MARIE PAULE JACQUELINE DELAFONTAINE

**VENENO DA SERPENTE *Bothrops lanceolatus*:
CARACTERIZAÇÃO, ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E
MECANISMOS POTENCIAIS ENVOLVIDOS NO ENVENENAMENTO**

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

São Paulo
2016

MARIE PAULE JACQUELINE DELAFONTAINE

**VENENO DA SERPENTE *Bothrops lanceolatus*:
CARACTERIZAÇÃO, ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E
MECANISMOS POTENCIAIS ENVOLVIDOS NO ENVENENAMENTO**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise V. Tambourgi

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB
quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Delafontaine, Marie Paule Jacqueline.

Veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*: caracterização, ativação do sistema complemento e mecanismos potenciais envolvidos no envenenamento / Marie Paule Jacqueline Delafontaine. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Denise Vilarinho Tambourgi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Interações de toxinas animais com o sistema complemento.

Versão do título para o inglês: *Bothrops lanceolatus* snake venom: characterization, complement system activation and potencial mechanisms involved in envenoming.

1. *Bothrops lanceolatus* 2. Veneno de serpente 3. Sistema complemento 4. Inflamação 5. Anafilatoxinas 6. Soro antibotrópico I. Tambourgi, Prof. Dr. Denise Vilarinho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB061/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marie Paule Jacqueline Delafontaine.

Título da Tese: Veneno da serpente Bothrops lanceolatus: caracterização, ativação do sistema complemento e mecanismos potenciais envolvidos no envenenamento.

Orientador(a): Prof. Dr. Denise Vilarinho Tambourgi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

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 "Ação de agentes quelantes na ativação do sistema complemento por veneno de serpente: abordagem teórica preditiva das características-chave das interações entre os agentes quelantes anfotéricos e as proteínas do complemento", **protocolo nº 1111/13**, sob a responsabilidade de Denise Vilarinho Tambourgi e Marie Paule Jacqueline Delafontaine – 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 13/11/2013.

Vigência do Projeto: 09/2013 - 02/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Imunoquímica	132 camundongos Swiss 6-8sem, 18 a 22g (M); 2 coelhos NZW 3Kg (M); Sangue de ovelha obtido da Fazenda São Joaquim*

São Paulo, 19 de novembro de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

*A coleta de sangue e os procedimentos de manutenção de carneiros se referem ao protocolo nº 1103/13, intitulado "Manutenção e obtenção de sangue de carneiros para fornecimento aos laboratórios do Instituto", sob a responsabilidade do Dr. Ronaldo de Azevedo Ferreira, aprovado em 19/06/2013.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **84** nas fls. **21** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Denise Vilarinho Tambourgi**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Ação de agentes quelantes na ativação do sistema complemento por veneno de serpente: abordagem teórica preditiva das características-chave das interações entre os agentes quelantes anfotéricos e as proteínas do complemento*" do qual participam o(s) aluno(s) **Marie Paule Jacqueline Delafontaine** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **18.09.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 22 de setembro de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ação de agentes quelantes na ativação do Sistema Complemento pelo veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*: análise das características-chave das interações entre os agentes quelantes anfotéricos e as proteínas do Complemento

Pesquisador: MARIE DELAFONTAINE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06690113.6.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo ((INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS))

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 274.313

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto:

Título de projeto: Ação de agentes quelantes na ativação do sistema Complemento pelo veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*: análise das características-chave das interações entre os agentes quelantes anfotéricos e as proteínas do Complemento.

Pesquisador responsável: Marie Delafontaine

Instituição onde se realiza: Instituto de Ciências Biomédicas-USP & Instituto Butantan

Objetivo da Pesquisa:

Compreender os efeitos de compostos quelantes sobre o sistema Complemento no contexto da ativação deste pelo veneno de uma serpente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O benefício do projeto está ligado à geração de conhecimento sobre os mecanismos de ação do veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*. Os riscos aos pacientes são ínfimos, uma vez que a única intervenção será a coleta de sangue por método padrão e pessoal qualificado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro:

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município:

Telefone: (113)091-7733

Fax: (113)091-8405

E-mail: pzanotto@usp.br; cep@icb.usp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 274.313

O projeto proposto é relevante e bem justificado. Amostras de sangue (25 mL) serão coletadas de 10 voluntários por punção venosa. As amostras serão tratadas de forma anônima e sigilosa. Os elementos sanguíneos de interesse (eritrócitos e soro) serão fracionados e utilizados no estudo do sistema Complemento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento é completo e apresenta as informações com clareza em linguagem leiga.

Recomendações:

A Comissão alerta para que a manipulação do sangue seja feita com total segurança.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com a resolução 196/96 conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c. Em não havendo um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante site do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

16 de Maio de 2013

Assinador por:
Paoio Marinho de Andrade Zanotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro:

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município:

Telefone: (113)091--7733

Fax: (113)091--8405

E-mail: pzanotto@usp.br; cep@icb.usp.br

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Dra Denise Vilarinho Tambourgi**, por acreditar em mim e ter aceitado o desafio de enfrentar esta difícil tese junto comigo, pela paciência e pelo tempo que me dedicou, e não apenas por ter aberto as portas do Laboratório de Imunoquímica, mas também do Instituto Butantan e do Instituto de Ciências Biomédicas da USP; por ser sempre um exemplo de dedicação e seriedade no trabalho como orientadora, pesquisadora e diretora; e, por ter iniciado a colaboração com a Prevor. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Às pós-doutorandas e pesquisadoras que compartilharam sua experiência comigo, que em português ou inglês, tiveram a paciência de me ensinar técnicas ou de responder minhas dúvidas, e com quem eu aprendi muito: **Dra Danielle Paixão-Calvalvante, Dra Isadora Maria Villas Boas, Dra Priscila Hess Lopes e Dra Giselle Pidde Queiroz**. Aprendi muito mais do que ciência com vocês.

Aos pesquisadores do Laboratório de Imunoquímica, que de perto ou de longe participaram do meu trabalho: **Fábio Carlos Magnoli, Dra Fernanda Calheta Vieira Portaro, Dra Carla Cristina Squaiella Baptistão e Jorge Mário da Costa Ferreira Junior**.

Ao **Dr Osvaldo Augusto Esteves Sant'Anna**, por participar da colaboração entre Instituto Butantan e Prevor e, por sempre se preocupar com meu bem estar.

Ao **Dr Wilmar Dias da Silva** pela sua atenção e gentileza.

Aos alunos e pós-doutorandos que eu tive a sorte de conhecer no Laboratório de Imunoquímica, com quem conversei de ciência, estudei artigos, compartilhei bancada e escritório; aprimorei meu português (e não somente vocabulário científico!), e para quem sempre guardarei um carinho especial: **Felipe Raimundi Guidolin, Felipe França da Silva, Daniela Tiemi Myamoto, Ângela Alice Amadeu Megale, Joel José Megale Gabrili, Ana Tung Ching Ching, Aurélio Pedroso Júnior, Lygia Samartin Gonçalves Luchini, Alexandre Kazuo Kuniyoshi, Daniela Cajado de Oliveira Souza Carvalho, Roberto Kodama, Mariana Torrente Gonçalves, Estevam Báldon, Karina Scaramuzzi**.

Aos funcionários do Laboratório de Imunoquímica, agradáveis e de bom humor sempre, graças a quem trabalhamos todos os dias com a mente tranquila: **Elaine Rodrigues, Lia Aguiar, Osmair Elder da Silva, Alécio Rodrigues, Guilherme Hiromi Yoshikawa,**

Ricardo Noguti, Márcia Franco, Ana Freire, Ana Cláudia Santana, Severino Ramos da Silva.

A **Maria Eni do Sacramento Santos**, secretária do Departamento de Imunologia do ICB-USP, pela ajuda com a burocracia ao longo destes quatro anos.

Às funcionárias da biblioteca do ICB-USP, pela ajuda com a correção deste manuscrito.

REMERCIEMENTS

À **Prevor**, pour le soutien financier, mais surtout pour la confiance de m'avoir donné ce projet à l'autre bout du monde, pour le plaisir d'avoir pu travailler avec l'équipe scientifique GAS-LBT, et la chance d'avoir été soutenue par les services RH et informatique. En particulier à **Joël Blomet**, pour avoir rendu cette thèse possible, et à **Laurence Mathieu** pour son suivi attentif et positif, son écoute, et les échanges constructifs avec le GAS.

À mes parents, mes frères et mes amis, pour leur soutien inconditionnel au cours de ces quatre années difficiles d'éloignement.

Et bien sûr, à **Ladislav Arato**, sans qui cette aventure n'aurait pas eu de sens.

“Aucun chemin de fleurs ne conduit à la gloire.”

*Jean de La Fontaine,
Livre X, Fable XIV, Les Deux Aventuriers et le Talisman*

RESUMO

DELAFONTAINE, M. **Veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*: caracterização, ativação do sistema complemento e mecanismos potenciais envolvidos no envenenamento.** 2016, 123 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bothrops lanceolatus, também chamada “Fer-de-Lance”, é uma espécie de serpente endêmica da ilha francesa da Martinica no Caribe. Os envenenamentos por *B. lanceolatus* apresentam um quadro clínico trombótico, acompanhado de inflamação local extensa, envolvendo edema, dor e hemorragia limitada, o que difere da síndrome hemorrágica descrita nos envenenamentos botrópicos do continente Sul-Americano. Vários venenos botrópicos ativam o sistema complemento (C). O objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos da inflamação induzida pelo veneno de *B. lanceolatus*, caracterizando o veneno, suas atividades enzimáticas, suas similaridades antigênicas com outros venenos botrópicos usando soro antibotrópico comercial, e descrevendo sua ação sobre o sistema C, e sua toxicidade para queratinócitos e células endoteliais. Para isso, foram usados métodos como separação eletroforética, zimografia, ensaios enzimáticos colorimétricos e fluorimétricos, ensaios hemolíticos, assim como técnicas imunoquímicas. Confirmou-se que o veneno de *B. lanceolatus* apresenta atividades fosfolipásica, gelatinolítica e fibrinogenolítica. Sua atividade hialuronidásica é particularmente fraca, quando comparada com outros venenos botrópicos. Vários componentes do veneno compartilham similaridades antigênicas com venenos de espécies da América do Sul, uma vez que o soro antibotrópico comercial brasileiro reagiu cruzadamente com o veneno e, também, inibiu suas atividades fosfolipásica, hialuronidásica e citotóxica para queratinócitos. Por outro lado, as proteases do veneno se destacam pela sua especificidade de substrato, como mostrado pelos resultados obtidos com os peptídeos fluorescentes, inibidores específicos e o soro antibotrópico. A citotoxicidade do veneno foi testada em linhagens humanas de queratinócitos (HaCaT) e de células endoteliais vasculares (EAhy926), e comparada à toxicidade do veneno de *B. jararaca*. Enquanto ambos os venenos foram altamente citotóxicos para os queratinócitos, o veneno de *B. lanceolatus* foi 10 vezes menos tóxico do que o veneno de *B. jararaca* em células endoteliais. Observou-se a produção de citocinas e quimiocinas próinflamatórias pelas duas linhagens celulares quando expostas aos venenos. No soro humano, o veneno de *B. lanceolatus* ativa a cascata do C pelas vias alternativa, clássica e das lectinas, liberando as anafilatoxinas C4a e C5a, assim como o complexo terminal do C. Ele apresenta também uma ação proteolítica sobre os componentes purificados da cascata C3, C4 e C5, gerando a anafilatoxina C5a ativa. Além disso, ele cliva o inibidor de C1, C1-INH, que é um regulador plasmático essencial das vias clássica e das lectinas do C, e da cascata da coagulação, gerando um único fragmento de tamanho menor, com um potencial de inibição reduzido de 40%. Este conjunto de dados sugerem que o veneno de *B. lanceolatus* exibe uma potente ação próinflamatória, pela ativação do sistema complemento, que resulta na produção de grandes quantidades da anafilatoxina C5a e do complexo terminal do C. A discrepância na citotoxicidade dos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca* em células endoteliais vasculares pode refletir a diferença entre as síndromes que eles induzem, respectivamente, trombótica e hemorrágica.

Palavras-chave: *Bothrops lanceolatus*. Veneno de serpente. Sistema Complemento. Inflamação. Anafilatoxinas. Soro antibotrópico

ABSTRACT

DELAFONTAINE, M. ***Bothrops lanceolatus* snake venom: characterization, activation of the complement system and potential mechanisms involved in envenoming.** 2016, 123 p. PhD thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bothrops lanceolatus, commonly named “Fer-de-Lance”, is the endemic snake of the French Caribbean Island of Martinique. Envenomations by *B. lanceolatus* present clinical aspects characterized by a systemic thrombotic syndrome and important local inflammation, involving oedema and pain, but limited haemorrhage; which differs from the haemorrhagic syndrome exhibited in South American bothropic envenomations. Several *Bothrops* venoms can activate complement (C) system, involving their metallo and/or serine proteases in this process. With the aim to investigate the mechanisms of venom-induced inflammation, we fully characterized *B. lanceolatus* venom and investigated the cross-reactivity of an antiothropic antivenom, the C-cascade activation by the venom and its cytotoxicity on human keratinocytes and vascular cells. We used electrophoretic separation, zymography, colorimetric or fluorimetric (FRET) enzymatic assays, and hemolytic assays, in addition to immunochemical assays to characterize *B. lanceolatus* venom. We confirmed that *B. lanceolatus* venom has phospholipase, gelatinolytic and strong fibrinogenolytic activities. Compared to other bothropic venoms, its hyaluronidase activity was particularly low. Several components of *B. lanceolatus* venom shared antigenic similarities with South American *Bothrops* species, since the therapeutical antiothropic antivenom, raised against Brazilian snakes, cross-reacted with the venom and completely abolished its phospholipase, hyaluronidase and cytotoxic (for keratinocytes) activities. However, the results obtained with fluorescent peptides, specific inhibitors and the antivenom, emphasized the substrate specificity of *B. lanceolatus* venom proteases. The cytotoxicity of the venom was tested on human keratinocytes (HaCaT) and vascular endothelial cells (EAhy926), and compared to *B. jararaca* venom toxicity. Both venoms showed to be cytotoxic on HaCaT cells cultures. However, *B. jararaca* venom was about ten times more cytotoxic for vascular cells than *B. lanceolatus* venom. The patterns of cytokine and chemokine production by the two cell lines exposed to the venoms were highly pro-inflammatory. In human serum, *B. lanceolatus* venom activated the C-cascade by the alternative, classical and lectin pathways, releasing the anaphylatoxins C4a and C5a, and the terminal C complex. It also showed a direct proteolytic activity upon the purified human C-proteins C3, C4, and C5, releasing active C5a. The venom cleaved the inhibitor of the classical and lectin C-pathways and the coagulation cascade, C1-INH, into a smaller compound, reducing its inhibitory potential by 40%. These data indicate that *B. lanceolatus* venom displays important pro-inflammatory properties, as it activates the complement cascade, inducing a strong release of the anaphylatoxin C5a and C-terminal complex. The discrepancy of toxicity on vascular endothelial cells between *B. lanceolatus* venom and *B. jararaca* venom may reflect the difference between the thrombotic and haemorrhagic syndromes, they respectively induce.

Keywords: *Bothrops lanceolatus*. Snake venom. Complement system. Inflammation. Anaphylatoxins. Antiothropic antivenom.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ativação do sistema complemento pelos venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	33
Figura 2 - Análise eletroforética do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	55
Figura 3 - Presença de resíduos de açúcar no veneno de <i>B. lanceolatus</i>	56
Figura 4 - Reconhecimento dos venenos de <i>B. lanceolatus</i> e <i>B. jararaca</i> pelo soro antibotrópico por <i>Western Blot</i>	57
Figura 5 - Análise da atividade hialuronidásica e inibição desta pelo soro antibotrópico	59
Figura 6 - Atividade fosfolipásica do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	60
Figura 7 - Inibição da clivagem dos peptídeos Abz-FRSSRQ e Abz-RPPGFSPFRQ.....	62
Figura 8 - Clivagem do fibrinogênio pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i> , na presença ou ausência de inibidores	63
Figura 9 - Zimografia com gelatina e fibrinogênio	64
Figura 10 - Atividade edematogênica do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	66
Figura 11 - Atividade hemorrágica do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	67
Figura 12 - Viabilidade de células HaCaT expostas ao veneno de <i>B. lanceolatus</i> durante 24, 48 e 72 horas.....	70
Figura 13 - Inibição da citotoxicidade do veneno de <i>B. lanceolatus</i> pelo soro antibotrópico	71
Figura 14 - Quimiocinas produzidas por células HaCaT expostas ao veneno de <i>B. lanceolatus</i> durante 24, 48 e 72 horas.....	72
Figura 15 - Viabilidade de células EAhy926 expostas ao veneno de <i>B. lanceolatus</i> durante 24, 48 e 72 horas.....	74
Figura 16 - Citocinas e quimiocinas produzidas por células EAhy926 expostas ao veneno de <i>B. lanceolatus</i> durante 24, 48 e 72 horas	75
Figura 17 - Modulação de moléculas de adesão e de fator tissular na membrana de células endoteliais incubadas com veneno	76
Figura 18 - Inibição da clivagem de MIG e IL-12 pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i>	77

Figura 19 - Ativação das três vias do complemento pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i>	80
Figura 20 - Indução da produção de anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento (TCC) em soro humano tratado com o veneno de <i>B. lanceolatus</i>	82
Figura 21 - Clivagem dos componentes purificados do complemento pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i>	83
Figura 22 - Clivagem do componente C5 pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i> e ativação de neutrófilos pelo C5a gerado.....	84
Figura 23 - Expressão dos receptores das anafilatoxinas C3a e C5a na membrana de células endoteliais incubadas com veneno	85
Figura 24 - Clivagem do C1-INH pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i> e sua atividade residual	87
Figura 25 - Modulação da expressão das proteínas reguladoras do complemento na membrana de células endoteliais incubadas com veneno.....	88
Figura 26 - Modulação da expressão de CD59 e MCP na membrana de células endoteliais incubadas com veneno, em presença ou ausência de inibidores.	89
Figura 27 - Perfil cromatográfico do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	91
Figura 28 - Perfil eletroforético das frações do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	92
Figura 29 - Clivagem dos componentes do complemento pelas frações 2 e 4 do veneno	93

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 – Composição protéica dos venenos de <i>B. jararaca</i> e de <i>B. lanceolatus</i>	28
Tabela 2 – Composição protéica dos venenos de <i>B. caribbaeus</i> e de <i>B. lanceolatus</i>	29
Tabela 3 – Ativação das três vias do complemento pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i>	79
Tabela 4 – Atividade proteolítica das frações do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	92
Tabela 5 – Resumo da caracterização do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	108

LISTA DAS ABREVIATURAS

- Abz – ácido orto-aminobenzóico
- BSA – albumina do soro bovino
- C1-INH – inibidor da C1 esterase
- C3aR – receptor da anafilatoxina C3a
- C4BP – proteína ligante de C4
- C5aR – receptor da anafilatoxina C5a
- CBA – ensaio citométrico baseado em esferas
- CLP – proteína parecida a lectinas do tipo C
- CR1 – receptor-1 do complemento
- DAF – fator de aceleração de decaimento
- DMSO – dimetilsulfóxido
- EDDnp – N-[2,4 dinitrofenil] etilenodiamino
- EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
- EtOH – etanol
- Fen – 1,10-fenantrolina
- FLA₂ – fosfolipase A2
- FRET – transferência de energia de ressonância por fluorescência
- HUVEC – célula endotelial da veia umbilical humana
- IL-2 – interleucina-2
- IL-4 – interleucina-4
- IL-6 – interleucina-6
- IL-8 – interleucina-8
- IL-10 – interleucina-10
- IL-12 – interleucina-12

IL-12p70 – interleucina-12 na sua forma ativa heterodimérica

ICAM-1 – molécula-1 de adesão intercelular

IFN- γ – interferon- γ

IP-10 – proteína induzida pelo interferon- γ

LAAO – oxidase L-amino ácida

LFA-1 – antígeno-1 de função de linfócito

LTB4 - leucotrieno B4

MAC – complexo de ataque à membrana

MASP – serino protease associada a lectina ligadora de manose

MIG – monocina induzida pelo interferon- γ

MCP – proteína cofator de membrana

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos-1

PECAM-1 – molécula-1 de adesão de plaqueta/célula endotelial

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

RANTES – proteína regulada pela ativação, expressa e secretada por células T normais

SVMP – metaloprotease de veneno de serpente

SVSP – serino protease de veneno de serpente

TNF- α – fator de necrose tumoral- α

TXA2 – tromboxano A2

VCAM-1 – molécula -1 de adesão de célula vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Envenenamento por serpentes: uma doença tropical negligenciada	22
1.2 Quadro clínico.....	23
1.3 Composição geral dos venenos botrópicos	24
1.4 Principais toxinas dos venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	25
1.5 Inflamação e ativação do sistema de complemento	30
1.6 Tratamentos	34
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Veneno	37
3.2 Inibidores	37
3.3 Soros hiperimunes	37
3.4 Dosagem de proteínas.....	37
3.5 Purificação de metaloproteases e serinoproteases.....	37
3.6 Caracterização do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	37
3.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida	37
3.6.2 Eletroforese bidimensional.....	38
3.6.3 Análise da presença de resíduos de açúcar no veneno de <i>B. lanceolatus</i>	38
3.6.4 Análise do reconhecimento do veneno pelo soro antibotrópico por ELISA.....	39
3.6.5 Análise do reconhecimento do veneno pelo soro antibotrópico por Western Blot.....	39
3.6.6 Atividade hialuronidásica	40
3.6.7 Atividade fosfolipásica	40
3.6.8 Atividade proteolítica	41
3.6.9 Atividade fibrinogenolítica.....	42
3.6.10 Zimografias com fibrinogênio e gelatina	42
3.7 Atividades biológicas do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	42
3.7.1 Animais	42
3.7.2 Atividade letal do veneno	43
3.7.3 Atividade edematogênica.....	43
3.7.4 Atividade hemorrágica	43

3.8 Ação do veneno de <i>B. lanceolatus</i> sobre queratinócitos e células endoteliais humanas: viabilidade celular, produção de citocinas e quimiocinas	43
3.8.1 Cultivo de células HaCaT e EAhy926	43
3.8.2 Ensaio com MTT.....	44
3.8.3 Inibição da citotoxicidade do veneno pelo soro antibotrópico	44
3.8.4 Produção de citocinas e quimiocinas.....	45
3.8.5 Atividade proteolítica do veneno sobre citocinas e quimiocinas	45
3.8.6 Ação do veneno sobre marcadores de membrana em células endoteliais	46
3.9 Ação do veneno de <i>B. lanceolatus</i> e/ou suas frações sobre o Sistema Complemento (C).....	47
3.9.1 Soro humano normal (SHN).....	47
3.9.2 Tratamento do SHN com o veneno de <i>B. lanceolatus</i>	47
3.9.3 Ensaio hemolíticos	47
3.9.4 Via Clássica.....	47
3.9.5 Via Alternativa.....	48
3.9.6 Ação do veneno de <i>B. lanceolatus</i> sobre a Via das Lectinas.....	48
3.9.7 Análise da atividade do veneno de <i>B. lanceolatus</i> sobre os componentes do complemento	49
3.9.8 Análise da produção de anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento em soros humanos tratados com o veneno de <i>B. lanceolatus</i>	49
3.9.9 Atividade do produto de clivagem de C1-INH gerado pelo veneno de <i>B. lanceolatus</i> ...	50
3.9.10 Atividade do fragmento C5a, gerado pela clivagem do C5 por ação do veneno de <i>B. lanceolatus</i>	51
3.9.11 Expressão dos reguladores e receptores do complemento em células endoteliais expostas ao veneno de <i>B. lanceolatus</i>	52
3.10 Fracionamento do veneno por cromatografia de exclusão molecular	52
3.11 Análise estatística.....	52
4 RESULTADOS	54
4.1 Caracterização do veneno de <i>Bothrops lanceolatus</i>	54
4.1.1 Dosagem de proteínas	54
4.1.2 Eletroforeses unidimensional e bidimensional.....	54
4.1.3 Presença de resíduos de açúcar nos componentes do veneno	56
4.1.4 Reconhecimento do veneno de <i>B. lanceolatus</i> pelo soro anti-botrópico.....	57
4.1.5 Atividade hialuronidásica	58

4.1.6 Atividade fosfolipásica	60
4.1.7 Atividade proteolítica	61
4.1.8 Atividade fibrinogenolítica	63
4.1.9 Zimografias	64
4.1.10 Atividades tóxicas do veneno analisadas “in vivo”	65
4.2 Análise da toxicidade do veneno para células humanas	68
4.2.1 Queratinócitos	68
4.2.2 Células endoteliais	73
4.2.3 Clivagem de citocinas e quimiocinas	77
4.3 Ação do veneno de <i>B. lanceolatus</i> sobre o sistema complemento	78
4.3.1 Ativação direta da cascata do complemento	78
4.3.2 Expressão dos receptor das anafilatoxinas em células endoteliais	85
4.3.3 Análise dos reguladores solúveis e da expressão dos reguladores de membrana do sistema complemento	86
4.4 Purificação de uma protease atuando sobre o sistema complemento: resultados preliminares	90
5 DISCUSSÃO	94
6 CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS	111
APÊNDICE	
A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamento por serpentes: uma doença tropical negligenciada

Envenenamento por serpentes tem sido um tema subestimado e negligenciado em saúde pública, sendo responsável por um grande número de vítimas que podem evoluir para morte e tem um grande valor sócio-econômico nas populações mais pobres, habitando zonas rurais e tropicais da África, Ásia, Oceânia e América Latina. Nas nações desenvolvidas, os acidentes com animais peçonhentos ocorrem, habitualmente, no decorrer de atividades recreativas, ao passo que, nos países em vias de desenvolvimento, esta é uma doença laboral, com maior probabilidade de afetar jovens trabalhadores agrícolas, sobretudo homens. Estima-se que ocorram, em média, 421.000 acidentes e 20.000 mortes por ano, resultantes de picadas por serpentes, principalmente no sul e no sudeste asiático e na África subsariana. A escassez e a demora na administração do antiveneno, a precariedade dos serviços de saúde e as dificuldades no transporte das zonas rurais para os centros de saúde são os fatores que mais contribuem para a elevada relação acidente/mortalidade no envenenamento por serpentes (KASTURIRATNE et al., 2008).

Nas Américas do Sul e Central, o gênero *Bothrops* é responsável pela maioria dos acidentes com serpentes (GUTIÉRREZ, 1995). Relativamente aos acidentes com serpentes no Brasil, o primeiro estudo epidemiológico data de 1901, quando Vital Brazil observou mortalidade associada aos acidentes por serpentes no Estado de São Paulo (BRAZIL, 1901). Ele estimou que, em média, ocorriam 20.000 acidentes com serpentes, todos os anos, no país (BRAZIL, 1909); número semelhante ao notificado hoje em dia pelo Ministério de Saúde brasileiro, que variou entre 19.000 e 30.000 nos últimos 5 anos (Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN, Ministério da Saúde, 2015). Pouco tempo depois, deu-se início a um levantamento epidemiológico sistemático com a distribuição de documentos de observação e registro dos acidentes, juntamente com antivenenos. Esta iniciativa foi, então, seguida por outros levantamentos de saúde pública ao longo do século, que permitem agora a determinação de um perfil epidemiológico regular destes acidentes.

Os acidentes são mais frequentes entre os trabalhadores agrícolas do sexo masculino, com idades compreendidas entre 20 e 59 anos. As vítimas são, na maioria, picadas nos membros inferiores (75% dos casos), durante o trabalho, principalmente no período de novembro a abril. A grande maioria dos acidentes com serpentes no Brasil é causada por serpentes do gênero *Bothrops*, principalmente por *Bothrops jararaca* (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; MOTA DA SILVA; BERNARDE; DE ABREU, 2015; SINAN, 2015).

1.2 Quadro clínico

Os venenos de serpentes da família Viperidae, e particularmente do gênero *Bothrops*, causam efeitos locais e sistêmicos marcantes. Dor e hemorragia são imediatos no local da picada, sendo que o edema se inicia alguns minutos após. Edema e dor (causados pela inflamação local), hemorragia, mionecrose, formação de bolhas e dermonecrose são os sintomas locais mais frequentes. Alteração na coagulação sanguínea, hematúria, hemorragia gengival, choque hipovolêmico e oligúria são os sinais sistêmicos do envenenamento. Além disso, infecção local por bactérias presentes na boca da serpente ou na pele dos pacientes, pode agravar o acidente (JORGE et al., 1994; OTERO et al., 2002). Em todos os casos, a severidade dos sinais e sintomas aumenta com o tempo. A severidade do envenenamento causado pela maioria dos Viperídeos depende de muitas variáveis, entre elas: espécie da serpente, toxicidade do veneno e quantidade injetada e estado físico da vítima, como idade, peso corporal, estado prévio de saúde e imunidade específica. A variação intraespecífica (geográfica, sazonal, ontogenética e associada ao sexo) na composição do veneno explica também a variabilidade observada na severidade e padrão do envenenamento por serpentes, além da variação interespecífica (CALVETE et al., 2011; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; LÓPEZ-LOZANO et al., 2011).

As serpentes, *Bothrops lanceolatus* e *Bothrops caribbaeus*, são as espécies endêmicas das ilhas da Martinica e de Santa-Lucia no arquipélago das Antilhas Menores no Caribe, respectivamente. Elas formam um grupo monofilético, próximo do clado das *Bothrops asper* e *Bothrops atrox* (WÜSTER et al., 2002). A picada por estas serpentes induz uma importante inflamação local: edema extenso, dor e hemorragia limitada. Porém, estes envenenamentos apresentam um quadro clínico trombótico, que difere do perfil hemorrágico causado pelas *Bothrops* das Américas do Sul e Central (NUMERIC et al., 2002; THOMAS et al., 2006). Os mecanismos desta patologia ainda não foram totalmente elucidados, uma vez que não existe modelo animal que reproduza as trombozes observadas em humanos (HERRERA et al., 2013; STROKA et al., 2005).

1.3 Composição geral dos venenos botrópicos

As serpentes usam o seu veneno, principalmente, para caçar e não hesitam em empregá-lo de forma defensiva. O veneno de *Bothrops* é produzido numa glândula, ligada por ducto a dentes inoculadores, que permitem a inoculação na vítima; este aparelho de veneno é do tipo solenóglifo (CARDOSO et al., 2003). Depois de ser liberado pelas células secretórias, o veneno pode ser conservado em baixo pH no lúmen glandular e ductos, durante muitos meses, e de forma ativa. O armazenamento do veneno em pH ácido, associado a outros mecanismos moleculares como a glicosilação, contribui para a manutenção das enzimas em estado inativo e só após a sua inoculação, ocorre a ativação espontânea, devido ao pH dos tecidos da presa (7,2-7,4) (MACKESSY ; BAXTER, 2006).

Venenos são misturas complexas e estáveis de componentes orgânicos, peptídicos e não peptídicos como hexoses e lípidios, juntamente com componentes inorgânicos. As proteínas e os peptídeos são os principais componentes dos venenos de *Bothrops*: o teor peptídico total corresponde em média a 90-95% do peso seco do veneno. As massas moleculares variam, em média, entre 10 e 150 kDa e a maioria dos componentes entre 14 e 64 kDa (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008), sendo em grande parte bastante ácida (ANGULO; LOMONTE, 2009). As proteínas isoladas dos venenos de *Bothrops* pertencem a pelo menos oito famílias: metaloproteases, serinoproteases, lectinas do tipo C, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, fragmentos desintegrinas e ricos em cisteína (provenientes de metaloproteases de classe III, descritas no parágrafo 1.4), proteínas ricas em cisteína e fosfolipases A₂ (ANGULO; LOMONTE, 2009; CARDOSO et al., 2010). Alguns dos componentes dos venenos botrópicos são glicosilados, mas o veneno também contém quantidades reduzidas de hidratos de carbono neutro livre, como açúcares neutros (hexoses), metilpentoses, hexosaminas e ácido siálico (ARAGÓN; BOLAÑOS; VARGAS, 1977). Os venenos de *Bothrops* contêm quantidades muito pequenas de lípidios, cujo papel ainda não foi totalmente compreendido. O teor total em lípidios, observado no veneno da *B. jararaca*, corresponde em média a algumas µg por mg de veneno (ANTUNES et al., 2010; TU, 1996). Diversos eletrólitos estão também presentes nos venenos de *Bothrops*: o sódio é o principal cátion no veneno, mas desconhece-se qual é o seu papel; zinco e cálcio estão presentes em muitas metaloproteínas, sendo provável que os seus níveis reflitam o teor de metaloproteínas no veneno. As concentrações de eletrólitos variam de 1 a 20 mg/g no veneno de *B. jararaca* (ANTUNES et al., 2010).

A composição geral dos venenos botrópicos pode variar, uma vez que passam por variações ontogenéticas importantes e podem também ser influenciados pela dieta e

distribuição geográfica. Recentemente, foram analisadas as diferenças na composição do veneno de *B. atrox*, entre serpentes criadas em cativeiro e selvagens: no pool de venenos de serpentes mantidas em cativeiro foi observada uma redução na quantidade de alguns componentes, como fosfolipases A2, metaloproteases de classe I e serino proteases (ANTUNES et al., 2010; FREITAS-DE-SOUZA et al., 2015; FURTADO et al., 2010; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002). Além disso, existe uma ampla gama de variações interespecíficas em termos de composição e atividades nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, sendo que Pidde-Queiroz et al. (2008) demonstraram uma variação significativa no potencial letal (de 1 a 11 mg/kg) entre 19 diferentes espécies. O soro antibotrópico, utilizado para a terapia humana, produzido pela imunização de cavalos com um *pool* de venenos de cinco espécies de *Bothrops*, não foi capaz de neutralizar totalmente as atividades tóxicas de todos os venenos botrópicos (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008). Como o gênero *Bothrops* é responsável por 90% dos casos de envenenamento por serpentes no Brasil, o conhecimento da variabilidade intraespecífica e interespecífica do veneno de serpentes é extremamente importante para o tratamento das vítimas de picada e para a produção de soros antivenenos específicos (FURTADO et al., 2010; PIDDE-QUEIROZ et al., 2008).

1.4 Principais toxinas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*

Diversas toxinas contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória local invocada pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. A principal função destas toxinas está diretamente relacionada a imobilização/morte e, ao mesmo tempo, a digestão da presa.

Metaloproteases: As metaloproteinases dos venenos de serpentes (SVMPs) são abundantes nos venenos de *Bothrops*. Representam ~80% da transcrição gênica de *B. alternatus* (CARDOSO et al., 2010); no veneno de *B. lanceolatus*, análises proteômicas detectaram entre 74% e 42,3% de metaloproteases (Tabela 1 e Tabela 2). Tais enzimas são membros da subfamília reprotisina. As SVMPs abrangem um vasto grupo de proteinases dependentes do zinco com composição de domínios variada, mas com sítios de ligação ao zinco altamente conservados. Após diferentes etapas de modificações pós-traducionais, podem ser encontrados vários tipos de SVMPs em venenos de serpentes, originalmente derivados de moléculas precursoras comuns. As SVMPs podem ser divididas em três classes (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). As proteínas da classe P-I apresentam apenas o domínio metaloproteinase, com uma massa molecular de cerca de 24 kDa. Uma metaloprotease da classe PI, de peso molecular 28 kDa, já foi purificada e caracterizada a partir do veneno de *B. lanceolatus* (STROKA et al., 2005). As proteínas da classe P-II (P-IIa a

P-IIe) possuem um domínio metaloproteinase seguido por um domínio tipo disintegrina. São proteínas de tamanho médio, que podem estar presentes como dímeros ou apenas como disintegrinas diméricas. A classe P-III (P-IIIa a P-IIIc) abrange os domínios metaloproteinase, tipo disintegrina e rico em cisteína; a massa molecular das proteínas P-III corresponde, em média, a 55 kDa. Podem estar também presentes como dímeros. O domínio rico em cisteína tem capacidade de interagir com outras proteínas, como colágeno, fator von Willebrand e integrinas, resultando numa atividade biológica particular. A classe P-IV é também chamada de P-IIIId, uma vez que não foi detectado nenhum transcrito para P-IV, sendo possível que a estrutura PIV seja resultante de outra modificação pós-translacional da estrutura canônica de P-III. Nestas proteínas estão presentes, além dos três domínios descritos, dois domínios lectina do tipo C, adicionais, ligados por pontes de dissulfeto, e sua massa molecular é de cerca de 95 kDa (FOX; SERRANO, 2008; MARKLAND; SWENSON, 2013). Estas proteases induzem hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2005), mionecrose local, lesões cutâneas e inflamação. Além disso, degradam os componentes da matriz extracelular e reduzem a regeneração do músculo esquelético afetado. Algumas metaloproteinases também afetam a função plaquetária, através dos seus domínios não catalíticos do tipo disintegrina e rico em cisteína, o que explica, pelo menos em parte, o seu efeito potenciador da hemorragia. Além destes efeitos, degradam fatores de coagulação sanguínea, impedindo uma resposta hemostática normal após danos dos microvasos. Terra et al. (2009) destacaram a relativa abundância de SVMP da classe P-I e menor teor em SVMP da classe P-III no veneno de *B. lanceolatus* (Tabela 1), quando comparado ao veneno de *B. jararaca*, e relacionaram este resultado com as diferentes patologias induzidas pelos dois venenos.

Serinoproteases: As serinoproteases ou serinoendopeptidases são enzimas nas quais um dos aminoácidos do sítio ativo é uma serina, que funciona como o aminoácido nucleofílico. As glândulas de veneno de serpentes sintetizam uma diversidade de serinoproteases ácidas e básicas (serinoproteases do veneno de serpentes - SVSP). Estas proteinases podem ser componentes abundantes: por exemplo, elas representam 5 a 18% das proteínas do veneno da *B. asper* e, entre 14,4% e 27,4%, do veneno de *B. lanceolatus* (ANGULO; BAXTER, 2009; GUTIÉRREZ et al. 2008; TERRA et al., 2009). As SVSPs apresentam a estrutura típica das enzimas do tipo quimotripsina; contêm quantidades variáveis de glicosilação e doze resíduos de cisteína, entre os quais se formam cinco pontes de dissulfeto (ITOH et al., 1987). Apesar de sequências bastante semelhantes, as SVSPs são específicas quanto ao seu substrato. Funcionam com um mecanismo catalítico comum que inclui um resíduo reativo de serina que desempenha um papel-chave de nucleófilo na

formação de um complexo acil-enzima transitório. Este complexo é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo. Os reagentes modificadores da serina, como fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e diisopropilfluorofosfato, podem consequentemente influenciar a atividade das SVSPs. A maioria das SVSPs são glicoproteínas com um número variável de pontos de glicosilação; contudo, pouco se sabe sobre o papel desempenhado pela porção carboidrato na estrutura e função dessas toxinas (SERRANO; MAROUN, 2005).

As serinoproteinases são capazes de afetar a coagulação sanguínea. As serinoproteinases básicas costumam apresentar atividade direta na agregação plaquetária, ao passo que as ácidas têm uma variedade de atividades proteolíticas em substratos relacionados a hemostase. Podem atuar nos substratos macromoleculares dos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina e também nas plaquetas, causando desequilíbrio no sistema hemostático da presa. As SVSPs são também inibidas de forma competitiva pela benzamidina e *p*-aminobenzamidina. De forma geral, as SVSPs são insensíveis aos inibidores endógenos de serinoproteinases.

Fosfolipases A₂: As fosfolipases A₂ (FLA₂s) são enzimas que hidrolisam glicerofosfolipídios na posição sn-2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. As FLA₂s de veneno de serpentes são proteínas de 14-18 kDa, que possuem 5 a 8 pontes de dissulfeto, uma díade catalítica His/Asp, no seu sítio ativo, e requerem Ca²⁺ para a atividade enzimática. Estão presentes em diferentes venenos de serpentes e são abundantes na composição do veneno botrópico (KANASHIRO et al., 2002). O veneno de *B. lanceolatus* contém entre 4,5% e 8,6% destas enzimas (Tabela 1 e Tabela 2). Podem ter uma ampla diversidade de efeitos biológicos como: atividades neurotóxica, cardiotóxica, miotóxica, hemolítica, convulsivante, anticoagulante, antiplaquetária, indutora de edema e lesiva aos tecidos. Após a ligação a um receptor alvo, as FLA₂s induzem efeitos farmacológicos por meio de mecanismos que são dependentes ou independentes da sua atividade catalítica (KINI, 2003). Os homólogos das FLA₂, as Lys49-FLA₂s, são altamente miotóxicas e causam extensos danos teciduais, apesar de não exibirem uma atividade catalítica mensurável.

Tabela 1 – Composição protéica dos venenos de *B. jararaca* e de *B. lanceolatus*

Família de proteínas	Porcentagem das proteínas totais (%)	
	<i>B. jararaca</i>	<i>B. lanceolatus</i>
SVMP	42,8%	42,4%
<37 kDa	16,0% **	23,0% **
37-75 kDa	54,0% **	43,0% **
SVSP	22,0%	27,4%
LAAO	9,7%	14,0%
CLP	12,5%	4,5%
FLA₂	8,1%	4,5%

Nota: Abreviaturas (em inglês):

SVMP: metaloproteinase de veneno de serpente

SVSP: serinoprotease de veneno de serpente

LAAO: oxidase L-amino ácida

CLP: proteína parecida a lectinas do tipo C

FLA₂: fosfolipase A2

Proporção das principais famílias de proteínas nos venenos de *B. jararaca* e *B. lanceolatus*, adaptada de Terra et al. (2009). Os venenos foram separados por electroforese. Três regiões foram definidas com base no peso molecular aparente das proteínas (<37 kDa; 37-75 kDa; >75 kDa), recortadas e submetidas á análise por LM/MS/MS. Os resultados representam as porcentagens da somatória das contagens de peptídeos únicos nas três regiões. **: porcentagem de SVMP em duas determinadas regiões.

Tabela 2 – Composição protéica dos venenos de *B. caribbaeus* e de *B. lanceolatus*

Família de proteínas	Porcentagem das proteínas totais (%)	
	<i>B. caribbaeus</i>	<i>B. lanceolatus</i>
SVMP	68,6%	74,3%
PI-SVMP	30,6%	25,8%
PIII-SVMP	38,0%	48,4%
SVSP	4,7%	14,4%
LAAO	8,4%	2,8%
CLP	-	<0,1%
FLA2	12,8%	8,6%

Nota: Abreviaturas (em inglês):

SVMP: metaloproteinase de veneno de serpente

SVSP: serinoprotease de veneno de serpente

LAAO: L-aminoácido oxidases

CLP: lectinas do tipo C

FLA2: fosfolipase A2

- : não detectado

Proporção das principais famílias de proteínas nos venenos de *B. caribbaeus* e *B. lanceolatus*, adaptada de Gutiérrez et al. (2008). Os venenos totais foram separados, por cromatografia em HPLC, e as proteínas coletadas manualmente. Cada fração foi caracterizada por análise da sequência N-terminal. As porcentagens de cada família de proteínas foram estimadas a partir da área dos picos obtidos por HPLC contendo proteínas da família, dividida pela área total dos picos do veneno.

1.5 Inflamação e ativação do sistema de complemento

A inflamação é um processo por meio do qual os tecidos respondem de forma ativa às infecções ou lesões teciduais para restaurar a homeostasia. Para permitir o fornecimento coordenado de componentes do sangue (plasma e leucócitos) ao local do ferimento, os microvasos passam por alterações funcionais logo após o ferimento, seguidas por fagocitose e dor local. Após a vasoconstrição sucessiva de arteríolas e vasodilatação, há um aumento da permeabilidade da microvasculatura, o que resulta no escape de um fluido rico em proteínas para o tecido extravascular, formação de edema, associado a dor (TEIXEIRA et al., 2009).

O edema é um sintoma clínico frequente nas picadas por serpentes (OTERO et al., 2002). Pode resultar em isquemia e compressão neural, causando perda permanente do tecido, incapacidade ou amputação. A terapia por antiveneno não é eficaz na redução do edema; a incubação experimental de antiveneno com veneno antes da injeção, em animais, não neutraliza o edema induzido pelo veneno (GUTIÉRREZ et al., 1986). Tem sido mostrado, que o veneno de *Bothrops* afeta os vasos linfáticos, por ação das FLA₂s miotóxicas que agem na musculatura destes vasos, induzindo contração e dano celular irreversível, e resultando na perturbação do fluxo da linfa. Isto pode desempenhar um papel importante na patogênese do edema local pronunciado, bem como na biodistribuição sistêmica do veneno, representando assim um potencial alvo terapêutico (MORA et al., 2008). Além do edema, há no local da picada, um intenso infiltrado inflamatório constituído primeiramente por neutrófilos polimofonucleares e, após 48 h, por células mononucleares. Estudos mostraram que o veneno de *B. asper* estimula os neutrófilos e as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão como L-selectina, antígeno-1 de função de linfócito (LFA-1), molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1), e molécula-1 de adesão de plaqueta/célula endotelial (PECAM-1) (ZAMUNER et al., 2005). Estas são responsáveis pelos eventos de espraiamento, adesão firme e transmigração associados à locomoção dos neutrófilos através do endotélio, no sentido da área inflamada. A inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops* caracteriza-se também por uma indução complexa de mediadores químicos. Foi demonstrada a participação dos mediadores adrenérgicos α -1 e α -2 e dos metabólitos derivados do ácido araquidônico (CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995), bem como das citocinas inflamatórias, tais como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), leucotrieno B₄ (LTB₄) e tromboxano A₂ (TXA₂) (ZAMUNER et al., 2005). O óxido nítrico é também produzido durante a resposta do hospedeiro, contribuindo para o edema e o infiltrado inflamatório, sem se observar um envolvimento significativo nos efeitos patológicos locais induzidos pelo veneno (CHAVES; TEIXEIRA; GUTIÉRREZ, 2006).

O sistema complemento, um importante mecanismo efetor da imunidade humoral com ação tanto na defesa inata como na adaptativa, é formado por um grupo complexo de proteínas do plasma e da membrana celular que participam de processos biologicamente importantes, desde a modulação das respostas inflamatórias locais, à promoção da fagocitose, lise dos agentes patogênicos, até ao reconhecimento do *self* alterado/danificado (CARROLL, 2008; DANILOVA, 2006; NIELSEN; FISCHER; LESLIE, 2000; PANGBURN; FERREIRA; CORTES, 2008). A ativação do sistema complemento é mediada por uma reação em cadeia de proteólise e montagem de complexos de proteínas e é composto por mais de 30 proteínas, que estão envolvidas na ativação e regulação do sistema. A maioria destas proteínas funciona como enzimas, inibidores ou cofatores (SJÖBERG; TROUW; BLOM, 2009; UNSWORTH, 2008).

O complemento é constituído por três vias de ativação, ou seja, vias clássica, alternativa e das lectinas, que se fundem no passo de ativação proteolítica de C3, o componente central do sistema. A ativação do complemento pode gerar anafilatoxinas e o complexo de ataque à membrana (MAC). As anafilatoxinas (C3a, C4a, e C5a) são consideradas a ponte entre a imunidade inata e adaptativa e são responsáveis pelo controle da resposta pró-inflamatória local através da vasodilatação e da quimiotaxia e ativação dos leucócitos (BEINROHR et al., 2006; KÖHL, 2006; SJÖBERG; TROUW; BLOM, 2009; UNSWORTH, 2008).

A ativação do sistema complemento é regulada por diversos inibidores, como os reguladores ligados à membrana CR1 (receptor-1 do complemento ou receptor de C3b; CD35), MCP (proteína cofator de membrana; CD46), DAF (fator de aceleração de decaimento; CD55) e CD59, e por proteínas plasmáticas como os fatores I, H, as proteínas relacionadas ao factor H, a proteína ligante de C4 (C4BP), e o inibidor da C1 esterase (C1-INH). CR1, que pode ter de 190 a 285 kDa, liga C3b e C4b, acelera o decaimento das convertases C4b2a e C3bBb; ele atua como cofator do fator I e também ajuda na fagocitose dos imunocomplexos. MCP é amplamente expresso e também se liga a C3b e C4b depositados na membrana, atuando como cofator do fator I. DAF acelera o decaimento das convertases de C3 e C5, via interação com C3b/C4b. O CD59 inibe a formação do complexo C5b-9 na superfície das células. A serino protease, fator I, regula a ativação das três vias do complemento clivando as unidades C4b e C3b das convertases; sua atividade depende de cofatores. O fator H é um importante regulador da via alternativa; ele compete com o fator B pela ligação ao C3b, acelerando, assim, a dissociação da convertase da via alternativa e atua como cofator para o fator I. O C1-INH regula a ativação de C1 e das serinoproteases

associadas à lectina ligadora de manose (MASPs), componentes das vias clássica e das lectinas, respectivamente (BOWEN et al., 2001; KÖHL, 2006; MIWA; SONG, 2001; NORIS; REMUZZI, 2013).

Os venenos de *Bothrops* têm capacidade de ativar a cascata do complemento, gerando grandes quantidades de anafilatoxinas, que podem desempenhar um papel importante no processo inflamatório e na difusão dos componentes do veneno por meio dos seus efeitos vasodilatadores (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010). A análise de venenos de 19 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* revelou que estes ativam a via clássica do complemento, sendo que proteases do veneno clivam o inibidor de C1, o que pode perturbar o controle de ativação do complemento. Não foi demonstrada qualquer modificação nos reguladores do complemento ligados à membrana, como DAF, CR1 e CD59. Alguns dos venenos de *Bothrops* foram também capazes de ativar as vias alternativa e das lectinas. C3a, C4a e C5a foram gerados em soros tratados com os venenos, através da ativação e da clivagem direta dos componentes do complemento. Os inibidores de metalo- e/ou serinoproteases foram capazes de prevenir a clivagem de C3 e C4 (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010), o que indica que a inibição destes tipos de enzimas, após o envenenamento, pode também reduzir a contribuição da ativação do complemento para a patologia. De fato, as metaloproteinases de classe I, BaP1 e C-SVMP, purificadas a partir dos venenos de *B. asper* e *Bothrops pirajai*, respectivamente, foram capazes de ativar o sistema complemento *in vitro* (FARSKY et al., 2000; PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). A C-SVMP foi capaz de consumir componentes da cascata do complemento *in vitro* e *in vivo*, induziu a clivagem da cadeia α dos componentes C3, C4, e C5, gerando as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a (PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). A Figura 1 resume estes resultados.

Figura 1 – Ativação do sistema complemento pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*

Ativação do complemento pelos venenos de *Bothrops*, segundo os resultados publicados por Farsky et al. (2000) e Pidde-Queiroz et al. (2010, 2013). Em vermelho aparecem as vias ativadas, assim como os produtos de ativação gerados. Os componentes clivados são marcados com o símbolo de relâmpago. Todos os venenos de *Bothrops* estudados ativam o complemento pela via clássica, alguns também pelas vias alternativa ou das lectinas (tracejado). Todos clivam os componentes C3, C4 e o inibidor C1-INH. A protease do veneno de *B. pirajai*, C-SVMP, cliva também o C5. A protease de *B. asper*, BaP1, ativa o complemento e induz a migração de leucócitos *in vivo*, via a geração de C5a. Essas atividades resultam na produção dos produtos de ativação da cascata: as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, e do complexo terminal do complemento, que foram observados na incubação de soro com os venenos ou com a C-SVMP. Os reguladores do complemento na superfície dos eritrócitos não são afetados.

1.6 Tratamentos

Antivenenos: Há um século a base da terapia dos envenenamentos por picada de serpentes é a administração parentérica de anticorpos de antivenenos. Tais antivenenos são produzidos por imunização dos animais, com os venenos de uma ou mais espécies, gerando assim antivenenos monoespecíficos ou poliespecíficos, respectivamente. Isto permite a produção de anticorpos capazes de neutralizar os efeitos tóxicos dos venenos como os letal, hemorrágico e causadores de desfibrinação, bem como as atividades da FLA₂ e de enzimas proteolíticas. Por outro lado, a concepção e o uso de antivenenos são dificultados pela ampla variabilidade bioquímica e imunogênica dos venenos de serpentes, envolvendo padrões complexos de variação regional e ontogenética entre espécies e dentro de uma única espécie (ANTUNES et al., 2010; PIDDE-QUEIROZ et al., 2008). Por isso, são utilizados *pools* representativos de venenos na preparação das misturas de imunização, de forma a cobrir o largo espectro de diversidade dos venenos (SEGURA et al., 2010). Por outro lado, graças ao fenômeno da reatividade imunológica cruzada, muitos antivenenos são capazes de neutralizar venenos homólogos e heterólogos de espécies relacionadas (FURTADO et al., 2010). Várias tentativas têm sido feitas para melhorar a capacidade neutralizante dos antivenenos e reduzir a quantidade de anticorpos não relevantes, incluindo o uso de toxinas purificadas e o uso de veículos antigênicos estratégicos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2011). De acordo com a revisão de autoria de Lomonte et al. (2009), que discute a neutralização do veneno da *B. asper*, é descrito que as ações tóxicas sistêmicas são eficientemente neutralizadas pelo antiveneno terapêutico, mas que a neutralização das ações locais lesivas do tecido nos envenenamentos, tal como sucede com muitas outras serpentes *Crotalinae*, continua a ser um problema de saúde pública.

Inibidores sintéticos: As SVMPs estão entre as mais lesivas e as mais abundantes nos venenos botrópicos; a sua inibição pode reduzir a extensão do dano tecidual local induzido pelo veneno. Batimastat, o nome genérico para [4-(N-hidroxiamino)-2-Risobutil-3S-(tienil tiometil)-sucinil]-L-fenilalanina-N-metilamida), é um inibidor sintético de metaloproteínases de matriz, peptidomimético do hidroxamato. Foi demonstrado que é eficaz na inibição da SVMP BaP1 do veneno *Bothrops*, em modelos *in vivo*, no caso da pré-incubação com o veneno ou quando administrado rapidamente após a injeção do veneno (ESCALANTE et al., 2000). As atividades proteolíticas e hemorrágicas das SVMPs podem também ser inibidas por compostos quelantes, como sais de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Estudos prévios mostraram que o CaNa₂EDTA, um agente quelante atualmente utilizado no tratamento da intoxicação por chumbo, é eficaz na inibição das atividades dermonecróticas e

formadoras de edema do veneno de *B. asper* quando pré-incubado com veneno, antes da injeção em animais de experimentação (BORKOW; GUTIÉRREZ; OVADIA, 1997; LEÓN et al., 1998; RUCAVADO et al., 2000).

2 OBJETIVOS

A cascata do complemento constitui um mecanismo efetor importante da inflamação. As anafilatoxinas são responsáveis, em parte, por modular a resposta local pró-inflamatória, através da vasodilatação e da quimiotaxia e ativação dos leucócitos. Por esse motivo é que a ativação excessiva pode ter efeitos nocivos, com geração de edema e destruição das células do hospedeiro. Foi demonstrado que vários venenos das serpentes do gênero *Bothrops* ativam a cascata do complemento, via a ação de proteases. O veneno de *B. lanceolatus* compartilha com os outros venenos do gênero um alto potencial inflamatório, porém muitas de suas características não foram estudadas. Assim, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar as atividades do veneno de *B. lanceolatus* e compreender os efeitos dos venenos de *Bothrops* e de suas toxinas sobre o sistema complemento, utilizando a ativação induzida pelo veneno de *B. lanceolatus*, como modelo.

A primeira etapa do trabalho consistiu na caracterização do veneno de *B. lanceolatus*, via o estudo de suas atividades enzimáticas e biológicas. Substratos com relevância biológica foram usados nos ensaios enzimáticos *in vitro*: componentes representativos das matrizes extracelulares, das membranas celulares, da cascata da coagulação, e elementos-chave da sinalização intercelular. As possíveis semelhanças antigênicas entre as toxinas do veneno e as toxinas dos venenos das serpentes *Bothrops* brasileiras foram investigadas usando-se o soro antibotrópico terapêutico, produzido pelo Instituto Butantan. As atividades biológicas do veneno foram caracterizadas *in vivo* num modelo murino. Com o objetivo de estabelecer um modelo de inflamação local *in vitro*, estudamos a toxicidade do veneno de *B. lanceolatus* em linhagens humanas de queratinócitos e de células endoteliais. O perfil de produção de citocinas e quimiocinas destas células expostas ao veneno foi estabelecido.

Em seguida, investigamos a capacidade de ativação do sistema complemento pelo veneno de *B. lanceolatus*. Descrevemos sua atividade em soro humano normal e sobre componentes isolados do sistema, a geração de produtos de ativação da cascata, e a atividade dos produtos de clivagem de C5 e do inibidor de C1. A ação do veneno sobre os reguladores de membrana e os receptores das anafilatoxinas foi estudada em células endoteliais. As etapas preliminares da purificação a partir do veneno de *B. lanceolatus*, de SVMs e SVSPs, atuando no sistema complemento, foram realizadas, utilizando procedimentos clássicos de separação e purificação das proteínas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Veneno

O veneno de *Bothrops lanceolatus* foi obtido, na forma liofilizada, junto a LATOXAN (Valence, França) e conservado a -20 °C. Os venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* foram obtidos, na mesma forma, junto ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, e conservados a -20 °C. As soluções estoque foram preparadas em salina estéril (150 mM NaCl) a 5,0 mg/mL, sendo as amostras aliquotadas e estocadas a -80 °C.

3.2 Inibidores

O agente quelante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), o inibidor específico de serinoprotease, fenilmetanesulfonilfluorídeo (PMSF), e o inibidor de metaloproteases 1,10-fenantrolina (fenantrolina) foram obtidos da Sigma (MO, EUA).

3.3 Soros hiperimunes

Os soros comerciais antibotrópico e antibotulínico foram obtidos da Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

3.4 Dosagem de proteínas

Para quantificação de proteínas foi utilizado o ensaio de BCA (“Protein Assay Kit”, Pierce Biotechnology, MA, EUA).

3.5 Purificação de metaloproteases e serinoproteases

A purificação de metaloproteases e serinoproteases do veneno *B. lanceolatus* foram realizadas conforme descrito (PIDDE-QUEIROZ et al., 2013; SERRANO et al., 1995).

3.6 Caracterização do veneno de *B. lanceolatus*

3.6.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O perfil eletroforético das amostras de veneno de *B. lanceolatus* e das frações do veneno foi determinado por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (12%) e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), como descrito por Laemmli (1970), em condições redutoras e

não redutoras, utilizando o sistema Mighty Small (Hoefer Pharmacia Biotech, CA, EUA). A corrida eletroforética foi efetuada sob corrente de 100 V, por 3 horas em tampão Tris-glicina, e o gel corado pelo método de impregnação pela prata (MORRISSEY, 1981).

3.6.2 Eletroforese bidimensional

O perfil eletroforético do veneno de *B. lanceolatus* foi também avaliado em eletroforese bidimensional, utilizando as fitas IPG strip (13 cm, pH 3-10, linear, GE Healthcare, CT, EUA) contendo um gradiente linear de pH entre 3 e 10. Primeiramente, as fitas foram rehidratadas com 250 µL de solução DeStreak contendo 1% de tampão IPG (GE Healthcare) e 100 µg de veneno, durante 16 horas e a temperatura ambiente. As fitas foram submetidas à isofocalização no sistema “Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System” (GE Healthcare), a temperatura ambiente, segundo o seguinte programa de eletroforese: 500 V durante 1 hora, gradiente de 1000 V a 750 kV/h, gradiente de 8000 V a 250 kV/h, 8000 V durante 30 minutos. A fita foi mantida sobre 100 V até o dia seguinte e submetida a uma última etapa a 8000 V, durante 30 minutos, antes das lavagens. As lavagens, redutora e quelante, consistiram em dois banhos de 15 minutos a temperatura ambiente com agitação leve, em tampão de equilíbrio (2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M ureia, 30% glicerol, azul de bromofenol, pH 8,8) contendo, respectivamente, ditioneitol (DTT - 10 mg/mL) ou iodoacetamida (25 mg/mL). Em seguida, a tira foi lavada rapidamente em tampão de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 0,1% SDS), acomodada em contato com o gel de acrilamida (12%, 16 x 18 cm) e coberta com agarose 0,5% líquida (entre 40 °C e 50 °C). Nos primeiros 30 minutos, a eletroforese na segunda dimensão foi efetuada a 600 V e 30 mA e, em seguida, foi alterada a amperagem para 80 mA. Após o final da corrida, o gel foi corado por impregnação por prata.

3.6.3 Análise da presença de resíduos de açúcar no veneno de *B. lanceolatus*

Para avaliação da presença de resíduos de açúcar nas proteínas do veneno de *B. lanceolatus* foi empregado o ensaio de *Western Blot*. Para tanto, amostras do veneno (10 µg) foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE a 12%, em condições não redutoras, e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1992). Após a transferência, estas foram bloqueadas com tampão PBS (8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) contendo 5% de albumina do soro bovino (BSA), por 2 horas a 37 °C, e incubadas com as lectinas concanavalina A

(Con A) ou “wheat germ agglutinin” – lectina de *Triticum vulgaris* (WGA) conjugadas à peroxidase, na diluição de 1:1000, durante 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas com o tampão PBS-Tween 0,05% e reveladas pela adição de diaminobenzidina - DAB (20 mg/ml).

3.6.4 Análise do reconhecimento do veneno pelo soro antibotrópico por ELISA

Para a avaliação do reconhecimento do veneno de *B. lanceolatus* pelo soro antibotrópico terapêutico, produzido pelo Instituto Butantan, placas de poliestireno com 96 poços (Costar®, Corning Inc., MA, EUA) foram sensibilizadas, “overnight” e a 4 °C, com 10 µg/mL de veneno de *B. lanceolatus* diluído em tampão PBS, em volume final de 100 µL/poço. As placas foram lavadas e bloqueadas com PBS-BSA 5% durante 2 horas e a 37 °C. Posteriormente, as placas foram incubadas, por 1 hora e a 37 °C, com diluições seriadas do soro antibotrópico ou soro antitoxínico (controle negativo - Instituto Butantan, Brasil) (100 µL/poço). As placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo de coelho anti-IgG de cavalo (diluído 1:20.000) conjugado à peroxidase (Sigma, MO, EUA), por 1 hora e a 37 °C. As placas foram lavadas e as reações reveladas pela adição de 50 µL do substrato (10 mg orto-dihidrocloreto de fenilediamina – OPD (Sigma, MO, EUA) diluído em 20 mL de tampão citrato/ fosfato/ H₂O₂ 0,3%). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4 N e as densidades óticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm. O título de anticorpos do soro antibotrópico foi calculado como a maior diluição cuja densidade óptica (DO) fosse superior a cinco vezes a média dos valores de DO obtidos com o soro antitoxínico.

3.6.5 Análise do reconhecimento do veneno pelo soro antibotrópico por Western Blot

Para avaliação do reconhecimento do veneno de *B. lanceolatus*, pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan, foi também empregado o ensaio de *Western Blot*. Como controle positivo, foi usado o veneno da *B. jararaca*. Para tanto, amostras do veneno foram separadas eletroforéticamente em gel de SDS-PAGE a 12%, em condições não redutoras, e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1992). Após a transferência, estas foram bloqueadas com PBS-BSA 5%, por 2 horas a 37 °C, e incubadas com o soro antibotrópico na diluição 1:1.000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem em PBS-Tween 0,05%, as membranas foram incubadas em solução de anticorpos anti-IgG de cavalo, conjugados com fosfatase alcalina na diluição de 1:7.500,

por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas, novamente, com o tampão PBS-Tween 0,05% e as reações reveladas pela adição da solução tampão (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) contendo de 0,33 mg/ml de nitroazul de tetrazolium (NBT) e 0,165 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl galactopyranoside (BCIP) (NBT/BCIP Reagente Kit, Molecular Probes, Invitrogen, MA, EUA). A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.6.6 Atividade hialuronidásica

A presença de hialuronidases no veneno de *B. lanceolatus* foi testada segundo os procedimentos de Pukrittayakamee et al. (1988), com pequenas modificações. Amostras do veneno foram incubadas com 10 µL do substrato (1 mg/mL de ácido hialurônico) (Sigma, MO, EUA) e tampão acetato de sódio (0,2 M de acetato de sódio e 0,15 M de cloreto de sódio, pH 6,0), em um volume final de 100 µL. Como controle da reação foram utilizados 10 µL do substrato em 90 µL do tampão acetato (controle negativo: 100% de turbidez), na ausência do veneno e, como controle positivo, foi usado o veneno da *B. jararaca*. As misturas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e, a seguir, acrescidas de 200 µL de brometo de cetil-trimetil-amônio 2,5% em NaOH 2%, para desenvolvimento de turbidez. As leituras foram feitas em leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia), em λ de 405 nm, e a atividade hialuronidásica expressa como UTR (unidade de redução de turbidez/ mg). Para testar a inibição desta atividade pelo soro antibotrópico, amostras de 8 µg dos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca* foram incubadas previamente por 30 minutos, a temperatura ambiente, em tampão acetato. Usando-se diluições seriadas do soro, foi possível determinar a concentração capaz de inibir em 95% (IC₉₅) a atividade do veneno de *B. jararaca*. Esta diluição de soro foi então testada com o veneno de *B. lanceolatus*.

3.6.7 Atividade fosfolipásica

A possível presença de fosfolipases A₂ no veneno de *B. lanceolatus* foi avaliada por método fluorimétrico, utilizando-se o EnzChek Phospholipase A₂ Assay Kit (Invitrogen, MA, EUA). Os venenos das serpentes *C. durissus terrificus* e *B. jararaca* foram usados como controles positivos. Seguindo as instruções do fabricante para ensaio em placa de 96 poços, amostras de venenos diluídos em 50 µL de tampão de reação foram misturadas com 50 µL da solução de substrato peptídico de fluorescência apagada (FRET – “Fluorescence Resonance Energy Transfer” ou transferência de energia de ressonância por fluorescência) e lipossomas,

contendo dioleoilfosfatidilcolina e dioleoilfosfatidilglicerol. A fluorescência foi analisada a 37 °C por 5 minutos com o leitor FLUOStar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha) nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 460 e 515 nm, respectivamente. A atividade específica foi expressa como UF/min/μg de veneno. A inibição da atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus* pelo soro antibotrópico comercial foi testada, usando o veneno de *B. jararaca* como controle positivo. Amostras de 1 μg de veneno foram previamente incubadas com o soro, por 30 minutos a temperatura ambiente, em tampão de reação e, em seguida, adicionada a solução de substrato e realizada a análise de fluorescência. Usando-se diluições seriadas do soro, foi determinada a concentração capaz de inibir em 95% (IC95) a atividade dos venenos de *B. jararaca* e de *B. lanceolatus*.

3.6.8 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica do veneno de *B. lanceolatus* e das frações do veneno foi avaliada em ensaios utilizando substratos peptídicos de fluorescência apagada (FRET), Abz-FRSSRQ-EDDnp e Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp (Abz: ácido orto-aminobenzóico; EDDnp: N-[2,4 dinitrofenil] etilenodiamino), e as leituras realizadas em espectrofluorímetro (Victor 3[™], Perkin – Elmer, MA, EUA). Para tanto, os peptídeos foram dissolvidos em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, diluídos em água Milli-Q de modo a permitir a utilização de volumes sem que a concentração do solvente orgânico ultrapassasse 5% do volume final de incubação (100 μL). Para o ensaio, amostras do veneno foram incubadas com amostras dos peptídeos (5 μM) em solução salina tamponada (50 mM NaHPO₄, 20 mM NaCl, pH 7,4), utilizando placas de 96 poços e analisadas em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 e 420 nm, respectivamente. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termo-estabilizado com agitação (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008). O aumento da fluorescência foi monitorado, continuamente por 15 minutos, e a atividade proteolítica específica do veneno expressa como unidade de fluorescência por minuto por micrograma de veneno (UF/min/μg), sendo calculada pela fórmula: Velocidade de hidrólise (UF/min) / [prot] (μg). Para os dois substratos foram utilizados os inibidores EDTA, PMSF (inibidor de serino proteínases), e fenantrolina (inibidor de metaloproteínases) para a determinação da natureza proteolítica. Além disso, foi testada a inibição dessas atividades proteolíticas pelo soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan. Dessa forma, amostras do veneno foram pré-incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com os inibidores ou o soro e, em seguida, incubadas com o peptídeo (5 μM), por 15 minutos e a 37 °C. A

porcentagem de inibição foi calculada comparando-se as atividades proteolíticas obtidas na presença ou ausência de inibidores.

3.6.9 Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi avaliada incubando fibrinogênio (30 µg) com o veneno durante 1 hora a 37 °C, na presença ou ausência de inibidores (20 mM). Como controle positivo foi usado trombina (1 U; Sigma, MO, EUA). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% em condições redutoras, sendo o gel corado por “Coomassie Brilliant Blue” R-250 (0,1%).

3.6.10 Zimografias com fibrinogênio e gelatina

As atividades fibrinogenolítica e gelatinolítica do veneno de *B. lanceolatus* foram analisadas por zimografia. Para tanto, as amostras, tratadas ou não com inibidores, foram solubilizadas, em tampão de amostra, em condições não redutoras, e separadas eletroforéticamente para desenvolvimento do ensaio de zimografia. Para isso, foi utilizado gel a 10% de acrilamida, acrescido de 1 mg/mL de gelatina ou de fibrinogênio e, para o empilhamento das amostras, gel a 4%. A corrida foi realizada sob amperagem constante de 20 mA e a 4 °C, no sistema Mighty Small (Hoefer Pharmacia Biotech, CA, EUA). Após a corrida, o gel contendo fibrinogênio foi lavado três vezes por 30 minutos em Triton X-100 a 2,5% e incubado por 12 horas a 37 °C em tampão substrato (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,05% Brij-35, pH 8,3). No caso da zimografia com gelatina, após a corrida, o gel foi lavado por 30 minutos em Triton X-100 a 2,5% e incubado, seguindo o mesmo procedimento. O gel foi corado em solução de “Coomassie Brilliant Blue” R-250 a 0,2% por 30 minutos sob agitação, para a análise da presença de zonas claras indicativas de digestão proteolítica.

3.7 Atividades biológicas do veneno de *B. lanceolatus*

3.7.1 Animais

Camundongos Swiss de dois meses de idade (18 g – 22 g) foram obtidos do Biotério de Criação de Animais do Instituto Butantan. Todos os procedimentos foram aprovados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob os pareceres nº 1111/13 e nº 84 nas fls. 21 do

livro 03, respectivamente.

3.7.2 Atividade letal do veneno

Grupos de cinco camundongos Swiss (18 – 22 g) foram injetados com diferentes doses do veneno de *B. lanceolatus* (5 – 7,5 – 10 – 12,5 µg/g), diluído em salina num volume de 100 µL pela via intraperitoneal. Três animais foram inoculados com salina (100 µL) como grupo controle. A mortalidade foi acompanhada por 72 horas e a dose letal 50 (DL50) foi calculada com o programa Probit (FINNEY, 1971).

3.7.3 Atividade edematogênica

Para a determinação da atividade edematogênica do veneno, grupos de 6 camundongos Swiss (18 – 22 g) foram injetados pela via subcutânea na pata direita com veneno de *B. lanceolatus* (0,5 – 1 – 2 µg diluídos em 50 µL de salina). Como controle os animais receberam apenas salina na pata esquerda. O tamanho do edema foi medido após 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas. Todos os animais foram eutanasiados após 48 horas. O edema foi expresso como a percentagem de aumento do tamanho da pata T(t) relativo ao seu tamanho inicial T(0) antes da injeção:

$$E (\%) = 100 * (T(t) - T(0)) / T(0)$$

3.7.4 Atividade hemorrágica

O veneno de *B. lanceolatus* (0,6 – 1,25 – 2,5 – 5 µg diluídos em 100 µL de salina; 4 animais por grupo) foi injetado pela via intradérmica no dorso previamente depilado de camundongos Swiss (18 – 22 g). Como grupo controle, três animais foram inoculados com salina. Após 6 horas, os animais foram eutanasiados e o tamanho das lesões hemorrágicas foi determinado. Amostras foram selecionadas para análise histológica, fixadas na hora em formalina 10% (pH 7,4) e encaminhadas para confecção de lâminas histológicas, coradas com hematoxilina-eosina.

3.8 Ação do veneno de *B. lanceolatus* sobre queratinócitos e células endoteliais humanas: viabilidade celular, produção de citocinas e quimiocinas

3.8.1 Cultivo de células HaCaT e EAhy926

Células da linhagem HaCaT de queratinócitos humanos e da linhagem EAhy926 de células endoteliais vasculares humanas foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning Inc.

- NY, EUA) contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco, Invitrogen Corp., CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab, SP, Brasil) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, Invitrogen Corp., CA, EUA), em estufa a 37 °C e 5% CO₂.

3.8.2 Ensaio com MTT

A ação do veneno bruto sobre as duas linhagens humanas foi avaliada pelo método do MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). Para tanto, queratinócitos (5×10^4 células/poço) e células endoteliais vasculares (10^4 células/poço) foram cultivados em placas de 96 poços contendo meio DMEM suplementado e, posteriormente, mantidos por 24 horas em meio DMEM sem SFB. Após este período, as células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas com concentrações crescentes dos venenos de *B. jararaca* e *B. lanceolatus* em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Ao fim dos períodos de incubação, o sobrenadante dos poços foi coletado para avaliar a produção de citocinas e quimiocinas e adicionada solução de MTT. Células EAhy926 foram incubadas durante 4 h com 200 µL/poço de uma solução contendo 0,5 µg/µL de MTT, seguindo as instruções do fabricante, enquanto as células da linhagem HaCaT, que metabolizam o MTT mais rápido, foram incubadas com 60 µL/poço de solução de MTT (0,83 µg/µL), em meio DMEM incompleto, por 30 minutos a 37 °C e 5% CO₂. A seguir, o sobrenadante foi aspirado, 100 µL/poço de DMSO (Dimetilsulfóxido – Merck - Darmstad, Alemanha) foram adicionados e as placas mantidas em repouso, à temperatura ambiente por 5 minutos, antes da leitura em leitor de placas (FLUOStar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha), nos comprimentos de onda de 540 e 620 nm. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada pela fórmula:

$$\frac{\Delta_{D.O.}(\text{amostra}) - \text{média do } \Delta_{D.O.}(\text{corante})}{\text{média da } \Delta_{D.O.}(\text{controle}) - \text{média da } \Delta_{D.O.}(\text{corante})} \times 100$$

Onde $\Delta_{D.O.} = D.O._{540nm} - D.O._{620nm}$

3.8.3 Inibição da citotoxicidade do veneno pelo soro antibotrópico

A inibição da ação citotóxica do veneno de *B. lanceolatus* pelo soro antibotrópico do Instituto Butantan foi avaliada pelo método do MTT, como acima descrito. Amostras de veneno foram previamente incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente. Como controle

positivo da inibição, foi usado o veneno de *B. jararaca* e, como controle negativo, foi usado o soro antituberculínico produzido pelo Instituto Butantan. Células foram incubadas por 24 horas com essas amostras e a viabilidade foi avaliada. Foram usadas as seguintes concentrações com os queratinócitos HaCaT: 4 µg/mL de veneno e 10 µL de soro/poço; e com as células endoteliais EAhy926: 50 µg/mL de veneno e até 40 µL de soro/poço.

3.8.4 *Produção de citocinas e quimiocinas*

Os sobrenadantes de cultura coletados nos ensaios de viabilidade celular foram centrifugados a $400 \times g$ e estocados a -80°C . A produção de citocinas e quimiocinas das células expostas ao veneno foi avaliada utilizando-se o “Cytometric Bead Arrays: Human Chemokine Kit, Human Inflammatory Cytokine Kit, Human Th1/Th2/Th17 Kit” (BD Biosciences, NJ, EUA). Seguindo as instruções do fabricante, as amostras foram incubadas por 3 horas, a temperatura ambiente e protegidas da luz, com o mesmo volume de “beads” e de reagente de detecção marcado com PE. Após uma etapa de lavagem e ressuspensão do “pellet”, a leitura foi feita em citômetro FACSCanto-II (Becton Dickinson, California, EUA), configurado seguindo as instruções do fabricante.

A quantidade de cada proteína foi calculada (em pg/mL de sobrenadante) utilizando a regressão linear deduzida da curva padrão no software FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson, California, EUA). Em seguida, foi estimado o número de células para cada tratamento, usando a viabilidade determinada pelo ensaio MTT, o número de células plaqueadas e o crescimento aproximado destas até o início do experimento (~10 vezes). Como foi usado DMEM incompleto ao longo do experimento, considerou-se um número de células constante nos poços controle. Assim, a concentração de citocinas e quimiocinas foi normalizada e expressa em $\text{pg}/5 \times 10^4$ células.

Foi analisada a produção das seguintes proteínas: a proteína induzida pelo interferon- γ (IP-10), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), a monocina induzida pelo interferon- γ (MIG), a proteína regulada pela ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES), TNF, as interleucinas 1 β , 2 (IL-2), 4 (IL-4), 6, 8 (IL-8), 10 (IL-10), 12 (na forma ativa heterodimérica, IL-12p70), 17a, e IFN- γ .

3.8.5 *Atividade proteolítica do veneno sobre citocinas e quimiocinas*

A clivagem direta das citocinas e quimiocinas pelo veneno de *B. lanceolatus* foi testada usando os “kits” de “Cytometric Bead Array”. A mistura padrão de citocinas e quimiocinas, fornecida nos “kits”, foi diluída 1:2 e incubada com 50 µg/mL de veneno de *B. lanceolatus*

durante 30 minutos a 37 °C, em presença ou ausência de inibidores de proteases (10 mM). Em seguida, foram adicionados EDTA (20 mM) e diluente de amostra até um volume final de 25 µL. Estas amostras foram submetidas ao ensaio como descrito no item 3.8.4. A ação do veneno foi analisada sobre as seguintes proteínas: IP-10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8, IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, e IL-1β.

3.8.6 Ação do veneno sobre marcadores de membrana em células endoteliais

Células endoteliais EAhy926 (10^6 células/mL) foram incubadas com veneno de *B. lanceolatus* (100 µg/mL) durante 2 horas a 37 °C com agitação. Como controles negativo e positivo foram usados salina e TNF-α (20 ng/mL; BD Pharmingen, NJ, EUA), respectivamente. As células foram centrifugadas a $400 \times g$ e resuspendidas em tampão de FACS (PBS contendo 1% de BSA e 0,01% de NaN_3).

Células (5×10^4 células/poço; volume final de 25 µL) foram incubadas por 1 hora a 4°C, protegidas da luz, com anticorpos monoclonais marcados com ficoeritrina (PE): anticorpos monoclonais de camundongo anti-fator tecidual (CD142, TF) (BD Pharmingen, NJ, EUA; diluído 1:2,5). Alternativamente, as células (5×10^4 células/poço; volume final de 50 µL) foram incubadas com os seguintes anticorpos primários, não marcados, durante uma hora a 4 °C: anticorpos monoclonais de camundongo anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA; diluído 1:400), anticorpos monoclonais de camundongo (doação do Dr Vaclav Horeji, Praga, República Checa) anti-molécula 1 de adesão de célula vascular (VCAM-1), E-selectina (diluídos 1:50), e P-selectina (diluído 1:100). Após centrifugação ($320 \times g$; 5 min) e descarte do sobrenadante, as células foram resuspendidas em tampão de FACS e incubadas protegidas da luz, com anticorpos secundários, diluídos 1:100 (Goat Anti-Mouse IgG-PE, Sigma, MO, EUA). Após marcação e centrifugação, as células foram resuspendidas em tampão de FACS para leitura no citômetro FACSCanto-II (BD Biosciences, NJ, EUA) usando o software FACSDiva (BD Biosciences, NJ, EUA). Após definição do gate, foram analisados 5000 eventos por amostra e a mediana de fluorescência de cada amostra foi calculada.

Para a análise dos dados, a média de fluorescência do controle sem marcação ou somente marcado com anticorpo secundário foi descontado da mediana de fluorescência de cada amostra.

3.9 Ação do veneno de *B. lanceolatus* e/ou suas frações sobre o Sistema Complemento (C)

3.9.1 Soro humano normal (SHN)

O soro humano normal foi obtido de indivíduos adultos saudáveis. O sangue foi coletado por punção venosa, mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e refrigerado a 4 °C por 4 horas, para retração do coágulo. Em seguida, o sangue foi centrifugado a $400 \times g$ por 15 minutos e a 4 °C, o soro coletado, aliquotado e armazenado a - 80 °C até o momento do uso. O projeto foi analisado, pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, e aprovado sob parecer n° 274.313.

3.9.2 Tratamento do SHN com o veneno de *B. lanceolatus*

Alíquotas de SHN (100 µL) foram tratadas com 100 µL de concentrações crescentes do veneno de *B. lanceolatus* e incubadas a 37 °C por 1 hora, para os ensaios da Via Clássica, e por 30 minutos, para os ensaios da Via Alternativa e da Via das Lectinas. Amostras controles, para a Via Clássica foram tratadas com VBS⁺⁺ (145,5 mM de cloreto de sódio; 0,9 mM de 5,5 dietilbarbiturato de sódio; 2,8 mM de ácido barbitúrico; 0,8 mM de cloreto de magnésio e 0,3 mM de cloreto de cálcio - pH 7,2), e para a Via Alternativa com tampão APB (5 mM 5,5-dietilbarbiturato de sódio, 7 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 150 mM NaCl - pH 7,4). Amostras controles, para o ensaio da Via das Lectinas, foram incubadas com tampão BVB⁺⁺ (VBS⁺⁺ contendo: 0,5 mM MgCl₂, 2,0 mM CaCl₂, 0,05% Tween 20, 0,1% BSA - pH 7,5).

3.9.3 Ensaios hemolíticos

Para os ensaios hemolíticos da Via Clássica do C foram utilizados eritrócitos de carneiro (E^S), sensibilizados com anticorpos de coelho anti-E^S (hemolisina), e para os ensaios da via alternativa do C, eritrócitos de coelho (E^R).

3.9.4 Via Clássica

Amostras de SHN, previamente incubadas como descrito no item 3.9.2, foram diluídas 1:80 em VBS⁺⁺. Alíquotas dessas diluições, variando de 10 a 100 µL, foram incubadas, em placas de 96 poços, com 50 µL da suspensão a 2% dos E^S sensibilizados e volumes de VBS⁺⁺ suficientes para completar o volume final de 150 µL por poço. Como controles negativo (branco) ou positivo (100% de lise), E^S sensibilizados foram incubados com VBS⁺⁺ ou água

destilada, respectivamente. A placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a $300 \times g$ por 5 minutos e a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de fundo chato e a hemólise determinada pela medida da absorbância da hemoglobina liberada, em λ de 414 nm, utilizando espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia).

3.9.5 Via Alternativa

Amostras de SHN, previamente incubadas como descrito no item 3.9.2, foram diluídas 1:4 em tampão APB (5 mM de 5,5-dietilbarbiturato de sódio, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, 150 mM NaCl - pH 7,4). Alíquotas dessas diluições, variando de 10 a 100 μL , foram incubadas, em placas de 96 poços, com 50 μL da suspensão a 2% de E^R e volumes do tampão suficientes para completar volume final de 150 μL por poço. Como controles, negativo (branco) ou positivo (100% de lise), amostras de E^R foram incubadas com tampão ou água destilada, respectivamente. A placa foi incubada a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a $300 \times g$ por 5 minutos e a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de fundo chato e a hemólise determinada pela medida da absorbância da hemoglobina liberada, em λ de 414 nm, utilizando espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia).

Cálculo da atividade hemolítica - A partir dos valores da leitura de absorbância (Abs), as porcentagens de hemólise (y) foram calculadas utilizando a seguinte fórmula:

$$y = [(Abs^{SORO} - Abs^{BRANCO}) / (Abs^{100\%LISE} - Abs^{BRANCO})] \times 100\%$$

Os valores de AP_{50} e CH_{50} , para as amostras de soro incubadas com o veneno, foram calculados a partir de uma curva de regressão não linear construída com as porcentagens de hemólise.

3.9.6 Ação do veneno de *B. lanceolatus* sobre a Via das Lectinas

Para a avaliação da atividade do veneno de *B. lanceolatus* sobre a Via das Lectinas, placas de poliestireno com 96 poços (Costar®, Corning Inc., MA, EUA) foram sensibilizadas, “overnight” e a 4 °C, com 100 $\mu g/mL$ de manose (Sigma-Aldrich, MO, EUA) diluída em tampão PBS, em volume final de 100 μL /poço. As placas foram lavadas e bloqueadas com PBS-BSA 1% durante 1 hora e a 37 °C. Posteriormente, foram incubadas, por 1 hora e a 37 °C, com diluições seriadas do SHN (100 μL /poço), previamente tratado com o veneno. Como controle negativo, SHN inativado por aquecimento a 56 °C por 30 minutos foi

utilizado, para avaliar as interações inespecíficas do soro com a placa sensibilizada. As placas foram lavadas e incubadas com o anticorpo anti-C4 humano (diluído 1:1.000) produzido em cabra (Quidel Corporation, CA, EUA), por 1 hora e a 37 °C. Após este período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpos anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase (diluído 1:5.000) (Pierce Biotechnology, IL, EUA), por 1 hora e a 37 °C. As placas foram lavadas e as reações reveladas pela adição de 50 µL do substrato (10 mg de orto-dihidrocloreto de fenilediamina – OPD [Sigma, MO, EUA] diluído em 20 mL de tampão citrato/ fosfato/ H₂O₂ 0,3%). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4N e as densidades óticas determinadas por leitura espectrofotométrica (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia) em λ de 492 nm.

Cálculo da inibição da ligação de C4 residual – Para cada dose de veneno a percentagem de inibição do soro foi calculada na diluição 1:25 (40 µL de SHN/mL). A concentração capaz de inibir 50% da atividade do SHN (CI50) foi calculada a partir da regressão não linear da curva de inibição, em função da concentração de veneno.

3.9.7 *Análise da atividade do veneno de B. lanceolatus sobre os componentes do complemento*

Para avaliar se o veneno de *B. lanceolatus* ou suas frações eram capazes de promover a clivagem de componentes do Sistema Complemento, amostras de 2 µg de C3, C4, C5 ou C1-INH humanos (Quidel Corporation, CA, EUA), foram incubadas com veneno, na presença ou ausência dos inibidores 1,10-fenantrolina (inibidor de metaloproteínas) ou PMSF (inibidor de serinoproteases), por 30 minutos a 37 °C, em tampão PBS, para um volume final de 8 µL. Após a incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE (10%), sendo o gel corado pelo método de impregnação pela prata (MORRISSEY, 1981). A clivagem do C1-INH foi também revelada por *Western Blot*, como descrito no item 3.6.5. Foram usados anticorpos caprinos anti-C1-INH humano (diluídos 1:2.000), e anticorpos secundários de coelho anti-IgG de caprino marcados com fosfatase alcalina, na diluição 1:7.500 (Sigma, MO, EUA).

3.9.8 *Análise da produção de anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento em soros humanos tratados com o veneno de B. lanceolatus*

A geração das anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento foi determinada em amostras de 50 µL de soro humano normal (SHN) incubadas com 50 µg de veneno de *B. lanceolatus*, na presença ou ausência de 1,10-fenantrolina (10 mM), a 37 °C por

30 minutos. A detecção das anafilatoxinas C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg, e C5a/C5a-desArg foi realizada utilizando-se o Cytometric Bead Array (CBA) Human Anaphylatoxins Kit (BD Biosciences, NJ, EUA). As três soluções de esferas conjugadas aos anticorpos específicos das anafilatoxinas C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg, e C5a/C5a-desArg, foram preparadas no momento do uso, seguindo as instruções do fabricante. Amostras foram diluídas a 1:5.000 e 25 µL de cada amostra foi adicionada a um volume de 25 µL da solução de esferas de captura. As amostras foram incubadas por 2 horas, a temperatura ambiente, e protegidas da luz. Após a adição de 500 µL de solução de lavagem (tampão fosfato contendo proteína e detergente), os tubos foram centrifugados a $200 \times g$ durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e 25 µL do reagente de detecção contendo anticorpos anti-C3a, C4a e C5a humanos, conjugados a ficoeritrina (PE), foram adicionados a cada tubo. As amostras foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após a segunda etapa de lavagem, foram adicionados 150 µL de tampão de lavagem a cada tubo e o “pellet” ressuspensão para a leitura por citometria. O citômetro FACSCanto-II (Becton Dickinson, California, EUA) foi parametrado seguindo as instruções do fabricante. A quantidade de cada anafilatoxina foi calculada (em µg/mL de soro) utilizando a regressão linear deduzida da curva padrão.

A produção do complexo terminal do complemento, no soro tratado, foi avaliada por ELISA, com o kit “MicroVue™ SC5b-9 Plus EIA Kit” (Quidel Corporation, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram diluídas (1:150), incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, em placa previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal murino, específico para o neoepítipo de C9, quando presente no complexo SC5b-9. Após a etapa de lavagem, o anticorpo anti-neoepítipo, conjugado à peroxidase, foi adicionado à placa, por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e as reações reveladas pela adição de 100 µL de solução contendo o substrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzideno), após a incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de H₂SO₄ (2N) e as densidades óticas determinadas por leitura espectrofotométrica a 450 nm (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia). A partir da curva padrão foi estabelecida uma equação da reta e, a partir desta, foi calculada a quantidade do complexo SC5b-9 (µg/mL de soro) nas amostras de soro.

3.9.9 Atividade do produto de clivagem de C1-INH gerado pelo veneno de *B. lanceolatus*

Para avaliar se o produto de clivagem do C1-INH pelo veneno de *B. lanceolatus* mantinha atividade inibidora sobre o componente C1 da via clássica, amostras de C1-INH

incubadas com veneno foram submetidas ao imunoenensaio enzimático funcional “MicroVue™ C1 Inhibitor Plus EIA” (Quidel Corporation, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O componente C1-INH purificado foi incubado com o veneno como descrito no parágrafo 3.9.7. As misturas diluídas (1:25) foram incubadas, a temperatura ambiente durante 30 minutos, com C1s ativo e biotilado. Na sequência, as misturas foram incubadas por 10 minutos em poços pré-revestidos com avidina. Após as lavagens recomendadas, foi adicionado anticorpo anti-C1-INH humano, produzido em caprino conjugado com peroxidase, às placas. Após mais uma etapa de lavagem, as reações foram reveladas e as densidades óticas determinadas por leitura espectrofotométrica a 450 nm (FLUOStar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Após subtração do branco, a percentagem de C1-INH funcional de cada amostra foi calculada usando como controle amostras de C1-INH tratado com salina.

3.9.10 Atividade do fragmento C5a, gerado pela clivagem do C5 por ação do veneno de B. lanceolatus

Para avaliar se o fragmento C5a, resultante da clivagem do C5 pelo veneno de *B. lanceolatus*, possuía atividade biológica, avaliamos a sua capacidade de ativar neutrófilos humanos, medindo o influxo de cálcio nas células.

Para tanto, leucócitos totais foram preparados a partir de sangue humano. O sangue (20 mL) tratado com heparina (25 UI/mL de sangue) foi misturado cuidadosamente com 20 mL de tampão BSS (137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 78,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄) contendo 6% de Dextran 70. Após 40 minutos de decantação, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 3 minutos a $260 \times g$. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido. Para lisar os eritrócitos restantes, 5 mL de água deionizada foram adicionados e deixados por 20 segundos em contato com as células. A hipo-osmolaridade foi neutralizada, imediatamente, com 20 mL de tampão BSS, sendo a mistura centrifugada e o pellet resuspendido em 1 mL de meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB. As células foram incubadas com o indicador de cálcio fluorescente Fluo4-AM ($2 \mu\text{g}/10^7$ células/mL; Life Technologies, Waltham, MA, EUA), a temperatura ambiente, durante 30 minutos, protegidas da luz. As células foram lavadas com 25 mL de tampão BSS e resuspendidas em tampão Krebs (120 mM NaCl; 25mM HEPES; 4,8 mM KCl; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄), contendo 0,1 % de BSA.

Numa placa, as células (10^6 células em 200 μL de tampão Krebs-BSA/poço) foram expostas aos estímulos e as mudanças de fluorescência medidas a cada 3 segundos, nos comprimentos de onda de excitação de 485 nm, e de emissão de 510 nm. Um único poço foi

medido por vez e submetido a um único estímulo. C5a purificado foi usado como controle positivo. Para cada poço, os valores de fluorescência foram normalizados pelo valor de fluorescência inicial F_0 , calculado como a média de fluorescência durante os 30 segundos iniciais.

3.9.11 Expressão dos reguladores e receptores do complemento em células endoteliais expostas ao veneno de *B. lanceolatus*

Seguindo a metodologia descrita no parágrafo 3.8.6, células endoteliais EAhy926 (10^6 células/mL) foram incubadas com veneno de *B. lanceolatus* (100 µg/mL) durante 2 horas a 37 °C com agitação. Como controles negativo e positivo foram usados salina e TNF- α (20 ng/mL), respectivamente. O veneno foi pre-incubado, ou não, com 50 mM de EDTA, minimizando a concentração final no volume de incubação com as células (4 mM).

Células (5×10^4 células/poço; volume final de 25 µL) foram incubadas por 1 hora a 4 °C, protegidas da luz, com os seguintes anticorpos monoclonais: anticorpo murino anti-receptor de C3a humano marcado com PE (BD Pharmingen, NJ, EUA; diluído 1:10), ou anticorpo murino anti-receptor de C5a (ou CD88) humano marcado com PE (BD Pharmingen, NJ, EUA; diluído 1:5). Alternativamente, as células (5×10^4 células/poço; volume final de 50 µL) foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: anticorpos monoclonais produzidos em camundongos contra MCP (CD46), DAF (CD55) e CD59 humanos (BD Pharmingen, NJ, EUA; diluídos 1:1000). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongos produzidos em caprinos, marcados com PE, diluídos 1:100 (Sigma, MO, EUA). A análise por citometria seguiu o protocolo acima descrito (3.8.6).

3.10 Fracionamento do veneno por cromatografia de exclusão molecular

O veneno de *B. lanceolatus* foi diluído em tampão bicarbonato (50 mM; pH 7,8) e fracionado em coluna Superose 12HR 10/30, com um fluxo de 0,4 mL/min. A separação foi monitorada pela medida da absorbância a 280 nm. O veneno foi fracionado manualmente, de acordo com as variações do valor da absorbância.

3.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, EUA).

As comparações de mais de dois grupos em relação a uma variável foram analisadas por One Way ANOVA e as comparações múltiplas realizadas através do teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). As diferenças entre mais de dois grupos em relação a duas ou mais variáveis foram avaliadas utilizando o teste Two Way ANOVA, seguido pelo post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). Quando comparados apenas dois grupos foi utilizado o teste t de Student ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do veneno de *Bothrops lanceolatus*

4.1.1 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo ensaio de BCA, sendo determinada a concentração de $3,37 \pm 0,15$ mg de proteína/mL na solução estoque de veneno, isto é, 5 mg de veneno por mililitro. A proporção de proteínas no veneno foi, portanto, de ~ 67%.

4.1.2 Eletroforeses unidimensional e bidimensional

O veneno foi submetido à eletroforese em SDS-PAGE a 12%, em condições redutoras e não redutoras, sendo o gel corado por “Coomassie Blue R-250”. A análise do perfil eletroforético do veneno de *B. lanceolatus* revelou a presença de proteínas com massa molecular entre 10 e 180 kDa, em condições não redutoras. O perfil do veneno, analisado em condições redutoras, apresentou três bandas principais, cujos pesos moleculares foram de 70 kDa, 45 kDa e 30 kDa (Figura 2.A).

A análise do veneno por eletroforese bidimensional revelou que a maioria das proteínas do veneno eram ácidas, com ponto isoelétrico (pI) entre 4 e 8, e apresentando apenas uma isoforma (Figura 2.B). No entanto, entre 14 kDa e 19 kDa foram reveladas algumas proteínas básicas. A proteína de 30 kDa foi resolvida como três isoformas distintas, com pI entre 6,6 e 6,9.

Figura 2 - Análise eletroforética do veneno de *B. lanceolatus*

[A] Amostras de 30 μg de veneno de *B. lanceolatus* foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12% de acrilamida em condições não redutoras (a) e redutoras (b). O gel foi corado por Coomassie Blue R-250. [B] A fita com o gradiente de pH (3-10) foi reidratada durante 16 horas com 250 μL de tampão contendo 100 μg de veneno de *B. lanceolatus*, antes da isofocalização. Após uma lavagem redutora e uma lavagem quelante, a amostra focalizada na fita foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%), sendo este corado por prata.

4.1.3 Presença de resíduos de açúcar nos componentes do veneno

A análise do veneno por *Western Blot*, usando Con A e WGA, mostrou a presença de várias proteínas contendo, respectivamente, N-acetil-D-glucosamina e/ou ácido siálico, e grupos terminais α -D-manosil e/ou α -D-glucosil (Figura 3) (GOLDSTEIN, 1983; IRIMURA; NICOLSON, 1975).

Figura 3 - Presença de resíduos de açúcar no veneno de *B. lanceolatus*

As amostras do veneno (15 μ g) foram separadas eletroforéticamente em gel de 12% (SDS-PAGE), em condições não redutoras [A] ou redutoras [B], e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência e bloqueio com PBS-BSA 5%, as membranas foram incubadas com as lectinas concanavalina A (Con A) ou “wheat germ agglutinin” – lectina de *Triticum vulgaris* (WGA), conjugadas à peroxidase. As reações foram reveladas com DAB.

4.1.4 Reconhecimento do veneno de *B. lanceolatus* pelo soro anti-botrópico

O reconhecimento do veneno de *B. lanceolatus* pelo soro anti-botrópico do Instituto Butantan foi avaliado por dois métodos distintos, ou seja: *Western Blot*, utilizando o veneno de *B. jararaca* como controle positivo, que faz parte do *pool* usado na produção do antiveneno, e o ensaio de ELISA, utilizando soro antitoxínico como controle negativo. A Figura 4 mostra um reconhecimento forte de bandas do veneno de *B. lanceolatus* com massa molecular entre 50 kDa e 70 kDa pelo soro antitoxínico. Os ensaios de ELISA confirmaram a capacidade do soro antitoxínico em reconhecer o veneno de *B. lanceolatus*, com título de 1:320.000; o soro antitoxínico não foi capaz de reconhecer componentes presentes no veneno de *B. lanceolatus* (dados não mostrados).

Figura 4 - Reconhecimento dos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca* pelo soro antitoxínico por *Western Blot*

As amostras de 5 µg de veneno de *B. jararaca* (Bj) e *B. lanceolatus* (Bl) foram separadas eletroforéticamente em gel SDS-PAGE a 12%, em condições não redutoras, e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. Após a transferência e bloqueio com PBS-BSA 5%, por 2 horas a 37°C, as membranas foram incubadas com soro anti-botrópico na diluição de 1:1.000 por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase (diluição de 1:7.500, 1 hora a temperatura ambiente). As reações foram reveladas com uma solução de NBT/BCIP.

4.1.5 Atividade hialuronidásica

O ácido hialurônico é um componente essencial das matrizes extracelulares, cuja degradação aumenta a difusão das toxinas. Vários venenos do gênero *Bothrops* apresentam atividade hialuronidásica (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008). A atividade hialuronidásica do veneno de *B. lanceolatus* foi determinada usando ácido hialurônico como substrato. O veneno de *B. jararaca* foi usado como controle positivo. A Figura 5.A mostra a presença de componentes com atividade hialuronidásica no veneno de *B. lanceolatus*. No entanto, a atividade específica de 8 µg de veneno de *B. lanceolatus* revelou ser 5 vezes mais baixa do que a atividade da mesma quantidade de veneno de *B. jararaca* (Figura 5.B).

A atividade hialuronidásica do veneno de *B. jararaca* (8 µg), incubado com diluições seriadas do soro antibotrópico, foi avaliada nas mesmas condições de ensaio (Figura 5.C). O volume de soro capaz de inibir em 95% a atividade hialuronidásica do veneno foi de 0,0562 µL/µg de veneno (IC₉₅%; 0,042-0,0721 µL/µg). Esta quantidade de soro inibiu totalmente a atividade hialuronidásica da mesma quantidade de veneno de *B. lanceolatus*.

Figura 5 - Análise da atividade hialuronidásica e inibição desta pelo soro antibotrópico

Amostras do veneno foram incubadas com 10 µg do substrato em tampão acetato de sódio. Como controles da reação, foram utilizados tampão acetato e substrato em tampão acetato (controle negativo: 100% de turbidez), ambos na ausência do veneno. As misturas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e, a seguir, acrescidas de brometo de cetil-trimetil-amônio em NaOH. As leituras foram realizadas em λ de 405 nm e a atividade hialuronidásica expressa como UTR (unidade de redução de turbidez) [A] ou em UTR/mg [B]. Os resultados representam a média de três ensaios, realizados em duplicatas. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. [B] A atividade hialuronidásica específica dos venenos foi medida em amostras de 8 µg de veneno. #: dados significativamente diferentes ($p < 0,05$). [C] Os venenos (8 µg) foram incubados com soro antibotrópico e a atividade hialuronidásica testada. A concentração capaz de inibir 95% da atividade do veneno de *B. jararaca* foi calculada por regressão não linear, usando o software GraphPad Prism 6.

4.1.6 Atividade fosfolipásica

A possível presença de fosfolipases A_2 no veneno de *B. lanceolatus* foi avaliada por método fluorimétrico, usando os venenos de *C. durissus terrificus* e *B. jararaca* como controles positivos. A Figura 6 mostra a curva dose-resposta que revela que o veneno de *B. lanceolatus* apresenta atividade fosfolipásica significativamente menor do que a do veneno de *C. durissus terrificus* e maior do que a do veneno de *B. jararaca*.

A inibição da atividade fosfolipásica dos venenos de *B. jararaca* e de *B. lanceolatus* pelo soro antibotrópico foi avaliada com amostras pré-incubadas com soro. As concentrações de soro capazes de inibir em 95% a atividade dos venenos foram de 0,327 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ de veneno de *B. jararaca* (IC95: 0,224 – 0,453 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$) e de 2,29 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ de veneno de *B. lanceolatus* (IC95: 1,47 – 3,29 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$), respectivamente.

Figura 6 - Atividade fosfolipásica do veneno de *B. lanceolatus*

Em placas de 96 poços, amostras de venenos foram diluídas em tampão de reação, e foi adicionado o mesmo volume de solução contendo o substrato fluorescente para um volume final de 100 μL por poço. A placa foi analisada em leitor de fluorescência ($\lambda_{\text{EX}}=460$ e $\lambda_{\text{EM}}=515$ nm) a 37 °C por 5 minutos. Os resultados representam a média de dois ensaios realizados em duplicatas. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. As atividades específicas dos venenos (valores obtidos com 1 μg de veneno) foram analisadas por One Way Anova e teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha<0,05$).*: estatisticamente diferente do controle *C. durissus terrificus*. #: estatisticamente diferente do controle *B. jararaca*.

4.1.7 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica do veneno de *B. lanceolatus* foi avaliada utilizando substratos peptídicos de fluorescência apagada FRET, que permitem uma quantificação rápida e sensível desta atividade, usando pouco veneno e substrato. Foram escolhidos os substratos Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp (Abz-RPPGFSPFRQ), que é clivado preferencialmente por serinoproteases em venenos no gênero *Bothrops* (KUNIYOSHI et al., 2012), e Abz-FRSSRQ-EDDnp (Abz-FRSSRQ), clivado por metaloproteases e serinoproteases. Na presença de 5 μ M de substrato e em condições de cinética linear (excesso de substrato), as atividades específicas do veneno sobre os substratos peptídicos Abz-FRSSRQ e Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp foram de $111,0 \pm 4,7$ UF/min/ μ g e de $78,27 \pm 9,63$ UF/min/ μ g, respectivamente.

Como mostrado pela Figura 7.A, a clivagem do Abz-FRSSRQ não foi inibida por EDTA e a 1,10-fenantrolina inibiu apenas 10%; o PMSF inibiu mais de 90% desta atividade. A clivagem do peptídeo Abz-RPPGFSPFRQ foi fortemente inibida por EDTA e pela 1,10-fenantrolina (94% e 100%, respectivamente), sendo que o PMSF foi também capaz de inibir em 80% esta atividade.

O potencial de inibição dessas atividades proteolíticas pelo soro antibotrópico, produzido pelo Instituto Butantan, foi também investigado (Figura 7.B). Usando uma alta concentração de soro (200 μ L/mL), as clivagens dos peptídeos Abz-FRSSRQ e Abz-RPPGFSPFRQ foram inibidas em 54% e 60%, respectivamente.

Figura 7 - Inibição da clivagem dos peptídeos Abz-FRSSRQ e Abz- RPPGFSPFRQ

Amostras de veneno de *B. lanceolatus* (2,5 µg/poço para a reação com Abz-FRSSRQ, ou 5 µg/poço para a reação com Abz-RPPGFSPFRQ) foram incubadas em tampão contendo EDTA (100 mM), PMSF (5 mM), 1,10-fenantrolina (5 mM) ou soro antitoxínico (20 µL). Após 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente, foi adicionado o substrato (volume final de 100 µL) e a atividade proteolítica do veneno medida por espectrofluorimetria durante 15 minutos. Os resultados representam a média de, respectivamente, 3 ensaios [A] e 6 ensaios [B], realizados em duplicatas. Os dados estão representados como média ± desvio padrão. Os dados foram analisados por One Way Anova com teste post-hoc de Bonferroni [A] ou teste t de Student [B] ($p < 0,05$). *: valores significativamente diferentes. N. S.: valores não significativamente diferentes.

4.1.8 Atividade fibrinogenolítica

O fibrinogênio desempenha um papel chave na coagulação e na agregação plaquetária. Nestes processos, as cadeias α e β do fibrinogênio são clivadas para formar fibrina sob a ação enzimática da trombina. Amostras de fibrinogênio (30 μ g) foram incubadas durante 1 hora com veneno (de 0,01 a 1 μ g por amostra), e separadas por eletroforese em condições redutoras. A Figura 8.A mostra a clivagem total das cadeias α e β do fibrinogênio, quando na presença de quantidades de veneno iguais ou superiores a 0,5 μ g. O mesmo experimento foi repetido na presença de 0,5 μ g de veneno e de 0,1 μ mol ou 0,2 μ mol dos inibidores EDTA, PMSF e fenantrolina (Figura 8.B). Ambas as quantidades de EDTA inibiram parcialmente a clivagem do fibrinogênio. 0,2 μ mol de PMSF inibiu parcialmente a clivagem do fibrinogênio pelo veneno; nenhuma inibição foi observada com 0,1 μ mol. A atividade foi totalmente inibida por ambas as concentrações de fenantrolina.

Figura 8 - Clivagem do fibrinogênio pelo veneno de *B. lanceolatus*, na presença ou ausência de inibidores

[A] 30 μ g de fibrinogênio foram incubados com trombina (1 U), ou com veneno de *B. lanceolatus* durante 1 hora a 37 °C. As amostras foram separadas em SDS-PAGE a 10% de acrilamida em condições redutoras. O gel foi corado por "Coomassie Blue R-250". [B] 30 μ g de fibrinogênio foram incubados com 0,5 μ g de veneno de *B. lanceolatus* durante 1 hora a 37 °C, na presença de 0,2 μ mol ou 0,1 μ mol de EDTA, PMSF ou 1,10-fenantrolina (Fen). As amostras foram submetidas ao mesmo procedimento descrito em [A].

4.1.9 Zimografias

Para estimar a massa molecular dos componentes do veneno, que apresentam atividade fibrinogenolítica, a clivagem do fibrinogênio pelo veneno de *B. lanceolatus* foi também avaliada em zimografia. Amostras de veneno foram separadas eletroforéticamente em gel contendo fibrinogênio. A Figura 9.A mostra a presença de várias proteínas com atividade fibrinogenolítica, com massa molecular entre 30 e 180 kDa. Uma banda com massa molecular ~ 30 kDa apresentou atividade particularmente forte.

O veneno de *B. lanceolatus* (25 µg) foi submetido à zimografia em gel contendo gelatina. A Figura 9.B revela a presença de gelatinases de alta massa molecular (superior a 115 kDa) e também de moléculas entre 70 kDa e 85 kDa.

Figura 9 - Zimografia com gelatina e fibrinogênio

Amostras de 25 µg de veneno de *B. lanceolatus* foram separadas em gel SDS-PAGE a 10% de acrilamida e 10% de fibrinogênio [A] ou de gelatina [B], em condições não redutoras a 4 °C. O gel foi incubado por 20 h a 37 °C em tampão substrato (pH 8,3) e corado por “Coomassie Blue R-250”.

4.1.10 Atividades tóxicas do veneno analisadas “in vivo”

Camundongos Swiss foram inoculados com diferentes doses do veneno de *B. lanceolatus* (5 – 7,5 – 10 – 12,5 mg/kg) e acompanhados durante 72 horas. A análise do número de animais mortos em cada dose, utilizando o programa Probit, mostrou que a DL50 determinada para o veneno foi de 8,42 mg/kg (IC95%: 6,24 - 11,02 mg/kg).

O veneno de *B. lanceolatus* (diluído em 50 µL de salina; 6 animais por grupo) foi injetado pela via subcutânea na pata direita dos camundongos Swiss, para a determinação da atividade edematogênica. O tamanho do edema foi acompanhado até 48 horas após a inoculação. Além do edema, a injeção do veneno causou hemorragia local. A Figura 10 mostra que o edema causado por ambos, o veneno e a solução salina, teve um pico máximo aos 30 minutos após a injeção. A amplitude do pico do edema foi proporcional à dose de veneno (Figura 10). O edema induzido pela solução salina foi resolvido em apenas 2 hora. Por meio de análise estatística, foi possível confirmar que a resolução do edema induzido por 0,5 µg de veneno ocorreu em 6 horas, enquanto o edema induzido por doses maiores do veneno foi resolvido em 24 horas. Os demais sintomas desapareceram em até 48 horas após a inoculação.

A atividade hemorrágica foi analisada 6 horas após a inoculação intradérmica do veneno de *B. lanceolatus*, no dorso de camundongos Swiss. A Figura 11.A mostra a curva dose-resposta linear obtida a partir da medida da área hemorrágica. Nas condições do ensaio, o veneno teve uma atividade hemorrágica de 33,13 mm² por µg de veneno. A análise histológica mostrou a presença de hemorragia e lesões inflamatórias, dose-dependentes, localizadas na região muscular da derme e na epiderme (Figura 11.B, C e D).

Figura 10 - Atividade edematogênica do veneno de *B. lanceolatus*

Grupos de 6 camundongos Swiss foram injetados, pela via subcutânea na pata direita, com veneno de *B. lanceolatus* diluído em 50 µL de salina. Os animais receberam apenas salina, na pata esquerda, como controle. O edema foi expresso como a percentagem de aumento do tamanho da pata $T(t)$ relativo ao seu tamanho inicial $T(0)$ antes da injeção. Analisado estatisticamente por teste Two Way Anova com teste post-hoc de Bonferroni, ou por teste One Way Anova, com teste post-hoc de Bonferroni (inserto) ($\alpha < 0,05$). *: diferença significativa em relação ao controle. #: valores significativamente diferentes. N.S.: valores não significativamente diferentes.

Figura 11 - Atividade hemorrágica do veneno de *B. lanceolatus*

O veneno de *B. lanceolatus* diluído em 100 µL de salina foi injetado pela via intradérmica no dorso previamente depilado de camundongos Swiss (4 animais por grupo). Como grupo controle, três animais foram inoculados com salina. Após 6 horas, os animais foram eutanasiados. **[A]** O tamanho das lesões hemorrágicas foi mensurado. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão. **[B]**, **[C]** e **[D]**. Após fixação das amostras de pele em formalina, lâminas histológicas foram confeccionadas e coradas com hematoxilina-eosina. As fotos (ampliação $\times 20$) mostram cortes transversais representativos dos grupos inoculados com salina **[B]**, 2,5 µg **[C]** ou 5 µg **[D]** de veneno de *B. lanceolatus*. Região muscular da derme (estrela), hemorragia (seta vermelha) e infiltrado inflamatório (seta preta).

4.2 Análise da toxicidade do veneno para células humanas

4.2.1 Queratinócitos

A Figura 12.A mostra que a incubação dos queratinócitos humanos, da linhagem HaCaT, com concentrações do veneno de *B. lanceolatus* de 2,75 µg/mL ou maiores que esta durante 24 horas, induziram perda de aproximadamente 96% da viabilidade celular. No mesmo período, concentrações do veneno entre 0 e 1,75 µg/ml induziram uma redução na viabilidade celular inferior a 10%. A CI50 calculada foi de 2,519 µg/mL (IC95%: 2,330 - 2,709 µg/mL; Figura 12.B). Após 48 horas e 72 horas de incubação com o veneno, concentrações iguais ou superiores a 2 µg/mL induziram a perda de 96% da viabilidade celular, com CI50 de 1,750 µg/mL (IC95%: 1,602 - 1,898 µg/mL) e 1,500 µg/mL (IC95%: 0,9379 - 2,061 µg/mL), respectivamente. Em 24 horas de incubação, o veneno de *B. jararaca* foi menos tóxico para os queratinócitos do que o veneno de *B. lanceolatus*, com uma CI50 de 2,935 µg/mL (IC95%: 1,727 - 4,144 µg/mL).

Para avaliar a inibição da atividade citotóxica dos dois venenos pelo soro antibotrópico, amostras foram previamente incubadas com soro. A Figura 13 mostra a inibição total da citotoxicidade do veneno de *B. lanceolatus* pelo soro antibotrópico, com viabilidade não significativamente diferente dos controles tratados apenas com meio. A inibição da citotoxicidade do veneno de *B. jararaca* pelo soro antibotrópico foi significativa, próxima de 84%. O controle negativo, o soro antitubulínico, não inibiu a atividade tóxica dos venenos para as células HaCaT.

Para avaliar a modulação na produção de citocinas e quimiocinas pelas células expostas ao veneno, foram escolhidas concentrações de veneno afetando parcialmente a viabilidade celular. A concentração das proteínas foi expressa em pg/5 x 10⁴ células, usando uma estimativa do número de células viáveis, calculada a partir da viabilidade medida pelo ensaio de MTT. Das citocinas e quimiocinas avaliadas nos sobrenadantes das células, expostas aos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca*, somente três proteínas foram detectadas: IL-8, MCP-1 e RANTES (Figura 14). Os níveis de IL-8, MCP-1 e RANTES nos controles ficaram constantes ao longo do tempo. O veneno de *B. jararaca* induziu uma diminuição na produção das quimiocinas após 24 horas de exposição, enquanto neste mesmo período, o veneno de *B. lanceolatus* induziu um aumento não significativo na produção das três proteínas. Após 48 horas de incubação, a concentração de IL-8, MCP-1 e RANTES no sobrenadante das células aumentou significativamente em presença do veneno de *B. lanceolatus*. Após 48 e 72 horas de exposição, a concentração das três proteínas foi

significativamente mais alta no sobrenadante das células expostas ao veneno, quando comparada à concentração no sobrenadante das células expostas ao meio no mesmo período. Houve uma diminuição significativa na concentração das quimiocinas nos sobrenadantes das células expostas ao veneno durante 72 horas, quando comparada à concentração observada após 48 horas de incubação. IP-10, MIG, IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-17a, IFN- γ , IL-4 e, IL-2 não foram detectadas nos sobrenadantes dos queratinócitos.

Figura 12 - Viabilidade de células HaCaT expostas ao veneno de *B. lanceolatus* durante 24, 48 e 72 horas

A

B

Células HaCaT foram tratadas com os venenos. Como controle, foram analisadas células tratadas apenas com meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas dos tratamentos, pelo método de MTT, e expressa em porcentagem. [A] Experimento representativo de três, realizados em triplicatas; os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. [B] A concentração capaz de induzir 50% de perda de viabilidade das células (CI50) foi determinada a partir da regressão não linear de cada curva. Os resultados representam a média de três ensaios realizados em triplicatas (média $\pm$ desvio padrão). Eles foram analisados por One Way Anova e teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). *: significativamente diferente dos valores calculados para as curvas dos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca* após 24 horas de incubação; N. S.: valores não significativamente diferentes entre si.

Figura 13 - Inibição da citotoxicidade do veneno de *B. lanceolatus* pelo soro antibotrópico

Células HaCaT (5×10^4 /poço) foram tratadas com 4 µg/mL de veneno incubado com soro antibotrópico, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como controle positivo foi usado o veneno de *B. jararaca* e como controles negativos foram usados soro antibotulínico e meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas, pelo método de MTT, e expressa em porcentagem. Os resultados representam a média de dois ensaios, realizados em triplicatas. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Eles foram analisados por Two-Way Anova e teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). *: significativamente diferente do controle correspondente, tratado apenas com soro ou meio. #: significativamente diferente das amostras tratadas com o mesmo veneno, incubado apenas com meio. N. S.: valores não significativamente diferentes entre si.

Figura 14 - Quimiocinas produzidas por células HaCaT expostas ao veneno de *B. lanceolatus* durante 24, 48 e 72 horas

Células HaCaT (5×10^4 /poço) foram tratadas com $2 \mu\text{g/mL}$ dos venenos de *Bothrops*. Os sobrenadantes foram coletados após 24, 48, e 72 horas. Citocinas e quimiocinas foram detectadas nos sobrenadantes usando-se os kits Cytometric Bead Array (BD, NJ, EUA), e a viabilidade celular foi medida pelo método do MTT. Os resultados representam um ensaio representativo de dois, realizado em triplicatas. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Eles foram analisados por teste Two Way ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). *: diferença significativa quando comparado com o controle tratado com DMEM durante o mesmo tempo de exposição. #: amostras significativamente diferentes entre si.

4.2.2 Células endoteliais

Os venenos de *Bothrops* apresentaram diferenças significativas de toxicidade para as células da linhagem EAhy926 (Figura 15). Concentrações de veneno de *B. jararaca* maiores ou iguais a 4 µg/mL induziram uma redução na viabilidade de, aproximadamente, 90% em 24 horas de exposição, enquanto no mesmo período, perdas de viabilidade comparáveis foram promovidas pelo veneno de *B. lanceolatus* somente com 125 µg/mL. As CI50 calculadas, as 24 horas, foram de 0,834 µg/mL (IC95%: 0,568 - 1,099 µg/mL) e 51,76 µg/mL (IC95%: 0 - 107,2 µg/mL), para os venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca*, respectivamente. Após 48 horas de incubação com o veneno de *B. lanceolatus*, a CI50 foi de 42,44 µg/mL (IC95%: 0 - 97,52 µg/mL) e após 72 horas foi de 17,63 µg/mL (IC95%: 0 - 51,24 µg/mL).

Não foi possível inibir a citotoxicidade do veneno de *B. lanceolatus*, assim como a do veneno controle, *B. jararaca*, pré-incubando-os com o soro antibotrópico comercial com concentração até 4 vezes maiores das que inibiam a citotoxicidade em queratinócitos.

Nos sobrenadantes das células endoteliais, expostas aos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca*, quatro proteínas foram detectadas: IL-8, IL-6, MCP-1 e RANTES (Figura 16). Para minimizar as variações devidas à perda de viabilidade, os resultados foram normalizados pelo número de células, usando a medida de viabilidade celular. Os níveis das quatro proteínas nos controles aumentaram, significativamente ou não, ao longo do tempo. Após 48 horas de exposição ao veneno de *B. lanceolatus*, a concentração de IL-6, IL-8 e RANTES no sobrenadante das células aumentou. Enquanto a produção das quatro proteínas aumentou significativamente nos sobrenadantes das células expostas ao veneno durante 72 horas, quando comparada aos controles (Figura 16). O aumento na produção de IL-8 foi observado a partir de 24 horas de exposição ao veneno, enquanto o efeito sobre IL-6 e RANTES foi observado a partir de 48 horas de exposição. O nível de MCP-1 aumentou somente depois de 72 horas de exposição. IP-10, MIG, IL-12p70, TNF, IL-10, IL-1β, IL-17a, IFN-γ, IL-4 e, IL-2 não foram detectadas nos sobrenadantes das células endoteliais.

Para investigar a ativação das células endoteliais pelo veneno de *B. lanceolatus*, foi também analisada a modulação de moléculas de adesão e do fator tecidual em células expostas ao veneno durante 2 horas (10⁶ células/mL e 100 µg/mL de veneno). O TNF-α, usado como controle positivo da ativação das células, induziu um aumento significativo da expressão de ICAM-1 (ou CD54), mas não afetou significativamente a expressão de P-selectina (CD62P) e fator tecidual (CD142; Figura 17). Houve um aumento na detecção de ICAM-1 e uma diminuição de P-selectina na superfície das células expostas ao veneno; porém estas mudanças não foram significativas. A expressão de fator tecidual não foi afetada pela

exposição ao veneno. E-selectina (CD62E) e VCAM-1 (ou CD106) não foram detectadas nesta linhagem celular (dados não mostrados), fato já descrito por Lidington et al. (1997).

Figura 15 - Viabilidade de células EAhy926 expostas ao veneno de *B. lanceolatus* durante 24, 48 e 72 horas

A

B

Células EAhy926 (10^4 /poço) foram tratadas com veneno. Como controle, foram analisadas células tratadas apenas com meio de cultura. A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas dos tratamentos, pelo método de MTT, e expressa em porcentagem. **[A]** Experimento representativo de três, realizados em triplicatas; os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. **[B]** A concentração capaz de induzir 50% de perda de viabilidade das células (CI50) foi determinada a partir da regressão não linear de cada curva. Os resultados representam a média de três ensaios realizados em triplicatas. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão; eles foram analisados por teste One Way ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$).*: significativamente diferente dos valores calculados para as curvas do veneno de *B. jararaca* após 24 horas de incubação.

Figura 16 - Citocinas e quimiocinas produzidas por células EAhy926 expostas ao veneno de *B. lanceolatus* durante 24, 48 e 72 horas

Células EAhy926 foram tratadas com 50 µg/mL de veneno de *B.lanceolatus* e 1 µg/mL de veneno de *B. jararaca*. Os sobrenadantes foram coletados após 24, 48, e 72 horas. Citocinas e quimiocinas foram detectadas nos sobrenadantes usando-se os kits Cytometric Bead Array (BD, NJ, EUA) e a viabilidade celular avaliada pelo método do MTT. Os resultados representam um ensaio representativo de dois, realizado em triplicatas. Os dados estão representados como média ± desvio padrão. Eles foram analisados por teste Two Way ANOVA e teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,005$). *: amostras significativamente diferentes do controle tratado com meio durante o mesmo período. #: amostras significativamente diferentes entre si.

Figura 17 - Modulação de moléculas de adesão e de fator tissular na membrana de células endoteliais incubadas com veneno

Células Eahy926 (10^6 células/mL) foram tratadas com veneno de *B. lanceolatus* (100 μ g/mL) ou TNF- α (20 ng/mL) durante 2 horas. Após marcação e fixação, a fluorescência das células foi medida por citometria de fluxo. Os resultados representam um ensaio representativo de dois, realizado em triplicatas. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Eles foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). *: significativamente diferente das amostras controle tratadas com salina. #: amostras significativamente diferentes entre si.

4.2.3 Clivagem de citocinas e quimiocinas

Para avaliar a atividade proteolítica do veneno de *B. lanceolatus* sobre citocinas e quimiocinas, foram usados imunoenaios baseados em esferas (“Cytometric Bead Array”, BD). Foram testadas as citocinas IL-12 (IL-12p70), TNF, IL-10, IL-6, IL-8, IL-1 β , assim como as quimiocinas: MIG, IP-10, MCP-1, e RANTES. O veneno apresentou atividade proteolítica significativa somente sobre MIG e IL-12, atingindo 100% e 59,1% de clivagem, respectivamente (Figura 18). Não foi observada clivagem de nenhuma das outras citocinas e quimiocinas analisadas (dados não mostrados). Para caracterizar esta atividade proteolítica, inibidores específicos foram usados. A clivagem de MIG não foi inibida pelo uso de PMSF, mas foi significativamente inibida pela 1,10-fenantrolina, e parcialmente inibida pelo EDTA. A clivagem de IL-12 foi mais fortemente inibida pelos inibidores de metaloproteases, principalmente o EDTA, do que pelo inibidor de serinoproteases, o PMSF. Estes resultados mostram que a quimiocina MIG é clivada exclusivamente por metaloproteases, enquanto a IL-12 é clivada, principalmente, por metaloproteases, mas também por serinoproteases.

Figura 18 - Inibição da clivagem de MIG e IL-12 pelo veneno de *B. lanceolatus*

Citocinas e quimiocinas foram incubadas com veneno de *B. lanceolatus* (50 μ g/mL) durante 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C, em presença ou ausência de inibidores de proteases (10 mM). Os resultados representam a média de dois ensaios, realizados em duplicatas (média $\pm$ desvio padrão). Eles foram analisados por One Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). #: amostras significativamente diferentes entre si.

4.3 Ação do veneno de *B. lanceolatus* sobre o sistema complemento

4.3.1 Ativação direta da cascata do complemento

Como determinado em ensaios hemolíticos, o veneno de *B. lanceolatus* foi capaz de reduzir a atividade lítica do soro tratado, como avaliado nas condições de ensaio para as vias clássica e alternativa da cascata do complemento (Figura 19). A via clássica foi afetada com CI50 de 156,6 µg/mL (IC95%: 147,3 - 166,6 µg/mL) e a alternativa com CI50 de 294,5 µg/mL (IC95%: 273,2 - 317,4 µg/mL) (Tabela 3). A ativação ou inibição da via das lectinas foi analisada por ELISA, via ligação de C4, que foi inibida com CI50 de 396,3 µg/mL (IC95: 375,7 - 418,0 µg/mL).

Com o objetivo de determinar se a redução da atividade lítica do soro e da ligação do C4 era devida a inibição ou ativação da cascata do complemento pelo veneno, foi avaliada a presença de anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento (TCC) em amostras de soro tratadas com veneno. A Figura 20 mostra que o veneno de *B. lanceolatus* induz uma significativa produção das anafilatoxinas C4a e C5a, assim como do complexo terminal do complemento, confirmando a ativação do sistema pelo veneno. A concentração de C3a presente no soro tratado com o veneno foi significativamente inferior a do controle. Todas estas atividades foram inibidas por 1,10-fenantrolina (5 mM), sugerindo a ação de metaloproteases na ativação da cascata do complemento e na clivagem de C3a pelo veneno de *B. lanceolatus*.

Para investigar a existência de uma ação proteolítica direta do veneno de *B. lanceolatus* sobre os componentes do complemento, amostras dos componentes purificados C3, C4 e C5 foram incubadas com veneno, na presença ou ausência de inibidores. A clivagem dos mesmos foi visualizada por coloração por prata, após separação eletroforética em SDS-PAGE em condições redutoras. Como mostrado nas Figura 21 e Figura 22.A, o veneno induziu a clivagem total ou parcial das cadeias α dos três componentes, gerando fragmentos de menor peso molecular. As clivagens foram parcialmente inibidas pelo EDTA e a 1,10-fenantrolina, inibidores de metaloproteases, e também pelo PMSF, inibidor de serinoproteases. Como o veneno possui componentes com massa molecular similar à da cadeia γ do C4, não foi possível concluir ainda sobre a clivagem desta.

Para investigar se a clivagem do componente C5 pelo veneno gerava um fragmento C5a funcional, foi testada a ativação de neutrófilos pelo C5a, via medida do influxo de cálcio por fluorescência. Neutrófilos previamente marcados com o fluóforo Fluo4-AM foram

expostos a amostras de C5 incubadas com o veneno de *B. lanceolatus*. Como controles positivo e negativo foram usadas amostras de C5a purificado; veneno ou C5 purificado incubado somente com salina, respectivamente. O gráfico da fluorescência em função do tempo (Figura 22.B) mostra que o C5 incubado com veneno induziu um influxo de cálcio nos neutrófilos, comparável ao induzido por 2,4 ng de C5a purificado.

Figura 19 - Ativação das três vias do complemento pelo veneno de *B. lanceolatus*

Amostras de SHN foram incubadas com veneno de *B. lanceolatus*. Como controle positivo foi usado SHN incubado apenas com tampão. Em seguida, as amostras foram incubadas com eritrócitos de carneiro sensibilizados com anticorpos de coelho para testar a ativação da via clássica do complemento [A]; ou alternativamente, com eritrócitos de coelho para os ensaios da via alternativa [B]. No ensaio da via das lectinas, as amostras de soro foram incubadas em placa sensibilizada com manose, para avaliação da deposição do C4 [C]. Os resultados representam a média de duplicatas de um ensaio, representativo de três. A partir dessas curvas foi calculada a CI50 do veneno para cada uma das três vias (Tabela 3).

Tabela 3 - Ativação das três vias do complemento pelo veneno de *B. lanceolatus*

Via de ativação	CI50 (µg/mL)	IC95 (µg/mL)
Clássica	156,6	147,3 - 166,6
Alternativa	294,5	273,2 - 317,4
Lectina	396,3	375,7 - 418,0

Nota: Abreviaturas

CI50: concentração de veneno capaz de inibir 50% da atividade lítica do SNH ou da ligação de C4

IC95: intervalo de confiança 95%

Figura 20 - Indução da produção de anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento (TCC) em soro humano tratado com o veneno de *B. lanceolatus*

A

B

Amostras de SHN foram incubadas com veneno de *B. lanceolatus* (0,5 mg/mL) durante 30 minutos a 37 °C, na presença ou ausência de 1,10-fenantrolina (10 mM). **[A]** Após diluição da amostra (1:5.000), a produção de anafilatoxinas C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg e C5a/C5a-desArg foi medida por “Cytometric Bead Array”. Os gráficos representam a média de dois ensaios, realizados em duplicatas (média $\pm$ erro padrão). **[B]** Após diluição do soro humano (1:150), a formação do complexo terminal do complemento SC5b-9 foi medida por ELISA, usando o kit “MicroVue™ SC5b-9 Plus EIA Kit”. O gráfico representa a média $\pm$ desvio padrão de duplicatas de um ensaio representativo de dois. **[A]** e **[B]** Os dados foram analisados por One Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). *: diferença significativa com o controle SHN. #: diferença significativa com o SHN tratado com *B. lanceolatus*.

Figura 21 - Clivagem dos componentes purificados do complemento pelo veneno de *B. lanceolatus*

Amostras (2 µg) dos componentes do complemento foram incubadas com 2 µg de veneno de *B. lanceolatus* durante 30 minutos a 37 °C, na presença ou ausência dos inibidores EDTA, PMSF ou 1,10-fenantrolina (Fen) na concentração final de 20 mM. A clivagem foi visualizada por separação eletroforética (SDS-PAGE com 10% de acrilamida) em condições redutoras, seguida de coloração por prata.

Figura 22 - Clivagem do componente C5 pelo veneno de *B. lanceolatus* e ativação de neutrófilos pelo C5a gerado

[A] Amostras (2 μ g) de C5 purificado foram incubadas com 2 μ g de veneno de *B. lanceolatus* durante 30 minutos a 37 °C, na presença ou ausência dos inibidores EDTA, PMSF ou 1,10-fenantrolina (Fen) na concentração final de 20 mM. A clivagem foi visualizada por separação eletroforética (SDS-PAGE com 10% de acrilamida) em condições redutoras, seguida de coloração por prata. [B] A atividade dos fragmentos de C5 gerados por ação do veneno de *B. lanceolatus* foi medida pelo influxo de cálcio em neutrófilos, marcados com o indicador de cálcio intracelular Fluo-4 (10^6 células/poço). Como controle positivo foi usado C5a purificado (2,4 ng/poço), e como controles negativos, C5 ou veneno, incubados com salina. As células foram estimuladas após 60 segundos (seta).

4.3.2 Expressão dos receptores das anafilatoxinas em células endoteliais

Mostrou-se que o veneno ativa fortemente a cascata do complemento, induzindo a liberação da anafilatoxina C5a ativa, e por outro lado, cliva o C3a. Sabendo que células endoteliais expressam os receptores das anafilatoxinas C3a (C3aR) e C5a (C5aR), a expressão destes foi avaliada em células endoteliais EAhy926 incubadas com veneno. Após 2 horas de exposição ao veneno, a expressão do receptor C3aR aumentou não significativamente; enquanto a expressão de C5aR não foi afetada. Nestas células, o TNF- α induziu um aumento não significativo da expressão dos dois receptores (Figura 23).

Figura 23 - Expressão dos receptores das anafilatoxinas C3a e C5a na membrana de células endoteliais incubadas com veneno

Células EAhy926 (10^6 células/mL) foram tratadas com veneno de *B. lanceolatus* (100 μ g/mL) ou TNF- α (20 ng/mL) durante 2 horas. Após marcação e fixação, a fluorescência das células foi medida por citometria de fluxo. Os resultados representam um ensaio representativo de dois, realizados em triplicatas (média $\pm$ desvio padrão). Nenhuma diferença foi achada significativa ($\alpha < 0,05$).

4.3.3 *Análise dos reguladores solúveis e da expressão dos reguladores de membrana do sistema complemento*

Além da clivagem dos componentes do complemento, envolvidos nas três vias de ativação da cascata, foi ainda revelado que o veneno tem atividade proteolítica sobre o regulador das vias clássica e das lectinas, o C1-INH (Figura 24). Nas condições do ensaio, o C1-INH, cuja massa molecular é de 104 kDa, foi completamente convertido em fragmentos de peso molecular entre 82 e 100 kDa pela ação do veneno. Esta atividade foi totalmente inibida por EDTA e 1,10-fenantrolina, enquanto o PMSF causou redução parcial da proteólise (Figura 24.A). A proteína clivada foi ainda reconhecida por anticorpos específicos no ensaio de *Western Blot* (Figura 24.B). No ensaio de ELISA funcional, que testa a inibição da via clássica, o C1-INH clivado conservou somente 61% da atividade inibitória, sendo que esta redução de atividade foi estatisticamente significativa (Figura 24.C).

O sistema complemento compreende também moléculas de regulação na membrana das células. Em células endoteliais da linhagem EAhy926, expostas ao veneno como descrito no item 3.9.11, foram analisadas a expressão de CD46 (MCP: “membrane cofactor protein”), CD55 (DAF: “decay-accelerating factor”), e CD59. O TNF- α induziu um aumento significativo na expressão de CD59 pelas células endoteliais, mas não afetou a expressão de MCP e DAF. Observou-se um aumento significativo na expressão de CD59 na superfície das células endoteliais expostas ao veneno, assim como na expressão de MCP (Figura 25). O nível de expressão de DAF na superfície das células não foi afetado pela incubação com o veneno de *B. lanceolatus*.

Para investigar se as variações de detecção das proteínas MCP e CD59, na superfície das células, eram devidas a ação das metaloproteases do veneno, o ensaio foi repetido incubando o veneno com EDTA (Figura 26). Nas condições do ensaio, o EDTA não foi tóxico para as células endoteliais (dados não mostrados). Ele não induziu mudança significativa no nível de expressão de CD59 na superfície das células, mas diminuiu significativamente a expressão de MCP. O EDTA aboliu o aumento de expressão de MCP causada pelo veneno. Em células tratadas com veneno pré-incubado com EDTA, a expressão de CD59 diminuiu significativamente quando comparada ao controle, e também, em relação ao veneno não tratado.

Figura 24 - Clivagem do C1-INH pelo veneno de *B. lanceolatus* e sua atividade residual

Amostras de C1-INH purificado foram incubadas com veneno de *B. lanceolatus* durante 30 minutos a 37 °C. A clivagem foi visualizada por separação eletroforética (SDS-PAGE com 10% de acrilamida) em condições redutoras, seguida de coração por prata [A] ou de Western Blot [B]. A atividade inibidora do C1-INH, clivado pelo veneno foi avaliada no ensaio de ELISA funcional [C]. Os dados representam a média de dois ensaios ($\pm$ desvio padrão), realizados em triplicatas, que foram analisados pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Figura 25 - Modulação da expressão das proteínas reguladoras do complemento na membrana de células endoteliais incubadas com veneno

Células EAhy926 (10^6 células/mL) foram tratadas com veneno de *B. lanceolatus* (100 μ g/mL) ou TNF- α (20 ng/mL) durante 2 horas. Após marcação e fixação, a fluorescência das células foi medida por citometria de fluxo. Os resultados representam um ensaio representativo de dois, realizado em triplicatas. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Eles foram analisados por One Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). *: significativamente diferente das amostras controle tratadas com salina. #: amostras significativamente diferentes entre si.

Figura 26 - Modulação da expressão de CD59 e MCP na membrana de células endoteliais incubadas com veneno, em presença ou ausência de inibidores

Células EAhy926 (10^6 células/mL) foram tratadas durante 2 horas com veneno de *B. lanceolatus* (100 µg/mL), pré-incubado ou não, com EDTA (50 mM). Após marcação e fixação, a fluorescência das células foi medida por citometria de fluxo. Os resultados representam um ensaio realizado em quadruplicatas (média $\pm$ desvio padrão). Eles foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni ($\alpha < 0,05$). *: significativamente diferente das amostras controle tratadas com salina. #: amostras significativamente diferentes entre si.

4.4 Purificação de uma protease atuando sobre o sistema complemento: resultados preliminares

A Figura 27 mostra que a separação do veneno por cromatografia de exclusão molecular resultou na obtenção de 8 frações. Após dosagem proteica, todas as frações foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel contendo 12% de acrilamida, e suas atividades proteolíticas testadas sobre peptídeos FRET. As frações 2 e 4 apresentaram as atividades mais altas sobre os substratos peptídicos Abz-RPPGFSPFRQ e Abz-FRSSRQ, respectivamente, e as atividades de ambas frações foram inibidas por 5 mM de PMSF ou de 1,10-fenantrolina (Tabela 4). A análise eletroforética mostrou que a fração 2 apresentava componentes com Mr superiores a 26 kDa, enquanto a fração 4 continha principalmente um componente de aproximadamente 30 kDa (Figura 28). A Figura 29 mostra que estas duas frações também apresentaram atividade proteolítica sobre a cadeia α dos componentes do complemento purificados C3, C4, C5 e de C1-INH. Como o veneno e as frações possuem componentes de massa molecular similar à da cadeia γ do C4, não foi possível concluir sobre a clivagem desta.

Figura 27 - Perfil cromatográfico do veneno de *B. lanceolatus*

1 mg de veneno em tampão bicarbonato foi fracionado em uma coluna Superose 12HR 10/30. A separação foi monitorada por medida de absorbância em comprimento de ondas de 280 nm. As frações delimitadas no gráfico foram coletadas de acordo com as variações do valor da absorbância. As setas apontam as frações 2 e 4 que tiveram as atividades proteolíticas mais altas sobre os substratos peptídicos Abz-RPPGFSPFRQ e Abz-FRSSRQ, respectivamente.

Tabela 4 - Atividade proteolítica das frações do veneno de *B. lanceolatus*

Fração (n°)	Atividade (UF/min/μg; média ± desvio padrão)		Inibição da clivagem (%)			
	Abz-RPPGFSPFRQ	Abz-FRSSRQ	Abz-RPPGFSPFRQ		Abz-FRSSRQ	
			PMSF	Fen	PMSF	Fen
1	N. D.	1,44 ± 1,92				
2	29,41 ± 3,87	8,24 ± 10,99	19	100	N. T.	N. T.
3	N. D.	75,71 ± 80,90				
4	5,82 ± 0,40	119,26 ± 70,91	100	100	100	7
5	N. D.	N. D.				
6	24,46 ± 32,62	N. D.				
7	N. D.	N. D.				
8	N. D.	2,30 ± 3,07				

Nota: Abreviaturas:

N.D. : não detectável

Abz-RPPGFSPFRQ: peptídeo Abz-RPPGFSPFRQ-EDDnp

Abz-FRSSRQ: peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp

Fen: 1,10-fenantrolina

N. T.: não testado

Figura 28 - Perfil eletroforético das frações do veneno de *B. lanceolatus*

Separação eletroforética de 5 μg do veneno total e das duas frações em gel de poliacrilamida (12%), em condições não denaturantes, seguido de coração por prata.

Figura 29 - Clivagem dos componentes do complemento pelas frações 2 e 4 do veneno

Amostras (2 μ g) dos componentes do complemento foram incubadas com 2 μ g de veneno de *B. lanceolatus* ou das frações durante 30 minutos a 37 °C. A clivagem foi visualizada por separação eletroforética (SDS-PAGE com 10% de acrilamida) em condições redutoras, seguida de coloração por prata. Como controles foram também incubadas amostras de 2 μ g de veneno ou das frações, sem os componentes do complemento.

5 DISCUSSÃO

A serpente *Bothrops lanceolatus* ou “Fer-de-Lance” foi escolhida para estabelecer o modelo de envenenamento botrópico, a fim de estudar a ação deste veneno sobre o sistema complemento e a modulação das reações tóxicas pelo uso de inibidores. Tal espécie é endêmica e confinada a ilha francesa da Martinica, onde é responsável por 20-30 acidentes por ano (RÉSIÈRES et al, 2010). O veneno desta serpente induz sintomas locais e sistêmicos comparáveis aos induzidos por outras serpentes do gênero, mas difere por causar um perfil clínico protrombótico, raramente necrótico e hemorrágico (MALBRANQUE et al., 2008; THOMAS et al., 2006). Localmente, o envenenamento é caracterizado por importante quadro de inflamação, envolvendo edema, dor e hemorragia nas áreas da picada. A gravidade do envenenamento depende do desenvolvimento de trombose sistêmica causando infarto cerebral, pulmonar ou do miocárdio. O soro específico produzido pela Sanofi-Pasteur (Bothrofav®, Sanofi-Pasteur, França) é o único tratamento eficiente para prevenir a trombose de grandes vasos em pacientes picados.

A análise proteômica do veneno da *B. lanceolatus* mostrou que a sua composição é semelhante a das serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo a presença de metaloproteinases, serinoproteases, fosfolipases A₂ acídicas, oxidases l-amino acídicas e uma molécula semelhante à lectina do tipo C (TERRA et al., 2008). Já foram purificadas deste veneno uma metaloproteinase hemorrágica, BlaH1 (STROKA et al, 2005), uma enzima esterolítica e fibrinogenolítica (LÔBO DE ARAÚJO; DONATO; BON, 1998) e uma fosfolipase A₂ (LÔBO DE ARAÚJO; RADVANYI; BON, 1994). Os ensaios aqui apresentados comprovam que o veneno apresenta as atividades fosfolipásica, gelatinolítica e fibrinogenolítica. A clivagem do fibrinogênio purificado foi inibida por PMSF e fenantrolina, mostrando que metaloproteinases e serinoproteases atuam sobre o fibrinogênio. Além disso, a análise por eletroforese bidimensional do veneno revelou um perfil semelhante aos perfis de outros venenos de *Bothrops* (PAES LEME et al, 2009). O veneno apresenta uma proteína de alta massa molecular (~70 kDa) com pI de 5, na faixa onde foram identificadas metaloproteinases de tipo III. Também foram detectadas várias proteínas com massa molecular menor (~30 kDa) e com pI entre 6,5 e 7, características semelhantes às das serinoproteases de veneno de *Bothrops*. Abaixo de 20 kDa, foram reveladas proteínas básicas identificadas como fosfolipases básicas em outros venenos, e também proteínas ácidas descritas como fosfolipases ácidas e lectinas do tipo C (PAES LEME et al, 2009). A glicosilação das toxinas é uma modificação pós-translacional que aumenta a complexidade dos venenos de serpentes,

especialmente do veneno de *B. jararaca* (ZELANIS et al., 2010; ZELANIS; SERRANO; REINHOLD, 2012). Os ensaios de *Western Blot* usando lectinas revelaram que várias proteínas do veneno de *B. lanceolatus* apresentam também esta característica.

O ácido hialurônico é um polissacarídeo de alto peso molecular, componente essencial das matrizes extracelulares dos tecidos intersticiais moles, e que está envolvido nos processos de embriogênese, migração celular, cicatrização de feridas, transformação maligna e manutenção dos tecidos. A degradação do ácido hialurônico, mediada por hialuronidase, aumenta a permeabilidade dos tecidos intersticiais e diminui a viscosidade dos fluidos extracelulares (GIRISH; KEMPARAJU, 2007). Tal enzima atua como potencializadora da atividade de outros componentes presentes nos venenos por aumentar a difusão das toxinas, promover também o contato direto entre membranas celulares e toxinas e, além disso, afetar a transmissão do sinal das citocinas e fatores de crescimento que dependem da matriz extracelular. Como as dezenove espécies de *Bothrops* da América do Sul, estudadas por Pidde-Queiroz et al. (2008), o veneno da *B. lanceolatus* apresenta atividade hialuronidásica, só que bem mais baixa, quando comparada com o veneno da *Bothrops jararaca*. Este fato pode, talvez, explicar porque os danos teciduais locais, principalmente hemorragia e necrose, são menores no caso de envenenamento por *B. lanceolatus* quando comparados aos causados por outras espécies do gênero *Bothrops*. A diminuição da atividade hialuronidásica foi provavelmente acompanhada, ao longo da evolução, por um aumento de outras atividades tóxicas, a fim de manter o potencial tóxico do veneno e a sobrevivência da espécie.

Os venenos de *Bothrops* afetam a difusão dos mediadores inflamatórios, por degradar componentes da matriz extracelular, como o ácido hialurônico e o colágeno, mas eles podem também ter ação hidrolítica sobre estes mediadores. Já foi descrito que a jararagina, metaloproteínase de classe III do veneno de *B. jararaca*, cliva as citocinas recombinantes: IL-6, TNF- α e IL-1 β (CLISSA et al., 2001). Para investigar se o veneno de *B. lanceolatus* possuía também tal atividade, este foi incubado com citocinas e quimiocinas, em presença ou ausência dos inibidores de proteases. Os resultados mostraram que o veneno possui uma atividade proteolítica sobre MIG (ou CXCL-9) e IL-12. A clivagem de MIG foi devida a ação de metaloproteinases, enquanto a clivagem da IL-12 foi devida a metaloproteinases e serinoproteinases. Não houve clivagem de TNF, IL-10, IL-6, IL-8, IL-1 β , IP-10, MCP-1 e RANTES. MIG ou CXCL-9 é um agente quimiotático específico para linfócitos T, cujas funções são redundantes com outras quimiocinas, como CXCL-10 e CXCL-11 (TENSEN et al., 1999). A IL-12 induz a diferenciação dos linfócitos no subtipo T_H1, a maturação dos linfócitos citotóxicos e a produção de INF- γ por estas populações. A degradação destas

proteínas pelo veneno pode prejudicar a resposta immune adaptativa, envolvida na produção do anticorpos específicos, mas provavelmente tem pouco impacto na patologia aguda dos envenenamentos.

As atividades biológicas do veneno foram estudadas em camundongos Swiss. A DL50 e as atividades edematogênica e hemorrágica foram comparáveis aos dados já publicados (BOGARIN et al, 1999; GUIMARÃES et al, 2004; LÔBO DE ARAÚJO et al, 1998; 2000). O valor do potencial letal do veneno de *B. lanceolatus*, 8,42 mg/kg (IC95%: 6,24 - 11,02 mg/kg), é também próximo aos dos determinados para venenos botrópicos da América do Sul estudados por Pidde-Queiroz et al. (2008), variando entre 1 e 11 mg/kg. O edema causado pelo veneno, na pata de camundongos Swiss, apresentou um pico dose-dependente 30 minutos após a injeção e foi acompanhado por hemorragia local. Ele foi resolvido em 24 horas, enquanto os demais sintomas (hemorragia local) desapareceram em até 48 horas após a inoculação. No modelo experimental, aqui utilizado, o veneno de *B. lanceolatus* apresentou uma atividade hemorrágica significativa, compatível com os efeitos já observados em roedores (STROKA et al., 2005).

O soro específico e o soro polivalente para Crotalinae (Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica) parecem neutralizar as atividades letal, hemorrágica, edematogênica, miotóxica e hemolítica do veneno de *B. lanceolatus* (BOGARIN et al., 1999; GUTIÉRREZ et al., 2008). O soro antibotrópico, produzido pelo Instituto Butantan, reage cruzadamente com o veneno de *B. lanceolatus* assim como com a hemorragina BlaH1, e seu potencial neutralizante foi comprovado somente sobre a atividade hemorrágica do veneno e da hemorragina BlaH1 (STROKA et al., 2005). Neste estudo, confirmamos que o soro antibotrópico, produzido contra serpentes brasileiras, reagiu cruzadamente com o veneno de *B. lanceolatus*, como observado nos ensaios de *Western blot* e ELISA, o que sugere que os componentes do veneno da *B. lanceolatus* apresentam semelhanças antigênicas com os das espécies de *Bothrops* da América do Sul. No ensaio de ELISA o título do soro atingiu 1:320.000, sendo este valor comparável aos títulos mais altos observados por Pidde-Queiroz et al. (2008), estudando os venenos de 19 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* presentes no Brasil. Nas condições dos ensaios, concentrações altas de soro não inibiram a citotoxicidade dos venenos de *B. jararaca* e *B. lanceolatus* sobre células endoteliais. No entanto, a inibição total das atividades fosfolipásica, hialuronidásica e citotóxica para queratinócitos, assim como a inibição parcial das atividades proteolíticas do veneno de *B. lanceolatus* sobre peptídeos FRET, comprova a capacidade do soro em neutralizar vários componentes do veneno. Este alto potencial de neutralização poderia ser futuramente testado *in vivo* no modelo murino já

estabelecido. No entanto, foi mostrado por Kuniyoshi et al. (2012) que o substrato Abz-RPPGFSPFRQ é preferencialmente clivado por serinoproteases nos venenos das cinco serpentes do gênero *Bothrops*, usados na produção do soro antibotrópico. No caso do veneno de *B. lanceolatus*, a inibição da clivagem do peptídeo Abz-RPPGFSPFRQ foi mais forte usando EDTA e 1,10-fenantrolina, mostrando a ação majoritária de metaloproteases na reação e, consequentemente, a diferente especificidade das proteases do veneno de *B. lanceolatus* comparado com cinco outros venenos do gênero *Bothrops*.

Alguns estudos relataram a ação tóxica, sobre diversos tipos celulares, de venenos de algumas espécies de *Bothrops* da América do Sul, como a *B. jararaca*, *B. atrox* e *B. alternatus*, e também de metaloproteases purificadas a partir destes venenos (BRENES et al., 2010; LOPES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2002), mas nada se sabe sobre o potencial tóxico celular do veneno de *B. lanceolatus* e suas toxinas. Os envenenamentos por *B. lanceolatus* são caracterizados por um quadro de inflamação local envolvendo edema e dor, que difere dos envenenamentos botrópicos pela ausência de hemorragia e de necrose local. Elaboramos a hipótese que o veneno seria menos citotóxico para os tipos celulares envolvidos nos processos de necrose e hemorragia, como os queratinócitos e as células vasculares endoteliais, mas causaria a ativação destas e o início de um processo inflamatório. Para a realização de tal análise, foram escolhidas a linhagem de queratinócitos humanos HaCaT e a linhagem de células endoteliais vasculares EAhy926, tendo em vista a avaliação dos efeitos locais do veneno. Nas condições do ensaio o veneno afetou a viabilidade celular dos queratinócitos (medida pelo ensaio de MTT), desde uma concentração de 2 µg/mL e 24 horas de exposição. No mesmo período, o veneno de *B. jararaca* foi menos tóxico do que o veneno de *B. lanceolatus*, o que pode ser relacionado à menor atividade fosfolipásica desse veneno. Após 48 e 72 horas de incubação com o veneno de *B. lanceolatus*, concentrações de 2 µg/mL já induziram a perda de quase 100% de viabilidade celular. Estes resultados mostraram a alta toxicidade do veneno para este tipo celular. Já os dois venenos de *Bothrops* apresentaram padrões de toxicidade diferentes para as células endoteliais EAhy926. Após 24 horas e 48 horas de incubação, o veneno de *B. lanceolatus* foi 10 vezes menos tóxico do que o veneno de *B. jararaca*. Após 72 horas de incubação, a citotoxicidade do veneno de *B. lanceolatus* aumentou quando comparado com os períodos de incubação mais curtos: 50 µg/mL induzindo 50% de perda de viabilidade. Essa diferença pode ser relacionada às diferenças observadas no quadro clínico em caso de envenenamentos por essas duas serpentes e a composição dos dois venenos. Ao contrário do veneno de *B. jararaca* e de outras serpentes *Bothrops* Sul-Americanas, o veneno de *B. lanceolatus* não causa hemorragia local significativa em

humanos, provavelmente devido a sua menor toxicidade para as células endoteliais dos vasos vasculares.

As SVMs podem hidrolisar proteínas de membrana das células endoteliais, tais como integrinas e caderinas, que são envolvidas nas interações da célula com a matriz extracelular e com outras células. Além disso, os domínios tipo disintegrina e rico em cisteína das SVMs de classe II e III interferem também na adesão da célula com a matriz extracelular, após interagirem com as integrinas (GUTIÉRREZ et al., 2005). Foi mostrado que concentrações de até 100 µg/mL da metaloproteinase de classe I, BaP1, não afetam a viabilidade de células endoteliais EAhy926 em 24 horas de tratamento, mas ativam genes envolvidos com a apoptose; enquanto concentrações de 20-40 µg/mL da metaloproteinase de classe III, jararagina, induzem apoptose em células endoteliais murinas desde 24 horas de tratamento, por anoikis (DÍAZ et al., 2005; TANJONI et al., 2005). Estes processos dependem da atividade hidrolítica das proteases (DÍAZ et al., 2005; TANJONI et al., 2005). O veneno de *B. lanceolatus* possui um maior teor em metaloproteinases de classe I e menor teor em metaloproteinases de classe III, quando comparado ao veneno de *B. jararaca* (TERRA et al., 2009), o que pode explicar a grande diferença de toxicidade para as células endoteliais entre os dois venenos. Além disso, em modelo murino de dano cutâneo, a BaP1 induziu a apoptose dos queratinócitos em condições que não induziram a apoptose das células endoteliais, o que corrobora os resultados obtidos com o veneno de *B. lanceolatus* (JIMÉNEZ et al., 2008). Por último, é necessário observar que o nosso modelo permitiu avaliar apenas a viabilidade das células aderidas (as células não aderidas sendo consideradas mortas), o que pode levar a uma superestimação da perda de viabilidade.

Os queratinócitos desempenham um papel fundamental no processo de inflamação via a produção de uma grande variedade de citocinas, pequenas proteínas que ativam células endoteliais e fibroblastos. Uma vez ativados, eles também são capazes de produzir quimiocinas, que atraem leucócitos ao sítio da inflamação (BARKER et al., 1991). Das citocinas e quimiocinas avaliadas nos sobrenadantes dos queratinócitos HaCaT, expostas aos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca*, somente três proteínas foram detectadas: IL-8, MCP-1 e RANTES. A interleucina 8 (ou CXCL8) tem por função principal o recrutamento de neutrófilos. A proteína MCP-1 (ou CCL2) atrai especificamente os monócitos, enquanto RANTES (ou CCL5) recruta leucócitos. A produção basal destas três proteínas pelos queratinócitos é aumentada em caso de estímulo inflamatório, tal como infecção (SHIRAKI et al., 2006). Nós verificamos que o veneno de *B. lanceolatus* não possui atividade hidrolítica direta sobre IL-8, MCP-1 e RANTES, nem sobre as principais citocinas e quimiocinas

envolvidas nos processos inflamatórios agudos em queratinócitos, como IL-6, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . A concentração das três quimiocinas se manteve constante nos sobrenadantes dos controles entre 24 e 72 horas, enquanto houve um aumento dos níveis das citocinas após os três tempos de incubação com o veneno de *B. lanceolatus*, o que revela uma ação inflamatória do veneno. A exposição dos queratinócitos ao veneno aumentou a produção de quimiocinas envolvidas com o recrutamento de neutrófilos, monócitos e leucócitos, desde 24 horas de incubação. Este resultado corrobora nossa hipótese, e o potente efeito pró-inflamatório do veneno, como observado *in vivo*, pela presença de infiltrado celular, já às 6 horas após a inoculação.

As células endoteliais desempenham um papel chave no processo de inflamação. Elas controlam a adesão e migração das células inflamatórias e a troca de fluidos entre o fluxo sanguíneo e o tecido danificado. Quando expostas a níveis baixos de venenos de *Crotalus atrox* e *B. jararaca*, células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) regulam positivamente e negativamente genes envolvidos no crescimento e na manutenção celulares (GALLAGHER et al., 2005). Em concentrações sub-apoptóticas, a jararagina também ativou o gene da IL-8 em HUVEC, mas não indziu um aumento da produção desta (LOPES et al., 2012). Quatro proteínas foram detectadas nos sobrenadantes das células endoteliais humanas, EAhy926, expostas aos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca*: IL-6, MCP-1, RANTES e IL-8. Ao longo do experimento, os níveis destas proteínas aumentaram nos sobrenadantes dos controles, possivelmente devido à acumulação destas nos sobrenadantes. Os níveis dessas proteínas aumentaram nos sobrenadantes das células expostas ao veneno de *B. lanceolatus*, devido à ação do veneno nas células, uma vez que o cálculo tomou em conta a diminuição da viabilidade celular. A IL-8, essencial para o recrutamento de neutrófilos no início do processo inflamatório, aumentou desde 24 horas de exposição. Este aumento foi significativo a partir de 48 horas de exposição ao veneno. Por outro lado, o aumento de IL-6, que é uma citocina central da fase aguda da inflamação, foi observada somente a partir de 48 horas de exposição ao veneno, e foi significativo após 72 horas. Além disso, os níveis de RANTES e MCP-1 nos sobrenadantes das células expostas ao veneno aumentaram a partir de 48 e 72 horas, respectivamente. Estes resultados não refletem a cinética observada *in vivo*, com sintomas aparecendo desde as primeiras horas após a inoculação. A linhagem EAhy926, resultando da fusão de células HUVECs com células da linhagem de carcinoma A459, possui mais cromossomos do que as células primárias (EDGEALL; MCDONALD; GRAHAM, 1983), por isso pode apresentar respostas não fisiológicas, o que poderia explicar os resultados observados no nosso modelo. Finalmente, a produção de citocinas e quimiocinas observada

em queratinócitos e células endoteliais expostas ao veneno apresentou um perfil inflamatório, em concordância com a inflamação observada *in vivo*. Em caso de dano tecidual, ambos os tipos celulares podem também ser ativados por citocinas produzidas por outras células, tais como TNF- α e IFN- γ (KULDO et al., 2005; MIRZA; KOH, 2015), ausentes no modelo celular aqui apresentado, o que pode explicar algumas diferenças nos resultados observados *in vitro* e *in vivo*.

Para completar nosso estudo, analisamos também a expressão de proteínas de adesão celular nas células endoteliais da linhagem EAhy926. Foram então avaliadas por citometria as mudanças na expressão de ICAM-1 e P-selectina. Além disso, confirmamos que a linhagem imortalizada EAhy926 não expressa VCAM-1 e E-selectina, mesmo após estímulo com TNF- α , como já havia sido mostrado (LIDINGTON et al. 1999). Após exposição ao veneno de *B. lanceolatus* durante 2 horas, observamos um aumento não significativo da expressão de ICAM-1, e uma diminuição da expressão de P-selectina, também não significativa. As SVMs podem interferir na adesão das células endoteliais com a matriz extracelular, via hidrólise de integrinas e caderinas, ou via a interação dos domínios tipo disintegrina e rico em cisteína com as integrinas (GUTIÉRREZ et al., 2005). *In vivo*, o veneno de *B. asper* estimula as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão como ICAM-1, PECAM-1 e CD-18 (ZAMUNER et al., 2005). O veneno de *B. jararaca* e a jararagina influenciam a expressão de genes que codificam para selectinas e integrinas em células endoteliais HUVECs, como E-selectina, VCAM-1, IL-6 e IL-8 (GALLAGHER et., al 2003; LOPES et al., 2012). No modelo de HUVECs expostas à doses sub-apoptóticas de jararagina, Lopes et al. (2012) observaram também que a regulação positiva de genes, codificando para citocinas e proteínas de membrana pró-inflamatórias, nem sempre resultam em expressão das proteínas. Os autores sugerem que a ação da toxina resultaria numa desestabilização da célula, que a tornaria mais sensível a mediadores inflamatórios, gerados no microambiente celular. Esta hipótese poderia explicar porque as modulações na expressão de ICAM-1 e P-selectina, observadas no nosso modelo não foram significativas, mas também porque não foi observada uma produção aumentada de citocinas e quimiocinas. O estudo da regulação dos genes envolvidos na inflamação, em células EAhy926 expostas ao veneno de *B. lanceolatus*, permitiria melhor avaliar a ação direta deste sobre as células endoteliais.

No presente estudo foi revelada a presença de proteínas glicosiladas no veneno de *B. lanceolatus*, como comprovada pelo ensaio de *Western blot* usando Con A e WGA, dado que se relaciona positivamente com o potencial de ativação da via das lectinas da cascata do

complemento, via a ligação da MBL aos resíduos de N-acetil-D-glucosamina e de mannose (KAWASAKI; KAWASAKI; YAMASHINA, 1983). De fato, os resultados obtidos mostram a ativação e/ou inibição da cascata do complemento pelo veneno da *B. lanceolatus*, não só pela via das lectinas (ligação do C4 residual), mas também pelas vias clássica e alternativa (atividade hemolítica residual); a via clássica sendo a mais fortemente afetada. A incubação do veneno com SHN revela a produção de grandes quantidades do complexo terminal do complemento (TCC) e das anafilatoxinas C4a e C5a, sugerindo que a diminuição da atividade lítica do soro e da ligação do C4 é devida a ativação da cascata do complemento pelas três vias, resultando no consumo dos seus componentes. No entanto, não foi detectado um aumento na geração de C3a no soro tratado com o veneno de *B. lanceolatus*, assim como foi mostrado anteriormente com o veneno de *Bothrops brazili* (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010). Isto sugere a presença de peptidases no veneno, capazes de degradar tal anafilatoxina. O C3a é um potente sinal pró-inflamatório para vários tipos celulares, como macrófagos/monócitos, células mononucleares do sangue periférico aderidas, e mastócitos (COULTHARD; WOODRUFF, 2015). Porém, ao contrário do C5a, o C3a não ativa diretamente os neutrófilos e pode impedir a mobilização destas células da medula óssea para a circulação sanguínea, o que sugere uma ação anti-inflamatória na fase aguda da inflamação (COULTHARD; WOODRUFF, 2015; DAFFERN et al., 1995; WU et al., 2013). A clivagem desta anafilatoxina pelo *B. lanceolatus* poderia participar da sua potente ação inflamatória, no entanto, mais investigações seriam necessárias para definir as consequências desta clivagem no quadro clínico do envenenamento.

O complexo terminal do complemento é um sinal inflamatório potente. Na superfície das células, cada molécula de CD59 inibe a formação do MAC via ligação forte a um único complexo C5b-8, o que inibe o recrutamento de C9, mas torna o CD59 indisponível para mais interações (DAVIES; LACHMANN, 1993). Assim, quantidades sub-líticas de MAC formando poros na superfície de células nucleadas podem ativá-las: neutrófilos e macrófagos secretam citocinas inflamatórias e degranulam, enquanto em certas condições, plaquetas podem produzir micropartículas, e sua atividade pró-coagulante ser aumentada (MARTEL et al., 2011; MORGAN, 1989). A geração de grandes quantidades de TCC no sangue, e a formação do MAC nas membranas celulares, podem participar da resposta inflamatória observada nos envenenamentos por *B. lanceolatus*.

A hipótese da clivagem direta dos componentes do complemento pelas proteases do veneno da *B. lanceolatus* foi testada, incubando os componentes purificados C3, C4, e C5, com o veneno. Os resultados confirmaram esta hipótese mostrando a clivagem da cadeia α das

três proteínas. Além disso, o uso dos inibidores específicos de metaloproteases e serinoproteases, 1,10-fenantrolina e PMSF, permitiu mostrar que ambos os tipos de proteases estão envolvidos nestas clivagens. A produção do TCC e das anafilatoxinas, C4a e C5a, assim como a degradação do C3a no soro tratado com o veneno, também são devidas a ação de metaloproteases, como observado pela a inibição parcial por 1,10-fenantrolina. O C5a, gerado na incubação de C5 purificado com o veneno de *B. lanceolatus*, foi capaz de ativar neutrófilos, mostrando assim que o C5a gerado pela ação direta do veneno sobre o C5 é funcional. A metaloprotease de classe I de *B. asper*, BaP1, também gera C5a ativo em soro humano (FARSKY et al., 2000), mas ainda não havia relatos da atividade do C5a gerado pela ação direta de um veneno de *Bothrops* sobre C5 purificado. Este resultado pode ser relacionado à presença no veneno de enzimas tipo trombina (LÔBO DE ARAUJO et al., 1998): a trombina também pode clivar C5 gerando C5a ativo, assim como um fragmento de C5 que forma um complexo de ataque à membrana com atividade lítica maior do que o complexo formado por com C5b (AMARA et al., 2010; KRISINGER et al., 2012). Entre os produtos de ativação do complemento, o C5a é um dos mais pró-inflamatórios. Ele é um potente fator quimiotático para neutrófilos, monócitos e macrófagos. Ele ativa os neutrófilos, causando degranulação, produção de espécies reativas do oxigênio, e de citocinas e quimiocinas, aumentando a fagocitose e a expressão de proteínas de adesão. O C5a também possui atividade vasodilatadora (GUO; WARD, 2005). Sua atividade é regulada pela ação de carboxipeptidases que clivam seu resíduo arginina N-terminal (VOGT et al., 1986). Assim, a clivagem direta do C5 pelas proteases do veneno de *B. lanceolatus*, pode ser um potente evento desencadeador de reações inflamatórias, por causar a produção de quantidades exacerbadas de C5a ativo, sem ser submetida aos principais mecanismos de regulação da cascata do complemento.

O inibidor de C1, C1-INH, é o unico inibidor de serinoproteases plasmático conhecido, que regula a ativação do complemento e inativa várias proteases fibrinolíticas e da cascata da coagulação. O C1-INH inativa C1r e C1s, assim como MASP2, regulando a ativação da cascata do complemento pelas vias clássica e das lectinas. Na ausência de C1-INH estas vias podem se auto-ativar (DAVIS; FENGXIN; MEJIA, 2010). Para completar a análise do veneno, foi investigada a sua ação sobre o regulador do complemento C1-INH. Os resultados obtidos confirmam a clivagem direta do C1-INH, principalmente, por metaloproteinases do veneno de *B. lanceolatus*. Apesar do C1-INH ser significativamente clivado pelo veneno, seus fragmentos ainda foram reconhecidos por anticorpos específicos. Em condições de clivagem completa do C1-INH pelo veneno de *B. lanceolatus*, a perda de

atividade inibidora medida em imunensaio funcional foi de aproximadamente 40%. Este valor foi muito próximo ao da perda de função observada quando C1-INH é incubado com a metaloprotease de *B. pirajai*, C-SVMP, em condições similares (PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). A perda de função inibidora do C1-INH, resultante da clivagem pelo veneno de *B. lanceolatus*, pode explicar em parte a sua ativação das vias das lectinas e clássica.

Nós mostramos que o veneno de *B. lanceolatus* ativa fortemente a cascata do complemento. Monsinjon et al. (2003) mostraram que os receptores do complemento C3aR e C5aR são expressos em células vasculares endoteliais HUVEC. Esta expressão é mais baixa quando comparada a dos monócitos, porém ela pode aumentar rapidamente em caso de estímulo por IL-1 β e/ou IFN- γ (mas não por TNF- α), já que as células possuem estoque intracelular destes receptores. A ativação dos receptores do complemento por concentrações fisiológicas de C3a e C5a modula a resposta inflamatória e a produção de IL-6, IL-8 e RANTES (MONSINJON et al., 2003). Após 2 horas de exposição, o veneno de *B. lanceolatus* não afetou a expressão dos receptores C3aR e C5aR em células endoteliais EAhy926. Porém, o fato do TNF- α induzir um aumento, mesmo não significativo, da expressão dos dois receptores é um indício de que a regulação da expressão destes receptores pode ser alterada na linhagem imortalizada EAhy926.

Para evitar danos causados pela ativação do complemento, células endoteliais vasculares expressam inibidores do complemento na sua superfície, como MCP (“membrane cofactor protein”, CD46), DAF (“decay-accelerating factor”, CD55), e CD59 (TSUJI; KAJI; NAGASAWA, 1994). Quando as células endoteliais foram expostas ao controle positivo TNF- α , a expressão de DAF e MCP não foi afetada, enquanto a expressão de CD59 aumentou. Este padrão de expressão de DAF está de acordo com o que já foi mostrado em HUVECs incubadas com TNF- α (MUTIN; DIGNAT-GEORGE; SAMPOL, 1997). No nosso modelo, o veneno também não afetou a expressão de DAF, mas causou um aumento significativo na detecção de CD59 e MCP, que são moléculas de superfície com 20 kDa e 63 kDa, respectivamente. Assim, antes de concluir que haveria ocorrido um aumento de expressão destas proteínas por ação do veneno, formulamos a hipótese de que o aumento observado poderia ser devido a uma melhor acessibilidade dos anticorpos aos marcadores, causada pela clivagem de outras proteínas de superfície pelo veneno. Para confirmar essa hipótese, a expressão de MCP e CD59, foi avaliada em células endoteliais tratadas com o veneno de *B. lanceolatus*, previamente incubado com EDTA, inibidor de metaloproteases. O EDTA reverteu o efeito do veneno sobre a detecção de MCP, enquanto a detecção do CD59 foi diminuída em células tratadas com veneno pré-incubado com EDTA, quando comparadas

às células controle. Estes resultados sugerem que metaloproteases do veneno podem estar envolvidas nas mudanças de detecção de MCP e CD59 na superfície das células endoteliais, e que o aumento na detecção destas proteínas pode ser devido à clivagem de proteínas de superfície adjacentes, e não a uma regulação positiva da expressão destas pelas células, em resposta ao veneno. O EDTA pode apresentar uma ação citotóxica em alguns tipos celulares (AMARAL et al., 2007). Estes resultados precisam ainda ser confirmados usando inibidores de metaloproteases e serinoproteases, mais específicos e não tóxicos para as células. Pelo que sabemos, é a primeira vez que se descreve a ação direta de um veneno de serpente sobre MCP e CD59. Dos dezenove venenos de *Bothrops* analisados por Pidde-Queiroz et al. (2010), nenhum teve efeito na expressão ou detecção de DAF, CD59 e CR1 na superfície de eritrócitos humanos. Para concluir, a ação do veneno de *B. lanceolatus* sobre os reguladores do complemento na superfície das células endoteliais é provavelmente devida à sua atividade proteolítica, clivando as moléculas maiores e expondo as menores, como MCP e CD59. Esta alteração da expressão dos reguladores de superfície celular do complemento carece de investigações adicionais.

Ao contrário dos outros venenos do gênero *Bothrops*, o veneno de *B. lanceolatus* causa envenenamento com perfil clínico pró-trombótico, raramente necrótico e hemorrágico. Foi descrito que 30% dos casos apresentam trombozes múltiplas, apesar de ter sangue hipocoagulante, por causa da coagulação intravascular disseminada. Essas trombozes podem causar infarto cerebral, pulmonar ou do miocárdio (RÉSIÈRES et al., 2010). O veneno possui varias toxinas com atividade tipo trombina e uma fosfolipase A2 ácida anti-coagulante. Ele não coagula o sangue ou o plasma humano tratado com citrato (LÔBO DE ARAÚJO et al., 1994; 1998; 2001; STROKA et al., 2005). O veneno de *B. caribbaeus*, espécie endêmica da ilha de Sainte-Lucie, induz uma patologia similar ao veneno de *B. lanceolatus*. Recentemente, Herrera et al. (2013) isolaram uma proteína parecida com lectina do tipo C a partir deste veneno (“snake C-type lectin-like” ou SNACLEC) responsável pela trombocitopenia observada *in vivo*, e capaz de aglutinar plaquetas humanas, via ligação à glicoproteína Ib. O veneno de *B. lanceolatus* também possui este tipo de enzimas, mas uma atividade comparável não foi comprovada (GUTIÉRREZ et al., 2008). Até agora, o mecanismo de desenvolvimento das trombozes causadas nos envenenamentos humanos por estes dois venenos ainda não foi elucidado. Apesar desta pergunta não ser o foco do nosso estudo, os resultados aqui apresentados trazem alguns elementos de resposta: a ativação do sistema complemento pelo veneno de *B. lanceolatus* pode contribuir para a sua atividade pró-coagulante, enquanto a

ausência de hemorragia observada nos envenenamentos por esta serpente pode ser relacionada aos efeitos observados em células endoteliais e componentes da matriz extracelular.

A cascata da coagulação e do complemento são interconectadas, e deficiências na regulação do complemento podem causar distúrbios da hemostase e efeitos pró-coagulantes como observado no lúpus eritematoso sistêmico ou na síndrome hemolítica-urêmica. Quando comparado com outros venenos do gênero *Bothrops*, o veneno de *B. lanceolatus* é um potente ativador da cascata do complemento, pelas vias clássica, alternativa e das lectinas, mas também da via terminal, gerando o complexo terminal do complemento e as anafilatoxinas C5a e C4a. Quando expostos aos produtos de ativação do complemento, a atividade pró-coagulante das plaquetas, dos neutrófilos, das células endoteliais e dos mastócitos, é exacerbada (HAMILTON et al., 1990; HUBER; VALENT, 2003; RITIS et al. 2006; SIMS; WIEDMER, 1991; WOJTA). Apesar de expressarem reguladores do complemento em suas membranas, plaquetas podem apresentar um depósito de produtos de ativação do complemento. O complexo C5b-9, depositado em quantidades sub-líticas nas suas superfícies, induz a secreção de grânulos e micropartículas (que agem como superfície extra de conversão da trombina), e estimula suas propriedades pró-coagulantes, via modificação dos fosfolípidos de superfície (SIMS; WIEDMER, 1991; WIEDMER; ESMON; SIMS, 1986). A ativação do complemento pelo veneno de *B. lanceolatus* poderia levar à ativação das plaquetas por depósito de TCC nas suas superfícies, aumentando sua atividade pró-coagulante; junto a ação pró-coagulante direta nas plaquetas das proteínas parecidas com lectinas do tipo C presentes do veneno (GUTIÉRREZ et al., 2008).

Foi mostrado que a ativação do complemento pode ter efeito pró-coagulante por facilitar a ativação da via extrínseca da coagulação, a via do fator tecidual. O C5a, via ligação a seu receptor C5aR, aumenta a produção deste em neutrófilos, e o TCC ativa células endoteliais, induzindo a expressão de fator tecidual e a ativação do gene da P-selectina (RITIS et al. 2006; TEDESCO et al., 1997). O veneno de *B. lanceolatus* não teve efeito direto sobre a produção de fator tecidual, nem ativou neutrófilos nas doses testadas, mas induziu uma produção alta de TCC e C5a quando incubado com soro humano, que podem ter estes efeitos e ativar a via extrínseca da coagulação. Além disso, as células endoteliais sofrem modificações de membrana que aumentam sua atividade pró-coagulante, quando expostas ao C5a ou ao TCC. O C5a modifica a membrana das células endoteliais, induzindo a clivagem do heparan (anti-coagulante nas superfícies destas), enquanto o TCC induz vesiculação e produção do fator ativador de plaquetas. Quando tratados com C5a, mastócitos passam de um fenótipo pró-fibrinolítico ao um fenótipo pró-trombótico (BOSSI et al., 2004; HAMILTON et al., 1990;

PLATT et al, 1991; WOJTA; HUBER; VALENT, 2003). Estes dados mostram que os produtos de ativação do complemento gerados pelo veneno de *B. lanceolatus*, mas também por outros venenos de *Bothrops*, podem ter uma ação pró-coagulante em células endoteliais e mastócitos.

O inibidor de C1, C1-INH é um inibidor central das vias clássica e das lectinas do complemento, assim como da fase inicial da via intrínseca da coagulação, via o sistema de contato. Ele inibe a kalikreína, o fator de Hageman e a tromboplasmina ativada (FORBES; PENSKY; RATNOFF, 1970; SCHAPIRA; SCOTT; COLMAN, 1982). Uma modificação no gene que codifica para o C1-INH pode levar a patologia grave como o angioedema hereditário (DAVIS, 2005). Assim, pela clivagem e diminuição da função inibidora do C1-INH, os venenos de *Bothrops* podem induzir a ativação da coagulação pela via intrínseca.

Em caso de envenenamento botrópico, o desenvolvimento de hemorragia depende do rompimento dos microvasos pela ação das SVMPs em duas etapas: a degradação da matriz extracelular, da membrana basal dos vasos, e das proteínas de adesão das células endoteliais, que deixam a parede dos vasos fragilizada, e, o rompimento subsequente dos vasos sob os efeitos da pressão vascular (GUTIÉRREZ et al., 2005). Em geral, metaloproteases das classes II e III apresentam um maior potencial hemorrágico do que as metaloproteases da classe I. A comparação de várias P-I-SVMPs revelou que a degradação de componentes da membrana basal e da matriz extracelular, especialmente do colágeno IV, é uma atividade essencial para o desempenho de uma atividade hemorrágica (ESCALANTE et al., 2011). Recentemente, foi mostrado que as SVMPs das classes II e III se localizam preferencialmente na membrana basal dos microvasos, e apresentam uma potente atividade citotóxica, enquanto as PI-SVMPs se espalham inespecificamente pelo tecido (HERRERA et al., 2015). Quando comparado com o veneno de *B. jararaca*, o veneno de *B. lanceolatus* foi menos citotóxico para células endoteliais, e apresentou atividade hialuronidásica menor. Além disso, foi mostrado que ele tem atividade gelatinolítica menor, e contém menos SVMPs da classe III, e mais SVMPs da classe I (TERRA et al., 2009). Esse conjunto de dados pode explicar a ausência de hemorragia observada em pacientes picados por *B. lanceolatus*. A formação das trombozes é provavelmente um efeito específico para a espécie humana, uma vez que no veneno de uma dada espécie de *Bothrops*, os diferentes tipos de SVMPs podem causar diferentes efeitos pró-coagulantes sobre a hemostasia dos sangues humano, murino ou de ave (BERNARDONI et al., 2015).

Foi mostrado que as dezenove espécies de *Bothrops* também ativam a cascata do complemento por uma ou mais vias de ativação (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010) e no caso da *B. asper* e da *B. pirajai*, metaloproteinases de classe I, BaP1 e C-SVMP, são envolvidas no processo (FARSKY et al., 2000; PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). Uma vez que existem semelhanças estruturais entre os venenos de *Bothrops* é possível que o veneno da *B. lanceolatus* ative a cascata do complemento via a ação de metaloproteinases de classe I e por mecanismos semelhantes. Para investigar esta hipótese foi realizado o fracionamento do veneno de *B. lanceolatus*. O veneno foi submetido a uma primeira etapa de cromatografia de exclusão molecular. Das oito frações obtidas, duas apresentaram atividade proteolítica significativa sobre peptídeos fluorescentes. A separação eletroforética revelou a presença de vários componentes, em ambas as frações, e o uso de inibidores específicos confirmou a presença de metaloproteinases e serinoproteases nas duas frações. Além disso, estas frações foram capazes de hidrolisar os componentes purificados do complemento, como C3, C4, C5 e C1-INH.

Tabela 5 – Resumo da caracterização do veneno de *B. lanceolatus*

	Presença / CI50 / Proteínas afetadas	Inibição pelo SAB
ATIVIDADES ENZIMÁTICAS		
Hialuronidásica	+	++
Fosfolipásica	++	++
Proteolítica	++	+
Fibrinogenolítica	++	N. T.
Gelatinolítica	++	N. T.
TOXICIDADE <i>in vivo</i>		
DL50	++	N. T.
Edematogênica	++	N. T.
Hemorrágica	++	N. T.
TOXICIDADE CELULAR		
Citotoxicidade (24h)		
Queratinócitos	2,519 µg/mL	++
Células endoteliais	51,76 µg/mL	N. T.
Citocinas/Quimiocinas		
Queratinócitos	IL-8, MCP-1, RANTES	N. T.
Células endoteliais	IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES	N. T.
Clivagem direta:	IL-12p70, MIG	N. T.
Marcadores de ativação em células endoteliais		
ICAM-1/P-Sel/TF	sem efeito	
	Presença / CI50 / Proteínas afetadas	Inibição por inibidores específicos de SVMP/SVSP
ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA COMPLEMENTO		
Ativação das vias:		
Clássica	156,6 µg/mL	N. T.
Alternativa	294,5 µg/mL	N. T.
Lectina	396,3 µg/mL	N. T.
Geração de anafilatoxinas	C3a, C4a, C5a	+/N. T.
Geração de TCC	++	+/N. T.
Clivagem direta:		
C3	++	+/+
C4	++	+/+
C5	++	+/+
C1-INH	++	+/+
Atividade dos componentes clivados		
C5a	++	N. T.
C1-INH	61%	N. T.
Modulação da expressão dos reguladores de membrana		
aumento	MCP, CD59	+/N. T.

Nota: Abreviaturas (português):

~~H~~-8: diminuição dos níveis da proteína quando comparados ao controle

+ : atividade fraca comparada com outros venenos de serpente *Bothrops* (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008)

++ : atividade comparável a de outros venenos botrópicos (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008)

CI50: concentração de veneno capaz de inibir 50% da viabilidade celular, da atividade lítica do SNH ou da ligação de C4

DL50: dose de veneno letal para 50% dos animais

N. T.: não testado

SAB: soro antibotrópico comercial

SVMP: metaloproteinase de veneno de serpente

SVSP: serino protease de veneno de serpente

TCC: complexo terminal do complemento SC5b-9

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, analisamos o veneno de *B. lanceolatus*, caracterizando suas atividades enzimáticas, citotóxicas e biológicas, e sua capacidade de ativar o sistema do complemento (Tabela 5). O veneno exibiu um perfil enzimático parecido com o de outros venenos de *Bothrops* e importantes semelhanças antigênicas entre suas toxinas e as dos venenos de serpentes *Bothrops* brasileiras. As diferenças nas composições protéicas dos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca*, especialmente na natureza de metaloproteases, podem explicar os diferentes perfis de citotoxicidade em células endoteliais; enquanto queratinócitos foram igualmente sensíveis aos dois venenos. A produção de citocinas nas células endoteliais e nos queratinócitos expostas ao veneno de *B. lanceolatus* indica uma ação direta e pró-inflamatória sobre estes tipos celulares. Os efeitos locais observados em modelo murino, assim como a ativação da cascata do complemento decorrente da clivagem direta dos componentes desta, por proteases do veneno, confirmam uma potente ação inflamatória. O veneno de *B. lanceolatus* ativa o sistema complemento pelas três vias, clássica, alternativa e das lectinas. Ele possui uma ação proteolítica direta sobre os componentes centrais da cascata, C3, C4 e C5, gerando a anafilatoxina C5a ativa. Quando incubado com soro humano, observou-se a produção de complexo terminal do complemento e da anafilatoxina C5a, ativadores potentes da inflamação, mas também da coagulação. O veneno clivou e diminuiu significativamente a atividade do inibidor de fase solúvel, o C1-INH. Por outro lado, os receptores de anafilatoxinas, C3aR e C5aR, não foram afetados pelo veneno neste modelo celular.

Estes resultados apontam que a ativação do sistema complemento é um importante elemento na inflamação causada pelo veneno de *B. lanceolatus*. É provável que esta ativação desempenhe também um relevante papel na patologia trombótica que caracteriza os envenenamentos por *B. lanceolatus*. A purificação de serinoproteases e metaloproteases, com atividade proteolítica sobre os componentes do complemento, permitirá descrever os mecanismos moleculares da ativação da cascata do complemento pelo veneno.

REFERÊNCIAS *

- AMARA, U.; FLIERL, M. A.; RITTIRSCH, D.; KLOS, A.; CHEN, H.; ACKER, B.; BRÜCKNER, U. B.; NILSSON, B.; GEBHARD, F.; LAMBRIS, J. D.; HUBER-LANG, M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. **J. Immunol.**, v. 185, n. 9, p. 5628-5636, 2010.
- AMARAL, K. F.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A.; BORELLI, P.; GAVINI, G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 5, p. 338-343, 2007.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, p. 949-957, 2009.
- ANTUNES, T. C. ; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI M.; SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 56, p. 1443-1458, 2010.
- ARAGÓN, F.; BOLAÑOS, R.; VARGAS, O. Carbohydrates of the venoms of *Bothrops asper* of Costa Rica: Quantitative study. **Rev. Biol. Trop.**, v. 25, n. 2, p. 171-178, 1977.
- BARKER, J. N.; MITRA, R. S.; GRIFFITHS, C. E.; DIXIT, V. M.; NICKOLOFF, B. J. Keratinocytes as initiators of inflammation. **Lancet**, v. 337, n. 8735, p. 211-214, 1991.
- BEINROHR, L.; DOBÓ, J.; ZÁVODSZKY, P.; GÁL, P. C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. **Trends Mol. Med.**, v. 14, p. 511-521, 2006.
- BERNARDONI, J. L.; SOUSA, L. F.; WERMELINGER, L. S.; LOPES, A. S.; PREZOTO, B. C.; SERRANO, S. M.; ZINGALI, R. B.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e109651, 2014.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, 2003.
- BOGARIN, G.; ROMERO, M.; ROJAS, G.; LUTSCH, C.; CASADAMONT, M.; LANG, J.; OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 37, p. 551-557, 1999.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 865-877, 1997.
- BOSSI, F.; FISCHETTI, F.; PELLIS, V.; BULLA, R.; FERRERO, E.; MOLLNES, T. E.; REGOLI, D.; TEDESCO, F. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. **J. Immunol.**, v. 173, n. 11, p. 6921-6927, 2004.

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

BOWEN, B.; HAWK, J. J.; SIBUNKA, S.; HOVICK, S.; WEILER, J. M. A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. **Clin. Immunol.**, v. 98, p. 157-163, 2001.

BRAZIL, V. As serpentes venenosas e o tratamento específico do ofidismo. **Imprensa Médica**, v. VII, p. 17-21, 1909.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophídico. **Rev. Méd. São Paulo.**, v. IV, p. 255-260, 1901.

BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 88, p. 424-432, 2010.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H.; FURTADO, M. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J. Proteomics**, n. 74, v. 4, p. 510-527, 2011.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, Jr. V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier; 2003. 468 p.

CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSE, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus*. **BMC Genomics**, v. 605, n. 11, 2010.

CARROLL, M.C. Complement and humoral immunity. **Vaccine**, v. 26, Suppl 8, p. 28-33, 2008.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, p. 31-39, 1995.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C.F.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. **Inflamm. Res.**, v. 55, n. 6, p. 245-253, 2006.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CLISSA, P. B.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D.; MOTA, I.; TAYLOR, M. J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567-1573, 2001.

COULTHARD, L. G.; WOODRUFF, T. M. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. **J. Immunol.**, v. 194, n. 8, p. 3542-3548, 2015.

DAFFERN, P. J.; PFEIFER, P. H.; EMBER, J. A.; HUGLI, T. E. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 6, p. 2119-2127, 1995.

DANILOVA, N. The evolution of immune mechanisms. **J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.**, v. 306, n. 6, p. 496-520, 2006.

DAVIES, A.; LACHMANN, P. J. Membrane defence against complement lysis: the structure and biological properties of CD59. **Immunol. Res.**, v. 12, n. 3, p. 258-275, 1993.

DAVIS, A. E. 3rd. The pathophysiology of hereditary angioedema. **Clin. Immunol.**, v. 114, n. 1, p. 3-9, 2005.

DAVIS, A. E. 3rd; LU, F.; MEJIA, P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. **Thromb. Haemost.**, v. 104, n. 5, p. 886-893, 2010.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. The humoral immune response induced by snake venom toxins. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 343-357, 2011.

DÍAZ, C.; VALVERDE, L.; BRENES, O.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 94, n. 3, p. 520-528, 2005.

EDGEELL, C. J.; MCDONALD, C. C.; GRAHAM, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, n. 12, p. 3734-3737, 1983.

EDLICH, R. F.; FARINHOLT, H. M.; WINTERS, K. L.; BRITT, L. D.; LONG, W. B. 3RD; WERNER, C. L.; GUBLER, K. D. Modern concepts of treatment and prevention of chemical injuries. **J. Long Term Eff. Med. Implants**, v. 15, n. 3, p. 303-318, 2005.

ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, n. 2, p. 269-274, 2000.

ESCALANTE, T.; ORTIZ, N.; RUCAVADO, A.; SANCHEZ, E. F.; RICHARDSON, M.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. **PLoS One**, v. 6, n. 12, e28017, 2011.

FARSKY, S. H. P.; GONÇALVES, L. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORREA, A. P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D. V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system: role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 9, p. 213-221, 2000.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3. Ed. New-York: Cambridge University Press, 1971.

FORBES, C. D.; PENSKY, J.; RATNOFF, O. D. Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma thromboplastin antecedent by purified serum C1 inactivator. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 76, n. 5, p. 809-815, 1970.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, p. 3016-3030, 2008.

FURTADO, M. F.; CARDOSO, S. T.; SOARES, O. E.; PEREIRA, A. P.; FERNANDES, D. S.; TAMBOURGI, D. V.; SANT'ANNA, O. A. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. **Toxicon**, v. 55, p. 881-887, 2010.

GALLAGHER, P. G.; BAO, Y.; SERRANO, S. M.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; FOX, J. W. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 429-440, 2003.

GALLAGHER, P.; BAO, Y.; SERRANO, S. M.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D.; GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; ZIGRINO, P.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; NISCHT, R.; MAUCH, C.; MOSKALUK, C.; FOX, J. W. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: *in vitro* and *in vivo* gene expression analysis of the effects of the toxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 441, n. 1, p. 1-15, 2005.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. **Life Sci.**, v. 80, n. 21, p. 1921-1943, 2007.

GOLDSTEIN, I. J. Studies on the combining sites of concanavalin A. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 55, p. 35-53, 1975.

GUO, R. F.; WARD, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annu. Rev. Immunol.**, n. 23, p. 821-852, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CERDAS, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venom and its neutralization by polyvalent anti-venom. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 85, n. 1, p. 171-175, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: J MEIER, J.; WHITE, J. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and Poisons**. Boca Raton (Florida), CRC Press; 1995. Cap. 30, p. 645-665.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; WARRELL, D. A.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 10, p. 4396-408, 2008.

HAMILTON, K. K.; HATTORI, R.; ESMON, C. T; SIMS, P. J. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for

assembly of the prothrombinase enzyme complex. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 7, p. 3809-3814, 1990.

HARRIS, C. L.; ABBOTT, R. J.; SMITH, R. A.; MORGAN, B. P.; LEA, S. M. Molecular dissection of interactions between components of the alternative pathway of complement and decay accelerating factor (CD55). **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 2569-2578, 2005.

HERRERA, C.; RUCAVADO, A.; WARRELL, D. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Systemic effects induced by the venom of the snake *Bothrops caribbaeus* in a murine model. **Toxicon**, v. 1, n. 63, p. 19-31, 2013.

HERRERA, C.; ESCALANTE, T.; VOISIN, M. B.; RUCAVADO, A.; MORAZÁN, D.; MACÊDO, J. K.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; NOURSHARGH, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; FOX, J. W. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 4, e0003731, 2015.

HOURCADE, D. E.; MITCHELL, L.; KUTTNER-KONDO, L. A.; ATKINSON, J. P.; MEDOF, M. E. Decay-accelerating factor (DAF), complement receptor 1 (CR1), and factor H dissociate the complement AP C3 convertase (C3bBb) via sites on the type A domain of Bb. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 1107-1112, 2002.

IRIMURA, T.; NICOLSON, G. L. Interaction of pokeweed mitogen with poly(N-acetyllactosamine)-type carbohydrate chains. **Carbohydr. Res.**, v. 120, p. 187-195, 1983.

ITO, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 7, p. 3132-3135, 1987.

JIMÉNEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, n. 10, p. 2421-2428, 2008.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; DA SILVA, M. L.; KUSANO, E. J.; DE MENDONÇA, J. S. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 743-748, 1994.

KANASHIRO, M. M.; DE CÁSSIA M ESCOCARD, R.; PETRETSKI, J. H.; PRATES, M. V.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L.; DA SILVA, W. D.; KIPNIS, T. L. Biochemical and biological properties of phospholipases A(2) from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 64, n. 7, p. 1179-1186, 2002.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLoS Med.**, v. 11, n. 5, 2008.

KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. **J. Biochem.**, v. 94, n. 3, p. 937-947, 1983.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KÖHL, J. Self, non-self, and danger: a complementary view. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 586, p. 71-94, 2006.

KRISINGER, M. J.; GOEBELER, V.; LU, Z.; MEIXNER, S. C.; MYLES, T.; PRYZDIAL, E. L.; CONWAY, E. M. Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. **Blood**, v. 120, n. 8, p. 1717-1725, 2012.

KULDO, J. M.; OGAWARA, K. I.; WERNER, N.; ASGEIRSDÓTTIR, S. A.; KAMPS, J. A.; KOK, R. J.; MOLEMA, G. Molecular pathways of endothelial cell activation for (targeted) pharmacological intervention of chronic inflammatory diseases. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 3, n. 1, p. 11-39, 2005.

KUNIYOSHI, A. K.; ROCHA, M.; CAJADO CARVALHO, D.; JULIANO, M. A.; JULIANO NETO, L.; TAMBOURGI, D. V.; PORTARO, F. C. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 124-131, 2012.

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

LEÓN, G.; ESTRADA, R.; CHAVES, F.; ROJAS, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Inhibition by CaNa₂EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 321-331, 1998.

LIDINGTON, E. A.; MOYES, D. L.; MCCORMACK, A. M.; ROSE, M. L. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. **Transpl. Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 239-246, 1999.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BON, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1069-1081, 1994.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; BON, C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrinolytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 5, p. 745-758, 1998.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; DE SOUZA, A. O.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; FLORES, C. A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 209-21, 2000.

LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 1012-1028, 2009.

LOPES, D. S.; FAQUIM-MAURO, E.; MAGALHÃES, G. S.; LIMA, I. C.; BALDO, C.; FOX, J. W.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA, P. B. Gene expression of inflammatory

mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v. 60, n. 6, n. 1, p. 072-1084, 2012.

LÓPEZ-LOZANO, J. L.; DE SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; FLORES SANCHEZ, E.; MUNIZ, E. G.; BÜHRNHEIM, P. F.; MORHY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 997-1006, 2002.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, p. 147-159, 2006.

MALBRANQUE, S.; PIERCECCHI-MARTI, M. D.; THOMAS, L.; BARBEY, C.; COURCIER, D.; BUCHER, B.; RIDARCH, A.; SMADJA, D.; WARRELL, D. A. Case Report: Fatal Diffuse Thrombotic Microangiopathy after a Bite by the “Fer-de-Lance” Pit Viper (*Bothrops lanceolatus*) of Martinique. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 856–861, 2008.

MARKLAND, F. S. JR; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, 2013.

MARTEL, C.; COINTE, S.; MAURICE, P.; MATAR, S.; GHITESCU, M.; THÉROUX, P.; BONNEFOY, A. Requirements for membrane attack complex formation and anaphylatoxins binding to collagen-activated platelets. **PLoS One**, v. 6, n. 4, e18812, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em: 21 Abr. 2016.

MIRZA, R. E; KOH, T. J. Contributions of cell subsets to cytokine production during normal and impaired wound healing. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 409-412, 2015.

MIWA, T.; SONG, W. C. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, n. 3, p. 445-459, 2001.

MONSINJON, T.; GASQUE, P.; CHAN, P.; ISCHENKO, A.; BRADY, J. J.; FONTAINE, M. C. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. **FASEB J.**, v. 17, n. 9, p. 1003-1014, 2003.

MORA, J.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of *Bothrops asper* Snake Venom on Lymphatic Vessels: Insights into a Hidden Aspect of Envenomation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 10, 2008.

MORGAN, B. P. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. **Biochem. J.**, v. 264, n. 1, p. 1-14, 1989.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUTIN, M.; DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOL, J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. **Tissue Antigens**, v. 50, n. 5, p. 449-458, 1997.

NIELSEN, C. H.; FISCHER, E. M.; LESLIE, R. G. The role of complement in the acquired immune response. **Immunology**, v. 100, n. 1, p. 4-12, 2000.

NUMERIC, P.; MORAVIE, V.; DIDIER, M.; CHATOT-HENRY, D.; CIRILLE, S.; BUCHER, B.; THOMAS, L. Multiple cerebral infarctions following a snakebite by *Bothrops caribbaeus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 3, p. 287-288, 2002.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation. **Semin. Nephrol.**, v. 33, n. 6, p. 479-492, 2013.

OLIVEIRA, J. C. R.; DE OCA, H. M.; DUARTE, M. M.; DINIZ, C. R.; FORTES-DIAS, C. L. Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. **Toxicon**, 2002, v. 40, n. 3, p. 321-325, 2002.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; BEATRIZ MESA, M.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; LUIS ARANGO, J.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; MARÍA RODRÍGUEZ, L.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; MARIANO GÓMEZ, L.; LUIS URIBE, F.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia: A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 2, p. 1107-1114, 2002.

PAES LEME, A. F.; KITANO, E. S.; FURTADO, M. F.; VALENTE, R. H.; CAMARGO, A. C.; HO, P. L.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Analysis of the subproteomes of proteinases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. **Proteomics**, v. 9, p. 733-745, 2009.

PANGBURN, M. K.; FERREIRA, V.P.; CORTES, C. Discrimination between host and pathogens by the complement system. **Vaccine**, v. 26, p. 115-121, 2008.

PIDDE-QUEIROZ, G.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.; FURTADO MDE, F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

PIDDE-QUEIROZ, G.; FURTADO MDE, F.; FILGUEIRAS, C. F.; PESSOA, L. A.; SPADAFORA-FERREIRA, M.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Mol. Immunol.**, v. 47, n. 16, p. 2537-2544, 2010.

PIDDE-QUEIROZ, G.; MAGNOLI, F. C.; PORTARO, F. C.; SERRANO, S. M.; LOPES, A. S.; PAES LEME, A. F.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. P-I snake venom metalloproteinase is able to activate the complement system by direct cleavage of central components of the cascade. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 10, e2519, 2013.

PLATT, J. L.; DALMASSO, A. P.; LINDMAN, B. J.; IHRCKE, N. S.; BACH, F. H. The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, n. 11, p. 2887-2890, 1991.

PRICE, J. A. 3rd. A colorimetric assay for measuring phospholipase A2 degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, n. 3, p. 441-444, 2007.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARRELL, D. A.; DESAKORN, V.; MCMICHAEL, A. J.; WHITE, N. J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629-637, 1988.

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 142, n. 3-4, p. 328-346, 2006.

RÉSIÈRES, D. ; MÉGARBANE, B.; VALENTINO, R.; MEHDAOUI, H.; THOMAS, L. *Bothrops lanceolatus* Bites: Guidelines for Severity Assessment and Emergent Management. **Toxins**, v. 2, p. 163-173, 2012.

RITIS, K.; DOUMAS, M.; MASTELLOS, D.; MICHELI, A.; GIAGLIS, S.; MAGOTTI, P.; RAFAIL, S.; KARTALIS, G.; SIDERAS, P.; LAMBRIS, J. D. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. **J. Immunol.**, v. 177, n. 7, p. 4794-4802, 2006.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LEÓN, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa2 EDTA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, n. 5-6, p. 313-319, 2000.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F.; FERNÁNDES, C. M.; DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm.**, v. 11, n. 2, p. 121-128, 2002.

SCHAPIRA, M.; SCOTT, C. F.; COLMAN, R. W. Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. **J. Clin. Invest.**, v. 69, n. 2, p. 462-468, 1982.

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L. R.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, MY.; ARAÚJO, H. P.; BOLLER, M. A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANO-MARTINS, I. S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G. P.; GEOGHEGAN, P.; HIGASHI, H. G.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980-989, 2012.

SERRANO, S. M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, n. 21, p. 7186-7193, 1995.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 9, p. 1175-1185, 2006.

SIMS, P. J.; WIEDMER, T. The response of human platelets to activated components of the complement system. **Immunol. Today**, v. 12, n. 9, p. 338-342, 1991.

SJÖBERG, A. P.; TROUW, L. A.; BLOM, A. M. Complement activation and inhibition: a delicate balance. **Trends Immunol.**, v. 30, p. 83-90, 2009.

STROKA, A.; DONATO, J. L.; BON, C.; HYSLOP, S.; DE ARAÚJO, A. L. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 411-420, 2005.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

TEDESCO, F.; PAUSA, M.; NARDON, E.; INTRONA, M.; MANTOVANI, A.; DOBRINA, A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 9, p. 1619-1627, 1997.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICCOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 988-997, 2009.

TENSEN, C. P.; FLIER, J.; VAN DER RAAIJ-HELMER, E. M.; SAMPAT-SARDJOEPERSAD, S.; VAN DER SCHORS, R. C.; LEURS, R.; SCHEPER, R. J.; BOORSMA, D. M.; WILLEMZE, R. Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXCL-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3). **J. Invest. Dermatol.**, v. 112, n. 5, p. 716-722, 1999.

TERRA, R. M. S. et al. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 836-844, 2009.

THOMAS, L.; PINTO, A. F.; GUIMARÃES, J. A.; FOX, J. W. Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-lance" *Bothrops lanceolatus* in Martinique despite antivenom treatment: A report of three recent cases. **Toxicon**, v. 48, p. 23-28, 2006.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, v. 24, p. 145-149, 1992.

TSUJI, S.; KAJI, K.; NAGASAWA, S. Decay-accelerating factor on human umbilical vein endothelial cells. Its histamine-induced expression and spontaneous rapid shedding from the cell surface. **J. Immunol.**, v. 152, n. 3, p. 1404-1410, 1994.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 37-62, 1996.

UNSWORTH, D. J. Complement deficiency and disease. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 1, p. 1013-1017, 2008.

VOGT, W.; DAMERAU, B.; LÜHMANN, B.; HESSE, D.; HALLER, Y. Complement activation in human lymph: modulation by the contact activation system and by leukocytes. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 79, n. 4, p. 423-433, 1986.

WANG, R.; QIU, P.; JIANG, W.; CAI, X.; OU, Y.; SU, X.; CAI, J.; CHEN, J.; YIN, W.; YAN G. Recombinant fibrinogenase from *Agkistrodon acutus* venom protects against sepsis via direct degradation of fibrin and TNF- α . **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, n. 5, p. 620-630, 2008.

WIEDMER, T.; ESMON, C. T.; SIMS, P. J. Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. **Blood**, v. 68, n. 4, p. 875-880, 1986.

WOJTA, J.; HUBER, K.; VALENT, P. New aspects in thrombotic research: complement induced switch in mast cells from a profibrinolytic to a prothrombotic phenotype. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 33, n. 5-6, p. 438-441, 2003.

WU, M. C.; BRENNAN, F. H.; LYNCH, J. P.; MANTOVANI, S.; PHIPPS, S.; WETSEL, R. A.; RUITENBERG, M. J.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M. The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 23, p. 9439-9444, 2013.

WÜSTER, W.; THORPE, R. S.; DA GRAÇA SALOMÃO, M.; THOMAS, L.; PUERTO, G.; THEAKSTON, D. R. G.; WARRELL, D. A. Origin and phylogenetic position of the Lesser Antillean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): biogeographical and medical implications. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Zool.)**, v. 68, n. 2, p. 101-106, 2002.

ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; DE FÁTIMA PEREIRA TEIXEIRA, C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids.; and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 806-813, 2005.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; ROCHA, M. M.; FURTADO, M. F.; CAMARGO, A. C.; HO, P. L.; SERRANO, S. M. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **J. Proteome Res.**, v. 9, n. 5, p. 2278-2291, 2010.

ZELANIS, A.; SERRANO, S. M.; REINHOLD, V. N. N-glycome profiling of *Bothrops jararaca* newborn and adult venoms. **J. Proteomics**, v. 75, n. 3, p. 774-782, 2012.

A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Apresentações Orais em Congressos

DELAFONTAINE, M.; VILLAS BOAS, I. M.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. *Bothrops lanceolatus* venom: Potential mechanisms involved in envenomings. XVIII World Congress of the International Society on Toxinology, Sept 25-30 2015.

Apresentações de Pôster em Congressos

DELAFONTAINE, M.; VILLAS BOAS, I. M.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. *Bothrops lanceolatus* venom: Potential mechanisms involved in envenomings. XVI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, Dec. 2015.

DELAFONTAINE, M.; VILLAS BOAS, I. M.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. *Bothrops lanceolatus* venom: Potential mechanisms involved in envenomings. XIII Congress of the Brazilian Society of Toxinology, Nov. 2015.

DELAFONTAINE, M.; PAIXAO-CALVALCANTE, D.; PORTARO, F. C.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Venom from the insular snake, *Bothrops lanceolatus*, activates complement cascade. XVI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, Dec. 2014.

DELAFONTAINE, M.; PAIXAO-CALVALCANTE, D.; PORTARO, F. C.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Venom from the insular snake, *Bothrops lanceolatus*, activates complement cascade. XXV International Complement Workshop. **Mol Immunol.**, v. 61, n. 2, 2014.

DELAFONTAINE, M.; PAIXAO-CALVALCANTE, D.; PORTARO, F. C.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Complement cascade activation by *Bothrops lanceolatus* venom: a pathway to improving patient management in case of envenomation? XXXIV Congress of the European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists. **Clin. Toxicol.**, v. 52, s. 1, 2014.

DELAFONTAINE, M.; PAIXAO-CALVALCANTE, D.; PORTARO, F. C.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Venom from the insular snake, *Bothrops lanceolatus*, activates complement cascade. XVI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, Dec. 2014.

DELAFONTAINE, M.; PAIXAO-CALVALCANTE, D.; PORTARO, F. C.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Immunochemical characterization of *Bothrops lanceolatus* venom: a pathway to complement cascade activation. XI Congress of the Pan-

American Section of the International Society on Toxinology, and XII Congress of the Brazilian Society of Toxinology, Nov 3-8 2013.

DELAFONTAINE, M.; PAIXAO-CALVALCANTE, D.; PORTARO, F. C.; MATHIEU, L.; BLOMET, J.; TAMBOURGI, D. V. Immunochemical characterization of *Bothrops lanceolatus* venom: a pathway to complement cascade activation. XV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, Dec. 2013.