

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE – SES – SP

Coordenadoria de Recursos Humanos

Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS

“Dr. Antonio Guilherme de Souza”

FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO – FUNDAP

INSTITUTO BUTANTAN

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL – PAP

Renata Begliomini Bruno de Oliveira

**Modulação Envolvida na Ação de Macrófagos pré-tratados com
Crotoxina sobre a Atividade Secretória de Neutrófilos no
modelo de Co-cultura**

São Paulo

2015

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE – SES – SP

Coordenadoria de Recursos Humanos

Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS

“Dr. Antonio Guilherme de Souza”

FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO ADMINISTRATIVO - FUNDAP

INSTITUTO BUTANTAN

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL - PAP

Renata Begliomini Bruno de Oliveira

**Modulação Envolvida na Ação de Macrófagos pré-tratados com
Crotoxina sobre a Atividade Secretória de Neutrófilos no
modelo de Co-cultura**

*Monografia apresentada ao Programa
de Aprimoramento Profissional – SES-SP
elaborada no Instituto Butantan, Laboratório de
Fisiopatologia, sob orientação da Prof^a. Dra.
Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni.*

São Paulo

2015

*Dedico este presente estudo primeiramente a **Deus**, por conceder-me a vida, dando-me sabedoria e saúde, para desenvolver este projeto, por guiar-me nesta jornada repleta de oportunidades.*

A meus pais,

Sérgio e Teresa, minha eterna gratidão, por sempre estarem do meu lado, dando-me força. Por serem exemplo de vida e perseverança.

*A minha irmã **Sofia**, que mesmo sem entender, teve toda paciência, amor e carinho nos dias difíceis, quando não pude ouvi-la, nem brincar com ela.*

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer

À minha orientadora Prof^a. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni, pela confiança, apoio e dedicação. Pelos exemplos de ética, caráter, respeito e perseverança. Pelo reconhecimento em nossos trabalhos e, por semear em mim o amor à ciência, a seriedade e a vontade de saber, que sempre estará comigo.

Obrigada!!!

Ao Dr. Luís Roberto C. Gonçalves, pela oportunidade de desenvolver este presente estudo no Laboratório de Fisiopatologia.

À Dra. Maria Cristina Cirillo e à doutoranda Tatiane Soares de Lima, pela colaboração do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rui Curi do departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, por ter me recebido em seu laboratório.

À Dra. Tatiana Carolina Alba Loureiro, do departamento de Fisiologia de Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas pela colaboração e auxílio nas dosagens das citocinas.

Aos colegas, Ellen, Luciana, Jaqueline e Camila. Pelo companherismo, pela ajuda e convivência.

Ao Prof. André, sempre prestativo e disposto em colaborar em minha pesquisa diária.

Aos pesquisadores, funcionários e alunos do Laboratório de Fisiopatologia, o meu mais profundo agradecimento.

Aos animais utilizados, meu profundo respeito. Imprescindíveis para a realização deste trabalho.

"De tudo, ficaram três coisas: A certeza de que estamos sempre começando... A certeza de que precisamos continuar... A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar... Portanto, devemos: Fazer da interrupção um caminho novo... Da queda, um passo de dança... Do medo, uma escada... Do sonho, uma ponte... Da procura, um encontro..."

Fernando Pessoa

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora 1
ATP	Trifosfato de adenosina
BPI	Proteínas bactericidas de permeabilidade aumentada
CA	Crotapotina
C3	Fragmentos do sistema do complemento
C3b	Fragmentos do sistema do complemento
C3bi	Fragmentos do sistema do complemento
C5a	Fragmentos do sistema do complemento
CB	Subunidade fosfolipase A ₂
CCL2	Quimiocina de ligação 2
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CFU- GM	Unidade formadora de colônia granulócitos-macrófagos
Cinc-2	Citocina quimiotractiva-2
CO₂	Dióxido de carbono
CTX	Crotoxina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e-NOS	Óxido Nítrico sintetase endotelial
ERK	Quinases reguladas por sinais extracelulares
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenosina
FAK	Proteína kinase de adesão

FLA₂	Fosfolipase A ₂
GMPc	Monofosfato Cíclico de guanosina
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
i-NOS	Óxido nítrico sintetase induzível
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LPS	Lipopolissacaride
MPO	Mieloperoxidase
MCP-1	Proteína inflamatória de macrófagos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato – forma reduzida
NFκB	Fator de transcrição NF κ B
O₂	Oxigênio molecular
O₂⁻	Ânion superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
NaNO₂	Nitrito de Sódio
n-NOS	Óxido Nítrico Sintetase Neuronal
NO	Óxido Nítrico (<i>nitric oxide</i>)
NO₂⁻	Nitrito (<i>nitrite</i>)
PBS	Tampão salina fosfato
PMA	Éster de forbol miristato

PKC	Proteína quinase C
SCdt	Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TMB	Tetrametilbenzidina
TNBS	Ac. 2,4,6 - trinitrabenzenosulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UVA	Radiação Ultravioleta
VCdt	Veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i>

SUMÁRIO

1 RESUMO.....	11
2 INTRODUÇÃO.....	12
2.1 Resposta Inflamatória: Considerações Gerais.....	13
2.2 Características e funções dos Neutrófilos.....	16
2.3 Características gerais dos Macrófagos.....	19
2.4 Cooperação entre macrófago-neutrófilos na atividade microbicida.....	21
2.5 Geração de espécies reativas do oxigênio por macrófagos e neutrófilos.....	24
2.6 Geração de espécies reativas do nitrogênio por macrófagos e neutrófilos.....	26
2.7 Produção de citocinas por macrófagos e neutrófilos na resposta inflamatória.....	27
2.8 Modelos experimentais para o estudo da interação celular.....	28
2.9 Serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	29
2.9.1 Veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e sua composição.....	31
2.9.2 Estudos experimentais sobre os efeitos imunorregulatório e anti-inflamatório do veneno de <i>Crotalus durissus terrificus</i> (Cdt) e suas toxinas isoladas.....	34
3 OBJETIVO.....	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	40
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1 Animais.....	42
5.2 Obtenção de Macrófagos peritoneais.....	42

5.3. Obtenção dos neutrófilos.....	42
5.4. Obtenção da Crotoxina.....	43
5.5. Tratamento com a crotoxina e ensaio de co-cultura.....	43
5.6. Determinação da Atividade Fungicida.....	44
5.6.1. Obtenção de <i>Candida albicans</i>	44
5.6.2. Atividade Fungicida.....	44
5.7. Geração de Espécies Reativas do Nitrogênio.....	45
5.7.1. Determinação da produção de Óxido Nítrico.....	45
5.8. Quantificação da Produção de Citocinas.....	46
5.9. Análise Estatística.....	47
6 RESULTADOS.....	48
6.1. Efeito da CTX sobre a capacidade fungicida por neutrófilos.....	48
6.2. Efeito da CTX sobre a produção de TNF- α por neutrófilos.....	51
6.3. Efeito da CTX sobre a produção de IL-1 β por neutrófilos.....	54
6.4. Efeito da CTX sobre a produção de Cinc-2 por neutrófilos.....	57
6.5. Efeito da CTX sobre a produção de NO por monoculturas de macrófagos.....	60
6.6. Efeito da CTX sobre a produção de NO por monoculturas de neutrófilos.....	60
6.7. Efeito modulatório da CTX sobre a liberação de NO por neutrófilos em modelo de co-cultura e submetidos à capacidade fungicida.....	63
7 DISCUSSÃO.....	66
8 CONCLUSÃO.....	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Modulação envolvida na ação de macrófagos tratados com crotoxina sobre a atividade secretória de neutrófilos do modelo de Co-Cultura", protocolo nº 1013/13, sob a responsabilidade de Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni e Renata Begliomini de Oliveira - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/04/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
04/2013 - 04/2014 Laboratório de Fisiopatologia	30 Ratos Wistar 45 dias - 170g (M)

São Paulo, 15 de abril de 2013


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

1 RESUMO

Dados da literatura têm demonstrado que a Crotoxina (CTX), toxina majoritária do veneno de serpente *Crotalus durissus terrificus* (VCdt) apresenta efeitos imunomodulatório e anti-inflamatório. Apesar das ações inibitórias sobre a migração de neutrófilos, bem como sobre a atividade fagocítica destas células, esta toxina não altera, diretamente, a atividade microbicida por neutrófilos ativados por PMA. Por outro lado, a CTX intensifica a geração dos reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio por macrófagos, células fundamentais para os mecanismos da defesa inata. Recentemente, nosso grupo constatou que neutrófilos, quando co-cultivados na presença de macrófagos previamente tratados com CTX ou incubados com o sobrenadante da cultura destes macrófagos, apresentaram aumento da capacidade de *burst* oxidativo, sobretudo após o estímulo com PMA, evidenciando que macrófagos pré-tratados com CTX atuam como indutores na ativação de neutrófilos, células que adquirem propriedades funcionais e metabólicas distintas, importantes para sua ação microbicida em processos fisiopatológicos. Apesar dessas evidências, os mecanismos envolvidos nesta ação imunomodulatória de macrófagos tratados com CTX sobre a atividade funcional e secretória de neutrófilos não foram ainda determinados. Baseados nestes fatos, nosso objetivo é investigar a atividade funcional e os possíveis mediadores secretados por neutrófilos durante o ensaio de co-cultura na presença de macrófagos tratados com CTX. Para tanto, serão avaliados os seguintes objetivos específicos: 1) Determinar a capacidade fungicida de neutrófilos co-cultivados por 4 horas, 12 horas e 24 horas, com o sobrenadante de macrófagos previamente tratados com a CTX ou apenas meio de cultura (controle), estimulados com LPS e 2) determinar a concentração TNF- α , IL-1 β , CINC-2 α/β e NO em: a) sobrenadantes das monoculturas de macrófagos e neutrófilos tratados com a CTX, após 4 horas, 12 horas e 24 horas; b) nas co-culturas entre neutrófilos e macrófagos previamente tratados com a CTX, estimulados com LPS por 4 horas, 12 horas e 24 horas; c) nos sobrenadantes de neutrófilos submetidos ao ensaio de atividade fungicida, após o co-cultivo por 4 horas, 12 horas e 24 horas na presença de macrófagos, previamente tratados com a CTX, estimulados com LPS. Os resultados obtidos demonstraram que neutrófilos co-cultivados na presença de sobrenadantes obtidos de cultura de macrófagos, previamente tratados com a CTX, apresentam importante aumento da capacidade fungicida. Esta atividade está associada apenas à produção de TNF- α , na fase inicial do co-cultivo (4 horas) e com a produção significativa de NO, mediador fundamental para potencializar a capacidade metabólica de neutrófilos e, conseqüentemente, a atividade microbicida destas células. Portanto, este estudo aponta que as espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio e o TNF- α são os principais mediadores envolvidos nas ações modulatórias da CTX sobre a resposta inflamatória associada à infecção.

Palavras-chave: *Crotoxina, Macrófagos, Neutrófilos, Inflamação, Óxido nítrico, Citocinas, Co-Cultura.*

2 INTRODUÇÃO

2.1 Resposta Inflamatória – Considerações Gerais

Doenças caracterizadas por inflamação são ainda, nos dias de hoje, uma importante causa de morbidade e mortalidade nos humanos. A palavra inflamação, do grego *phlogosis*, e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. O processo inflamatório não é uma doença, mas uma resposta sem especificidade, cuja doença vinculada à inflamação está no desequilíbrio desta resposta (Rocha-e-Silva e Garcia Leme, 2006).

Descrições dos sinais clínicos da inflamação são datados desde a antiguidade nos papiros egípcios, aproximadamente 3000 a.C, porém o primeiro autor a identificar os sinais cardinais da inflamação foi Celsius, um escritor romano do século I d.C, que relatou as primeiras descrições do processo inflamatório como o aumento do fluxo sanguíneo, dilatação de pequenos vasos, *rubor*, aumento da permeabilidade vascular, *tumor*, que conduz um aumento na temperatura local, *calor*, à passagem de células circulantes e dor local, *dolor*. A perda de função, quinto sinal clínico foi adicionado por Virchow (Aller *et al.*, 2006; Rocha-e-Silva e Garcia Leme, 2006).

O processo inflamatório é uma resposta do organismo à injúria que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado. Essa resposta independente da natureza do estímulo lesivo é composta por eventos sensoriais (nervosos), vasculares, celulares e linfáticos que atuam de maneira inter-relacionada com a finalidade de eliminar o agente lesivo restituir o tecido lesado e recuperar a homeostasia do organismo (Kumar *et al.*, 2005).

A fase imediata que se refere à fase nervosa, diz respeito a uma resposta motora, sensitiva, onde há o predomínio de corticoides, nociceptores, provenientes do SNC e do

sistema motor somático, que são gerados imediatamente após a lesão, responsáveis pela percepção da dor (Kuchel, O., 1991; Rosman, *et al.*, 2005).

As manifestações uniformes que caracterizam a resposta inflamatória são decorrentes da ação de mediadores químicos, liberados após o estímulo lesivo que atuam de maneira inter-relacionada em todos os eventos da resposta inflamatória (Rocha e Silva & Garcia-Leme, 1972; Ferreira & Vane, 1973; Majno & Joris, 2004). Esses mediadores podem ser originados do plasma, tais como os componentes do sistema complemento, do sistema de coagulação e as cininas ou ainda originados de células e de tecidos, tais como a histamina, a serotonina, os metabólitos do ácido araquidônico, o fator de ativação plaquetária, o óxido nítrico e as interleucinas (Rankin, 2004; Majno & Joris, 2004, Kumar *et al.*, 2005).

Imediatamente após o estímulo lesivo, as ações desses mediadores geram alterações vasculares que compreendem em alterações hemodinâmicas, que culminam com o extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido adjacente, onde ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de uma vasodilatação observada, principalmente, nas vênulas pós-capilares. Essas alterações são seguidas por mudanças estruturais na parede do vaso caracterizadas, principalmente, pela contração da célula endotelial e abertura de junções entre essas células. Essas aberturas levam ao aumento da permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (Kowal-Vern *et al.*, 1997; Rankin, 2004), o que caracteriza o edema inflamatório (Janeway & Travers, 1994; Vane, 1994; Blake & Ridker, 2001; Tedgui & Mallat, 2001). Ainda, em conseqüência ao extravasamento plasmático ocorre o aumento da viscosidade sanguínea e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas geram a estase sanguínea e cooperam para a migração leucocitária e marginação destas células para o tecido extravascular (Kumar *et al.*, 2005). Formando um complexo denominado interação

leucócito-endotélio, na qual, ocorre através das junções das células endoteliais adjacentes (via para celular), ou ainda, em alguns casos, através do corpo celular (via transcelular) e, subsequentemente a migração destas células para o estímulo lesivo (Engelhard & Wolburg, 2004; Carman & Springer, 2004).

Além disso, esses mediadores promovem a destruição do agente lesivo e ativação das células imunes, onde, a acumulação e subsequente ativação de leucócitos são eventos essenciais na patogenicidade da inflamação. Esses mediadores são sintetizados e secretados biologicamente através dos metabólitos do ácido araquidônico, que degradam os fosfolipídios de membrana celular, e em seguida são liberados, sua degradação é dada pela ação das enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases (Crowley, 1996).

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

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

As primeiras células a migrarem para o foco inflamatório são os leucócitos polimorfonucleares, particularmente os neutrófilos (Rankin, 2004; Kumar *et al.*, 2005). O exsudato celular é caracterizado, na fase inicial da resposta inflamatória, pela presença predominante destas células e, posteriormente, pela predominância de células mononucleares, monócitos e macrófagos. Uma vez no sítio inflamatório, essas células iniciam o processo de fagocitose do agente lesivo e dos debris celulares (Auger & Ross, 1992). Sendo, os macrófagos e os neutrófilos componentes celulares centrais deste sistema (Silva, 2010 a e b) (**Figura 1**).

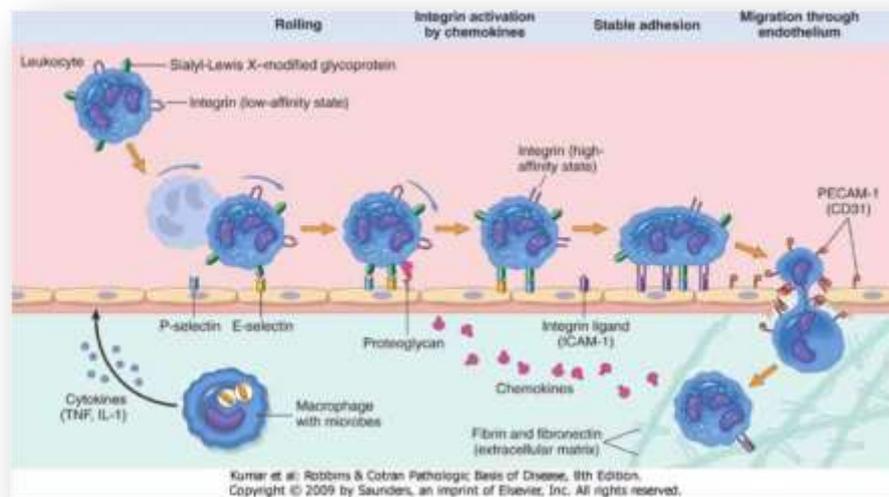


Figura 1. Processo inflamatório - (reação local do tecido vascularizado em resposta a injúria). Fonte: www.studyblue.com

2.2 Características e Funções dos Neutrófilos

Os neutrófilos são células efetoras essenciais na resposta autoimune, já que, formam a primeira linha de defesa contra patógenos invasores, pois são rapidamente recrutados no sítio da infecção ou inflamação, onde eles detectam patógenos invasores por meio de mecanismos microbicidas que incluem fagocitose, liberação de enzimas, espécies reativas do oxigênio (EROs), entre outros (Sadik and Luster, 2012).

Uma das principais características destas células é a sua habilidade em se direcionar a compartimentos diferentes em resposta de diferentes injúrias. Sob condições homeostáticas a medula óssea funciona como o principal reservatório para neutrófilos. Durante a resposta inflamatória aguda os neutrófilos são rapidamente recrutados da medula óssea em direção aos vasos sanguíneos, gerando aumento dos níveis de neutrófilos circulantes (Semerad *et al.*, 2002).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea a partir de uma célula precursora hematopoiética denominada *stem cell*, por meio de uma série de precursores mielóides, os neutrófilos passam por processos de diferenciação e maturação que dão origem aos metamielócitos neutrofilicos, que se diferenciam em neutrófilo bastonete e, por fim, em neutrófilos segmentados maduros tornando-os aptos à passagem para os vasos sanguíneos (Dale DC, 2003).

Durante sua maturação três tipos de grânulos neutrofilicos são formados e eles são aumentados por proteínas pró-inflamatórias, que correspondem aos grânulos azurófilos (primários) que contém mieloperoxidase (MPO), grânulos específicos (secundários), que contém lactoferrina e gelatinase (terciários), que contém metaloproteinase de matriz. Estes grânulos podem ser subdivencionados em defensinas, e os grânulos específicos podem ser subdivididos em: lactoferrina, cisteína, gelatinase e ficolina, fundamentais para as diferentes ações destas células (Borregard, 2010).

Assim, os neutrófilos mobilizam diversas vesículas secretórias que rapidamente transportam seu conteúdo para a superfície celular, essas estruturas são importantes para adesão e transmigração destas células, bem como, para suas ações microbicidas (Kolaczkowska & Kubes, 2013).

Após chegada ao seu sítio alvo, os neutrófilos dão início a mecanismos efetores importantes, uma vez que são hábeis em secretar conteúdos de seus grânulos pré-formados, que contém peptídeos antibacterianos e enzimas. Além destes mecanismos, os neutrófilos podem também liberar e gerar EROs (espécies reativas do oxigênio) através de NADPH oxidase transmembrana, por meio de um mecanismo denominado “burst oxidativo” (Nathan C, 2013).

Adicionalmente, neutrófilos são fagócitos competentes e são hábeis em migrar e engolfar microorganismos, quando encapsulados nos seus fagolisossomos, essas células degradam-os por enzimas, e por mecanismos dependentes de NADPH oxidase, e, por meio de proteínas antibactericidas, eliminando então microorganismos invasores (Kolaczkowska & Kuber, 2013).

Assim, os neutrófilos são células que apresentam uma natureza dinâmica, que têm a habilidade de se direcionar em diferentes compartimentos do organismo participando como células efetoras fundamentais no sistema imune inato (Liang Li *et al.*, 2012) (**Figura 2**).

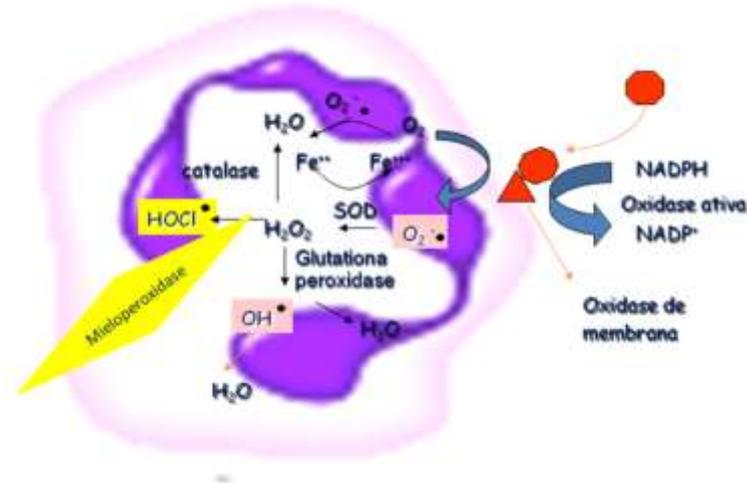


Figura 2. Ativação da NADPH oxidase e geração de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. (Adaptado da Fonte: Physiology Online).

2.3 Características e Funções dos Macrófagos

O macrófago foi descrito por Metchnikoff no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir dos estudos de MacKness *et al.* (1970), a atividade secretória desta célula adquiriu importância.

Ontogeneticamente, o macrófago deriva do saco vitelínico (Moore & Metcalf, 1970) e, no homem adulto, da medula óssea (van Furth, 1989), a partir da célula precursora para macrófagos e polimorfonucleares, a CFU-GM (colony-forming unit, granulocyte-macrophage) (Metcalf, 1971). A primeira célula da linhagem macrófágica na medula óssea, morfológicamente, é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos que, ao contrário do seu precursor, já apresentam capacidade de pinocitose e expressam receptores característicos de macrófagos (van Furth & Diesselhoff -Den Dulk, 1970; van Furth *et al.*, 1980). O pró-monócito, ao dividir-se, dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas, encaminhando-se então, para a corrente sanguínea, na forma de monócitos circulantes, que

permanecem na circulação por cerca de 70 horas, no homem (Whitelaw, 1966) e 25 horas, no camundongo (van Furth & Cohn, 1968). Juntas estas células fazem parte do sistema mononuclear fagocítico, que consiste de uma população altamente versátil e heterogênea (Halddar & Murphy, 2014).

Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo (macrófago). Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional, onde nestas cavidades e tecidos estas células apresentam a capacidade de disparar fenótipos locais específicos com diferentes perfis gênicos, onde a sua diferenciação e estado de ativação estão relacionados de acordo com seu microambiente, por meio de sinais reguladores gerados no seu ambiente tecidual, contribuindo então na homeostasia do organismo (Halddar & Murphy, 2014). A baixa capacidade de espraiamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos tais como lisozima, proteinases neutras e ácidas e espécies reativas do oxigênio, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (Cohn, 1978; Takemura & Werb, 1984). O macrófago residente permanece no órgão ou cavidade para o qual migrou por alguns meses (van Furth & Cohn, 1968) e é considerado célula terminal, sem capacidade de proliferação (Gordon, 1986), embora em algumas ocasiões, tal fenômeno tenha sido observado, como em macrófagos alveolares (Tarling *et al.*, 1987).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (Metcalf, 1971), assim como redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão (van Furth *et al.*, 1973). No sítio inflamatório, o monócito, agora denominado macrófago, passa por processo de diferentes estágios de ativação (Cohn, 1978; Gordon, 1986; Werb *et al.*, 1986; Nathan, 1987), definido como a aquisição de competência para executar uma tarefa complexa (Adams & Hamilton, 1984).

Deste modo, os macrófagos atuam como células “sentinela” para a resposta autoimune, no qual estas células expressam uma variedade de receptores que irão facilitar a remoção de debris celulares, tecidos necróticos, e moléculas citotóxicas da circulação. Assim, estes receptores sinalizam aos macrófagos à produzirem uma variedade de mediadores que recrutam células autoimunes como os neutrófilos, e juntos promoverem o combate de diversas afecções (Lawrence & Natoli, 2011; Galli *et al.*, 2011).

Além destas os macrófagos executam outras funções complexas tais como, quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e capacidade de morte tumoral (Mantovani *et al.*, 2004) (**Figura 3**).

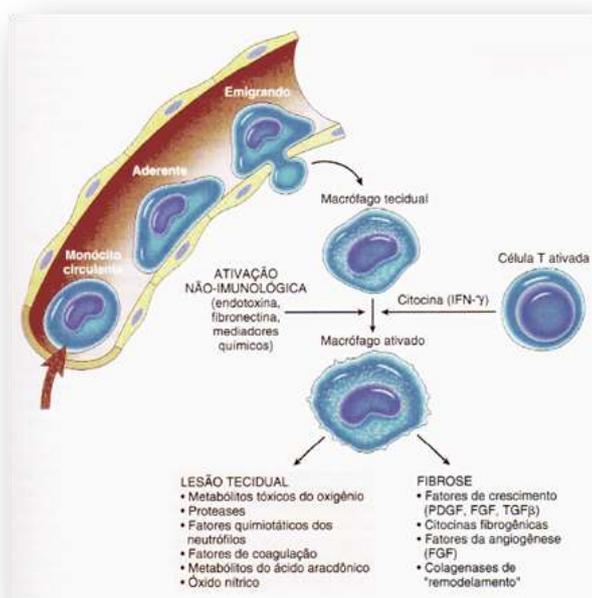


Figura 3. Liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos. (Fonte: Robbins and Cotran Bases Patológicas das Doenças - Kumar, Abbas e Fausto; Sétima Edição).

2.4. Cooperação entre macrófago-neutrófilo na atividade microbicida

Como citado anteriormente, os neutrófilos e os macrófagos originam-se de um precursor comum, *stem cell*, o qual se diferencia em progenitores mielóides e a seguir em

progenitores das linhagens granulocítica e monocítica (Bradley & Metcalf, 1966; Metcalf, 1989). Assim, neutrófilos e macrófagos compartilham várias características, tais como atividade fagocítica e microbicida. Entretanto, algumas modificações progressivas durante a maturação levaram a especialização desses fagócitos, os quais adquiriram propriedades individuais distintas e complementares.

Em relação à atividade microbicida, embora exista variação entre os mamíferos, a produção de reativos do oxigênio é maior nos neutrófilos do que nos macrófagos. Várias proteínas antimicrobicas estão presentes nos neutrófilos, porém são ausentes ou escassas nos macrófagos, como por exemplo, a mieloperoxidase. Esta enzima está presente nos monócitos circulantes, porém desaparece quando estas células migram para os tecidos e se transformam em macrófagos o que confere a estas células menor capacidade microbicida em relação aos neutrófilos. Além disso, ambas as células possuem características específicas e complementares, essa complementaridade permite a participação cooperativa dessas células como efetoras e moduladoras da imunidade inata.

O mecanismo de cooperação macrófago-neutrófilo se baseia no fato de que quando um agente estranho invade o tecido do hospedeiro os macrófagos residentes detectam a presença desse agente e secretam quimiocinas e citocinas, tais como: IL-8 e CCL2, as quais induzem o recrutamento e ativação dos neutrófilos, estes por sua vez, liberam citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IL-1 β e TNF- α (Cassatela, 1995; Kasama *et al.*, 2005), as quais induzem a produção de quimiocinas (Scapini *et al.*, 2000), atraindo mais neutrófilos e, posteriormente, monócitos para o foco da lesão, amplificando assim a resposta inflamatória (**Figura 4**).

O recrutamento recíproco dessas células no sítio inflamatório promove uma fagocitose cooperativa que potencializa a atividade microbicida. Essa cooperação envolve dois fatores que age concomitantemente: a ativação recíproca de macrófagos e neutrófilos,

ou seja, os macrófagos são ativados diretamente por produtos de neutrófilos, enquanto que os neutrófilos são ativados por citocinas e quimiocinas liberadas por macrófagos – captação de moléculas microbicidas de neutrófilos pelos macrófagos, as quais aumentam sua atividade microbicida (Silva, 2010 a e b).

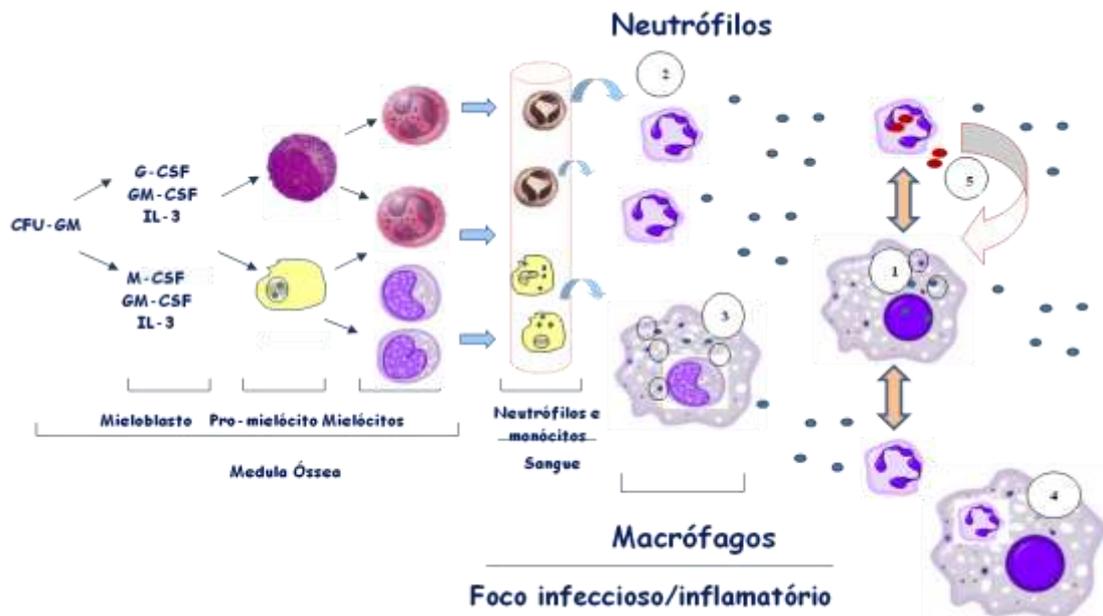


Figura 4. Cooperação entre macrófago-neutrófilo no sítio inflamatório/infeccioso. Macrófagos residentes que detectam a presença de patógenos invasores (1), e os fagocitam e secretam quimiocinas, recrutando os neutrófilos (2). Neutrófilos recrutados são ativados e começam a recrutar outros neutrófilos e macrófagos inflamatórios para o sítio da lesão. Os mecanismos efetores ativados por estes fagócitos contra os patógenos invasores incluem: fagocitose por macrófagos residentes (1), inflamatórios (3) e neutrófilos recrutados (2), macrófagos infectados ingerindo neutrófilos (4), proteínas de grânulos neutrofilicos liberados (5) e intensificação da capacidade microbicida por neutrófilos (5). Adaptado de Silva, 2010 a.

Sendo assim, a resposta imune apresenta papel fundamental na defesa contra agentes infecciosos, constituindo-se no principal impedimento para a ocorrência de doenças infecciosas disseminadas. Os neutrófilos e macrófagos exercem sua ação microbicida de forma mais ampla contra vários agentes, sendo, células de grande importância para a defesa do hospedeiro (Machado *et al.*, 2004).

2.5 Geração de espécies reativas do oxigênio por macrófagos e neutrófilos

O oxigênio molecular (O_2) é um composto essencial para todas formas de vida aeróbicas, notavelmente para a célula obter energia, como forma de ATP.

Sob condições patológicas, o oxigênio frequentemente transmuta-se em formas altamente reativas, denominadas espécies intermediárias reativas do oxigênio (EROs), como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxil (OH) (Adler *et al.*, 1999).

As EROs nas células se originam através de múltiplas fontes como, a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, aminoácidos e também por enzimas que produzem ânion superóxido como as NADPH oxidases (NOX) fagocíticas e não fagocíticas e também por enzimas como as lipoxigenases e ciclooxigenases, dentre outros. Também podem ser originados por fontes exógenas que são radiações ionizantes, fumo, poluentes. (Haddad, J. 2003; Lambeth, J.D. 2004; Imlay, J.A. 2008; Jiang, *et al.*, 2011).

A produção e a regulação das EROs pelas NADPH oxidases ocorre nos domínios citosólicos da membrana celular que transfere um elétron da NADPH a um co-fator redox denominado *FAD* (*flavin adenine dinucleotide*), em seguida, o elétron é transferido a um grupo heme que doa uma molécula de oxigênio (O_2) ao sítio extracelular da membrana, gerando ânion superóxido (Yasdanpanah, *et al.*, 2009). Outro nível de regulação pode ser dado por meio da sinalização de Ca^{2+} , por cascatas de fosforilação, e por ativação de pequenas proteínas G, que controlam o recrutamento de proteínas acessórias do citosol como o flavocitocromo na membrana formando um complexo funcional de NOXs (Bae *et al.*, 2011).

Nas células as NADPH oxidases (NOXs), são ativadas após a ativação de receptores por seus ligantes como insulina, fatores de crescimento, quimiocinas que se ligam à proteína G, TNF- α , GM-CSF, leucotrienos, componentes do sistema complemento, também por atividades funcionais como adesão e fagocitose (Nathan C, 2012).

Assim, as EROs se originam das NADPH oxidases no plasma, por membranas endossomais e fagossomais e da mitocôndria no citosol, podendo influenciar a transcrição por regular a fosforilação de diversos fatores de transcrição (Halliwell B, 2006).

Dentre as espécies oxidativas, existem duas que são fisiologicamente importantes: o ácido hipocloroso (HOCl) produzido pela enzima MPO derivada do “burst” de neutrófilos e o O₂⁻ gerado após fotosenssitação e radiação UVA. Quando a produção celular de EROs aumenta ocorre um stress oxidativo que contribui na patogênese de diversas doenças (Rhee *et al.*, 2003).

Deste modo, dependendo do nível de espécies reativas do oxigênio, diferentes fatores de transcrição *redox* são ativados para coordenar respostas biológicas distintas, onde um baixo nível de stress oxidativo induz a ativação de enzimas antioxidantes. Um volume intermediário de EROs estimula uma resposta inflamatória através da ativação do fator de transcrição NF- κ B e AP-1 e, um alto nível de stress oxidativo induz perturbação do poro mitocondrial, disfunção no transporte de elétrons, que resulta em apoptose ou necrose (Deora *et al.*, 1998; Hensley *et al.*, 2000; Aslan & Ozben, 2003; Tonks, 2005).

Onde, as espécies reativas do oxigênio reagem com certos átomos para modular diversas funções celulares importantes que incluem inibição e ativação de proteínas, mutagênese de DNA e ativação de genes de transcrição. Promoção ou supressão da inflamação. Além de auxiliarem no combate de microorganismos pelo hospedeiro principalmente por fagócitos envolvidos, portanto, na competição intermicrobiana (Nathan C, 2013).

2.6 Geração de Espécies reativas do nitrogênio por macrófagos e neutrófilos

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa do nitrogênio, sendo uma das menores moléculas sinalizadoras com atividade biológica, sendo altamente reativa, apresentando propriedades que facilitam sua difusão através das membranas celulares sem o auxílio de transportadores específicos no desempenho de várias funções fisiológicas (Mayer & Hemmens, 1997).

Durante muito tempo o NO foi ignorado como molécula biológica, sendo conhecido somente por ser um gás altamente tóxico, como um poluente ambiental devido à presença de um radical livre (elétron extra), que o torna um reagente químico muito reativo (Norman *et al.*, 1965; Snyder & Bredt, 1992; Pires *et al.*, 2000).

Contudo nos anos 80, dois pesquisadores Furchgott e Zawadski demonstraram que o NO, é um componente primordial na fisiologia do organismo, quando evidenciaram aumento dos níveis de cGMP cíclico, produzido pela guanilato ciclase em aortas de coelho “in vitro”, que promovia vasodilatação e aumentava o fluxo sanguíneo (Furchgott & Zawadski, 1980).

O NO é um radical-livre levemente estável, derivado do metabolismo de L-arginina, NADPH e oxigênio, sendo esta reação catalisada por isoformas severas da NOS (óxido nítrico sintetases). Este mediador é um mensageiro intracelular ubíquo, expresso em uma variedade de tipos celulares, como os macrófagos e neutrófilos na mediação de múltiplos processos fisiológicos, que incluem neurotransmissão, agregação plaquetária, resposta imune em processos inflamatórios agudos, apresentam, portanto, papel importante em atividades microbidas (Dickie *et al.*, 2004). E, além disso, é um mediador que

atravessa facilmente a membrana das células e difunde-se fora delas (Ignarro, 1989; Moncada *et al.*, 1999; Pacher *et al.*, 2007).

É produzido em baixas quantidades e constitutivamente expressos pelas isoformas NO sintetases como a endotelial (e-NOS) e a neuronal (n-NOS), no controle de processos homeostáticos, como pressão sanguínea. E a forma induzível (i-NOS), que aparecem em processos inflamatórios infecciosos agudos, expressa em uma variedade de tipos celulares, como os macrófagos e neutrófilos são induzidas após a ativação de citocinas pró-inflamatórias e também por LPS (lipopolissacarídeo bacteriano) dentre outros. Devido a esses fatores esta enzima apresenta um papel importante em atividades antimicrobicas e antineoplásicas (Beckman *et al.*, 1990; Lundberg *et al.*, 2008).

Atualmente, sabe-se que o NO é um mediador intracelular que apresenta função dual, ele pode atuar como mensageiro celular ou modulador e também, pode atuar como molécula efetora antimicrobiana. Onipresente em diversos vertebrados modula, portanto, diversas atividades fisiopatológicas do organismo (Pacher *et al.*, 2007).

2.7 Produção de citocinas por macrófagos e neutrófilos na resposta inflamatória

Como citado anteriormente, inflamação é uma resposta de defesa dos tecidos vivos para estímulos prejudiciais, que envolve a ativação de células autoimunes como no caso, os macrófagos e os neutrófilos que secretam uma série de mediadores pró-inflamatórios como enzimas, citocinas e quimiocinas decorrentes de células e tecidos infectados (Piraino *et al.*, 2010).

Os macrófagos e os neutrófilos são fonte importante de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, e de quimiocinas como a IL-8. Por exercerem suas ações pleiotrópicas de maneira autócrina, parácrina e endócrina, estas moléculas são hábeis em orquestrar a resposta inflamatória (Fieren, *et al.*, 1991).

Após a ativação de leucócitos, por patógenos microbianos, a liberação de citocinas pró-inflamatórias são os primeiros passos para a ativação da resposta imune, pois, ativam as células autoimunes a fagocitar e a liberar radicais livres do oxigênio e nitrogênio, eliminando o patógeno invasor (Duque & Descoteaux, 2014, para revisão). Além disso, induzem efeitos locais, tais como o aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de células inflamatórias e efeitos sistêmicos, como febre. Portanto, a resposta inflamatória é benéfica quando as citocinas são produzidas em amostras apropriadas (Griffin *et al.*, 2012).

2.8. Modelos experimentais para o estudo da interação celular

Nos ensaios experimentais, utilizando os modelos *in vitro* é essencial mimetizar as condições naturais possíveis envolvidas no ambiente celular. Neste sentido, ao escolher um para a realização de experimentos *in vitro* é imprescindível os cuidados com a observação, mensuração e a manipulação das células para que o sistema *in vitro* reproduza o comportamento celular observado no ambiente *in situ*. No modelo de co-cultura, diferentes tipos celulares são agregados em um mesmo ambiente, promovendo a comunicação celular, importante para a regulação da fisiologia e diferenciação destas células. Esta comunicação pode ocorrer de diferentes maneiras: via *sinalização paracrina ou autocrina* (sinais liberados por uma célula ligada a receptores de membrana de outras células, por *sinalização justacrina* (sinais expressos na membrana de uma célula que são reconhecidos por receptores de membrana de outras células), ou por *comunicação juncional* (gap)

(mudanças na sinalização intracelular) (Hendriks *et al.*, 2007). Quando diferentes tipos celulares estão co-cultivados as células podem interagir e se comunicarem por essas diferentes vias, dependendo da proximidade e habilidade de interação ou comunicação. Utilizando ensaios em co-cultura foi evidenciada a interação entre macrófagos e neutrófilos e a importância dessa interação na atividade funcional e secretória de ambas as células no controle da resposta inflamatória (Silva, 2010 a e b).

Assim, considerando os diferentes estudos relatados na literatura, o modelo de co-cultura provou ser uma ferramenta *in vitro* fundamental para elucidar a importância de interações celulares na fisiologia, homeostasia, reparo e regeneração tecidual e a gênese e desenvolvimento de diversas doenças (Hendriks *et al.*, 2007), tornando-se importante modelo para o desenvolvimento de fármacos com potencial terapêutico.

2.9 Serpente *Crotalus durissus terrificus*

O gênero *Crotalus* inclui as serpentes popularmente conhecidas como cascavéis, causadoras de aproximadamente 7,6% dos acidentes ofídicos no Brasil, que podem ser usualmente fatais, quando na ausência de tratamentos adequados específicos (Sinan, 2011), sendo estes acidentes causados principalmente pelas serpentes *Crotalus durissus terrificus* (SCdt).

De acordo com Cardoso *et al.*, (2001), as serpentes deste gênero são terrestres, robustas e pouco ágeis. Sua característica mais marcante é a presença do chocalho ou guizo no extremo caudal. O corpo com a linha vertebral bem pronunciada apresenta um colorido de castanho claro, de tonalidades variáveis. Este gênero está representado no Brasil por uma única espécie *Crotalus durissus* que apresenta uma ampla distribuição geográfica, que são distinguidas de acordo com sua localização territorial e coloração. Nesta espécie estão

incluídas cinco subespécies: *Crotalus durissus cascavella*, sendo a maior das cascavéis, que habita a região do Nordeste (caatinga); a *Crotalus durissus collineatus*, comum nas regiões Sudeste e Centro-oeste; a *Crotalus durissus ruruima*, que vive em regiões de savanas como os campos de Roraima; a *Crotalus durissus marajoensis*, típica da Ilha de Marajó do estado do Pará, e por fim, a *Crotalus durissus terrificus* a forma mais lendária predominante nas regiões Sul e Sudeste. Os venenos produzidos por estas serpentes são variáveis em relação à sua composição, bem como, seus efeitos biológicos (Melgarejo, 2003) **(Figura 5)**.



Figura 5. Serpente *Crotalus durissus terrificus*

As manifestações clínicas do envenenamento por serpentes *Crotalus durissus terrificus* são decorrentes particularmente, da atividade neurotóxica do veneno e caracterizadas pelo aparecimento do chamado “facies miastênico” ou “facies neurotóxico”, onde se distinguem ptose palpebral, diplopia, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos (Rosenfeld, 1971).

Apesar destes efeitos sistêmicos importantes, não são observados, nestes envenenamentos, sinais inflamatórios significativos no local da picada (Brazil, 1934; Amorim *et al.*, 1951). São relatadas ainda, ausência de dor ou dor de pequena intensidade, seguida de

parestesia local (Rosenfeld, 1971). Vale ressaltar que, além de não causar dor, Brazil (1934, 1950, para revisão) evidenciou que este veneno é capaz de causar analgesia em humanos, sendo utilizado no início do século passado, no tratamento de algias, principalmente de origem neoplásica.

2.9.1 Veneno de *Crotalus durissus terrificus* e sua composição

O veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, são formados por um complexo de substâncias biologicamente ativas que incluem toxinas, sendo as principais presentes neste veneno a crotoxina, crotamina, convulxina e giroxina. Peptídeos, enzimas (trombina, nucleotidase, phosphodiesterase, amino-oxidase e NAD-hidrolase), dentre estas destaca-se a trombina, responsável pelos distúrbios da coagulação sanguínea (Raw *et al.*, 1986). Têm sido sugerido que a giroxina e a enzima tipo trombina sejam o mesmo componente, uma vez que ambas apresentam as mesmas características bioquímicas e biológicas (Alexander *et al.*, 1988).

A crotamina é uma proteína básica com peso molecular de 4,8 kDa e ponto isoelétrico de 10,3 (Moura-Gonçalves & Arantes, 1956) e representa cerca de 17% do peso do veneno total. Experimentalmente, a crotamina, quando injetada por via intraperitoneal em camundongos, causa paralisia associada à hiperextensão da pata traseira (Barrio & Brazil, 1950; Laure, 1975).

A convulxina é uma glicoproteína que representa 5% do peso do veneno e está associada a crises convulsivas (Prado-Franceschi & Vital Brazil, 1981). É um complexo com aproximadamente 72 kDa, cujos resíduos de aminoácidos da porção N-terminal apresentam alta similaridade com a botrocetina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Francischetti *et al.*, 1997). Esse complexo formado por unidades globulares α e β , associadas por pontes dissulfídicas, é capaz de agregar e lisar plaquetas através de mecanismo dependente de íons

cálcio, fibrinogênio, adenosina difosfato e independente da ativação da via das ciclooxigenases (Sano-Martins & Daimon, 1992). A convulxina apresenta ação letal, dependente da via de inoculação, sendo muito tóxica quando inoculada pela via intravenosa.

A giroxina é uma glicoproteína com peso molecular de 33 a 35 kDa, sendo um componente tóxico e não letal do veneno crotálico. Este componente age sobre o sistema nervoso central de camundongos, causando a síndrome da lesão labiríntica, provocando movimentos giratórios ao longo do eixo longitudinal do corpo (Barrio, 1961).

A elevada toxicidade do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (VCdt), é atribuída à crotoxina, seu principal componente tóxico, (Brazil, 1972), que corresponde à 60% do veneno total (Slotta; Fraenkel-Conrat, 1938), contribuindo com cerca de 80% da letalidade induzida pelo veneno total.

A crotoxina (CTX) foi isolada por Slotta e Fraenkel-Conrat (1938), e teve sua estrutura descrita por Fraenkel-Conrat e Singer (1956), sendo uma β -neurotoxina heterodimérica, formada pela associação não-covalente de duas diferentes subunidades: a crotapotina (CA) e a fosfolipase A₂ (FLA₂ - CB). Seu peso molecular é de 24 a 26 kDa, ponto isoelétrico de 4,7 e exibe atividades fosfolipásica, neurotóxica (bloqueio da transmissão neuromuscular) e miotóxica (Gopalakrishnakone *et al.*, 1984; Stoker, 1990; Brazil, 1972). A subunidade CB ou FLA₂ apresenta cerca de 14 kDa, ponto isoelétrico 9,7, sendo constituída por uma cadeia única polipeptídica contendo 123 resíduos de aminoácidos, formando estruturas globulares associadas por sete pontes dissulfídicas (Aird *et al.*, 1986). A subunidade CA (crotapotina) apresenta peso molecular de 8,9 kDa, com ponto isoelétrico de 3,4, características ácidas, sendo desprovida de atividade enzimática e tóxica (**Figura 6**).

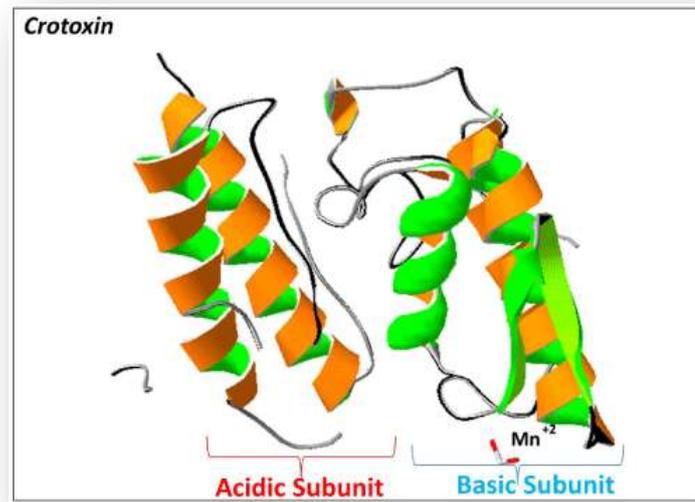


Figura 6. Estrutura Tetramérica (3D) da Crotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Os monômeros das isoformas CB1 e CB2 estão laranja e verde, respectivamente. Esta figura foi gerada utilizando o software SPDB Viewer software (Gasnov *et al.*, 2014).

Além disso, tem sido demonstrado, que a crotapotina, atua como uma molécula carreadora para subunidade fosfolipase A₂, que reduz a interação não específica e ainda, facilita a ligação da CTX com seu alvo, elevando a toxicidade da molécula. Quando ocorre a ligação forma-se um complexo ternário transiente, após isso a crotapotina é liberada. Portanto, a toxicidade da fração CTX é dependente dessa interação em que CA, atua sinergicamente com CB, aumentando sua potencialidade, farmacológica e letal (Hendon & Fraenkel-Conrat, 1971; Bon, 1989).

Para a subunidade CB são atribuídas as atividades fosfolipásicas encontradas no veneno crotálico ou na fração CTX. Quando associada à CA, esta FLA₂ apresenta atividade

hidrolítica reduzida, porém as atividades neurotóxicas e miotóxicas são potencializadas (Choumet *et al.*, 1996).

A CTX exerce seu efeito por meio da associação da fração FLA₂ aos seus alvos nas membranas, levando à dissociação do complexo, onde CA permanece em solução, enquanto CB interage com seus aceptores. Foram realizados estudos no intuito de compreender a ligação da CTX às membranas pré-sinápticas, e esclarecer a participação da subunidade CA. Délot e Bon (1993) observaram que CA participa temporariamente da etapa na qual CB se associa com seu receptor na membrana, formando um complexo ternário transitório. A subunidade CA só se dissocia de CB após o acoplamento irreversível deste componente ao receptor na membrana das terminações nervosas.

2.9.2 Estudos experimentais sobre os efeitos antitumoral, anti-inflamatório e imunorregulatório da CTX

Vários estudos experimentais têm mostrado que o VCdt ou substâncias isoladas deste veneno, em particular, a CTX (Sampaio *et al.*, 2010, Revisão), são capazes de induzir efeitos imunorregulatório (Cardoso & Mota, 1997; Cardoso *et al.*, 2001; Landucci *et al.*, 1995, 2000; Zambelli *et al.*, 2008), anti-inflamatório (Nunes *et al.*, 2007; Sampaio *et al.*, 2003; Souza-e-Silva, 1996) e antitumoral (Corin *et al.*, 1993; Donato *et al.*, 1996; Newman, 1993; Rudd *et al.*, 1994, Costa *et al.*, 2013).

Em relação à atividade antitumoral, ratos tratados pela via subcutânea com CTX apresentaram diminuição significativa do volume da pata causado pelo tumor de Walker 256, evidenciado por meio de pletismografia, acompanhado pela diminuição da formação de neovasos, sugerindo que esta toxina interfere com a neovascularização na vigência do tumor (Brigatte *et al.*, enviado para publicação). Ensaios *in vitro* evidenciaram a ação

direta desta toxina sobre as células tumorais LLC WRC 256, linhagem correspondente ao tumor de Walker 256, inibindo a proliferação, adesão da célula tumoral à fibronectina, além de inibir a polimerização dos filamentos de actina e proteínas sinalizadoras da família das GTPases Rho, tais como a RhoA e a quinase FAK nestas células (Faiad *et al.*, 2008). Esta ação direta também foi caracterizada sobre a função de células endoteliais (t.End.1), inibindo a proliferação, formação de tubos no matrigel 3-D, a migração celular avaliada no modelo de cicatrização (*wound healing*) e quimiotaxia, tanto na presença de meio de cultura como no meio condicionado de célula tumoral. Além disso, CTX inibiu a adesão celular, o que pode ser decorrente da diminuição significativa da expressão e distribuição de subunidades $\alpha 2$ e αv de integrinas na superfície das células endoteliais e, conseqüentemente, da inibição da expressão da FAK e ERK, principalmente frente ao estímulo tumoral (Kato *et al.*, 2013).

Em relação à resposta inflamatória, Nunes e colaboradores (2010) mostraram que a ação inibitória da CTX sobre os componentes vascular e celular da resposta inflamatória induzida pela carragenina, persistem por até 14 dias da administração de uma única dose. Esse efeito anti-inflamatório foi observado também em modelo de colite (Almeida *et al.*, 2013).

Dentre as ações imunomoduladoras descritas para a CTX, foi demonstrado seu efeito inibitório sobre a secreção de citocinas por células dendríticas ativadas com LPS (Freitas *et al.*, 2013). Em modelo de inflamação intestinal aguda induzida por TNBS a CTX modulou a diferenciação de macrófagos e linfócitos, resultando na diminuição do processo inflamatório (Almeida *et al.*, 2013). Ainda, neutrófilos obtidos no modelo de peritonite induzido pela carragenina, tratados *in vivo* ou *in vitro* apresentam importante inibição da atividade de fagocitose, via ação inibitória sobre a fosforilação de proteínas sinalizadoras e a polimerização de actina (Lima *et al.*, 2012). Diferentemente dos

neutrófilos, sobre macrófagos é observado um efeito dual da CTX, uma vez que esta toxina acarreta a drástica inibição sobre a fosforilação de tirosina quinase, levando à inibição do processo de fagocitose, no mesmo momento que se observa a ativação da produção de vias glicolítica e glutaminolítica, por até 14 dias da administração da dose única da toxina (Faiad *et al.*, 2011).

Para melhor compreensão da ação prolongada da CTX sobre os diferentes processos fisiopatológicos, estudos foram direcionados ao efeito desta toxina sobre as células do sistema imune. Neste sentido, foi demonstrado que macrófagos peritoneais de animais portadores de tumor, obtidos 14 dias após a administração subcutânea de uma única injeção de CTX apresentaram aumento da produção de reativos do oxigênio e nitrogênio, e de TNF- α . Da mesma forma, quando a toxina foi administrada após o surgimento da massa tumoral (5º dia da injeção das células tumorais), foi observado o restabelecimento da atividade secretória dos macrófagos peritoneais, restaurando a capacidade destas 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, determinado pela 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. Estas ações estimulatórias da CTX sobre a função e metabolismo de macrófagos são de longa duração, pois foram observadas por até 14 dias após a administração de uma única dose da toxina, acompanhadas de significativa inibição da progressão do tumor (Faiad, 2012). Com o intuito de investigar se essas alterações funcionais acarretadas pela CTX seriam importantes para a ação tumoricida de macrófagos do microambiente tumoral, por meio de ensaios *in vitro*, utilizando a técnica de co-cultura demonstrou-se que macrófagos tratados com a CTX e co-

cultivados na presença das células tumorais da linhagem LLC WRC 256 apresentam aumento expressivo na sua produção de reativos do oxigênio e do nitrogênio (H_2O_2 e NO, respectivamente), da IL-1 β e dos mediadores lipídicos Lipoxina A₄ e análogo estável 15-epi-LXA₄, e consequente decréscimo na proliferação das células tumorais (Costa *et al.*, 2013). Adicionalmente ao efeito inibitório de macrófagos previamente tratados com a CTX sobre a proliferação de células tumorais, macrófagos, após a incubação na presença da toxina, inibem os eventos-chave envolvidos com a angiogênese (Pimenta *et al.*, 2014), reforçando a importância da ação imunomoduladora da CTX durante a progressão tumoral.

Ainda, utilizando modelo de co-cultura, foi demonstrado que macrófagos pré-tratados com a CTX atuam como indutores na ativação de neutrófilos, que adquirem propriedades metabólicas específicas, importantes para sua ação microbicida em processos fisiopatológicos (Oliveira *et al.*, 2012). As ações estimulatórias dos macrófagos tratados com CTX sobre o metabolismo de neutrófilos são observadas, principalmente após o estímulo dos macrófagos com o LPS, evidenciando, mais uma vez, a importante ação modulatória da CTX na cooperação inter-celular, demonstrada pelo aumento da capacidade de liberação de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por neutrófilos co-cultivados com macrófagos previamente tratados com CTX (Oliveira *et al.*, 2012).

Em conjunto, esses estudos evidenciam, mais uma vez, o potencial desta toxina como uma importante ferramenta científica para os estudos dos mecanismos envolvidos em diferentes processos fisiopatológicos.

* * *

Portanto, considerando as ações estimulatórias dos macrófagos tratados com CTX sobre os reativos do oxigênio de neutrófilos e a importância da cooperação entre macrófagos e neutrófilos na defesa antimicrobiana adaptativa, é relevante ampliar os conhecimentos dos mecanismos envolvidos nas ações modulatórias de macrófagos acarretadas pela CTX. Ainda, o melhor conhecimento da importância dessa modulação sobre o metabolismo e função dos neutrófilos, pode evidenciar, mais uma vez, o potencial desta toxina como uma importante ferramenta científica para os estudos dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da resposta inflamatória, bem como, a ação cooperativa entre macrófagos e neutrófilos como células efetoras e moduladoras da imunidade inata.

3 OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Baseados nestes fatos, nosso objetivo é investigar a atividade funcional e os possíveis mediadores secretados por neutrófilos durante e após diferentes períodos de ensaio de co-cultura na presença de macrófagos tratados com CTX.

Para tanto, serão avaliados os seguintes objetivos específicos:

1) Determinar a capacidade fungicida de neutrófilos co-cultivados por 4 horas, 12 horas e 24 horas, com o sobrenadante de macrófagos previamente tratados com a CTX ou apenas meio de cultura (controle), estimulados com LPS e

2) determinar a concentração TNF- α , IL-1 β , CINC-2 α/β e NO em:

a) sobrenadantes das monoculturas de macrófagos e neutrófilos tratados com a CTX, após 4 horas, 12 horas e 24 horas;

b) nas co-culturas entre neutrófilos e macrófagos previamente tratados com a CTX, estimulados com LPS por 4 horas, 12 horas e 24 horas;

c) nos sobrenadantes de neutrófilos submetidos ao ensaio de atividade fungicida, após o co-cultivo por 4 horas, 12 horas e 24 horas na presença de macrófagos, previamente tratados com a CTX, estimulados com LPS.

Monoculturas de macrófagos e neutrófilos foram realizadas simultaneamente aos ensaios de co-cultura.

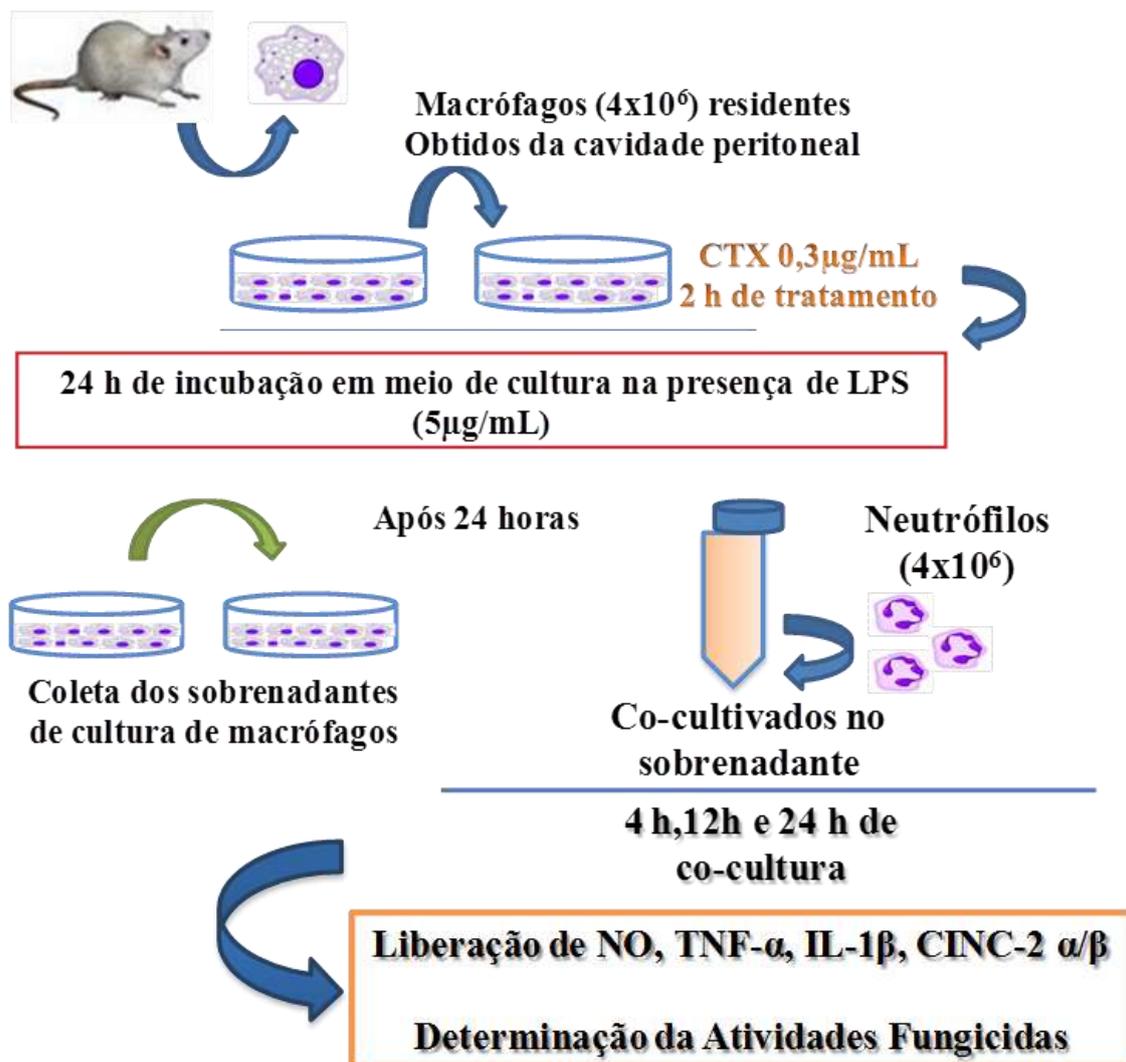
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a avaliação da ação modulatória de macrófagos inflamatórios, previamente tratados com a CTX, sobre a atividade secretória de neutrófilos, primeiramente os macrófagos foram incubados na presença de CTX, por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas na presença de meio de cultura contendo LPS (5 µg/ml), por 24 horas. Após este período, os sobrenadantes foram coletados e neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos, após 4 horas da injeção de carragenina, foram adicionados aos sobrenadantes coletados destas monoculturas. Nos ensaios de co-cultura (sobrenadante-célula), os períodos de incubações foram de 4 horas, 12 horas e 24 horas respectivamente. Após este período, a liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , CINC-2 α/β) e NO por neutrófilos foram determinadas.

Para a determinação da atividade fungicida de neutrófilos após o ensaio de co-cultura, os macrófagos inicialmente residentes peritoneais foram incubados na presença da CTX, ou em meio de cultura (controle), por duas horas e em seguida lavados e incubados em meio de cultura RPMI, contendo LPS (5µg/mL), por 24 horas. Em seguida, neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos, 4 horas após a injeção de carragenina, foram ressuspensos e incubados na presença dos macrófagos inflamatórios ou nos sobrenadantes destes macrófagos, por um período de 24 horas. Após este período a capacidade fungicida e a liberação de NO e citocinas foram determinadas.

Monoculturas de macrófagos e neutrófilos foram mantidas como ensaios controles para avaliar a ação da CTX sobre a liberação dos mediadores investigados, bem como as atividades funcionais destas células.

Protocolo Experimental: Liberação de NO e citocinas (TNF- α , IL-1 β , CINC-2 α/β) e determinação da atividade fungicida por neutrófilos co-cultivados com macrófagos inflamatórios pré-tratados com CTX. Para tanto:



5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – Animais

Foram utilizados ratos Wistar (160-180g). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos no Laboratório de Fisiopatologia com livre acesso a ração e água, por um período mínimo de dois a três dias antes de serem utilizados nos experimentos. Os protocolos experimentais realizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de ética do Instituto Butantan (CEUAIB nº 1013/13).

5.2 – Obtenção de Macrófagos Peritoneais

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Em seguida, a pele da região abdominal foi removida e 10 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. A suspensão de células peritoneais foi diluída na proporção de 1:80 (v:v), com líquido de Turk e a contagem total de células foi feita em Hemocítômetro de Neubauer.

5.3 – Obtenção dos Neutrófilos (modelo de peritonite)

Com a finalidade de obter um exsudato peritoneal contendo 95% de neutrófilos, foi utilizado o modelo de peritonite. Para tanto, os animais foram anestesiados com solução composta por xilasina (Rumpum®) e quetamina (Ketalar®), em uma proporção de 1:1. Os animais anestesiados foram injetados pela via intraperitoneal, com solução de carragenina 4,5mg/kg em 1 mL de PBS estéril. Após as 4 horas, os animais serão sacrificados em CO₂. A pele da região abdominal foi removida, a cavidade foi lavada com 10 mL de PBS estéril e o exsudato foi coletado com o auxílio de pipeta Pasteur de

polietileno. A suspensão de células peritoneais foi diluída na proporção de 1:80 (v:v), com líquido de Azul de Tripán e a contagem total de células foi feita em Hemocítômetro de Neubauer.

5.4 – Obtenção da Crotoxina

A CTX foi purificada a partir de veneno da espécie *Crotalus durissus terrificus*, liofilizado, extraído de vários exemplares de espécimes adultos, fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e estocado a -20°C. A purificação da fração CTX do veneno foi realizada segundo o método descrito por Rangel-Santos e colaboradores (2004), pelo Prof. André Fonseca Alves, assistente técnico responsável do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

5.5 – Tratamento com a CTX e ensaio de co-cultura

Os macrófagos peritoneais residentes foram obtidos conforme descrito no item **5.2**. As células (4×10^6 /mL de meio de cultura RPMI) foram aderidos em placa de 24 poços por 1 hora. Após esse período, os poços foram lavados e incubados com 1 mL de meio de cultura RPMI (controle) ou meio de cultura RPMI na presença de CTX (0,3µg/mL), a 5% de CO₂ a 37°C, por um período de 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas na presença de meio de cultura fresco contendo LPS (5µg/ml) por 24 horas. Neste mesmo período, neutrófilos (4×10^6 céls/ml) foram obtidos conforme item **5.3** e incubados na presença de meio de cultura por 24 horas. Após esse período, foram lavados e incubados com os sobrenadantes coletados das monoculturas de macrófagos (contato célula-sobrenadante). As co-culturas foram realizadas por um período de 4 horas, 12 horas e 24 horas respectivamente, para a quantificação da produção do NO pelos neutrófilos.

Monoculturas de macrófagos e neutrófilos foram mantidas como ensaios controles para avaliar a ação da CTX sobre a liberação dos mediadores investigados. Para a quantificação em monoculturas de neutrófilos (4×10^6 céls/ml), as células foram obtidas conforme item 5.3, incubadas com meio de cultura RPMI (controle) ou meio de cultura RPMI na presença de CTX ($0,3 \mu\text{g/mL}$), a 5% de CO_2 a 37°C , por um período de 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas na presença de meio de cultura fresco contendo LPS ($5 \mu\text{g/ml}$) por 24 horas. A concentração da CTX, bem como o tempo de incubação com a toxina foi baseada em estudos anteriores (Sampaio *et al.*, 2003; 2005; 2006, Costa *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2012).

5.6 Determinação da atividade fungicida

5.6.1 Obtenção de *Candida albicans*

Candida albicans (ATCC 9002-8) foi fornecida pelo Dr. Sandro Rogerio de Almeida do Departamento de Análises clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O fungo *Candida albicans* foi cultivado em meio Sabouraud dextrose 10%, a 37°C por 24 horas, para a obtenção de forma de levedura do fungo. Após o cultivo o fungo foi coletado com uma alça de platina e ressuspenso em PBS Dulbecos, pH 7,4. Uma suspensão contendo 5×10^6 leveduras foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos e ressuspenso em meio RPMI para o ensaio da capacidade fungicida.

5.6.2 Atividade fungicida

Neutrófilos ($1 \times 10^6/\text{mL}$), tratados conforme **item 5.5**, foram centrifugados por 10

min, a 1000 rpm, 4°C e o *pellet* ressuspensão em 1,0 mL de meio de cultura RPMI 1640, mantendo a proporção de 1 célula: 4 leveduras de *Candida albicans*, respectivamente. Após 40 minutos de incubação em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C, foram obtidos esfregaços utilizando uma citocentrífuga, na rotação de 800 rpm, por 5 minutos. A atividade fungicida foi determinada por meio da técnica proposta por Herscowitz (1981), modificada por Corazzini (1981) & Lima et al. (2012). Nesta técnica, apenas as leveduras intracelulares vivas, coram-se em azul pelo corante May-Grunwald-Giemsa. A atividade fungicida foi avaliada em microscópio de luz (objetiva de imersão), em neutrófilos que fagocitaram *Candida albicans* expressos através de “escore”, como segue descrito abaixo:

Resultado	“Escore”
Nº de neutrófilos c/ nenhuma levedura de <i>Candida albicans</i> morta	x0
Nº de neutrófilos c/ uma levedura de <i>Candida albicans</i> morta	x1
Nº de neutrófilos c/ 2 leveduras de <i>Candida albicans</i> morta	x2
Nº de neutrófilos c/3 leveduras de <i>Candida albicans</i> morta	x3
Nº de neutrófilos c/ mais de 3 leveduras de <i>Candida albicans</i> morta	x4

5.7 - Geração de Espécies Reativas do Nitrogênio

5.7.1 – Determinação da produção de Óxido Nítrico: A concentração de NO foi medida por meio do método colorimétrico indireto pelo reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% diicloreto de α -naftiletinodiamina, 2,5% de H₃PO₄), que determina indiretamente pela quantificação de nitrito (NO₂⁻) produzido, no qual, reflete a produção de NO pelos neutrófilos. As células (4x10⁵ céls/100µL) foram tratadas conforme **itens 5.5**, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente com o reagente. O conteúdo de

nitrito foi determinado utilizando-se uma curva com diferentes concentrações de Nitrito de Sódio (NaNO_2), como padrão e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Os resultados foram expressos em μmoles de NO_2^- por 4×10^5 neutrófilos/ $100\mu\text{L}$ (Stuehr & Nathan, 1989).

5.8 Quantificação da produção de Citocinas (TNF- α , IL-1 β e CINC-2 α/β)

As citocinas presentes nos sobrenadantes das co-culturas e monoculturas ($100\mu\text{l}$), foram mensuradas através do ensaio imunoenzimático de ELISA, conforme as especificações do fabricante. Resumidamente, microplacas de ELISA (Immuno Maxisorp, Nunc, NJ), foram sensibilizadas com anticorpos primários monoclonais ou policlonais, anti-IL-1 β , TNF- α e CINC-2 α/β , reativos para ratos (R&D Systems, Minneapolis, MN), e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. Após incubação as placas foram bloqueadas com PBS/Soro Albumina bovina 4%, por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionadas as amostras e as diluições seriadas da curva padrão, as placas foram incubadas por duas horas à temperatura ambiente e após o término deste período, os respectivos anticorpos secundários anti-citocinas/anti-quimiocinas foram adicionados e incubados por 2 horas. A seguir, foi adicionada streptoavidina-peroxidase conjugada do Kit e as placas foram incubadas por 20 minutos, sob proteção da luz, para o desenvolvimento de cor. Após incubação foi adicionado o substrato 3,3',5,5' tetrametilbenzedina (TMB, R&D) e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas de ELISA à 450 nm (Spectra Max, 190, Molecular Devices).

As concentrações de citocinas foram determinadas por comparação com uma curva padrão preparada com as citocinas recombinantes de murídeos (R&D Systems), que podem ser detectados em pg/ml (15-4000 pg/ml). As concentrações de citocinas

expressas como a quantidade de citocina induzida em picogramas por 4×10^5 neutrófilos/ml.

5.9 Análise estatística

Os resultados obtidos são expressos como média +/- erro padrão de média e foram analisados estatisticamente por ANOVA e teste de Bonferroni (INSTAT – GraphPad Software).

6 RESULTADOS

6.1 Efeito modulatório dos sobrenadantes de macrófagos previamente tratados com CTX sobre a capacidade fungicida por neutrófilos

6.1.1. Atividade fungicida por monoculturas de neutrófilos

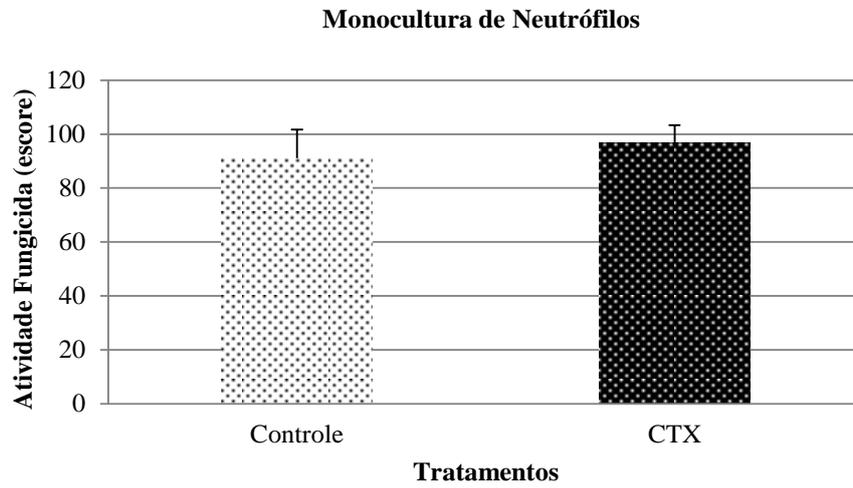
Neutrófilos, incubados na presença da CTX (0,3 µg/ml) por 1 hora e mantidos em cultura por 24 horas, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na capacidade fungicida, quando comparado aos seus respectivos controles (**Figura 7 A**).

6.1.2. Atividade fungicida por neutrófilos após co-cultura

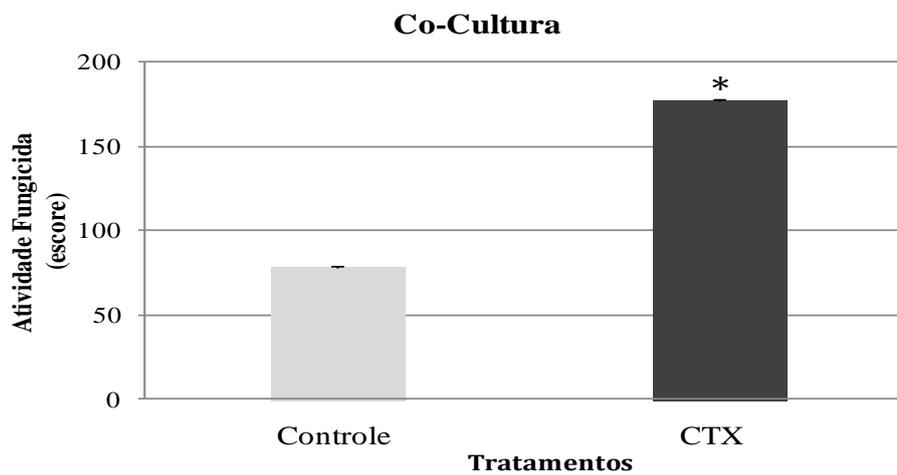
Por outro lado, conforme demonstrado na **Figura 7 B**, neutrófilos co-cultivados na presença do sobrenadante de macrófagos inflamatórios tratados previamente com CTX, apresentaram significativo aumento na capacidade fungicida (127%), quando comparadas às células incubadas nos sobrenadantes obtidos de monoculturas de macrófagos controles.

Figura 7. Atividade funcional de neutrófilos co-cultivados no sobrenadante de macrófagos inflamatórios pré-tratados com CTX

A)



B)



Os neutrófilos foram coletados do exsudato peritoneal de ratos, após 4 horas a injeção de carragenina e incubados (4×10^6 células), tratados ou não previamente com CTX ($0.3 \mu\text{g/ml}$), por um período de 1 hora (**A - monoculturas controles**) ou incubados no sobrenadante de monoculturas de macrófagos pré-tratados com a CTX ($0,3 \mu\text{g/mL}$) ou apenas na presença de meio (controle), por um período de 2 h e estimulados com LPS ($5 \mu\text{g/mL}$), por 24 horas (**B- co-culturas**). Para a determinação da capacidade fungicida, os neutrófilos foram retirados da cultura após 24 horas de incubação, centrifugados e ressuspensos na presença de 1 mL de meio de cultura contendo as partículas de *Candida albicans* (1cel:3 partículas Ca), por 4 horas. A capacidade fungicida foi determinada por teste de coloração de exclusão, onde apenas as leveduras intracelulares vivas coram-se em azul pela contagem de leveduras vivas e mortas, expressas em “escore”. A porcentagem da atividade fungicida foi quantificada em cada amostra, pela contagem de 100 células em microscopia de luz. Os resultados são representativos de 3 ensaios distintos e expressam a média \pm e.p.m de 3 animais para obtenção dos macrófagos e 2 animais para obtenção dos neutrófilos. * $P < 0,01$, por comparação ao grupo controle.

6.2 Efeito da CTX sobre a produção de TNF- α por neutrófilos

6.2.1 – Produção de TNF- α por monoculturas de neutrófilos

Em relação à produção de TNF- α por monoculturas de neutrófilos tratados previamente com CTX (0,3 μ g/ml) por 1 hora, não foram observadas diferença estatisticamente significativa entre os grupos, nos diferentes períodos investigados. Porém, pode-se observar queda nos níveis do mediador investigado entre as 12^a horas e 24^a horas (**Figura 8 A**).

6.2.2 – Produção de TNF- α por neutrófilos após co-cultura

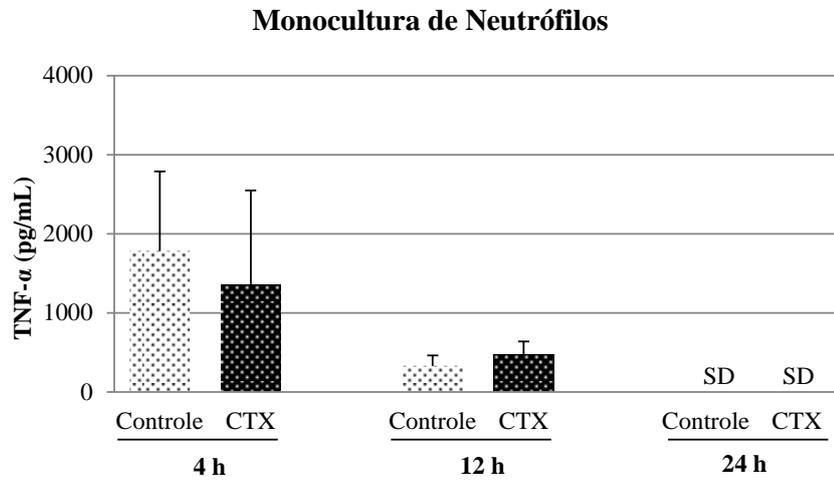
Neutrófilos co-cultivados nos sobrenadantes de macrófagos inflamatórios, tratados com CTX (0,3 μ g/ml), não apresentam diferença estatisticamente significativa nos níveis de TNF- α entre os grupos (controle/tratado), nos diferentes períodos de incubação 4, 12 e 24 horas, respectivamente. Novamente, observa-se queda nos níveis do mediador investigado entre as 12^a horas e 24^a horas de co-cultura (**Figura 8 B**).

6.2.3 – Produção de TNF- α por neutrófilos após co-cultura e submetidos à atividade fungicida

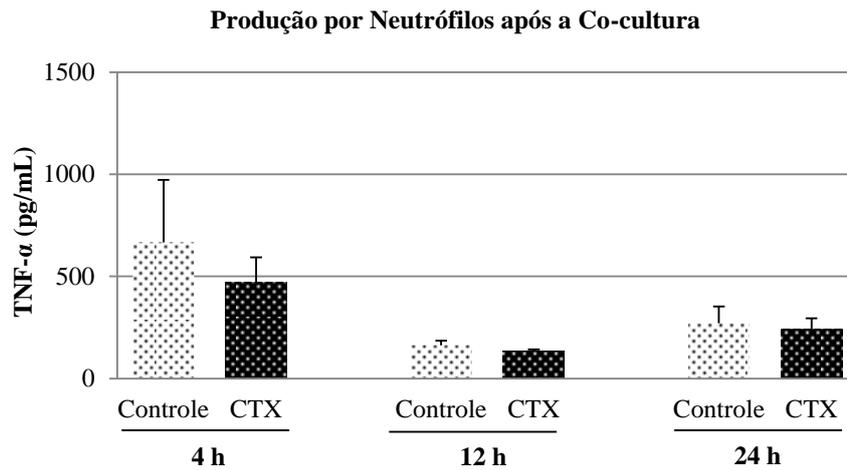
Conforme demonstrado na **Figura 8 C**, diferentemente ao observado nas situações anteriores, pode-se observar que neutrófilos co-cultivados por 4 horas na presença de macrófagos inflamatórios tratados com CTX, submetidos à capacidade fungicida, apresentaram aumento significativo nos níveis de TNF- α (4,25x), em relação ao grupo controle. No entanto, após a 12^a hora e 24^a hora, não é observada diferença na produção de TNF- α , entre os grupos tratados e controles. Diferentemente ao observado anteriormente, observa-se aumento na produção do mediador investigado ao longo das 24 horas de incubação (**Figura 8 C**).

Figura 8. Produção de TNF- α por neutrófilos

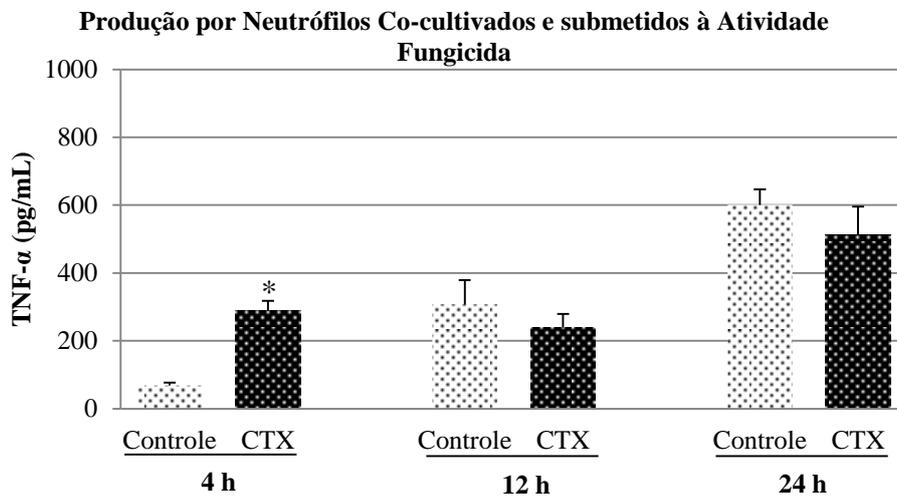
A)



B)



C)



Para a determinação de **TNF- α** em monocultura de neutrófilos (**A**), os mesmos foram coletados do exsudato de ratos após 4 horas a injeção de carragenina e incubados (4×10^6 células), tratados ou não previamente com CTX (0,3 μ g/ml), por um período de 1 hora, lavados e mantidos em cultura por 4, 12 e 24 horas. Após os diferentes períodos, os sobrenadantes foram obtidos. Para a determinação do **TNF- α** após a realização da co-cultura (**B**), os neutrófilos foram incubados com o sobrenadante obtido de cultura de macrófagos inflamatórios pré-tratados com a CTX (0,3 μ g/mL) ou apenas na presença de meio de cultura (controle), por um período de 2 h, estimulados com LPS (5 μ g/mL), por 24 horas. Após esse período, os neutrófilos foram co-cultivados nos sobrenadantes dos macrófagos por 4, 12 e 24 horas. Após os diferentes períodos, os sobrenadantes foram obtidos. Para a determinação do **TNF- α** após o ensaio da atividade fungicida (**C**), os neutrófilos submetidos à co-cultura com o sobrenadante de macrófagos, nos diferentes períodos (4, 12 e 24 horas), foram coletados, centrifugados e submetidos à atividade fungicida por um período de 4 horas. Para a determinação da produção de TNF- α as placas foram sensibilizadas com anticorpos de ratos monoclonais ou policlonais, anti-TNF- α e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os neutrófilos foram retirados da cultura, plaqueadas (100 μ L) em placas de 96 poços e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Após o término deste período, os respectivos anticorpos secundários anti-citocinas foram adicionados. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas e, a absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 450 nm obtendo-se a densidade óptica (D.O.) e calculando-se os resultados em picogramas de TNF- α por 4×10^5 neutrófilos/ml. Os resultados são representativos de 3 ensaios distintos e expressam a média \pm e.p.m de 3 animais para obtenção dos macrófagos e 2 animais para obtenção dos neutrófilos. Na Figura 8C, *P<0,0001, por comparação ao respectivo grupo controle.

6.3 Efeito da CTX sobre a produção de IL-1 β por neutrófilos

6.3.1 – Produção de IL-1 β por neutrófilos

Neutrófilos, tratados com CTX (0,3 μ g/ml) por 1 hora e mantidos em cultura por 4 horas apresentaram inibição significativa (76%) na produção de IL-1 β , quando comparados com seus respectivos controles. Entretanto, na 12^a hora e 24^a hora pode-se observar um decréscimo nos níveis de IL-1 β e demonstra que a adição da CTX durante estes períodos não afetou a liberação do mediador investigado em relação aos grupos controles (**Figura 9 A**).

6.3.2 – Produção de IL-1 β por neutrófilos após co-cultura

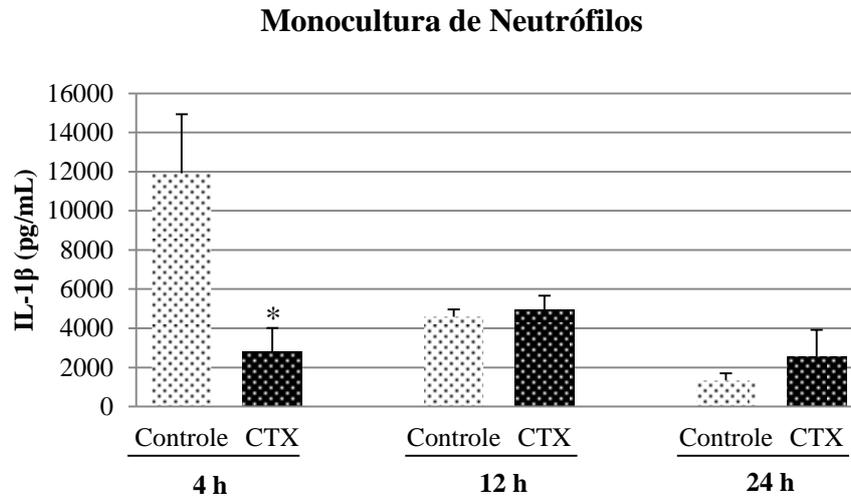
A **Figura 9 B**, demonstra que neutrófilos co-cultivados no sobrenadante de macrófagos inflamatórios tratados com CTX, não apresentaram alterações estatisticamente significativas na produção do presente mediador investigado.

6.3.3 – Produção de IL-1 β por neutrófilos após co-cultura e submetidos ao ensaio da capacidade fungicida

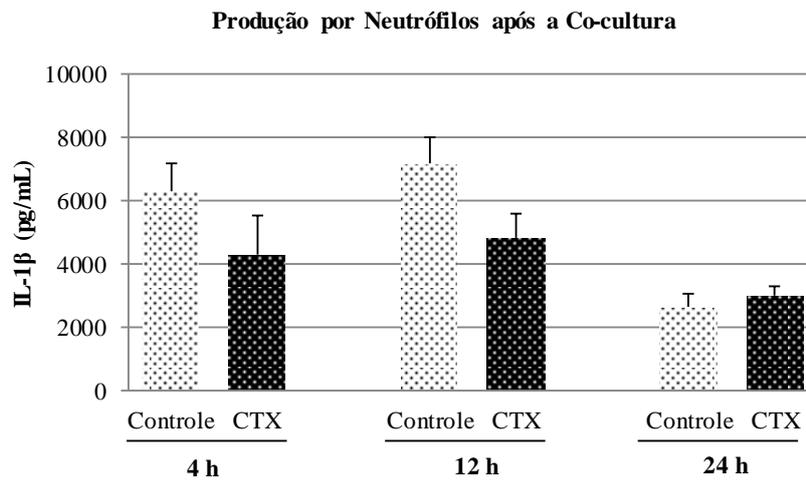
Conforme demonstrado na **Figura 9 C** não são observadas diferenças estatisticamente significativas dos níveis de IL-1 β entre os grupos, nos diferentes períodos de incubação, durante a atividade fungicida de neutrófilos.

Figura 9. Produção de IL-1 β por neutrófilos

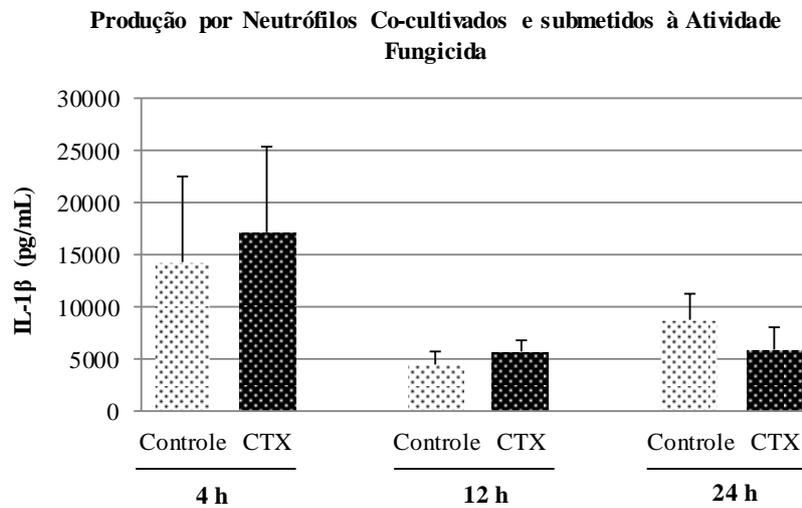
A)



B)



C)



Para a determinação da produção de **IL-1 β** em monocultura de neutrófilos (**A**), os mesmos foram coletados do exsudato de ratos após 4 horas a injeção de carragenina e incubados (4×10^6 células), tratados ou não previamente com CTX (0,3 μ g/ml), por um período de 1 hora, lavados e mantidos em cultura por 4, 12 e 24 horas. Após os diferentes períodos, os sobrenadantes foram obtidos. Para a determinação da **IL-1 β** após a realização da co-cultura (**B**), os neutrófilos foram incubados com o sobrenadante obtido de cultura de macrófagos inflamatórios pré-tratados com a CTX (0,3 μ g/mL) ou apenas na presença de meio de cultura (controle), por um período de 2 h, estimulados com LPS (5 μ g/mL), por 24 horas. Após esse período, os neutrófilos foram co-cultivados nos sobrenadantes dos macrófagos por 4, 12 e 24 horas. Após os diferentes períodos, os sobrenadantes foram obtidos. Para a determinação da **IL-1 β** após o ensaio da atividade fungicida (**C**), os neutrófilos submetidos à co-cultura com o sobrenadante de macrófagos, nos diferentes períodos (4, 12 e 24 horas), foram coletados, centrifugados e submetidos à atividade fungicida por um período de 4 horas. Para a determinação da produção de IL-1 β as placas foram sensibilizadas com anticorpos de ratos monoclonais ou policlonais, anti-IL-1 β e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os neutrófilos foram retirados da cultura, plaqueadas (100 μ L) em placas de 96 poços e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Após o término deste período, os respectivos anticorpos secundários anti-citocinas foram adicionados. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas e, a absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 450 nm obtendo-se a densidade óptica (D.O.) e calculando-se os resultados em picogramas de IL-1 β por 4×10^5 neutrófilos/ml. Os resultados são representativos de 3 ensaios distintos e expressam a média \pm e.p.m de 3 animais para obtenção dos macrófagos e 2 animais para obtenção dos neutrófilos. Na Figura 9A, *P<0,05, por comparação ao respectivo grupo controle.

6.4 Efeito da CTX sobre a produção de Cinc-2 por neutrófilos

6.4.1 – Produção de Cinc-2 por monoculturas de neutrófilos

Neutrófilos, coletados do exsudato peritoneal de ratos, tratados com CTX (0,3 µg/ml) por 1 hora, não demonstraram diferença significativa na liberação de Cinc-2, após 4, 12 e 24 horas de cultura, quando comparados às células incubadas apenas na presença de meio de cultura, no mesmo período (**Figura 10 A**).

6.4.2 – Produção de Cinc-2 por neutrófilos após co-cultura

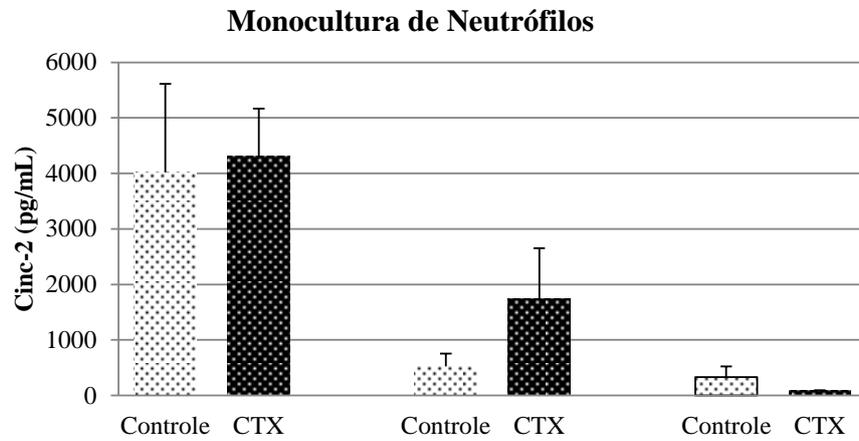
A **Figura 10 B**, demonstra, que neutrófilos co-cultivados na presença de sobrenadantes de macrófagos previamente tratados com CTX, não apresentam diferença na produção de Cinc-2, quando comparados aos seus respectivos controles, independente do período avaliado.

6.4.3 – Produção de Cinc-2 por neutrófilos após co-cultura e submetidos a capacidade fungicida

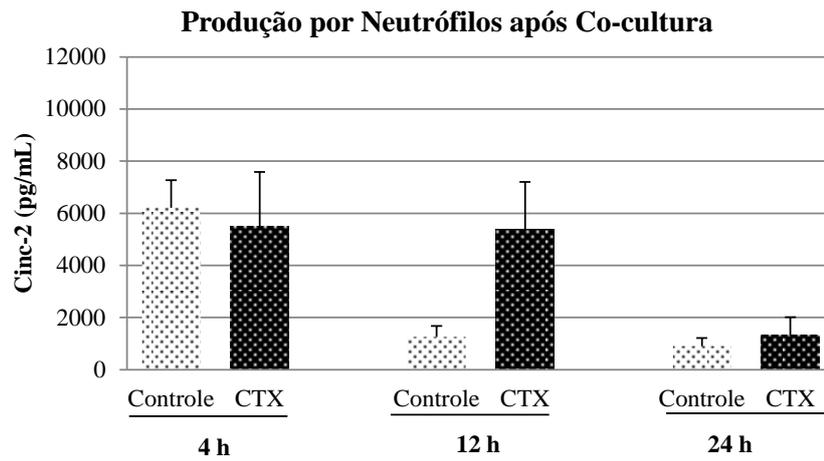
Neutrófilos co-cultivados por diferentes períodos na presença de sobrenadante obtidos de macrófagos inflamatórios, tratados previamente com CTX (0,3 µg/ml) e submetidos ao ensaio da capacidade fungicida, não apresentaram diferença significativa na liberação de Cinc-2, quando comparado aos respectivos grupos controles (**Figura 10 C**).

Figura 10. Produção de Cinc-2 por neutrófilos

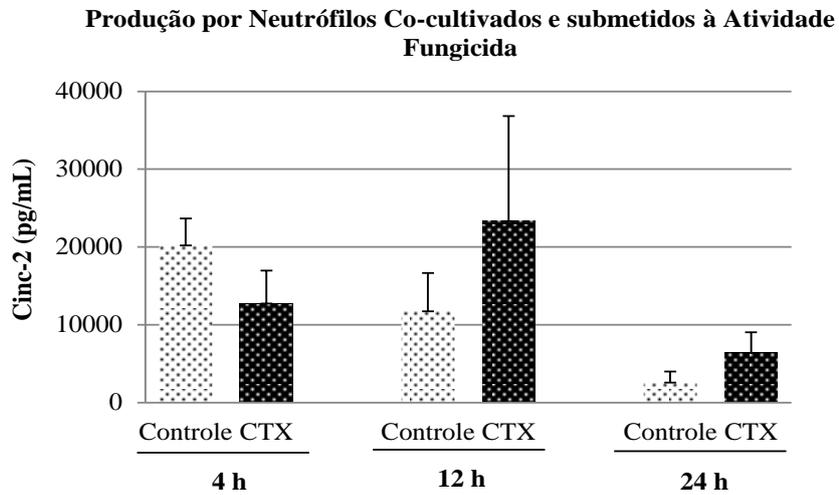
A)



B)



C)



Para a determinação da **Cinc-2** em monocultura de neutrófilos (**A**), os mesmos foram coletados do exsudato de ratos após 4 horas a injeção de carragenina e incubados (4×10^6 células), tratados ou não previamente com CTX ($0,3 \mu\text{g/ml}$), por um período de 1 hora, lavados e mantidos em cultura por 4, 12 e 24 horas. Após os diferentes períodos, os sobrenadantes foram obtidos. Para a determinação da **Cinc-2** após a realização da co-cultura (**B**), os neutrófilos foram incubados com o sobrenadante obtido de cultura de macrófagos inflamatórios pré-tratados com a CTX ($0,3 \mu\text{g/mL}$) ou apenas na presença de meio de cultura (controle), por um período de 2 h, estimulados com LPS ($5 \mu\text{g/mL}$), por 24 horas. Após esse período, os neutrófilos foram co-cultivados nos sobrenadantes dos macrófagos por 4, 12 e 24 horas. Após os diferentes períodos, os sobrenadantes foram obtidos. Para a determinação da **Cinc-2** após o ensaio da atividade fungicida (**C**), os neutrófilos submetidos à co-cultura com o sobrenadante de macrófagos, nos diferentes períodos (4, 12 e 24 horas), foram coletados, centrifugados e submetidos à atividade fungicida por um período de 4 horas. Para a determinação da produção de Cinc-2 as placas foram sensibilizadas com anticorpos de ratos monoclonais ou policlonais, anti-Cinc-2 e incubadas por 18 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os neutrófilos foram retirados da cultura, plaqueadas ($100 \mu\text{L}$) em placas de 96 poços e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Após o término deste período, os respectivos anticorpos secundários anti-citocinas foram adicionados. Os ensaios foram realizados em quadruplicatas e, a absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 450 nm obtendo-se a densidade óptica (D.O.) e calculando-se os resultados em picogramas de Cinc-2 por 4×10^5 neutrófilos/ml. Os resultados são representativos de 3 ensaios distintos e expressam a média \pm e.p.m de 3 animais para obtenção dos macrófagos e 2 animais para obtenção dos neutrófilos.

6.5 Efeito da CTX sobre a produção de NO por monoculturas de macrófagos

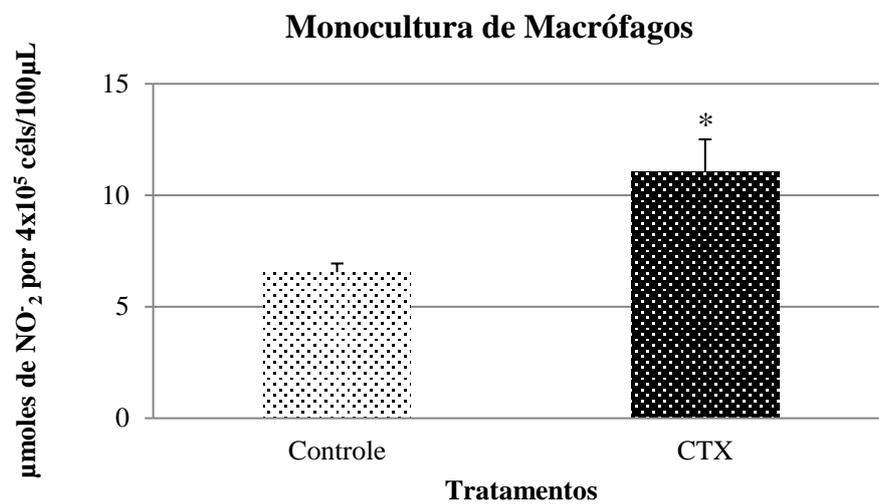
Os resultados apresentados na **Figura 11 A**, demonstram que macrófagos residentes obtidos da cavidade de ratos, quando tratados com CTX (0.3µg/ml), por 2 horas apresentaram aumento significativo (50%) na produção de óxido nítrico, quando comparados aos macrófagos incubados apenas na presença de meio de cultura.

6.6 Efeito da CTX sobre a produção de NO por monoculturas de neutrófilos

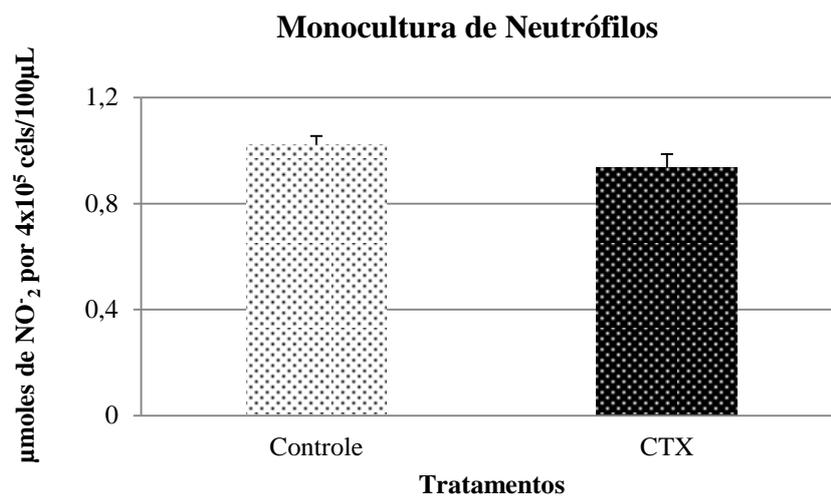
Diferentemente ao observado para os macrófagos, os resultados demonstrados na **Figura 11 B**, indicam que a CTX não afetou a produção de óxido nítrico por neutrófilos obtidos do exsudato peritoneal de ratos, tratados com CTX por 1 hora, onde não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 11. Produção de Óxido Nítrico por macrófagos

A)



B)



Determinação da produção NO_2^- por macrófagos (**A**), as células foram coletadas da cavidade peritoneal de ratos e aderidas (4×10^6 células por poço em placas de 96 poços), na presença de meio de cultura RPMI 1640, com 10% SFB, por 1 hora. Após este período, as células foram tratadas com CTX ($0,3 \mu\text{g/mL}$), por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas na presença de meio de cultura fresco contendo LPS ($5 \mu\text{g/ml}$) por 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes dos macrófagos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente com o reagente de griess. Determinação da produção NO_2^- por Neutrófilos (**B**), as células foram coletadas do exsudato peritoneal de ratos, após 4 horas a injeção de carragenina e incubadas na presença de CTX ($0,3 \mu\text{g/mL}$), ou apenas na presença de meio de cultura (controle), por um período de 1 hora, e posteriormente, incubados na presença de meio de cultura contendo LPS ($5 \mu\text{g/mL}$), por 24 horas. Em seguida, a placa foi centrifugada e os sobrenadantes foram coletados e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente com o reagente de griess. O conteúdo de nitrito foi determinado utilizando-se uma curva com diferentes concentrações de Nitrito de Sódio (NaNO_2), como padrão e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Os resultados foram expressos em μmoles de NO_2^- por 4×10^5 neutrófilos/ $100 \mu\text{L}$. Os resultados são representativos de 3 ensaios distintos e expressam a média \pm e.p.m de 3 animais para obtenção dos macrófagos e 2 animais para obtenção dos neutrófilos. * $P < 0,001$, por comparação ao grupo controle.

6.7 Efeito modulatório da CTX sobre a liberação de NO por neutrófilos em modelo de co-cultura e submetidos a capacidade fungicida

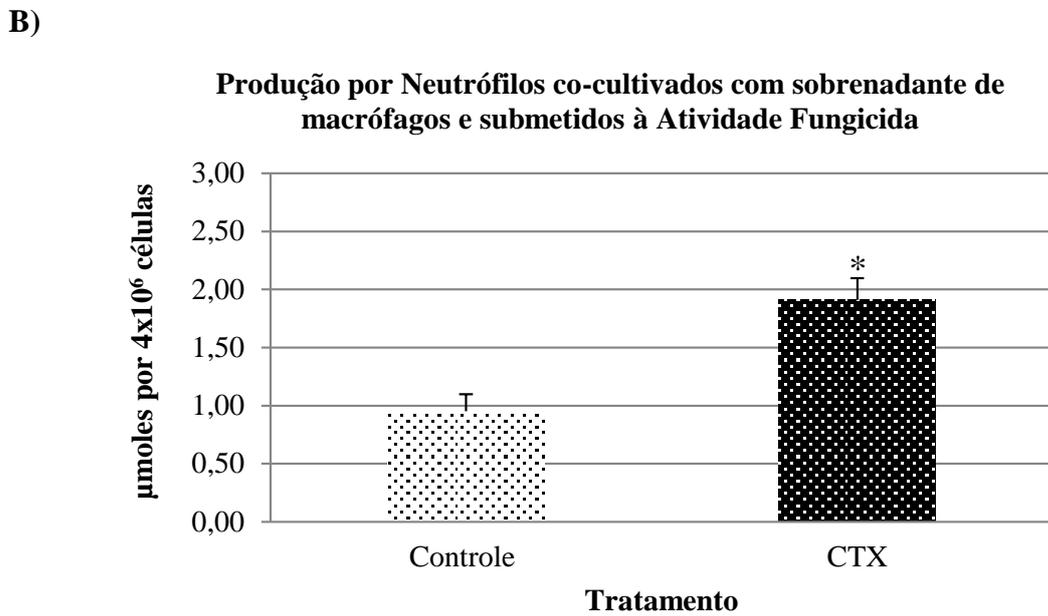
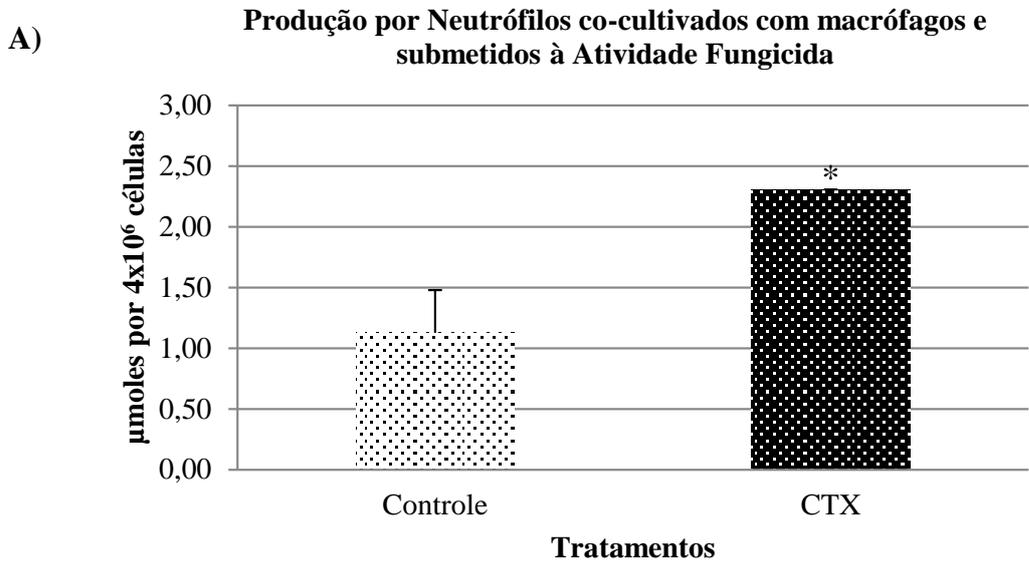
6.7.1 – Produção de NO por neutrófilos co-cultivados com macrófagos pré-tratados e submetidos à atividade fungicida

Neutrófilos co-cultivados por 24 horas com macrófagos inflamatórios previamente tratados com CTX, e incubados com partículas de *Candida albicans* apresentaram aumento significativo (90%) na produção de NO, quando comparadas às células incubadas apenas na presença de meio de cultura (**Figura 13 A**).

6.7.2 – Produção de NO por neutrófilos co-cultivados com sobrenadantes de macrófagos pré-tratados e submetidos à atividade fungicida

O mesmo comportamento estimulatório sobre a produção de NO foi observado, em neutrófilos submetidos à atividade fungicida (101%), após o co-cultivo por 24 horas no sobrenadante coletado de monoculturas de macrófagos inflamatórios previamente tratados com CTX, quando comparadas às células incubadas nos sobrenadantes obtidos de monoculturas de macrófagos apenas com meio de cultura (**Figura 13 B**).

Figura 13. Efeito modulatório da CTX sobre a produção de NO por neutrófilos co-cultivados com macrófagos (A) ou sobrenadante de macrófagos (B) pré-tratados com a CTX, após ensaio da capacidade fungicida.



Para a determinação da produção NO_2^- por neutrófilos co-cultivados com macrófagos pré-tratados (**A**) ou co-cultivados com sobrenadantes de macrófagos pré-tratados (**B**), inicialmente macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de ratos e aderidos (4×10^6 células) na presença de meio de cultura RPMI 1640, com 10% SFB, por 1 hora. Após este período, as células foram tratadas com CTX ($0,3 \mu\text{g/mL}$), por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas na presença de meio de cultura fresco contendo LPS ($5 \mu\text{g/ml}$) por 24 horas. Os neutrófilos foram coletados do exsudato peritoneal de ratos, após 4 horas a injeção de carragenina e incubados na presença de macrófagos ou de sobrenadantes obtidos desses macrófagos, por um período de 24 horas. Após esse período, os neutrófilos foram retirados das co-culturas, centrifugados e ressuspensos na presença de 1 mL de meio de cultura contendo as partículas de *Candida albicans* (1cel:3 partículas Ca), por 4 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram centrifugados e incubados por 10 minutos à temperatura ambiente com o reagente de Griess. O conteúdo de nitrito foi determinado utilizando-se uma curva com diferentes concentrações de Nitrito de Sódio (NaNO_2), como padrão e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm. Os resultados foram expressos em μmoles de NO_2^- por 4×10^5 neutrófilos/ $100 \mu\text{L}$. Os resultados são representativos de 3 ensaios distintos e expressam a média \pm e.p.m de 3 animais para obtenção dos macrófagos e 2 animais para obtenção dos neutrófilos. * $P < 0,001$, por comparação ao grupo controle.

7 DISCUSSÃO

Como citado na Introdução, macrófagos tratados com CTX ou o sobrenadantes obtidos desses macrófagos acarretam importante ação estimulatória sobre a liberação de peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso por neutrófilos, principalmente após o estímulo dos macrófagos com o LPS, em modelo de co-cultura, evidenciando a importante ação modulatória da CTX na cooperação inter-celular (Oliveira *et al.*, 2012). Apesar dessas evidências, os mediadores envolvidos nesta ação estimulatória não foram demonstrado na sua totalidade.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a atividade funcional e os possíveis mediadores secretados por neutrófilos durante e após diferentes períodos de ensaio de co-cultura na presença de macrófagos tratados com CTX.

Inicialmente, avaliou-se a capacidade fungicida de neutrófilos, após incubação dos mesmos nos sobrenadantes de macrófagos inflamatórios tratados previamente com CTX. Como controle, foram realizadas culturas de neutrófilos tratadas diretamente na presença da CTX (0,3µg/mL). Os resultados obtidos evidenciam que em monoculturas de neutrófilos inflamatórios obtidos, após 4 horas da injeção da carragenina na cavidade peritoneal de ratos, quando tratados com CTX, não apresentaram alteração na capacidade fungicida em relação ao grupo controle (**Figura 7 A**). Entretanto, quando os neutrófilos foram incubados em sobrenadantes de macrófagos previamente tratados com a toxina e estimulados com LPS, foram capazes de aumentar significativamente a morte de leveduras de *Candida albicans* (**Figura 7 B**). Esses resultados obtidos demonstram que os macrófagos, na presença da CTX, são importantes para a ativação de neutrófilos.

Diversos trabalhos demonstram que o LPS acarreta estado de ativação dos macrófagos ideais para responderem às injúrias, sendo essa resposta orquestrada principalmente por macrófagos M1 (Meffert & Baltimore, 2005), perfil caracterizado

pelo aumento da liberação e produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, moléculas fundamentais para potencializar a capacidade secretória de neutrófilos (Marcinkiewiks, 1994; Sierra-Filardi et al., 2011; Muralidharan & Mandrekar, 2013). Esta ativação culmina na transcrição de vários genes para a produção de citocinas, tais como IL-1 β , IL-8, TNF- α , amplificando o mecanismo de cooperação destas células no processo inflamatório infeccioso (Silva, 2010 a e b).

Assim, com a finalidade de verificar se o aumento da liberação de reativos do oxigênio, observado em estudo anterior (Oliveira *et al.*, 2012), bem como da atividade fungicida de neutrófilos co-cultivados no sobrenadante de macrófagos inflamatórios tratados com CTX estariam associados à ação de citocinas pró-inflamatórias, foram avaliados os níveis de TNF- α , IL-1 β , e Cinc-2, nos sobrenadantes de neutrófilos, após a co-cultura de macrófagos tratados com CTX e após a atividade fungicida.

Em relação ao efeito direto da CTX sobre a produção de TNF- α por monoculturas de neutrófilos, obtidos após 4 horas de injeção da carragenina na cavidade peritoneal de ratos, não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos do presente mediador investigado em relação às monoculturas mantidas apenas em meio de cultura, entre a 4^a hora e 12^a hora de incubação. Na 24^o hora, os níveis desse mediador não foram detectados em ambas as culturas (tratada/controle) (**Figura 8 A**). Quando investigado o nível desse mediador em sobrenadantes de neutrófilos co-cultivados, em diferentes períodos em sobrenadantes de macrófagos inflamatórios, não foi observada, novamente, diferenças na análise quantitativa entre os grupos tratados e controles (**Figura 8 B**). Entretanto, conforme demonstrado na **Figura 8 C**, observa-se aumento da significativo da produção de TNF- α por neutrófilos co-cultivados por 4 horas no sobrenadante de macrófagos pré-tratados com CTX e submetidos à atividade fungicida.

Esse aumento, induzido pela atividade funcional desempenhada pelo neutrófilo, não foi observada nos demais períodos avaliados (12^a e 24^a horas), evidenciando a importância deste mediador, nas primeiras horas da atividade funcional dos neutrófilos estimulados pela incubação previa com sobrenadantes de macrófagos tratados com a CTX.

Quanto à produção de IL-1 β , foi observada inibição significativa (76%), na produção do mediador por monoculturas de neutrófilos tratados com CTX, na 4^a hora de incubação (**Figura 9 A**). Estes dados corroboram aos dados demonstrados por nosso grupo (Nunes *et al.*, 2012), que são compatíveis com o perfil anti-inflamatório descrito para esta toxina. Esta ação inibitória não foi detectada nos demais períodos avaliados. Quando os neutrófilos foram co-cultivados no sobrenadante de macrófagos inflamatórios, observa-se redução percentual nos níveis de IL- β entre 4 e 12 horas de incubação, porém essa redução não foi estatisticamente diferente (**Figuras 9 B**). Da mesma forma, no sobrenadante de neutrófilos submetidos à atividade fungicida não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, nos diferentes períodos (**Figura 9 C**). Baseado nestes fatos podemos sugerir que a IL-1 β , não está envolvida no aumento da capacidade fungicida de neutrófilos.

Outra citocina que apresenta-se aumentada em neutrófilos estimulados é a Cinc-2. Assim, a produção desta citocina foi avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferenças estatisticamente diferentes entre os grupos das monoculturas, co-culturas e nos sobrenadantes de neutrófilos co-cultivados e submetidos à atividade fungicida (**Figuras 10 A, B e C**, respectivamente). Porém, é interessante notar que na 12^a hora, de todos os ensaios, é observado aumento percentual desta citocina, apesar de não serem significativamente diferentes. Provavelmente, ensaio de migração de neutrófilos permita comprovar o aumento da produção de Cinc-2, por neutrófilos

estimulados pela presença de macrófagos inflamatórios ou seus sobrenadantes tratados com CTX, já que, esta citocina é amplamente produzida por estas células durante o processo inflamatório (Knudsen *et al.*, 2002).

Como citado anteriormente, diversos trabalhos da literatura demonstram que as citocinas, apresentam ações importantes na modulação de neutrófilos no processo inflamatório, principalmente gerados por macrófagos classicamente ativados, onde são evidentes altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α , IL-8, que induzem a ativação e migração de neutrófilos ao local da injúria, como demonstrado em modelos de endotoxemia e sepse (Cunha *et al.*, 1986; Luster, 1998; Fine *et al.*, 2001; Kundsén *et al.*, 2002). Mas, apesar dessas evidências, os resultados presentemente obtidos não demonstram participação relevante das citocinas, durante a ativação induzida pelo co-cultivo de neutrófilos por macrófagos tratados com CTX. Entretanto, durante a atividade fungicida por neutrófilos, previamente incubados por 4 horas no sobrenadante de macrófagos tratados com CTX, observou-se aumento marcante (4,25x) da produção de TNF- α .

O TNF- α é uma citocina produzida em resposta a infecção fúngica na fase inicial da infecção estimulada por *C. albicans* (Vecchiarelli *et al.*, 1991), por diferentes células, incluindo macrófagos e neutrófilos. Estudos *in vitro* demonstraram que o TNF- α pode ativar macrófagos e neutrófilos, levando ao aumento do “burst oxidativo”, da fagocitose e da atividade fungicida (Djeu *et al.*, 1986; Ferrante, 1989; Jupin; Parant; Chedids, 1989; Shalaby *et al.*, 1985).

A liberação de TNF- α por macrófagos, durante a fase inicial da resposta inflamatória ao fungo, atrai e ativa neutrófilos para um estado efetor antifúngicos (Diamond; Lyman; Wysong, 1991). Esse fato pode explicar, pelo menos em parte, a

produção substancial de TNF- α pelos neutrófilos logo nas primeiras horas de incubação na presença do sobrenadante de macrófagos.

Ainda, o TNF-alfa, por sua vez, ativa macrófagos e neutrófilos a fagocitar o fungo e a liberar reativos do oxigênio e nitrogênio (NO), eliminando, então, o patógeno invasor (Kulberg et al., 1993).

Assim, além da determinação da produção das citocinas, a produção de NO por neutrófilos foi determinada. Inicialmente, foi avaliada a capacidade da CTX, *per se*, em induzir a produção desse reativo por neutrófilos. Como controle positivo, foi realizada cultura de macrófagos, células responsivas à ação estimulatória desta toxina sobre o metabolismo. De fato, conforme demonstrado em estudos anteriores (Faiad *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013), a CTX (0,3 μ g/ml), foi capaz de acarretar aumento (50%), da liberação de NO por macrófagos (**Figura 11 B**). Entretanto, diferentemente ao observado para macrófagos, neutrófilos obtidos após 4 horas da injeção de carragenina, na cavidade peritoneal de ratos, não apresentaram alteração nos níveis de NO (**Figura 11 A**). Esse efeito distinto da CTX sobre macrófagos e neutrófilos pode ser devido às diferenças existentes entre as duas células no mecanismo de “burst oxidativo”. Apesar dessas células originarem-se de um precursor comum “stem cell”, algumas modificações progressivas durante a maturação levam a especialização desses fagócitos. Nos macrófagos a geração de reativos está associada a NAPH-oxidase internalizada na membrana plasmática durante a formação do fagossoma, em contraste nos neutrófilos, além da ativação da NADPH-oxidase da membrana, essas células recrutam NADPH-oxidase adicional para o fagossoma após fusão de grânulos (Nordenfelt & Tapper, 2011).

Assim, considerando a complementaridade funcional entre essas células, foi avaliada a ação modulatória de macrófagos inflamatórios tratados com CTX sobre a produção de NO por neutrófilos, após co-cultura e submetidos ao ensaio da capacidade fungicida. Os resultados obtidos demonstraram que neutrófilos na presença de macrófagos tratados com CTX (0,3µg/ml) ou na presença do sobrenadante dessas células, apresentaram aumento significativo nos níveis de NO, quando comparados aos respectivos grupos controle (**Figura 13 A e B**).

Dessa forma, podemos sugerir que o aumento da produção de NO seja fundamental para potencializar a capacidade metabólica de neutrófilos (Carballal *et al.*, 2013), e, conseqüentemente a atividade microbicida destas células (Galli *et al.*, 2011). Estes resultados corroboram com dados da literatura, que apontam que a sinalização do óxido nítrico é importante na regulação de intermediários reativos do oxigênio (Suzuki *et al.*, 2002). Principalmente em ânion superóxido, pois quando, ambos NO e O₂⁻, são sintetizados dentro das células, onde eles se fundem espontaneamente, para gerar peroxinitrito através de reação de difusão controlada. Sendo assim, o peroxinitrito (ONOO⁻), é um dos mais importantes agentes oxidantes, na resolução de diversos processos fisiopatológicos (Huie & Padmaja, 1993; Szabo, 2007; Pacher *et al.*, 2007; Carballal *et al.*, 2013).

Em conjunto, estes resultados obtidos permitem sugerir que a indução da capacidade secretória e funcional de neutrófilos está relacionada ao aumento do metabolismo oxidativo de macrófagos frente à ação da CTX e que, através destes mecanismos podem atuar como indutores na ativação de neutrófilos, onde adquirem propriedades metabólicas, tais como a capacidade da produção de TNF-α aumentada, na

fase inicial da co-cultura, importante para a geração de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, cruciais para sua ação microbicida (Silva, 2010 a e b).

Desta forma, este estudo contribui com a ampliação dos conhecimentos sobre as ações da CTX sobre a resposta inflamatória e evidencia, mais uma vez, o potencial desta toxina como uma importante ferramenta científica para os estudos dos mecanismos envolvidos no controle da ação cooperativa entre neutrófilos e macrófagos como células efetoras e moduladoras da imunidade inata.



8 CONCLUSÃO

Neutrófilos co-cultivados na presença de macrófagos inflamatórios previamente tratados com CTX ou com o sobrenadante dessas células apresentam a capacidade fungicida significativamente aumentada, acompanhada pelo aumento do TNF- α e produção de óxido nítrico.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.O. & HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 283-318, 1984.
- ADLER V, YIN Z, TEW KD, RONAI Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signalling. 18(45):6104–11; *Oncogene*. 1999.
- AIRD SD, KAISER II, LEWIS RV, KRUGGEL WG. A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Arch Biochem Biophys.*, 249 (2):296-300, 1986.
- ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R.J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombin-like enzyme. *Toxicon*, 26: 953-60, 1988.
- ALLER MA, ARIAS JL, ARIAS JI, SÁNCHEZ-PATÁN F, ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. *Medical Science Monitor*, v. 12 (10), p. 225 – 234, 2006.
- ALMEIDA CS, JACYSYN JF, FAQUIM-MAURO EL. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* modulates the macrophage and lymphocyte populations in acute intestinal inflammation in mice. *Memórias do Instituto Butantan, XV Annual Scientific Meeting, Volume 70, 2013. ISSN 1982-3045.*
- AMORIM, M.F.; FRANCO DE MELLO, R.; SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. *Mem.Inst.Butantan*,23:108, 1951.
- ARANGO DUQUE G, DESCOTEAUX A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Oct 7*;5:491. doi:10.3389/fimmu.2014.00491. eCollection 2014. Review. *Front Immunol*. 2014.
- ASLAN M, OZBEN T. Oxidants in receptor tyrosine kinase signal transduction pathways. *Dec*;5(6):781-8. Review. *Antioxid Redox Signal*. 2003.
- BAE YS, OH H, RHEE SG, YOO YD. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Dec*;32(6):491-509. doi:10.1007/s10059-01-0276-3. Review. *Mol Cells*. 2011.
- BARRIO, A. & BRAZIL, O.V. Neuromuscular action of the *Crotalus durissus terrificus* (Laur.) poison. *Acta Physiol. Latino Am.*, 1: 291-308, 1950.
- BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Acta. Physiol.Latino-Am.*, 11: 224-30, 1961.

- BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Feb;87(4):1620-4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990.
- BLAKE GJ, RIDKER RM, Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Cir. Res.*, v.89, n.9. p. 763-771, 2001.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.S.; LAMBEZART, M.P.; RADVANY, F.; SALIOU, B. Crotoxin halfcentury of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. *Acta Physiol. Pharmacol.Latino-Am.*, 39: 439-48, 1989
- BORREGARD N, LOLLIKEK, KJELDSSEN LSENGELOV H, STHOLULM L, NIELSEN, MH, BAINTON DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematology.*, v.51., n.4., p. 187-198. 1993.
- BRADLEY TR, METCALF D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. Aust Jun;44(3):287-99. *J Exp Biol Med Sci*.1966.
- BRAZIL, Neurotoxins from South American rattlesnake. *J.Formosan. Med. Assoc.*, 71: 394-6, 1972.
- BRAZIL, V. Do emprego da peçonha em terapêutica. Ibid: *Anais Paulistas de Medicina e Cirurgia*, 60: 398-408, 1950.
- BRAZIL,V. Do emprego da peçonha em terapêutica. *Biol.Med.S.Paulo*, 1:7-21, 1934.
- CARBALLAL S, BARTESAGHI S, RADI R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta.*, dx.doi.org/10.1016/j.bbagen..07.005, 2013.
- CARDOSO, D.F. & MOTA, I. Effect of Crotalus venom on the humoral and celular immune response. *Toxicon*, 4: 607-612, 1997.
- 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*, 10: 125-33, 2001.
- CARMAN CV, SPRINGER TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.*;167(2):377-88. 2004
- CASSATELLA MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. Jan;16(1):21-6. Review. *Immunol Today*.1995.

- CHOUMET, V.; BOUCHIER, C. DELOT, E.; FAURE, G.; SALIOU, B.; BOM, C. Structure and function relationship of crotoxin, a heterodimérica neurotoxic phospholipase A₂ from the venom of a South-American rattlesnake. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 391: 197-202, 1996.
- COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J. Immunol.*, 121: 813-6, 1978.
- COLOMBO AL, GIMARÃES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas
- CORIN, R.E.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C. & ETCHEVENY, M.A. Cytotoxicity of crotoxina on murine erythroleukemia cells in vitro. *Invest New Drugs 11*: 11-15, 1993.
- CORRÊA G, SILVA CM, ABREU AC, SOUZA M, VOMMARO RC, COUTINHO-SILVA R. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes and Infection 12*, 497e504, 2010.
- COSTA IC, FELIPE I, GAZIRI LCJ. Resposta imune a *Candida albicans*. *Ciências Biológicas e da Saúde*. Londrina, 2008.
- COSTA, E.S.; FAIAD, O.J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, S.C. Effect of Crotoxin on secretory activity of peritoneal macrophages co-cultivated with tumor cells. Involvement of formyl peptide receptors. *Inflammation Research* (abstracts for 10th World Congresso on Inflammation, DOI 10.1007/s00011-011-0341-6), Vol 60, (Suppl 1): P-601. Official Journal of The International Association of Inflammation Societies and The European Histamine Research Society, 2011.
- COSTA, E.S.; FAIAD, O.J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, S.C. Effect of Crotoxin on secretory activity of peritoneal macrophages co-cultivated with tumor cells. Involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon*, 2013.
- CROWLEY, S.R. The pathogenesis of septic shock. *Heart lig.*, v.25., p. 124-136, 1996.
- CRUZ A, RINNA, H.J FORMAN AL, VENTURA PM, PERSECHINI DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of pro inflammatory cytokines in macrophages. *J.Biol.Chem.* 282-2871, e2879., 2007.
- CUNHA FQ, SOUZA GE, FERREIRA SH. Macrophages simulated with lipopolysaccharide release a selective neutrophil chemotactic factor: an in vivo demonstration. *Brazilian Journal of Medical & Biological Reserch.* v. 19, p. 775-777, 1986.
- DALE DC. Optimizing the management of chemotherapy-induced neutropenia. *Clin Adv Hematol Oncol.* Nov;1(11):679-84. Review. 2003.

- DELÓT, E. & BON, C. Model of interaction of crotoxina, a phospholipase A₂ neurotoxin, with pre-synaptic membranes. *Biochemistry*, 32: 10708-13, 1993.
- DEORA AA, WIN T, VANHAESEBROECK B, LANDER HM. A redox-triggered ras-effector interaction. Recruitment of phosphatidylinositol 3'-kinase to Ras by redox stress. *Nov 6;273(45):29923-8. J Biol Chem.* 1998.
- DIAMOND, R. D.; LYMAN, C. A.; WYSONG, D. R. Disparate effects of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on early neutrophil respiratory burst and fungicidal response to *Candida albicans* hyphae in vitro. *Journal of Clinical Investigator, Berlin*, v. 82, n. 2, p. 711-720, 1991.
- DICKIE P, ROBERTS A, UWIERA R, WITMER J, SHARMA K, KOPP JB. Focal glomerulosclerosis in proviral and c-fms transgenic mice links Vpr expression to HIV-associated nephropathy. *Virology*. 2004 Apr 25;322(1):69-81.
- DJEU, J. Y.; BLANCHARD, D. K.; HALKIAS, D.; FRIEDMAN, H. Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *Journal of immunology, Baltimore*, v. 137, n. 9, p. 2980-2984, 1986.
- DOI 10.1007/s12026-012-8292-8. 2012.
- DONATO, J.N.; MARTIN, C.A.; PEREZ, M.; NEWMAN, R.A.; VIDAL, J.C. & ETCHEVENY, M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A₂ toxin. A novel growth inhibitory mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 51: 1535-1543, 1996.
- EGELHARDT, B. & WOLBURG, H. Transendotelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of house? *Eur. J. Immunol.*, 2004.
- FAIAD OJ, CURI R, CURY Y, SAMPAIO SC. Crotoxin stimulates glucose metabolism in peritoneal macrophages during tumor progression. In: XIII Annual Scientific Meeting 68, 2011. ISSN 1982-3045.
- FAIAD, O.J., DELLA-CASA, M.S., SAMPAIO, S.C. Lipoxin A4 contributes to inhibitory effect of Crotoxin on growth of Walker 256 tumor. In X Annual Scientific Meeting, 65: 8.04, December 2008. ISSN 1982-3045
- FAIAD, ODAIR JORGE. Efeito da Crotoxina sobre função e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos durante a progressão tumoral. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

- FANG, F.C, Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat.Rev.Microbiol*, 2820 e832, 2004.
- FERRANTE, A. Tumor necrosis factor alfa potentiates neutrophil antimicrobial activity: Increased fungicidal activity against *Touloopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release. *Infection and Immunity*, Washington, v. 57, n. 7, p. 2115-2122, 1989.
- FERREIRA, S.H.; & VANE, J.R. The continuous bioassay of the release and disappearance of histamine in the circulation, *Br. J. Pharmacol.*, v.49., p. 443-53, 1973.
- FIEREN MW, VAN DEN BEMD GJ, BONTA IL, BEN-EFRAIM S. Peritoneal macrophages from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis have an increased capability to release tumour necrosis factor during peritonitis. *Jan*;34(1):1-9. *J Clin Lab Immunol*. 1991.
- FINE, J.S.; BYRNES, H. D.; ZAVODNY, P.J. Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. *Inflammation*, v. 25, n. 2, p. 61-67, 2001.
- FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. *Archs Biochem*. 60: 64-73, 1956.
- FRANCISCHETTI, I.M.; SALIOL, B.; LEDUC, M.; CARLINI, C.R.; HATMI, M.; RANDON, J.; FAILI, A.; BON, C. Convulxin, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom specifically binds to platelets. *Toxicon*, 35: 1217-28, 1997.
- FREITAS AP, FAVORETTO BC, RANÉIA PA, PEREIRA NA, FAQUIM-MAURO E L. Study of the modulatory potential of crotoxin and its subunits isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on dendritic cells. *Memórias do Instituto Butantan, XV Annual Scientific Meeting, Volume 70, 2013. ISSN 1982-3045*
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nov 27*;288(5789):373-6. *Nature*. 1980.
- GALLI SJ, BORREGAARD N, WYNN TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *12(11)*:1035-44. doi: 10.1038/ni.2109. Review. *Nat Immunol*.2011.
- GASANOV SE, DAGDA RK, RAEL ED. Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A(2)s, and Zn(2+)-dependent Metalloproteinases: Mechanisms of Action and Pharmacological Relevance. *Jan 25*;4(1):1000181. *J Clin Toxicol*. 2014.

- GOPALAKRISHNAKONE, P. DEMPSSTER, D.W.; HAWGOOD, B.J.; ELDER, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. *Toxicon*, 22: 85-98, 1984.
- GORDON, S. Biology of the macrophages. *J. Cell Sci.*, 4: 267-86, 1986.
- GRIFFIN GK, NEWTON G, TARRIO ML, BU DX, MAGANTO-GARCIA E, AZCUTIA V, ALCAIDE P, GRABIE N, LUSCINSKAS FW, CROCE KJ, LICHTMAN AH. IL-17 and TNF- α sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. Jun 15;188(12):6287-99. doi: 10.4049/jimmunol.1200385. *J Immunol*. 2012.
- GUERRA et al., Nucleotide receptor signaling and the generation of reactive oxygen species. *Purinergic Signalling*, 3: 39-51, 2007
- HADDAD JJ. Science review: redox and oxygen-sensitive transcription factors in the regulation of oxidant-mediated lung injury: role for hypoxia-inducible factor-1alpha. Feb;7(1):47-54.Review. *Crit Care*. 2003.
- HALDAR M, MURPHY KM. Origin, development, and homeostasis of tissue-resident macrophages. *Immunol Rev*.Nov;262(1):25-35. doi: 10.1111/imr.12215. 2014.
- HALLIWELL B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? Sep;31(9):509-15. Aug 4. Review. *Trends Biochem Sci*. 2006.
- HAYTON K, GAUR D, LIU A, TAKAHASHI J, HENSCHEN B, SINGH S, LAMBERT L, FURUYA T, BOUTTENOT R, DOLL M, NAWAZ F, MU J, JIANG L, MILLER LH, WELLEMS TE. Erythrocyte binding protein PfRH5 polymorphisms determine species-specific pathways of Plasmodium falciparum invasion. Jul 17;4(1):40-51. doi: 10.1016/j.chom.2008.06.001. *Cell Host Microbe*. 2008.
- HENDON RA, FRAENKEL-CONRAT H. Biological roles of the two components of crotoxin. Jul;68(7):1560-3. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971.
- HENDRIKS, J.; RIESLE,J.; VEM BLITTERSWIJ, C.A. Co-culture in cartilage tissue engineering. *J. Tissue Eng Regen. Med.*, 1: 170-178, 2007. Review Article.
- HENSLEY K, ROBINSON KA, GABBITA SP, SALSMAN S, FLOYD RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. May 15;28(10):1456-62. Review. *Free Radic Biol Med*. 2000.
- HUIE RE, PADMAJA S. The reaction of no with superoxide. 18(4):195-9. Free Radic Res Commun. 1993.

- IGNARRO LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Jan*;3(1):31-6. Review. *FASEB J*.1989
- IMLAY JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide.;77:755-76.doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055. Review. *Annu Rev Biochem*. 2008.
- JACOB F, PÉREZ NOVO C, BACHERT C, VAN CROMBRUGGEN K. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *9*(3):285-306. Review. *Purinergic Signal*. 2013.
- JANEWAY, C.A & TRAVERS, P. The immune system in health and disease. In: Immunobiology. New York., ed. Current Biology/ Garland Publishin., p. 12-16, 1994.
- JIANG J, SHI Y, SHAN Z, YANG L, WANG X, SHI L. Bioaccumulation, oxidative stress and HSP70 expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR under laboratory conditions. *Comp Biochem Physiol C Apr*;155(3):483-90 doi:10.1016/j.cbpc.2011.12.008. *Toxicol Pharmacol*. 2011
- JUPIN, C.; PARANT, M.; CHEDIDS, L. Involvement of reactive oxygen metabolites in the candidacidal activity of human neutrophils stimulated by muramyl dipeptide or tumor necrosis factor. *Immunobiology, Jena*, v. 180, n. 1,p. 68-79, 1989.
- KASAMA T, MIWA Y, ISOZAKI T, ODAI T, ADACHI M, KUNKEL SL. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Jun*;4(3):273-9. Review. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005.
- KATO EE, PIMENTA LA, PEREIRA JF, ALMEIDA MES, SANTOS MF, SAMPAIO SC. Crotoxin, a toxin from rattlesnake venom, inhibits endothelial cells function stimulated by tumor cell conditioned medium: in vitro assay. XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular/VIII International Symposium on Extracellular Matrix. p.44, 2013
- KNUDSEN, E.; IVERSEN, P.O.; VAN ROOIJEN, N.; BENESTAD, H.B. Macrophage- dependent regulation of neutrophil mobilization and chemotaxis during development of sterile peritonitis in the rat. *Eur J Haematol*. 69(5-6):284-96, 2002.
- KOLACZKOWSKA E, KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. Mar;13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399.Review. 2013.
- KOWAL-VERN, A.; WLANGA, J.M.; SHAPR-PUCCI.; HOPPENTEAD, D.; GAMELLI, R.L. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endothelial and C1 esterase inhibitor. *J. Burn Care Rehabil.*, v.18., p. 99-103, 1997.

- KRONLAGE *et al.*, Autocrine Purinergic Receptor Signaling Is Essential for Macrophage. *Science Signaling* 3, 2010.
- KUCHEL O. Stress and catecholamines. *Methods Achiev Exp Pathol.*;14:80-103. Review, 1991.
- KULBERG, B. J.; VAN'T WOUT, J. W.; HOOGSTRATEN, C., VAN FURTH, R. Recombinant interferon-g enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 168, n. 2, p. 436–443, 1993.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Inflamação aguda e cr nica*. In: Robbins & Contran – Patologia. São Paulo, Editora Elsevier, 7^a ediç o, p. 49-89, 2005.
- LAMBETH JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Mar*;4(3):181-9. *Review. Nat Rev Immunol.* 2004.
- LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. *Br. J. Pharmacol.*,114:578-83,1995.
- LAURE, C.J. The primary structure of crotamine. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 365: 213-5, 1975.
- LAWRENCE T, NATOLI G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* 11(11):750-61.doi: 10.1038/nri3088. 2011.
- LIANG LI. Peeking into the secret life of neutrophils. *Immunol Res* 53:168–181
- LIMA, T.S.; CATANEO, S.C.; IRITUS, A.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. *Exp Biol Med*, doi: 10.1258/ebm.2012.012010. Published online on 8 October 2012.
- LUNDBERG JO, WEITZBERG E, GLADWIN MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Feb*;7(2):156-67. doi: 10.1038/nrd2466. *Review. Nat Rev Drug Discov.* 2008.
- LUSTER, A.D. Chemokines – chemotatic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*; 338:436-445, 1998.
- MACHADO, R.L.; ARAUJO, S.A.; CARVALHO, L.; CARVALHO E, E. Mecanismos de resposta imune a infecções. *Ambras Dermatol.* Rio de Janeiro, v.79., p. 647-664, 2004
- MaCKANNES *et al.* 1970. *Apud AUGER & ROOS*, 1992.

- MAJNO, G.; JORIS, I. Inflammation: The actors and their language. *In Cells, tissues and disease. Principles of general pathology*. New York, Oxford University Press, p. 307-382, 2004.
- MANTOVANI A, SICA A, SOZZANI S, ALLAVENA P, VECCHI A, LOCATI M. The Chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. (12):677-86. Review. *Trends Immunol*. 2004.
- MARCINKIEWICZ J, CZAJKOWSKA B, GRABOWSKA A, KASPROWICZ A, KOCISZEWSKA B. Differential effects of chlorination of bacteria on their capacity to generate NO, TNF-alpha and IL-6 in macrophages. *Immunology*, 83(4): 611-6, 1994.
- MARÓDI, L.; JOHNSTON JÚNIOR, R. B. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon- γ . *Immunodeficiency*, Yverdon, v. 4, n. 1-4, p. 181-185, 2008.
- MAYER B, HEMMENS B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Dec; 22(12):477-81. Review. *Trends Biochem Sci*. 1997
- MEFFERT, M.K., BALTIMORE, D. Physiological functions for brain NF- κ B. *Trends in Neurosciences*. 28: 27-43, 2005.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.J.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, J.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD, J.R.V.; Acidentes Peçonhentos no Brasil. *Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo, Editora Sarvier, p.33-61, 2003.
- METCALF, D. The molecular control of cell division, differentiation and maturation in haemopoietic cells. *Nature*, 339(6219): 27-30, 1989.
- METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 77: 227-80, 1971.
- MONCADA S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. Apr; 92(4):164-9. Review. *J R Soc Med*. 1999.
- MOORE, M.A.S. & METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: ylk sac origem of *in vivo* na *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo. *Br.J. Haematol.*, 18: 279-96, 1970.
- MOURA-GONÇALVES, J. & ARANTES, E.G. Estudo sobre venenos de serpentes brasileiras. III. Determinação quantitativa da crotamina no veneno de cascavel brasileira. *Na. Acad. Bras. Ciênc.*, 28: 369-72, 1956.

- MURALIDHARAN S, MANDREKAR P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. Dec;94(6):1167-84. doi:10.1189/jlb.0313153. Review. *J Leukoc Biol.* 2013
- NATHAN C. Secretory products of macrophages: twenty-five years on. J Apr;122(4):1189-90. *Clin Invest.* 2012.
- NATHAN, C. & BUSSEL-CUNNINGHAM. Beyond stress oxidative stress: Immunologists guide to reactive oxygen species; *Nature reviews Immunology.*, 2013.
- NATHAN, C.F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, 79: 319-26, 1987.
- NEWMAN, R.A.; VIDAL, J.C.; VISKATIS, L.J.; JOHNSON, J. & ETCHEVENY, M.A. URCTC-310. A novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. *Invest New Drugs 11*: 151-159, 1993.
- NORDENFELT P, TAPPER H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol.* 90 (2):271-84,. Review. 2011.
- NORMAN AW, BIEBER LL, LINDBERG O, BOYER PD. relationships of ca++ to "protein-bound" phosphate fractions of mitochondria. jul; 240: 2855-62. *j biol chem.* 1965.
- NOVAIS FO, SANTIAGO RC, BÁFICA A, KHOURI R, AFONSO L, BORGES VM, BRODSKYN C, BARRAL-NETTO M, BARRAL A, DE OLIVEIRA CI. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. Dec 15;183(12):8088-98. doi: 10.4049/jimmunol.0803720. *J Immunol.* 2009
- NUNES, F.P.B.; SAMPAIO, S.C.; SANTORO, M.L.; SOUZA-E-SILVA, M.C.C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*, v.49, p. 1090-1098, 2007.
- NUNES, F.P.B.; ZYCHAR, B.C.; DELLA-CASA, M.S.; SAMAPIO, S.C.; GONÇALVES, L.R.C.; CIRILLO, M.C. Crotoxin is responsible for the long anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. *Toxicon*, 2010.
- OLIVEIRA RBB, LIMA TS, CIRILLO MC, SAMPAIO SC. Secretory activity of neutrophils is mediated by macrophages pretreated with crotoxin in co-culture model XIV Annual Scientific Meeting, 69, 11.31, 2012. ISSN 1982-3045.
- PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Jan;87(1):315-424. Review. *Physiol Rev.* 2007.

- PARK, S.B. & LEE, J-OH. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 Complexes. *Experimental & Molecular Medicine*. 45, e66; doi: 10.1038, 2013.
- PIMENTA LA, PEREIRA JF, KATO EE, CIRILLO MC, SAMPAIO SC. Crotoxin, A Toxin From Rattlesnake Venom, Inhibits The Angiogenic Function Of Macrophages In Co-Culture Model. 46° Brazilian Congresso f Pharmacology and Experimental Therapeutics, 21-24 october, 2014, resume 09.045.
- PIRAINO P, SEPÚLVEDA A, CAVADA G. [Hashimoto chronic thyroiditis. Retrospective analysis of 228 patients]. Jul;138(7):827-31. Spanish. *Rev Med Chil*. 2010.
- PIRES SL, DE ASSIS TS, DE ALMEIDA RN, FILHO JM, JULIEN C, DE MEDEIROS IA. Endothelium-derived nitric oxide is involved in the hypotensive and vasorelaxant responses induced by the aqueous fraction of the ethanolic extract of the leaves of *Albizia inopinata* (Harms) G. P. Lewis in rats. Apr;7(2):91-8. *Phytomedicine*. 2000
- por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36(5): 599-607, 2003.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL-BRAZIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*, 19: 875-87, 1981.
- RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical issues*, v.15., n.1. 3-17, 2004.
- RAW, I.; ROCHA, M.C.; ESTEVES, M.I.; KAMIGUTI, A.S. Isolation of a thrombin-like enzyme from venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Brazilian J. Med. Biol. res.*, 19: 333-8, 1986.
- RHEE SG, CHANG TS, BAE YS, LEE SR, KANG SW. Cellular regulation by hydrogen peroxide. Aug;14 (8 Suppl 3):S211-5. Review. *J Am Soc Nephrol*. 2003.
- ROCHA E SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: *International series of Monographs in Pure and Applied Biology, Modern Trends in Physiological Sciences*, v. 37, p. 1 – 47, 2006.
- ROCHA E SILVA, M.; GARCIA-LEME. *J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction*. Oxford: pergamon press., p. 1-47, 1972.
- ROSENFELD,G. Symptomatology, Pathology and Treatment of snakes bites in South America. In: *Venomous Animals and Their Venoms*, Bücherl, W and Buckley, E. eds.New York, Academic Press, 2:345-84, 1971.

- ROSMAN, AS.; MELIS, M.; FICHERA, A. Metaanalysis of trials comparing laparoscopic and open surgery for Crohn's disease. *Surg Endosc.* 19(12):1549-55. Epub 2005.
- RUDD, C.J. VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C. & ETCHEVERY, M.A. *In vitro*. Comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumours and a normal human epidermal keratinocyte cell line. *Invest New Drugs*, 12: 183-184, 1994.
- SADIK CD, LUSTER AD. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol.*91(2):207-15. doi:10.1189/jlb.0811402. Epub 2011 Nov 4. Review. 2012.
- SAMPAIO S.C.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; BRIGATTE, P.; LANDGRAF, R.G.; DOS-SANTOS, E.C.; CURTI, R.; CURY, Y. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. *Toxicon.* 47(3): 313-21, 2006 a
- SAMPAIO S.C.; BRIGATTE, P.; SOUZA E SILVA, M.C.C.; DOS SANTOS, E.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; CURTI, R.; CURY, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon*, 41: 889-907, 2003.
- SAMPAIO S.C.; HYSLOB, S.; FONTES, M.R.M.; FRANCESCHI, J.P.; ZAMBELLI, V.O.; MAGRO, A.J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V.P.; CURY, Y. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. *Toxicon*, 55, p. 104501060, 2010.
- SAMPAIO S.C.; RANGEL-SANTOS, A.C.; PERES, C.M.; CURTI, R.; CURY, Y. Inhibitory effect of phospholipase A₂ isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom on macrophage function. *Toxicon.*, v.45, p. 671-676, 2005.
- SANO-MARTINS, I.S. & DAIMON, T. Electron microscopic cytochemistry on the distribution of wheat germ agglutinin receptor on the platelet plasma membrane after treatment with convulxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, 30: 141-50, 1992.
- SCAPINI P, LAPINET-VERA JA, GASPERINI S, CALZETTI F, BAZZONI F, CASSATELLA MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Oct*;177:195-203.Review. *Immunol Rev.* 2000.
- SEMERAD CL, LIU F, GREGORY AD, STUMPF K, LINK DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity.* Oct;17(4):413-23.2002
- SHALABY, M. R.; AGGARWAL, B. B.; RINDERKNECHT, E.; SVEDERSKY, L. P.; FINKLE, B. S.; PALLADINO JÚNIOR., M. A. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 135, n. 3, p. 2069-2073, 1985.

- SIERRA-FILARDI E, PUIG-KRÖGER A, BLANCO FJ, NIETO C, BRAGADO R, PALOMERO MI, BERNABÉU C, VEGA MA, CORBÍ AL. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood*, 12; 117(19):5092-101, 2011.
- SILVA, M.T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptative immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J.Leuk. Biol.* 87., p. 805-813, 2010b.
- SILVA, M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J. Leuk. Biol.* 87., p. 93-106, 2010a.
- SINAN: ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2011.
- SLOTTA, K.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4- Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan*, 12: 505-12, 1938.
- SNYDER SH, BREDT DS. May;266(5):68-71, 74-7. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992.
- SOUSA-e-SILVA, M.C.C.; GONÇALVES, L.R.C.; MARIANO, M. The venom of South American rattlesnakes inhibits macrophage functions and is endowed with anti-inflammatory properties. *Mediators of Inflammation*,5:18-23, 1996.
- SPRINGER CJ, DOWELL R, BURKE PJ, HADLEY E, DAVIS DH, BLAKEY DC, MELTON RG, NICULESCU-DUVAZ I. Optimization of alkylating agent prodrugs derived from phenol and aniline mustards: a new clinical candidate prodrug (ZD2767) for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *J Med Chem*;38(26):5051-65. 1995
- STOCKER, K. Composition of snake venoms. In: Stocker K.F. Medical Use of Snake Venom Proteins. Boca Raton, Boston: CRC, pg. 33-56, 1990.
- STUEHR DJ.; NATHAN CF.; Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Immunol. Methods* pg;231-235- 174. 1989
- SUZUKI, S. Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis. *J. Infect.Dis.* 186 s234es240, 2002.
- SZABÓ C, ISCHIROPOULOS H, RADI R. Peroxynitrite: biochemistry, Pathophysiology and development of therapeutics. Aug;6(8):662-80.Review. *Nat Rev Drug Discov.* 2007

- TAKEMURA, R. & WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.*, 246: C1-C9, 1984.
- TARLING, J.D.; LIN, H-S & HSU, S. Self renewal of pulmonary alveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 42: 443-6, 1987.
- TEDGUI, A., MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ. Res.*, v.88., p. 877-887, 2001.
- TONKS NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell Jun 3;121(5):667-70. Review. *Signaling.Cell.* 2005.
- Van FURTH, R. & COHN, Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.*, 128: 415-35, 1968
- Van FURTH, R. & DIESSELHOFF-den DULK,M.M.C. The kinetics of promonocytes and monocytes in the bone marrow. *J. Exp. Med.*, 132: 813-28, 1970.
- VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr. Top. Pathol.*, 79: 125-150, 1989.
- Van FURTH, R.; DIESSELHOFF-den DULK, M.M.C. & MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J. Exp. Med. Med.*, 138: 1314-30, 1973.
- Van FURTH, R.; DIESSELHOFF-den DULK,M.M.C.; RAEBURN, J.A.; van ZWET, H.L.; CROFTON, R. & BLUSSÉ van OUD ALBLAS, A. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In *Mononuclear phagocytes. Functional aspects.* Ed. R. van FURTH, Martinis Nijhoff, The Hague, Boston, London, 1980.
- VANE, J.R. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci.*, v. 343, n. 1304, p. 225-246, 1994.
- VECCHIARELLI, A.; PULITI, M.; TOROSANTUCCI, A.; CASSONE, A.; BISTONI, F. In vitro production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. *Cellular Immunology*, New York, v. 134, n. 1, p. 65-76, 1991.
- WERB, Z.; HEMBRY, R.M.; MURPHY, G. & AGGELER, J. Commitment to expression of metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. *J. Cell Biol.*, 102: 697-702, 1986.

WHITELAW, D.M. The intravascular lifespan of monocytes. *Blood*, 28: 445-464, 1966.

YAZDANPANA B, WIEGMANN K, TCHIKOV V, KRUT O, PONGRATZ C, SCHRAMM M, KLEINRIDDERS A, WUNDERLICH T, KASHKAR H, UTERMÖHLEN O, BRÜNING JC, SCHÜTZE S, KRÖNKE M. Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase. Aug 27;460(7259):1159-63. doi: 10.1038/nature08206. *Nature*. 2009.

ZAMBELLI VO, SAMPAIO SC, SUDO-HAYASHI LS, GRECO K, BRITTO LR, ALVES AS, ZYCHAR BC, GONÇALVES LR, SPADACCI MORENA DD, OTTON R, DELLA-CASA MS, CURI R, CURY Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxygenase-derived mediators. *Toxicon*, 15;51(8):1357-67, 2008.