir com a membrana para a sua entrada, o comportamento térmico (DSC) foi realizado utilizando-se vesículas lipídicas puras (sintéticas, constituídas com os principais tipos de lipídios encontrados na membrana de macrófagos (DPPC, DPPG e DPPS). Todas as vesículas lipídicas puras apresentaram comportamento térmico esperado (SILVIUS, 1982; MARSH, 2013), caracterizado por uma pré-transição suave (por serem vesículas extrusadas), seguida por uma grande transição. A principal transição dos lipídios DPPC e DPPG ocorreu em aproximadamente 41,5 °C e 40,5 °C, respectivamente, e o DPPS apresenta a transição principal a aproximadamente 52,2 °C

(HEIMBURG, 2007). Após a adição da CTX (0,1 mol% da CTX), não houve variação na pré-transição do ou nas principais temperaturas de transição de DPPC. Isso indica que a CTX não está afetando a estrutura das vesículas deste lipídio.

A principal transição DPPG, com a adição de CTX ocorre a aproximadamente 50 °C, ou seja, 10 °C acima da temperatura de transição principal lipídica pura. Nesse caso, a crotoxina se liga à membrana lipídica (na superfície da membrana), estabilizando a fase gel, causando a transição a uma temperatura um pouco mais alta. Segundo a literatura, seria uma situação em que ocorre uma interação de proteínas integrais que se misturam de forma ideal com a fase gel lipídico e, com isso, os perfis de capacidade de aquecimento mudam para temperaturas mais altas e são assimetricamente estendidos até o final de alta temperatura (HEIMBURG, 2007).

Na interação DPPS/CTX, a transição principal é bastante aumentada na comparação com o lipídio puro. É possível observar um pico muito mais alto e mais fino no lipídio puro, enquanto no lipídio com adição de CTX observamos um pico mais baixo e amplo. Sabe-se na literatura que esse comportamento pode ser observado quando a proteína interage com ambas as fases lipídicas (HEIMBURG, 2007).

Na técnica DSC é possível realizar medições no aquecimento (ciclo endotérmico) e no resfriamento (ciclo exotérmico) dos lipídios. Novamente, no ciclo de resfriamento, é possível observar que não há alteração no lipídio DPPC, tanto na ausência, quanto na presença de CTX. Quando observamos o lipídeo DPPG, é possível ver um perfil muito mais cooperativo na transição de fase durante o ciclo de resfriamento do que no ciclo de aquecimento quando incubado com CTX. Mesmo com o DPPG puro, também observamos um perfil um pouco mais cooperativo quando resfriado do que quando aquecido. E, também é possível observar uma mudança no ciclo de resfriamento no lipídio DPPS, tanto na ausência ou na presença da CTX, quando comparado ao aquecimento.

No que diz respeito à técnica de vazamento de carboxifluoresceína, interessante, os dados corroboram com as imagens obtidas nos ensaios biológicos. Uma vez que foi possível observar a entrada da toxina nas células, o ensaio de vazamento demonstra que a CTX interage fortemente com as membranas DPPS nas fases gel e fluido, causando a formação de poros na membrana em ambas as fases, enquanto que no mesmo experimento, não são observadas alterações na presença de CTX no lipídio neutro DPPC. É importante ressaltar que unicamente neste ensaio, para estudar a interação na fase fluida foram utilizados outros lipídios com cabeças polares iguais (POPC, POPG e POPS), uma vez que não é possível realizar este experimento acima da temperatura ambiente (~25 °C), uma vez que com o aumento da temperatura, ocorre vazamento de CF da vesícula. E neste sentido, os resultados demonstram que os lipídios puros

POPC e POPS não apresentam nenhum vazamento espontâneo, somente o POPG apresenta um pequeno vazamento espontâneo abaixo de 10%, no período da medida. Porém, quando se adiciona a CTX, tanto o POPG quanto POPS, apresentam um forte vazamento.

Posteriormente, foram realizados ensaios de EPR com interações lipídicas/proteínas próximas à superfície da bicamada (5-PCSL) e próximas ao centro da bicamada (16-PCSL). As membranas DPPC, nos espectros obtidos a partir do marcador 5-PCSL (ou seja, o radical nítróxido está localizado no 5º carbono dentro da bicamada, próximo à cabeça polar) demonstram, um comportamento muito anisotrópico na fase gel (20 °C) nesta região. Com a adição de CTX, os espectros da fase gel aparentemente não mudam, indicando uma baixa interação DPPC/CTX. O mesmo pode ser observado nos espectros desse marcador no DPPG, na presença e ausência da proteína. Portanto, não foram observadas alterações significativas na fase gel desses lipídios.

Na fase fluida (60 °C), o 5-PCSL em DPPC, está localizado em um ambiente com maior mobilidade (quando comparado ao espectro na fase gel), visível por meio de picos estreitos. Além disso, observou-se alguma ordem molecular na região sondada pelo marcador. Novamente, nada muda com a adição de CTX à membrana DPPC. Um fato muito interessante é que, diferente do lipídio DPPC, a bicamada DPPG, quando interage com a proteína, apresenta forte perda de ordem e/ou aumento da mobilidade, alterando completamente a característica do espectro em 60 °C, fazendo um comparativo da ausência e presença de CTX.

Finalmente, para o 5-PCSL inserido em membranas DPPS puras, o marcador de spin tem claramente um efeito de troca. É possível que o marcador de spin não esteja sendo distribuído homogeneamente na bicamada lipídica, sendo, portanto, "forçado" a formar regiões com maior densidade de marcadores de spin, favorecendo a interação entre eles. Esse mesmo efeito de troca ocorre no DPPS com a adição de CTX. Mais interessante, após a transição de fase gel-fluido, tanto o marcador de spin se rearranja na bicamada DPPS como o sinal não têm mais o efeito de troca. O espectro de 5-PCSL permanece anisotrópico com ordem molecular razoável. Com a adição de CTX, um efeito muito semelhante no DPPG é observado. A membrana possui baixa ordem, característica de marcadores de spin inseridos em regiões mais móveis ou menos organizadas (ou mais próximas do centro da bicamada).

Assim, com o intuito de avaliar quantitativamente a interação proteína/lipídio próximo à superfície da bicamada, analisamos os espectros de acordo com alguns parâmetros empíricos obtidos diretamente do espectro (ROZENFELD et al., 2017). O valor do desdobramento hiperfino máximo, A_{max} , medido com 5-PCSL em bicamada de fluido é claramente menor que

o medido na fase gel. Portanto, este parâmetro, A_{max} , pode ser usado para informar sobre o empacotamento do nanoambiente monitorado pelo marcador de spin.

Para o marcador de spin 5-PCSL, levamos em conta o parâmetro de ordem efetivo (S_{eff}), que se aproxima da unidade quando todas as moléculas dos marcadores são completamente orientadas paralelamente ao eixo normal da bicamada (LANGE et al., 1985; ROZENFELD et al., 2017). Nossos resultados (S_{eff}) mostram que próximo à superfície da bicamada, na fase fluida, o 5-PCSL inserido no DPPC com ou sem CTX apresenta comportamento semelhante. No entanto, os dois lipídios com carga negativa mostram uma grande perda de ordem com a adição da proteína.

As sondas localizadas no centro da bicamada (16-PCS) têm movimento isotrópico mais rápido. Na fase fluida da bicamada, seu movimento é quase isotrópico, e a amplitude das três linhas hiperfinas, correspondentes a $m_l = +1, 0, -1$, pode ser medida (HUBBELL; MCCONNEL, 1971). As relações entre as amplitudes das linhas, h_{+1}/h_0 e h_{-1}/h_0 , mostraram-se mais próximas da unidade, à medida que o movimento da sonda se torna mais rápido e/ou menos ordenado, com a relação ao raio h_{-1}/h_0 , sendo mais sensível ao empacotamento da bicamada (MARSH, 2013).

À medida que o espectro apresentado corresponde à soma de dois componentes distintos, o uso de parâmetros empíricos se torna impreciso, pois, como mencionado anteriormente, não é possível separar completamente o comportamento de cada um dos componentes. Portanto, optamos por analisar mais detalhadamente os espectros nos quais obtemos puramente um único sinal e isso ocorre na fase fluida para os lipídios.

No DPPS, a bicamada é mais rígida na superfície. No centro da bicamada, não foi possível obter os parâmetros h_{+1} e h_0 , devido ao segundo sítio, que já é bastante aparente a 20 °C. Isso pode ser visto na **Figura 29 E**, onde símbolos preenchidos, sendo DPPC (preta), DPPG (vermelha) e DPPS (verde), representam os lipídios puros. Símbolos abertos nas mesmas cores representam os lipídios na presença de CTX (**Figura 29 E**). Não há presença do símbolo preenchido verde representativa do DPPS puro no gráfico de h_{+1}/h_0 pelos motivos mencionados acima. Ainda, observamos que, tanto na superfície quanto no centro da bicamada, há poucas alterações nas membranas DPPC e DPPG com a adição de CTX, comparadas aos respectivos lipídios puros.

Os espectros do marcador 16-PCSL inserido nas membranas de DPPC na fase gel (20°C) apresentam, como esperado, características de um micro ambiente móvel, tanto na ausência quanto na presença da toxina. Além disso, novamente, CTX não causa nenhum efeito na membrana e parece não haver interação entre eles. Na fase fluida (60 °C), os espectros de

16-PCSL no DPPC na ausência e presença de CTX são bastante semelhantes, como se a interação proteína/lipídio não causasse efeito na estrutura/ mobilidade da membrana e esses mesmos espectros não mostram nenhum sinal de marcador de spin móvel. Portanto, podemos concluir que CTX não está na membrana e o marcador de spin 16-PCSL, como já estava localizado na membrana do DPPC, prefere ficar na membrana a sair para ligar a CTX. Porém, um efeito ligeiramente diferente pode ser visto no DPPG na presença de CTX.

O espectro do marcador 16-PCSL mostra dois sinais simultaneamente, um sendo anisotrópico semelhante ao DPPG puro e um segundo sinal bastante móvel.

Para melhor entendimento da estrutura do DPPS puro para estudar como a CTX interage com a membrana na fase gel, foram realizadas simulações em colaboração com o colaborador doutor Evandro Luiz Duarte (resultados demonstrados no Anexo da tese – Paper).

Outros parâmetros empíricos foram extraídos desses espectros, como: h_{-1}/h_0 (parâmetro obtido apenas na fase fluida, relacionado à mobilidade da membrana nas regiões sondadas pelo marcador de spin 16-PC); a_0 (parâmetro relacionado ao grau de polaridade da membrana). Com relação ao parâmetro de mobilidade, a membrana DPPS pura é muito mais rígida que os lipídios DPPC e DPPG na fase fluida. Quando na presença de CTX, a membrana DPPC não muda e, com DPPG e DPPS, torna-se mais rígida e/ou organizada no centro da bicamada.

Em relação ao parâmetro de polaridade, os três lipídios puros estudados apresentam graus de polaridade muito próximos. Com a adição da CTX, nada muda nas membranas DPPC, porém, nos lipídios DPPG e DPPS, o grau de polaridade no centro da bicamada aumenta radicalmente. Este resultado é muito interessante quando comparado com os resultados de vazamento, onde na fase fluida, apenas DPPG e DPPS na presença de crotoxina apresentaram permeabilidade de membrana.

Assim, os resultados obtidos nesta tese nos permitem a compreensão das interações CTX-lipídio, bem como a otimização da concentração da toxina e a seleção de componentes de membrana apropriados. Alguns pontos são importantes a serem destacados: 1) 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. Com o ensaio de cultura de células, foi possível confirmar a interação da CTX com a membrana e observar sua entrada nos macrófagos. Ainda sob este aspecto, interessantemente, no que diz respeito às cargas das células humanas, estudos têm mostrado que as células tumorais possuem cargas negativas, e correlacionando esses dados com a atividade biológica da molécula de CTX, curiosamente, vários estudos demonstram sua capacidade antitumoral, sugerindo uma correlação desta interação CTX apenas com lipídio negativo (LE et al., 2019); 2) a CTX induz, nos lipídios com carga negativa, um

componente mais fluido que se sobrepõe a um componente mais rígido. Portanto, todos os lipídios foram analisados em sua transição de fase, já na fase fluida. Com (S_{eff}), os dois lipídios com carga negativa mostram uma grande perda de ordem com a adição da toxina. Além disso, o grau de polaridade do meio sondado pelo 16-PCSL aumenta bastante. Esse comportamento pode ser comparado ao experimento de vazamento, onde os dois lipídios com carga negativa apresentaram vazamento. Isso pode ser uma forte indicação da formação de poros na membrana.

Sobre os estudos in silico

Finalmente, paralelamente aos estudos biológicos e estudos termoestruturais, foram realizados estudos *in silico* da molécula com auxílio de diversos bancos de dados. Por meio do DrugBank encontramos moléculas similares às estruturas da crotoxina (subunidades CA e CB) e nos fornece informações sobre as indicações e alvos das moléculas encontradas. Interessantemente algumas moléculas possuem atividades biológicas semelhantes às vistas para a toxina. É o exemplo de moléculas indicadas e investigadas para diferentes tipos de tumores. Sabe-se que a CTX inibe o crescimento tumoral em modelo de tumor de Walker (BRIGATTE et al., 2016), em modelos com células tumorais da linhagem LLC (COSTA et al., 2013), e ainda em modelos de angiogênese reduzindo o tumor por redução da vascularização (KATO, 2013; DE ARAÚJO PIMENTA et al., 2019).

Outro exemplo de similaridade de atividades biológicas encontrado foi o uso para tratamento de candidíase uma vez que os neutrófilos co-cultivados com macrófagos previamente incubados com a CTX apresentam aumento da sua atividade fungicida de leveduras de *Candida albicans* (DE-OLIVEIRA et al., 2018). Ainda, estudos recentes que estão sendo realizados com crotoxina em modelo de diabetes evidenciaram que a toxina melhora o quadro da doença, assim como em modelo de sepse (Alvares-Saraiva e colaboradores, comunicação pessoal; Salgado e colaboradores, comunicação pessoal). Por outro lado, a análise dos diferentes alvos destas moléculas similares à crotoxina no banco de dados TTD, nos possibilitou verificar a similaridade dos alvos com o alvo em estudo (FPR). Essas similaridades nos possibilita um entendimento de qual fragmento da toxina pode se ligar ao receptor para seus efeitos biológicos.

O estudo da análise *in silico* foi realizado paralelamente à proposta original do projeto de pesquisa, uma vez que esta análise nos possibilita um direcionamento para identificar fragmentos que seriam promissores para investigação de funções/atividades interessantes da toxina.

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.

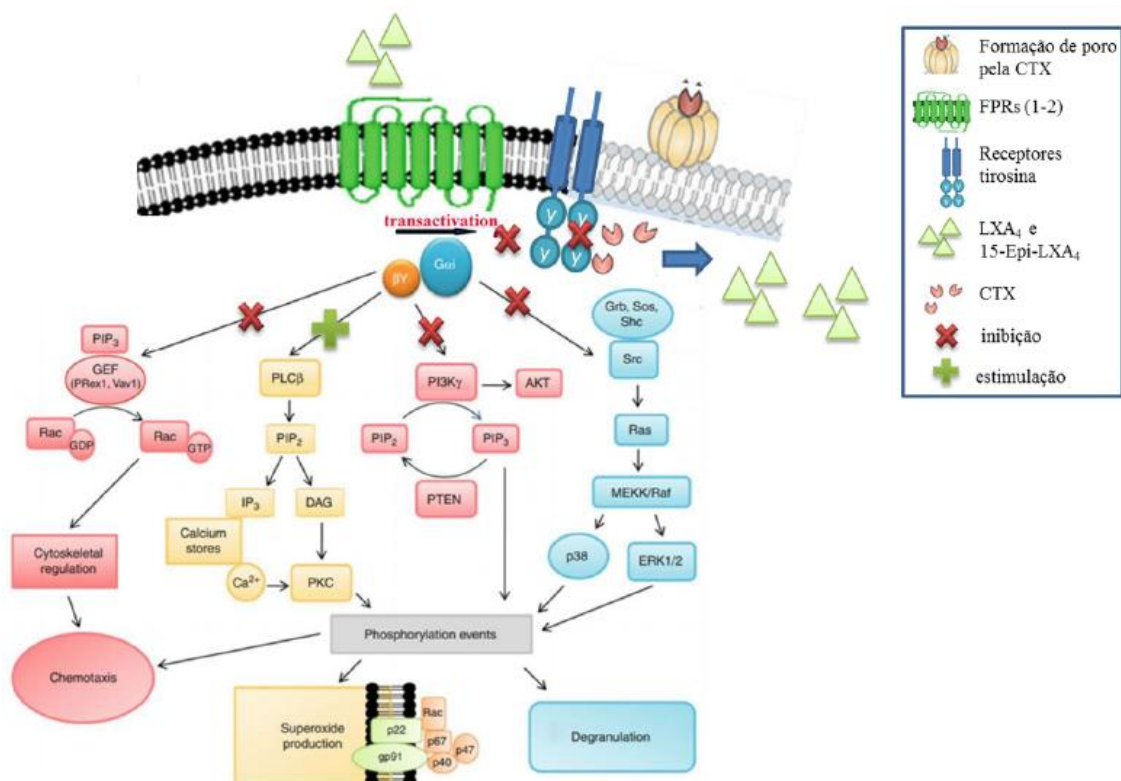


Figura 30. Representação hipotética da interação CTX e membrana de macrófagos. A CTX, por meio de formação de poros, é rapidamente (a partir de 1 min) internalizada. Uma vez no meio intracelular, inibe a fosforilação dos resíduos tirosina quinase1, levando à inibição transativação da conversa cruzada 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 espreadimento 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 G α e $\beta\gamma$ da proteína heterodimérica G i , 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 PI3K γ /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 baseado 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 macrophages** **Annual 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 phagocytes** Journal of Clinical Investigation, 1984. .
- BAILEY, P.; WILCE, J. **Venom as a source of useful biologically active molecules** Emergency 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 cancer** Cell Death and Differentiation Nature 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 macrophages** Cell 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 activation***Blood*, 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 terapêutica**São Paulo*Biologia 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 PPAR β 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 progression**LifeMDPI 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) agonists**International 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 bran- and 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 approach**International ImmunopharmacologyElsevier, , 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 overview** *Drug 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-Activity-in-co-cultured-Neutrophils#pdf>>.

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.; CURTI, 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.

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 venom** *Toxicon*, 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 receptors** **Current 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 fusion*Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* Elsevier 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 interfaces***Trends in Biochemical Sciences* Elsevier Ltd, , 2014. .

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. **Differential scanning calorimetry techniques: Applications in biology and nanoscience***Journal 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 phagocytosis***Trends 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. 345-352, 1991.

HE, H. Q.; YE, R. D. **The formyl peptide receptors: Diversity of ligands and mechanism for recognition** *Molecules* MDPI 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-Labeled 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. Crostamine 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 crostamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake***BioMed 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 12-myristate 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 peptides** **Nature Reviews Drug Discovery** European 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 diseases** **Journal 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 A4 and 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 system***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.

MELLENDEZ, 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 responses***Cytokine and Growth Factor Reviews**Cytokine 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 macrophages***Journal 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: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34984101/>>. Acesso em: 23 maio. 2021.

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

NUNES, F. P. B.; SAMPAIO, S. C.; SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1090–1098, 15 jun. 2007.

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 discovery** *Drug 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 pharmacology***British Journal of Pharmacology* John 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 obesity***bioRxiv*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 vasculature***Atherosclerosis*Atherosclerosis, , 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 spectroscopy** *Biophysical 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 -neurotoxin** *Toxicon*, 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 crotopotin 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 end** *Nature 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 oligomerization** *Current 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 leukocyte endothelial 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 disease** *Physiological 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 acid *Chemistry and Physics of Lipids* Elsevier 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 proteins** *Seminars in Cell and Developmental Biology* Elsevier 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,

K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **International Journal of Cancer**, v. 26, n. 2, p. 171–176, 1980.

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

VAN FURTH, R.; MARTINA M.C. DICSELHOFF-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 Cardiology* Elsevier 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 Lipopeptides** *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* Blackwell 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.; IYNNKARAN, 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) family** **Pharmacological Reviews** American 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 Syndrome** **Cell 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 bilayers** **Current Biology** Cell Press, , 23 mar. 2004. .