# LYGIA SAMARTIN GONÇALVES LUCHINI

Papel do Sistema Complemento no processo inflamatório causado por uma metaloproteinase de classe PI, do veneno da serpente *Bothrops pirajai*: Análise em modelo *ex vivo* de sangue total humano

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

> > São Paulo 2016

# LYGIA SAMARTIN GONÇALVES LUCHINI

Papel do Sistema Complemento no processo inflamatório causado por uma metaloproteinase de classe PI, do veneno da serpente *Bothrops pirajai*: Análise em modelo *ex vivo* de sangue total humano

> Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise V. Tambourgi

Versão Original

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 total

Luchini, Lygia Samartin Gonçalves.

Papel do sistema complemento no processo inflamatório causado por uma metaloproteinase de classe PI, do veneno da serpente *Bothrops pirajai*: análise em modelo *ex vivo* de sangue total humano / Lygia Samartin Gonçalves Luchini. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Processo inflamatório desencadeado por toxinas em modelo *ex vivo* de sangue total humano.

Versão do título para o inglês: Role of the complement system in the inflammatory process caused by a class PI metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom: analysis in the *ex vivo* model of human whole blood.

1. Sangue total humano 2. Inflamação 3. *Brothrops pirajai* 4. Metaloproteinase 5. Sistema complemento 6. Toxina I. Tambourgi, Profa. Dra. Denise Vilarinho II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB038/2016

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Lygia Samartin Gonçalves Luchini.
Título da Dissertação:	Papel do sistema complemento no processo inflamatório causado por uma metaloproteinase de classe PI, do veneno da serpente <i>Bothrops pirajai</i> : análise em modelo <i>ex vivo</i> de sangue total humano.
Orientador(a):	Profa. Dra. Denise Vilarinho Tambourgi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ....../....., considerou

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

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



#### 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) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 01 de outubro de 2013.

PARECER 1145/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na reunião realizada no dia 25.09.2013, APROVOU o projeto intitulado: "Papel do sistema complemento no processo inflamatório causado pelo veneno da serpente bothrops jararaca: análise em modelo ex-vivo de sangue humano tota/" das pesquisadoras LYGIA SAMARTIN GONÇALVES LUCHINI, DENISE V. TAMBOURGI.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final ), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. conforme modelo constante no <u>site.icb.usp.br.</u>

*Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.* 

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **25.09.2014**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A.ZANOTTO Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



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 04 nas fls. 15 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 "Papel do sistema complemento no processo inflamatório causado pelo veneno da serpente bothrops jararaca: análise em modelo ex-vivo de sangue humano total" do qual participam o(s) aluno(s) Lygia Samartin Gonçalves Luchini, 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 10.03.2014, com validade de 4 anos.

São Paulo, 12 de março de 2014.

1.14

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador-CEUA- ICB/USP

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

Ao meu amado vovô **Waldy** *(in memoriam)*, que tanto me ensinou e que estará para sempre em meu coração e em cada etapa da minha vida.

#### AGRADECIMENTOS

À Dra. Denise Tambourgi, muito obrigada pela orientação, apoio, e confiança depositada em mim nesses três anos de projeto. E obrigada por permitir que eu realizasse meu sonho de fazer mestrado dentro de um dos maiores institutos de pesquisa do país.

Aos queridos amigos e colegas do laboratório de Imunoquímica: Dra. Priscila Hess (Carni!) obrigada pela amizade eterna, carinho e apoio sempre, além das risadas e brincadeiras (como as do gelo seco e das bexigas de gás hélio). Dra. Carla Squaiella e Dra. Giselle Pidde, obrigada por estarem sempre dispostas a me ajudar em tudo que precisei, pela disposição em me ensinar, e pela companhia na copa para almoçar (ah, e Gi, pelas diversas conversas sobre tudo da vida).

Angela e Joel Megale (casal tão querido), obrigada aos dois pela amizade e conversas diárias, e Angies, pelas risadas também (jamais esquecerei quando arremessei aquele marimbondo em você – sem querer). Ao Felipe França, pelas horas tão divertidas no lab, pelas risadas e conversas sérias sobre imuno, papers e experimentos. À Marie Delafontaine, pela ajuda fundamental nos últimos experimentos, e pelos bate-papos também, principalmente na copa, na hora do almoço.

Às doutoras Ana Tung e Isadora Vilas Boas, obrigada pela companhia diária e ao Dr. Aurélio Pedroso, pelas piadas e risadas (e também pelo sangue doado para meus experimentos).

Aos amigos que não estão mais no laboratório, mas que levarei para toda a vida: Mariana Torrente (Nicinha), obrigada por ter me ensinado tanto e por me deixar ser sua aprendiz, pela amizade eterna, brincadeiras (com bexigas), por ter herdado sua bancada e pelas conversas sérias ou não (e sempre que vejo um iPhone, lembro de você). Caroline Cassero, obrigada pela confiança que você depositou em mim durante seu projeto, ajudá-la foi um aprendizado para mim. E obrigada por toda a ajuda que você me deu também, além da companhia e das conversas tão agradáveis (nunca vou esquecer seu amor por Harry Potter e "Naldo" Reis!). Jefferson de Souza ("Jegg", segundo os pesquisadores de Myanmar), obrigada pela amizade, risadas e companhia nos experimentos (e principalmente pelos bolos deliciosos da sua mãe!), sua alegria e cantoria deixavam nossos dias muito mais felizes.

Aos técnicos sempre dispostos a nos ajudar: Guilherme (obrigada pelas "pentelhices" tão divertidas), Osmair (obrigada pelos seus suportes com computador, login, email), Alécio, Marcinha, dna. Ana, Ricardo, Ana Claudia, a ajuda diária de vocês foi e será sempre fundamental.

Às queridas secretárias Lia e Elaine, sem vocês o laboratório não existe. Obrigada por toda

ajuda com as burocracias durante esses três anos, e Elaine, obrigada também pela companhia no almoço na copa.

Às enfermeiras do Hospital Vital Brasil, principalmente a Neide e a Cida, que sempre foram tão carinhosas comigo. Obrigada por toda atenção. E Neide, obrigada por querer me ajudar, doando seu sangue para minha pesquisa.

Ao professor Wilmar Dias da Silva, obrigada pelas conversas, dicas e conselhos. É uma honra conhecer o senhor e ter tido a chance de trabalhar com alguém com tanta experiência e conhecimento.

À Dra. Fernanda Portaro, obrigada pelas sugestões, pelas conversas e por toda ajuda que me deu nesses três anos. E principalmente pela colaboração na minha qualificação, que foi extremamente importante para o andamento do meu projeto.

Também agradeço a Dra. Angela Barbosa pela disponibilidade e sugestões na qualificação, que acrescentaram muito no meu trabalho.

E ao professor Anderson de Sá, que acompanhou todo meu desenvolvimento nesses anos, permitindo lá no início que eu acompanhasse suas aulas da graduação, para que eu pudesse prestar a prova de ingresso do mestrado, obrigada também por todas as dicas, sugestões e apoio durante esses anos e principalmente na minha qualificação.

Todos vocês tornaram meus dias mais felizes, e me ajudaram a chegar onde cheguei, mas não teria conseguido sem o apoio e a ajuda da minha família:

Mãe/mamys (Rosecler), minha base e exemplo de mulher, não seria capaz de colocar em palavras o quanto sou grata por TUDO que você fez por mim, desde quando nasci. Sempre acreditou em mim, me apoiou em tudo, e sacrificou muita coisa para poder me oferecer o melhor. Obrigada por ser minha melhor amiga, pelos conselhos, pelas orações, pelas broncas, e pelo amor incondicional. Se cheguei onde cheguei, foi graças à você que sempre esteve ao meu lado, me incentivando a ir atrás dos meus sonhos, e me ensinando valores que levarei para toda vida.

Vicensio, meu "paidrasto", um dos maiores presentes que minha mãe me deu. Obrigada por todo carinho que você tem por mim, pelas nossas conversas e pelo apoio que sempre me deu. Pelos conselhos sérios, e brincadeiras, e principalmente pelas orações.

Pai (Valdir), obrigada por sempre acreditar em mim e me incentivar em cada escolha. Por se orgulhar de cada conquista, e por me ajudar em tanta coisa, da melhor maneira que poderia. Obrigada por me ensinar a enfrentar tudo na vida de maneira leve e bem humorada (um dia eu chego no seu nível), por ser meu amigo desde sempre e anjo da guarda e pelo seu carinho e amor infinitos.

Rocheli, muito obrigada pela torcida e por toda ajuda que você já me deu. Você foi um dos primeiros tijolinhos que me ajudou a alcançar o sonho de fazer mestrado em um dos laboratórios do Instituto Butantan.

Vovó Dorothy e vovô Waldy (*in memoriam*), vocês foram e serão sempre meus exemplos. Obrigada pelos valores ensinados, pelos incentivos e pela torcida sempre. Vovó, meu maior exemplo de superação, seu amor e carinho foram essenciais para eu ser quem sou hoje. Vovô, não conseguiria escrever aqui tudo que o senhor me ensinou na vida, desde amar e cuidar das pequenas coisas até agir da maneira mais grandiosa. Incentivou minha curiosidade, me ajudou com meus "experimentos" malucos de criança, e até pouco tempo estava me ajudando a pensar nos dados do meu mestrado, me dando diversas dicas e sugestões. Obrigada pelo carinho, pelos cuidados, pela cumplicidade, conversas, e principalmente pelo amor.

À minha irmã (do coração) Thais Machado, obrigada pela amizade além da vida, pelo amor de irmã, pela preocupação e por estar sempre em minha defesa (rs), obviamente pela cumplicidade (principalmente durante a faculdade - rsrs) e por partilhar das mesmas ideias e sonhos, me incentivando e apoiando sempre.

Vocês são e serão sempre os maiores alicerces da minha vida. E um dos principais, que caminha ao meu lado há 8 anos, é o meu marido Igor (Linói), que é uma das minhas maiores inspirações, meu orgulho e minha base para conquistar meus sonhos. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me incentivando e me dando o conforto e carinho que me ajuda a enfrentar cada obstáculo. Obrigada pelo companheirismo, cumplicidade, por estar sempre me apoiando (mesmo nas maiores loucuras), por ser meu melhor amigo e professor em tantas horas (me dando broncas, conselhos e puxões de orelha), por compreender minhas maluquices e estresse (eu sei que não é fácil), e principalmente pelo carinho e amor eterno. A conquista desse sonho (dentre muitos outros que virão) devo à sua ajuda, confiança e incentivo.

E claro, não poderia deixar de agradecer a minha cachorrinha Penny, que deixou essa fase da minha vida tão mais emocionante e cheia de alegria. Fazendo-me relaxar e esquecer um pouco dos problemas simplesmente por existir e me fazer (de maneira "super sutil") brincar de bolinha com ela.

Obrigada a todos vocês que fizeram, fazem e farão para sempre parte da minha vida para sempre. Sem o apoio, amizade e carinho de cada um, nada disso seria possível. Vocês são incríveis!!

Trabalho realizado com o apoio financeiro:



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo





"Assim como uma pequena planta deve enfrentar muitos obstáculos antes de se transformar numa árvore, nós precisamos experimentar muitas dificuldades no caminho da felicidade absoluta" – Nitiren Daishonin

#### RESUMO

LUCHINI, L.S. G. Papel do Sistema Complemento no processo inflamatório causado por uma metaloproteinase de classe PI, do veneno da serpente *Bothrops pirajai*: Análise em modelo *ex vivo* de sangue total humano. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O gênero Bothrops, família Viperidae, compreende serpentes que são responsáveis por cerca de 80% dos envenenamentos no Brasil. O veneno das serpentes deste gênero é composto por uma mistura complexa de moléculas, contendo metalo e serinoproteinases, disintegrinas, fosfolipases, lectinas, peptídeos, entre outras. Os envenenamentos são caracterizados por efeitos locais proeminentes, incluindo edema, hemorragia e necrose, que podem levar a um dano permanente e, também, gerar manifestações sistêmicas, como coagulação intravascular, choque, falência renal aguda e hemorragia sistêmica. Estudos do nosso grupo mostraram que o veneno da Bothrops pirajai é capaz de ativar o sistema complemento, sugerindo que essa ativação possa contribuir para o agravamento dos sintomas observados nesses envenenamentos. Assim, considerando a importância do Sistema Complemento no processo inflamatório e o papel das metaloproteinases nos envenenamentos botrópicos, o objetivo deste estudo foi analisar a geração de fragmentos biologicamente ativos desse sistema, bem como a ativação de leucócitos induzidos pela metaloproteinase de classe PI, purificada do veneno de B. pirajai (PI-Bp), usando o modelo ex vivo de sangue total humano. Neste, células e mediadores plasmáticos estão presentes podendo interagir, o que permite uma melhor compreensão dos eventos inflamatórios sistêmicos induzidos por uma toxina. Os resultados mostraram que a PI-Bp foi capaz de promover aumento na expressão dos marcadores CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4 nos leucócitos. Além disso, o tratamento do sangue com a toxina promoveu a geração de anafilatoxinas e TCC no plasma. Foram também realizados ensaios com amostras de sangue total humano, tratadas com PBS (controle negativo), LPS (controle positivo) ou PI-Bp, na presença ou não da compstatina, um inibidor do componente C3 do Sistema Complemento. A inibição do componente C3 pela compstatina reduziu significativamente a geração de anafilatoxinas e TCC no plasma das amostras de sangue tratadas com a toxina, assim como a expressão dos marcadores de membrana relacionados ao Complemento, como CD11b, C3aR e C5aR nos leucócitos. A PI-Bp foi capaz de induzir aumento na produção das citocinas IL-10, IL-6, IL-1β e quimiocinas IL-8, MCP-1 e MIG, no modelo de sangue total humano. A adição de compstatina às reações, causou uma redução significativa na produção de IL-10, IL-1β, MCP-1 e IL-8, nas células tratadas com PI-Bp. Considerando estes resultados, pode-se concluir que a PI-Bp é capaz de ativar o Sistema Complemento, o que leva a um aumento do processo inflamatório. Os dados obtidos com o uso da compstatina sugerem que a inibição do Complemento possa controlar, de forma significativa, o processo inflamatório desencadeado pela toxina no modelo de sangue total humano.

Palavras-chave: Sangue total humano. Inflamação. Bothrops pirajai. Metaloproteinase. Sistema Complemento.

### ABSTRACT

LUCHINI, L. S. G. Role of the Complement System in the inflammatory process caused by a class P1 metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom: Analysis in the *ex vivo* model of human whole blood. 2016. 72 p. Masthers thesis (Immunology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

The genus Bothrops, Viperidae family, comprises snakes that are responsible for about 80% of the envenomations in Brazil. These venoms are composed by a complex mixture of molecules, such as metallo- and serine proteinases, desintegrins, phospholipases, lectins, peptides, among others. The local effects of the envenomations include edema, hemorrhage and necrosis, which can lead to permanent damage and produce systemic manifestations such as intravascular coagulation, shock, acute renal failure and systemic hemorrhage. Studies of our group have shown that the venom of Bothrops pirajai is able to activate the complement system (C), suggesting that this activation may contribute to the worsening of symptoms. Thus, considering the importance of Complement system in the inflammatory process and the role of metalloproteinases in Bothrops envenomations, the aim of this study was to analyze the generation of biologically active fragments from this system, as well as the leukocyte activation, induced by a class PI metalloproteinase purified from *B. pirajai*'s venom (PI-Bp), using the human whole blood model (ex vivo). In this model, cells and plasma mediators are present and are able to interact, which allows the better understanding of the systemic inflammatory events induced by a toxin. The results showed that PI-Bp was able to promote an increase in the expression of CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 and TLR4 markers in leukocytes. In addition, the blood treatment with this toxin promoted generation of anaphylatoxins and TCC in the plasma. Tests were also carried out with samples of human whole blood treated with PBS (negative control), LPS (positive control) or PI-BP, in the presence or absence of Compstatin, an inhibitor of C3 component from the Complement System. Inhibition of the component C3 by compstatin significantly reduced the production of anaphylatoxins and TCC in blood plasma treated with the toxin, as well as the expression of membrane markers related to complement, such as CD11b, C3aR and C5aR on leukocytes. PI-Bp was able to induce increased production of the cytokines IL-10, IL-6, IL-1ß and the chemokines IL-8, MCP-1 and MIG, in the human whole blood model. The addition of compstatin, to the reactions, caused a significant reduction in the production of IL-10, IL-1β, IL-8 MCP-1 and IL-8 in the cells treated with PI-Bp. Considering these results, it is possible to conclude that IP-Bp is able to activate the complement system, which leads to an increase in the inflammatory process. The data obtained with the use of compstatin indicate that Complement inhibition may significantly control the inflammatory process initiated by the toxin in the human whole blood model.

Keywords: Human whole blood. Inflammation. Bothrops pirajai. Metalloproteinase. Complement System.

# ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 – Representação das vias de ativação do sistema Complemento21
Figura 1 – Perfil cromatográfico do veneno bruto de <i>B. pirajai</i>
Figura 2 – Perfil eletroforético das frações do veneno bruto de <i>B. pirajai</i>
Figura 3 – Perfil cromatográfico da fração 2 repurificada a partir do veneno bruto de B.
pirajai36
Figura 4 - Perfil eletroforético das sub-frações provenientes da repurificação da fração 2 do
veneno bruto
Figura 5 – Atividade proteolítica das frações do veneno de <i>B. pirajai</i>
Figura 6 – A análise do pool formado pelas frações Fr2-2 e Fr2-3, por espectrometria de
massas
Figura 7 – Níveis de C3a/C3a-desArg e C5a/C5a-desArg no plasma humano, após os
tratamentos experimentais
Figura 8 – Níveis plasmáticos de SC5b-9 após os tratamentos experimentais
Figura 9 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana em linfócitos 44
Figura 10 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana em monócitos
Figura 11 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana de granulócitos
Figura 12 – Níveis de C3a/C3a-desArg e C5a/C5a-desArg no plasma após os tratamentos
experimentais
Figura 13 – Níveis plasmáticos de SC5b-9 após os tratamentos experimentais
Figura 14 – Ação da PI-Bp, em modelo de sangue total humano, na presença ou ausência da
compstatina: expressão dos marcadores de membrana de linfócitos
Figura 15 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana em monócitos $52$
Figura 16 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana de granulócitos
Figura 17 – Níveis de citocinas pró-inflamatórias, no plasma, após os tratamentos
experimentais
Figura 18 – Níveis de quimiocinas, no plasma, após os tratamentos experimentais

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Sistema Complemento: vias de ativação	18
1.2	Interação de venenos animais com o Sistema Complemento	21
1.3	Metaloproteinases dos venenos de serpentes	23
1.4	Modelo de sangue total humano	24
2	OBJETIVOS	
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Veneno e toxinas	27
3.2	Purificação da metaloproteinase de classe P1 do veneno de <i>B. pirajai</i>	27
3.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e gel de gradiente	27
3.4	Atividade proteolítica	28
3.5	Espectrometria de massas	28
3.6	Ensaio de Coagulação	29
3.7	Modelo de sangue total humano	29
3.8	Tratamento do sangue com compstatina ou peptídeo controle	30
3.9	Dosagem de anafilatoxinas	30
3.10	Dosagem de TCC	31
3.11	Análise da expressão de marcadores de superfície em leucócitos	31
3.12	Quantificação de citocinas inflamatórias	32
3.13	Quantificação de quimiocinas	32
3.14	Análise estatística	33

4	RESULTADOS
4.1	Purificação do veneno de <i>B. pirajai –</i> Cromatografia (FPLC)
4.1.1 molec	Fase 1 da purificação do veneno da serpente B. pirajai por cromatografia de exclusão cular
4.1.2	Perfil eletroforético (SDS-Page) das frações obtidas na fase 1
4.1.3	Fase 2 da purificação do veneno da B. pirajai pela coluna Superdex 75
4.1.4	Perfil eletroforético das frações obtidas na fase 2
4.2	Análise da Atividade Proteolítica das frações repurificadas
4.3 reput	Ensaio de coagulação, usando o modelo de sangue total humano e as frações rificadas
4.4 espec	Identidade proteica da fração Fr2-2/3 (pool das frações Fr2-2 e Fr2-3) por trometria de massas
4.5 com a	Dosagem das anafilatoxinas, C3a e C5a, no sangue total humano, após tratamento a PI-Bp41
4.6	Dosagem de SC5b-9, no sangue total humano, após tratamento com a PI-Bp43
4.7 com a	Análise da expressão de marcadores de superfície de leucócitos, após tratamento a PI-Bp44
4.7.1	Expressão dos marcadores em linfócitos44
4.7.2	Expressão dos marcadores em monócitos45
4.7.3	Expressão dos marcadores em granulócitos46
4.8 com ]	Dosagem das anafilatoxinas, C3a e C5a, no sangue total humano, após tratamento PI-Bp, na presença ou ausência da compstatina/peptídeo controle47
4.9 prese	Dosagem de SC5b-9, no sangue total humano, após tratamento com PI-Bp, na nça ou ausência da compstatina/peptídeo controle49
4.10	Análise da expressão de marcadores de superfície de leucócitos, no modelo de

4.10.1	Expressão dos marcadores em linfócitos	50
4.10.2	Expressão dos marcadores em monócitos	52
4.10.3	Expressão dos marcadores em granulócitos	53

5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	63
REFE	CRÊNCIAS <sup>*</sup>	64

# 1 INTRODUÇÃO

# 1.1 Sistema Complemento: vias de ativação

O Sistema Complemento (C) é um importante componente do sistema imune, atuando como a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e células hospedeiras. Age principalmente no plasma, nos tecidos ou nas células, sendo composto por mais de 30 proteínas, algumas solúveis no plasma e em outros fluidos biológicos, e outras ligadas às membranas de células sanguíneas e de outros tecidos (KOLEV et al., 2014; MERLE et al., 2015a). A ativação desse sistema pode ocorrer por três vias distintas, mas relacionadas, denominadas via clássica (VC), via alternativa (VA) e via das lectinas (VL), que envolvem uma complexa cascata de eventos de alteração conformacional e clivagem proteolítica, geradoras de moléculas biologicamente ativas. A ativação do C resulta em fenômenos pró-inflamatórios e citolíticos.

A ativação das vias alternativa e das lectinas é usualmente desencadeada na ausência de anticorpos e parecem ter um importante papel na resistência a patógenos invasores em hospedeiros não-imunes. Por outro lado, a via clássica requer para sua ativação, de uma forma geral, a presença de anticorpos específicos (MERLE et al., 2015a).

A VA é iniciada pela deposição de algumas moléculas de C3 modificadas (C3-H<sub>2</sub>O), pela hidrólise de seus grupamentos tioéster, em superfícies de células ou moléculas. A interação de C3-H<sub>2</sub>O com o fator B ocorre na presença de íons Mg<sup>2+</sup>. Esse fator, após interação com C3b ou C3-H<sub>2</sub>O, sofre uma mudança conformacional que permite a exposição de um sítio críptico reconhecido por uma serinoprotease, o fator D (DAVIS et al., 1979; MERLE et al. 2015a, TURNER, 1996). A referida enzima cliva o fator B em dois fragmentos, Ba - que é liberado -, e Bb, que se mantém associado ao complexo. O complexo C3-H<sub>2</sub>O-Bb é denominado C3 convertase de iniciação da via alternativa e age sobre novas moléculas de C3 clivando-as em C3a e C3b (DUNKELBERGER; SONG, 2010). A ativação da via é amplificada pela interação do fator B, através de íons Mg<sup>2+</sup>, com novas moléculas de C3b - covalentemente associadas aos aceptores -, seguida da clivagem de B por ação do fator D. O complexo resultante, C3bBb, denominado C3 convertase de amplificação da VA, cliva novas moléculas de C3 em C3a e C3b. O complexo C3bBb é bastante instável (FISHELSON; MÜLLER-EBERHARD, 1982, 1984; MERLE et al., 2015b), e o decaimento dessa enzima,

que ocorre por dissociação do fragmento Bb, é reduzido pela ação da properdina (P), estabilizadora do complexo (DISCIPIO, 1981a). A interação de novas moléculas de C3b ao complexo pré-existente C3bBbP resulta na formação de uma nova enzima, C3b<sub>(n)</sub>BbP, denominada C5 convertase da VA, a qual cliva o componente C5 em C5a e C5b (DISCIPIO, 1981b; DUNKELBERGER; SONG, 2010).

A ativação da via clássica do Sistema Complemento é iniciada pela ligação da proteína C1 do complemento aos anticorpos IgG ou IgM, associados aos antígenos específicos. A interação do anticorpo com o antígeno expõe um sitio de ligação no anticorpo que se liga ao componente C1 (MEREGA et al., 2015), que é um complexo proteico composto pelas subunidades C1q, C1r e C1s. A subunidade C1q interage com a região Fc das imunoglobulinas sendo que cada molécula de C1q deve se ligar, pelo menos, às porções Fc de duas moléculas de IgG. Tais interações dão origem a uma série de eventos intramoleculares, que culminam com a ativação enzimática de C1r associado, o qual cliva e ativa C1s, que por sua vez cliva a proteína seguinte da cascata, o C4 (SCHUMAKER et al., 1987; SONG, 2012). Quando clivado, o C4 gera um fragmento menor, C4a (anafilatoxina) que é liberado para a corrente sanguínea, e um maior, o C4b, que se liga a receptores presentes em superfícies celulares ou moléculas, através de ligações covalentes - como pontes amida ou éster (GORSKI et al., 1979; SONG, 2012; TACK, 1983). O fragmento C4b apresenta o sítio de ligação para o componente C2 e esta interação ocorre por meio de íons Mg<sup>2+</sup>. O C2 é clivado por ação de C1 em C2a e C2b, sendo que C2a se mantém associado ao C4b (KERR, 1981; KOLEV et al., 2014; NAGASAWA; STROUD, 1977; OGLESBY et al., 1988). O complexo C4b2a, denominado C3 convertase, possui atividade de serinoprotease e é capaz de clivar o componente C3. Durante a clivagem de C3, por ação da enzima C3 convertase, são gerados dois fragmentos: C3a (anafilatoxina) e C3b (DIAS da SILVA et al., 1967; MERLE et al., 2015a; TACK et al., 1979). A depleção de C3a da molécula de C3 leva a um rearranjo complexo na estrutura terciária da molécula remanescente, ou seja, o C3b, o que permite a exposição e a ativação do grupamento tioéster (ISENMAN; COOPER, 1981; TACK, 1983). Esse grupamento instável pode, então, estabelecer ligações covalentes com grupos doadores de elétrons, presentes na molécula aceptora de C3 - como com os radicais hidroxila, formando pontes éster, ou com grupos amina, formando pontes amida (LAW; LEVINE, 1977). Uma vez ligado ao seu receptor, o C3b pode se associar ao complexo C4b2a, formando a C5 convertase, enzima capaz de agir sobre o componente C5 clivando-o em C5a (anafilatoxina) e C5b.

A proteína MBL (lectina ligante de manose) foi a primeira proteína descrita como sendo capaz de iniciar a via das lectinas do sistema Complemento (KJAER et al., 2013), e é a molécula alvo melhor caracterizada dessa via, capaz de reconhecer carboidratos. A MBL apresenta estrutura similar a C1q, porém pode apresentar múltiplas formas oligoméricas, como trimeros ou tetrâmeros. Apesar da semelhança entre os complexos C1 e MBL/MASP, o mecanismo de ativação da via das lectinas é diferente do da via clássica. Enquanto o complexo C1 na via clássica, carrega tanto C1r quanto C1s juntos, na via das lectinas a maioria das moléculas de MBL presentes no plasma está associada com apenas um homodímero de MASP 1 ou de MASP 2 (MERLE et al., 2015a). As proteínas MASP 1 e MASP 2 atuam como C1r e C1s, respectivamente. Em condições fisiológicas a MASP 1 é usada na ativação de MASP 2, e ambas proteases ativadas são capazes de clivar o componente C2 da cascata do complemento, enquanto MASP 2 ativada pode clivar também C4, formando uma C3 convertase e dando sequência a cascata de ativação do complemento. Tanto MASP 1 quanto MASP 2 podem se retroativar, conferindo a ambas papel essencial na ativação da via das lectinas (MERLE et al., 2015a). De acordo com Zhang et al. (2006), no modelo analisado de isquemia/reperfusão intestinal, existe uma interação natural entre IgM e MBL, que leva à ativação da via das lectinas, sem a presença de manose, indicando que esta via também pode ser ativada, indiretamente, por um anticorpo.

O processo de formação do complexo lítico do Complemento, C5b-C9, é idêntico nas três vias de ativação: a via clássica, alternativa e das lectinas; e envolve uma associação sequencial de alta afinidade dos componentes C5b, C6, C7, C8 e C9. Esses componentes associados formam um complexo macromolecular anfifílico, denominado complexo de ataque à membrana (MAC), que é capaz de se inserir em membranas celulares. Tal complexo, inserido no interior da bicamada lipídica, é organizado na forma de um canal, o que permite a livre passagem de íons, de pequenas moléculas e de H<sub>2</sub>O, gerando uma alteração osmótica com subsequente lise celular (BRADKIL; TRANUM-JENSEN, 1991; MERLE et al., 2015a; PODACK E TSCHOPP, 1984).



Esquema 1: Representação das vias de ativação do sistema Complemento

# 1.2 Interação de venenos animais com o Sistema Complemento

Os venenos animais podem desencadear seus efeitos danosos através de um único componente ou pela ação em concerto de vários fatores, incluindo fosfolipases, neurotoxinas, cardiotoxinas e enzimas proteolíticas (MANDELBAUM; ASSAKURA, 1988; SILVA et al., 1967; STOCKER; BARLOW, 1976), potencialmente capazes de agir sobre componentes dos tecidos ou sobre o plasma. As reações locais e sistêmicas induzidas pelos venenos animais envolvem, frequentemente, a interação com o Sistema Complemento (C) (MÜLLER-EBERHARD, 1988) e da cascata da coagulação (BERNARDES et al., 2013; MENALDO et al., 2013; SANTORO; SANO-MARTINS, 1993).

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, as mais complexas dentre os venenos animais, contendo vinte ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do peso seco do veneno é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas. As frações não-protéicas são representadas por carboidratos, lipídios, metais (frequentemente associados à glicoproteínas e proteases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (SAAD et al., 2012).

Os estudos pioneiros sobre a interação de venenos com o Sistema Complemento foram realizados utilizando-se venenos de serpentes do gênero *Naja*. Destes venenos foi isolado uma glicoproteína de 144 kDa, denominada "Cobra Venom Factor" (CVF), com mobilidade eletroforética, em pH 8.6, comparável a das β-globulinas do soro de mamíferos (MÜLLER-EBERHARD; FJELLSTRÖM, 1971; OSIPOV et al., 2005). Essa proteína exibe algumas similaridades estruturais e reatividade antigênica cruzada com o C3 humano (ALPER; BALAVITCH, 1976; EGGERTSEN et al., 1983). Não exerce ação enzimática sobre esse componente, mas combina-se com fator B formando o complexo CVFB (GÖTZE; MÜLLER-EBERHARD, 1971), que se transforma numa enzima ativa, CVFBb, funcionalmente análoga às C3 convertases. O complexo CVFBb, capaz de clivar C3 e C5 *in vitro* e *in vivo*, é resistente a inativação por ação dos fatores regulatórios do Complemento. Assim, a ação contínua do complexo CVFBb sobre C3 é responsável pela depleção de C3 e dos componentes da etapa terminal da cascata do Complemento (VOGEL; MÜLLER-EBERHARD, 1982).

Recentemente, Tanaka e colaboradores (2012) demonstraram que os venenos de oito serpentes do gênero *Micrurus*, que ocorrem no Brasil, são capazes de interferir, de maneira distinta, com as vias de ativação do Sistema Complemento, promovendo a geração de quantidades significativas de anafilatoxinas, as quais podem contribuir na injúria causada pelos venenos de corais em acidentes humanos.

No contexto dos acidentes ofídicos que ocorrem no país, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 80% dos casos, distribuídos por todo o território nacional. Os venenos dessas serpentes são misturas bastante complexas de proteínas com diferentes propriedades tóxicas ou enzimáticas. Dentre as várias enzimas encontradas nestes venenos, destacam-se as metalo- e serinoproteinases que podem atuar em diversas funções fisiológicas e causar a patologia local e sistêmica (KINI, 2006).

As metaloproteinases estão entre as enzimas proteolíticas mais abundantes nos venenos de viperídeos (FOX; SERRANO, 2008). Algumas destas enzimas são chamadas de hemorraginas e estão envolvidas nos diversos processos decorrentes do envenenamento, como a dermonecrose, degradação de fatores da cascata de coagulação sanguínea, edema e hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2005; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Pidde-Queiroz e colaboradores (2010), estudando venenos de 19 serpentes do gênero *Bothrops*, que ocorrem no Brasil, mostraram que estes são capazes de ativar a via Clássica do Sistema Complemento, na ausência de anticorpos sensibilizantes. Alguns dos venenos deste gênero também podem ativar as outras vias do Sistema (a Via Alternativa e a Via das Lectinas). Foi observado que as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a estavam presentes no soro humano tratado com esses venenos, devido à ativação do Complemento. Tais anafilatoxinas foram também geradas pela clivagem direta dos componentes do sistema por ação das enzimas proteolíticas destes venenos. Inibidores de metalo- e de serinoproteinases impediram a clivagem de C3 e C4 por ação dos venenos do gênero *Bothrops*, indicando que tais classes de enzimas atuam sobre o Sistema Complemento (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010, 2013).

# 1.3 Metaloproteinases dos venenos de serpentes

Diversos componentes dos venenos de *Bothrops* já foram isolados, como serino e metaloproteinases, fosfolipases A2, hialuronidase, entre outros (KINI, 2006). As proteases correspondem a mais de 90% do peso seco desses venenos, sendo que análises transcriptômicas da glândula de veneno mostraram que 30 % e 8% do total de transcritos correspondiam a metalo- e serinoproteinases, respectivamente (ZELANIS et al., 2012). Essas enzimas, por apresentarem sequências diversificadas de aminoácidos, exercem atividades fisiológicas diferentes, relacionadas aos efeitos locais ou sistêmicos dos envenenamentos.

As metaloproteinases dos venenos de serpentes (SVMPs) estão entre as enzimas que mais contribuem para a alta toxicidade desses venenos. As SVMPs incluem enzimas responsáveis pela clivagem de importantes proteínas dos tecidos, como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV, e proteoglicanas, presentes na membrana endotelial (FOX; SERRANO, 2008). Assim como a metaloproteinase PI isolada do veneno de *Bothrops asper* (Ba PI) que foi capaz de ativar o Sistema Complemento (FARSKY et al., 2000), Pidde-Queiroz e colaboradores (2013) demonstraram que a metaloproteinase PI isolada do veneno de *Bothrops pirajai* também era capaz de ativar o sistema Complemento (C) em soro humano normal (SHN), pela clivagem direta dos componentes centrais da cascata do C, gerando fragmentos biologicamente ativos, como as anafilatoxinas, e também pela clivagem de C1-Inh, inibidor do componente C1 da cascata do Complemento, afetando o controle da ativação desse sistema.

A análise proteômica do veneno de *Bothrops pirajai* mostrou que cerca de 20% de sua composição protéica, correspondem as metaloproteinase, sendo que as de classe PI correspondem a cerca de 50% de todas as metaloproteinases desse veneno (BERNARDES et

al., 2015).

A metaloproteinase PI da *B. pirajai* apresenta baixa atividade hemorrágica, sendo capaz de clivar tanto as cadeias  $\alpha \in \beta$  de fibrinogênio, quanto degradar fibrina e coágulos de sangue *in vitro* (BERNARDES et al., 2013). A metaloproteinase PI de *B. pirajai*, purificada por Bernardes et al. (2015), também mostrou efeitos nos componentes da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*.

# 1.4 Modelo de sangue total humano

O modelo de sangue total humano vem sendo utilizado em diversos estudos sobre os mecanismos inflamatórios, dentre eles, processos desencadeados por microorganismos ou suas toxinas purificadas, e têm contribuído para o entendimento dos mecanismos moleculares operantes nas inflamações sistêmicas.

Esse modelo também é importante para explorar as reações iniciais em transplantes, mostrando-se relevante para avaliar intervenções farmacológicas e evitar a rejeição do enxerto (Hardstedt et al., 2015). Outra aplicação do modelo de sangue total humano foi reportada por Hamza e Irimia (2015) em estudo de quimiotaxia de neutrófilos mediante a um estimulo microbiano.

Algumas estratégias para inibição da ativação dos leucócitos, no processo inflamatório sistêmico, também foram exploradas usando o modelo de sangue total humano. Brekke e colaboradores (2008) mostraram que a combinação de inibidores de Complemento, como a compstatina, um inibidor de C3 (MORIKIS et al., 1998), e de anticorpos anti-C5a e anti-C5aR, com anticorpos anti-CD14, podiam induzir bloqueio da resposta inflamatória desencadeada por *E. coli*. Christiansen e colaboradores (2012) mostraram que a combinação da inibição de CD14 e do Sistema Complemento diminuía a produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas no plasma após estimulação com LPS ou *E. coli*. Esse conjunto de resultados mostrou que a combinação de inibidores de Complemento e anti-CD14 no sangue pode ter potencial terapêutico para o tratamento de inflamações sistêmicas como, por exemplo, o choque séptico.

A principal importância desse modelo é poder analisar a interação entre os componentes do sangue, de maneira sistêmica, e não isoladamente como em cultura celular,

ou com a influência de outros fatores envolvidos nos experimentos *in vivo*, como hormônios, estresse, ambiente, entre outros.

Com base nas informações obtidas na literatura sobre a importância desse modelo, principalmente na análise de processos inflamatórios sistêmicos, tal modelo foi por nós utilizado no estudo do envenenamento por toxinas botrópicas, no intuito de compreender o processo inflamatório desencadeado, e possíveis intervenções para modular este processo. Para tanto, foi utilizado um anticoagulante análogo a hirudina, a lepirudina (Refludan<sup>®</sup>), que é incapaz de afetar a cascata do complemento, agindo diretamente como inibidor específico da trombina (CHANG, 1983; MOLLNES et al., 2002).

# **OBJETIVOS**

Para melhor compreender o papel do Sistema Complemento na gênese das reações inflamatórias desencadeadas por toxinas de serpentes do gênero *Bothrops*, o presente projeto teve como objetivo analisar a ação de uma metaloproteinase de classe PI da serpente *B. pirajai* (PI-Bp) sobre o Sistema Complemento, bem como de receptores de superfície celular envolvidos na resposta imune inata, usando o modelo de sangue total humano proposto por Mollnes e colaboradores (2002).

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Veneno e toxinas

O veneno da serpente *Bothrops pirajai* foi fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan na forma liofilizada e mantido a -20° C. A determinação do conteúdo proteico do veneno foi realizada pelo método de BCA (*Protein Assay Kit*, Pierce Biotechnology Inc., EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração das amostras de veneno foi ajustada para 1 mg/ml, com solução salina estéril, sendo aliquotadas e estocadas a -80 °C, até o momento do uso.

# 3.2 Purificação da metaloproteinase de classe P1 do veneno de B. pirajai

O veneno bruto de *B. pirajai* (20 mg) foi aplicado no sistema FPLC-GP-250 PLUS, usando a coluna de exclusão molecular (Superose 12 10/300 GL, GE Life Sciences, EUA), equilibrada com tampão 0,05 M de bicarbonato de amônio, pH 7,8. As frações eluídas foram coletadas com fluxo de 30 ml/h, e liofilizadas. As frações selecionadas nesta primeira fase passaram pela segunda etapa de purificação, utilizando a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Life Sciences, EUA), com o mesmo tampão e fluxo, sendo também liofilizadas na sequência. Nas duas etapas, as frações foram monitoradas pela leitura da absorbância (em  $\lambda$  214 e 280 nm). Todas as amostras foram analisadas quanto a concentração proteica, pelo método de BCA, e o perfil eletroforético, em géis de SDS-PAGE.

A presença de Lipopolissacarídeo (LPS), nas frações ativas do veneno de *B. pirajai* (PI-Bj), foi analisada pelo método de LAL (Limulus amebocyte lisate) e realizada pela Seção de Controle Microbiológico (Serviço de controle de qualidade, Divisão Bioindustrial) do Instituto Butantan, com a utilização do Kit PYROGENT<sup>™</sup> Plus Gel Clot LAL Assays (Lonza, MD, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração de endotoxina (LPS) determinada, a partir de uma curva padrão de endotoxina de *E. coli* (concentrações de 2,5 a 0,125 UE/mL), foi inferior ao limite de sensibilidade do teste, ou seja, 0,125 UE/mL.

#### 3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e gel de gradiente

Os perfis eletroforéticos do veneno e das frações do veneno de *B. pirajai* foram determinados 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, Califórnia, EUA). A corrida eletroforética foi efetuada sob corrente de 110 V, por 2 horas e 30 minutos em tampão Tris-Glicina. Para a estimativa da massa molecular dos componentes das amostras, foi utilizado um padrão de massa molecular relativa, contendo componentes proteicos précorados, com peso molecular (MW) entre 6 a 180 kDa (BenchMark Pre Stained Protein Ladder – Invitrogen Corp. Califórnia, EUA). As proteínas presentes nas amostras foram reveladas pela impregnação por nitrato de prata (MORRISSEY, 1981). O perfil das amostras foi também determinado em géis de gradiente de 8-16% (BD Biosciences, Califórnia, EUA), sendo a corrida eletroforética efetuada sob corrente de 150 V, por 2 horas em tampão Tris-Glicina.

## 3.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica, do veneno e das frações de *B. pirajai*, foi avaliada em ensaios utilizando o substrato peptídico de fluorescência apagada (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer). Para tanto, o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp foi dissolvido em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, diluído 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 das frações (1,0 µg) foram incubadas com amostras do peptídeo (5,0 µM) em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), utilizando placas de 96 poços. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termo-estabilizado, sob agitação (ARAÚJO et al., 2000). A reação foi medida por fluorescência ( $\lambda_{em} = 420$  nm and  $\lambda_{ex} = 320$  nm) em espectrofotômetro (FLUOstar OPTIMA Multi-Mode Microplate Reader – BMG LABTECH, Offenburg, Alemanha). O aumento da fluorescência foi monitorado, continuamente, por 10 minutos e a atividade proteolítica específica das amostras expressa pela média de unidades de fluorescência por minuto (UF/min).

# 3.5 Espectrometria de massas

A análise da identidade da fração isolada do veneno de *B. pirajai* foi realizada pelo setor de espectrometria de massas do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, como descrito por Pidde Queiroz et al., 2013. Para tanto, uma amostra contendo 5  $\mu$ g (30  $\mu$ l) da proteína purificada foi ressuspendida em 50  $\mu$ l de uma solução contendo Tris-

HCl (20 mM), EDTA (2 mM), uréia (7 M) e DTT (5 mM). Em seguida, 20 µl de DTT (5 mM, ressuspendido em 25 mM de bicarbonato de amônio) foi adicionado. Na sequência, a amostra foi incubada durante 1 hora, a 60 °C. Após a incubação, 20 µl de IAA (55 mM, ressuspendido em 25 mM de bicarbonato de amônio) foram adicionados e o material foi novamente incubado durante 1 hora, a temperatura ambiente e no escuro. Por último, adicionou-se 30 µl de tripsina (40 ng por µl, ressuspendida em 50 mM de bicarbonato de amônio) e 30 µl de bicarbonato de amônio (50 mM) na amostra, sendo novamente incubada a 37 °C, durante 12 horas. Após esse período, a amostra foi seca e preparada para ser analisada através da cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, utilizando um sistema UFLC binário (20A Prominence, Shimadzu Co., Japão) acoplado ao ESI-IT-TOF. A amostra foi ressuspendida em água / 0,1% Ácido Acético e analisada em uma coluna C18 (Discovery C18, 5 µm, 50 mm x 2.1 mm), tendo como solventes (A) Ácido Acético / água (1:999) e (B) Ácido Acético / ACN / água (1:900:99). Por meio de um fluxo constante de 0,2 ml/min, o gradiente variou de 5 a 70% de solvente B, durante 35 minutos, a 37 °C, e monitorado a 214 nm por um detector Shimadzu SPD-M20A PDA. Logo após a etapa cromatográfica, foram realizadas as análises por espectrometria de massas, de acordo com os seguintes parâmetros: voltagem utilizada da interface foi de 4,5 KV e voltagem do detector, 1,76 KV, com temperatura de 200 °C; a fragmentação foi causada por gás de colisão argônio, com 50% de energia, e os espectros foram obtidos na faixa de 50 a 2000 m/z. O padrão de fragmentação para cada amostra foi processado pelo programa MASCOT (Ion Search) versão in house (SCIANI et al., 2010) para análises proteômicas e/ou pelo Peaks Studio V7 para sequenciamento e análises proteômicas e de comparação de sequências.

# 3.6 Ensaio de Coagulação

Para o ensaio de coagulação, foi utilizado o volume total de 1 ml, sendo 720 µl de sangue contendo lepirudina, (forma recombinante da hirudina capaz de inibir trombina, sem interferir com a cascata do Complemento), 140 µl de PBS e 140 µl de PBS contendo a toxina purificada. As amostras foram incubadas a 37 °C, sob agitação e por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram analisadas visualmente para a presença ou não de coágulos.

### **3.7** Modelo de sangue total humano

Os ensaios utilizando o modelo de sangue total humano foram desenvolvidos segundo os protocolos estabelecidos por Mollnes e colaboradores (2002) e Brekke e colaboradores (2007, 2008). O sangue foi coletado de 3 voluntários saudáveis, em tubos de polipropileno contendo lepirudina (50 µg por ml de sangue) (Refludan<sup>®</sup>, Celgene, Munique, Alemanha). A lepirudina é uma forma recombinante da hirudina, que apresenta atividade anticoagulante, não interferindo na ativação do Sistema Complemento (MOLLNES et al., 2002). Para o ensaio, foi utilizado o volume total de 1 ml, sendo 720 µl de sangue, 140 µl de PBS e 140 µl de PBS contendo ou não toxina purificada ou LPS (50 µg/µl – diluído em água milli-Q) (Lipopolisacarideo de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). As amostras foram incubadas a 37 °C, por 30 minutos, sob agitação. Após a incubação, foi coletada uma alíquota de 500 µl para análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo. O material restante foi centrifugado a 405 g e a 4 °C, por 10 minutos, para obtenção do plasma. Após essa etapa, foi adicionado ao plasma EDTA (concentração final 10 mM), e este foi aliquotado, sendo as amostras armazenadas a -80 °C.

# 3.8 Tratamento do sangue com compstatina ou peptídeo controle

Amostras de sangue, sangue (720 µl) foram tratadas com 200 µM do inibidor de C3, a compstatina (ICVVQDWGHHRCT – Tocris Biosciences, Minneapolis, EUA), ou com seu peptídeo controle (IAVVQDWGHHRAT – Tocris Biosciences, Minneapolis, EUA) (MOLLNES et al., 2013), e incubadas a 37 °C por 30 minutos. Na sequência as amostras foram tratadas com PI-Bp, PBS (controle negativo) ou LPS (controle positivo), por 30 minutos, sob agitação. Após a incubação, foram coletadas alíquotas de 500 µl de cada amostra para análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo. O material restante foi centrifugado a 405 g e a 4 °C, por 10 minutos, para obtenção do plasma. Após essa etapa, foi adicionado ao plasma EDTA (concentração final 10 mM), e este foi aliquotado, sendo as amostras armazenadas a -80° C.

# 3.9 Dosagem de anafilatoxinas

A presença de C3a/C3a-desArg e C5a/C5a-desArg no plasma foi determinada com o kit *OptEIA Human C3a, C5a ELISA* (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Para tanto, amostras de plasma (50 µl) foram diluídas (C3a, 1:5000; C5a, 1:25) e adicionadas às placas de poliestireno de 96 poços (Costar®, Corning Inc., Massachusetts, EUA), já preparadas com o anticorpo de captura. Conforme as instruções do kit, curvas padrão com concentrações conhecidas das anafilatoxinas, C3a e C5a, foram também preparadas e adicionadas aos poços

da placa. As placas foram incubadas no escuro e a temperatura ambiente, por 2 horas e, em seguida, lavadas com 200 µl do *wash buffer*, fornecido pelo kit. Após a lavagem, foram adicionados 100 µl de solução contendo o anticorpo de detecção conjugado com estreptavidina-HRP e as placas foram incubadas por mais 1 hora. Após esse período, 50 µL do substrato tetrametilbenzamidina (TMB, BD Biosciences, Califórnia, EUA) foram adicionados aos poços para revelação, sendo as placas incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Finalizada a incubação, as amostras receberam 50 µL de solução STOP do kit. Os resultados das reações foram analisados em espectrofotômetro pela leitura da absorbância a  $\lambda$  450 nm (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia).

# 3.10 Dosagem de TCC

A presença do complexo terminal do complemento (TCC) no plasma foi analisada com o kit *MicroVue SC5b-9 Plus EIA Kit* (Quidel Corporation, Califórnia, EUA). As amostras do plasma foram diluídas na proporção de 1:25, no *Specimen Diluent*, fornecido pelo kit, e adicionadas às placas de poliestireno de 96 poços (Costar<sup>®</sup>, Corning Inc., Massachusetts, EUA), já preparadas com anticorpo de captura. A curva padrão com as concentrações já definidas de SC5b-9 também foi preparada e adicionada às placas, que foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com a solução de lavagem e aos poços adicionados 50 µL de *SC5b-9 Plus Conjugated*. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi feita mais uma lavagem e 100 µL do substrato foram adicionados a cada poço. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, os poços receberam 100 µL da solução ácida. Os resultados foram analisados em espectrofotômetro pela leitura da absorbância a  $\lambda$  450 nm (Multiskan EX, Labsystems, Helsinki, Finlândia).

#### 3.11 Análise da expressão de marcadores de superfície em leucócitos

As amostras, submetidas aos tratamentos acima descritos, foram analisadas quanto a expressão dos marcadores CD11b, CD14, C5aR, C3aR, TLR2 e TLR4 na superfície dos leucócitos, marcados com anticorpos específicos para as populações de linfócitos (CD3 e CD19), monócitos (CD33) e granulócitos (CD66b). Para tanto, após tratamento do sangue, as hemácias foram lisadas com tampão de lise BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Na sequência, as células foram centrifugadas a 405 g a 4 °C, por 10 minutos, ressuspendidas e fixadas em paraformaldeído 0,5%, na proporção 1:1, e marcadas

com anticorpos monoclonais da BD Biosciences (Califórnia, EUA) ou eBioscience (Califórnia, EUA), diluídos na proporção 1:5: anti-CD11b PE (clone VIM12), anti-CD14 FITC (clones 61D3 e TüK4) e anti-CD33 APC; 1:10: anti-C5aR FITC (clone 8D6), anti-C3aR PE (clone 17), anti-TLR2 PE (clone TL2.1) e anti-TLR4 PE (clone HTA125); e 1:20: CD3 APC-Cy7, CD19 PE-Cy7 e CD66b Alexa647. Foram utilizados também como controle isotípico, os anticorpos monoclonais *mouse* IgG1<sub>k</sub> PE, *mouse* IgG2a<sub>k</sub> FITC e *mouse* IgG PercP (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Após 30 minutos de incubação no escuro e a temperatura ambiente, foram adicionados 275  $\mu$ l de tampão de FACS e, após mais 30 minutos de incubação no escuro, a 4 °C, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Califórnia, EUA), utilizando o software BD FACSDiVa, versão 4.1 (BD Bioscience, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como mediana de intensidade de fluorescência, determinada a partir da aquisição de 20 mil eventos.

#### 3.12 Quantificação de citocinas inflamatórias

A presença das citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$  no plasma foi determinada com o kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines* (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Para tanto, amostras de plasma puro (25 µl) foram adicionadas aos tubos de FACS, já contendo *beads* para cada citocina e o tampão, e incubadas durante 30 minutos. Conforme as instruções do kit, curvas padrão com as concentrações conhecidas das citocinas foram também preparadas e adicionadas a outros tubos de FACS. Os tubos foram incubados no escuro e à temperatura ambiente, por 1 hora e 30 minutos e, em seguida, lavados com 500 µl do tampão de lavagem, fornecido pelo kit e centrifugados a 200 *g* por 5 minutos. Após a lavagem, as amostras foram ressuspendidas com 25 µl de PE *Detection Reagent*, e incubadas a temperatura ambiente, no escuro, por 1 hora e 30 minutos. Finalizada a incubação, as amostras foram novamente lavadas com 500 µl do tampão de lavagem. Os resultados das reações foram analisados no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Califórnia, EUA), utilizando software FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson, California, USA).

### 3.13 Quantificação de quimiocinas

A presença das quimiocinas IP-10, MCP-1, MIG, RANTES e IL-8 no plasma humano foi determinada com o kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokines* (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Para tanto, amostras de plasma (25  $\mu$ l) foram diluídas 1:3 em diluente de amostra fornecido pelo kit, e adicionadas aos tubos de FACS, juntamente com beads (25  $\mu$ l) de cada quimiocina, e com 25  $\mu$ l de PE *Detection Reagent*, e incubadas por 3 horas no escuro, em temperatura ambiente. Conforme as instruções do kit, curvas padrão com as concentrações conhecidas das quimiocinas foram também preparadas e adicionadas a outros tubos de FACS e também incubadas nas mesmas condições. Finalizada a incubação, as amostras foram lavadas com 500  $\mu$ l do tampão de lavagem, centrifugadas a 200 g por 5 minutos e ressuspendidas com 300  $\mu$ l de tampão de lavagem. Os resultados das reações foram analisados no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Califórnia, EUA), utilizando software FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson, California, USA).

# 3.14 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism (versão 5.1). Comparações entre mais de dois grupos foram feitas pela análise não paramétrica One Way Anova, complementada com teste de Tukey. Nos testes realizados, foram consideradas como diferenças estatisticamente significativas, valores de *P*<0,05.

## 4 **RESULTADOS**

## 4.1 Purificação do veneno de *B. pirajai* – Cromatografia (FPLC)

4.1.1 Fase 1 da purificação do veneno da serpente B. pirajai por cromatografia de exclusão molecular

Com base no protocolo estabelecido por Pidde-Queiroz et al. (2013), 15 mg de veneno de *B. pirajai* foram submetidos ao fracionamento em coluna de Superose 12, para a obtenção da metaloproteinase de classe PI, a ser utilizada no modelo de sangue humano total. A **Figura** 1 mostra o perfil cromatográfico do veneno bruto de *B. pirajai*, sendo 6 frações (picos) coletadas.



![](_page_34_Figure_5.jpeg)

Purificação (FPLC-GP-250 PLUS) de 15 mg do veneno bruto de *Bothrops pirajai* com a coluna Superose 12 (10/300 GL, GE Life Sciences, EUA), diluído em 400  $\mu$ l de PBS (4 corridas de 100  $\mu$ l). Fluxo de corrida de 30 ml/h, com tampão de bicarbonato de amônio (0,05M). Frações monitoradas pela absorbância a  $\lambda$  280 nm.

### 4.1.2 Perfil eletroforético (SDS-Page) das frações obtidas na fase 1

Após a cromatografia, as 6 frações coletadas do veneno foram submetidas a eletroforese em gel SDS-Page a 12%, como mostrado na **Figura 2**. A massa molecular relativa de cada fração foi analisada, a fim de detectar moléculas com MW ~23 kDa, ou seja, com a massa molecular prevista para metaloproteinases de classe PI. Desta forma, foi verificado que a fração 2 atendia a tal expectativa.

![](_page_35_Figure_2.jpeg)

![](_page_35_Figure_3.jpeg)

Gel de acrilamida (SDS-Page) a 12%, com 5 µg de cada fração em tampão de amostra não redutor, submetido a coloração com prata.
4.1.3 Fase 2 da purificação do veneno da B. pirajai pela coluna Superdex 75

A **Figura 3** mostra o perfil cromatográfico da repurificação da fração 2 (400  $\mu$ g) em coluna Superdex 75, que resultou em 3 novas frações.

**Figura 3** – Perfil cromatográfico da fração 2 repurificada a partir do veneno bruto de *B*. *pirajai* 



Repurificação (FPLC-GP-250 PLUS) da fração 2 (400  $\mu$ g), proveniente da primeira etapa da purificação do veneno bruto de *Bothrops pirajai*, pela coluna Superdex 75 (10/300 GL, GE Life Sciences, EUA), diluída em 100  $\mu$ l de PBS (2 corridas com amostras contendo 200  $\mu$ g). Fluxo de purificação de 30 ml/h, com tampão de bicarbonato de amônio (0,05M). Frações monitoradas pela absorbância ultravioleta a  $\lambda$  280 nm.

### 4.1.4 Perfil eletroforético das frações obtidas na fase 2

As 3 novas frações coletadas, a partir da fração 2 do veneno total, foram submetidas à dosagem proteica, seguida pela análise do perfil eletroforético em gel de gradiente de 8-16%, com tampão de amostra não redutor, como mostra a **Figura 4**. A massa molecular relativa de cada fração foi analisada, com o mesmo objetivo, ou seja, identificar a metaloproteinase de classe PI, com ~23 kDa. Os resultados mostraram que apenas 2 das 3 frações, denominadas Fr2-2 e Fr2-3 apresentavam perfis eletroforéticos similares, com bandas com cerca de ~23 kDa. Três quantidades diferentes de cada fração foram analisadas no gel: 0,62 µg, 1,25 µg e 2,5 µg.

Figura 4 – Perfil eletroforético das sub-frações provenientes da repurificação da fração 2 do veneno bruto



Géis de gradiente 8-16%, com 0,62 µg, 1,25 µg e 2,5 µg de cada fração (Fr2-3, Fr2-2 e Fr2-1) em tampão de amostra não redutor, submetidos a coloração com prata.

### 4.2 Análise da Atividade Proteolítica das frações repurificadas

A atividade proteolítica de todas as frações repurificadas na fase 2 foi testada usando o substrato FRET Abz-FRSSRQ-EDDnp. A **Figura 5** mostra que somente as frações Fr2-2 e Fr2-3 apresentaram atividade proteolítica, assim como o veneno bruto de *B. pirajai* e a fração 2.

Figura 5 – Atividade proteolítica das frações do veneno de B. pirajai



Atividade proteolítica das frações repurificadas a partir da fração 2 do veneno bruto de *B. pirajai*, comparada com a do tampão PBS (controle negativo) e com os controles do veneno bruto de *B. pirajai* (0,5  $\mu$ g – 472 UF/min) e da fração 2 (purificada na primeira etapa) (1  $\mu$ g – 178 UF/min), sobre o substrato (FRET) Abz-FRSSRQ-EDDnp. Ensaio realizado com 1  $\mu$ g de cada fração, sendo a fluorescência determinada em intervalos de 30 segundos, por 10 minutos. UF/min = Unidades de Fluorescência por Minuto. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de duplicatas, representativo de 3 experimentos independentes. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle negativo (PBS).

## 4.3 Ensaio de coagulação, usando o modelo de sangue total humano e as frações repurificadas

O ensaio foi realizado com 25  $\mu$ g/ml das frações Fr2-2 e Fr2-3 no modelo de sangue humano total. A **Tabela 1** apresenta o potencial coagulante das frações que apresentaram atividade proteolítica, sendo que nenhuma das duas frações promoveu coagulação. Pelas similaridades de perfil eletroforético e atividade proteolítica, e a não ativação da cascata de coagulação, decidiu-se combinar as duas frações em um pool que foi utilizado nos demais ensaios do presente estudo.

Tabela 1 – Coagulação das amostras de sangue pelas frações repurificadas

Incubação	Veneno de	Fr2-2	Fr2-3
	<i>B. pirajai</i> (25 µg)	(25 μg)	(25 μg)
37 ℃ – 30 min	+	-	-

Amostras de sangue incubadas com 25 µg de cada fração repurificada, por 30 minutos, a 37 °C. [+] Presença de coágulo; [-] Ausência de coágulo.

### 4.4 Identidade proteica da fração Fr2-2/3 (pool das frações Fr2-2 e Fr2-3) por espectrometria de massas

Amostras do pool das frações Fr2-2 e Fr2-3 foram analisadas pelo setor de Espectrometria de Massas do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, sendo confirmada a identidade da proteína (**Figura 6**), como a metaloproteinase de classe P1, previamente identificada e purificada pelo nosso grupo (PIDDE-QUEIROZ et al., 2013).

Figura 6 – A análise do pool formado pelas frações Fr2-2 e Fr2-3, por espectrometria de massas

>sp|PODL29|VM1\_BOTPI Snake venom metalloproteinase BpirMP (Fragment) OS=Bothrops pirajai PE=1 SV=1

- 1 TYIEVAVVAD HRMFKKYNSN LNTIRKWVHE MVNSMNGVYR SMDVHLSLAN LEVWSKKDLI NVQKDSRETL KSFGEWRERD E Carboxymeethyl(+58.01) 81 LLPRISHDNA QLLTAIVFDQ QTIGRAYIGG MCDPRHSVGV VMDHSKINLQ VAVTMAHELG HNLGMEHDEN QCHCDAPSCV
- 161 MXXXXXXXXX XXXXXXXXXX XXXXXXKHNP QCILNEPL

Amostras do pool foram ressuspendidas em solução de Tris-HCl, EDTA, uréia e DTT. Após incubação de 1 hora, a 60 °C, iodoacetamida foi adicionada e o material foi novamente incubado durante 1 hora. Tripsina e bicarbonato de amônio foram adicionados as amostras, sendo incubadas a 37 °C, por 12 horas. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

## 4.5 Dosagem das anafilatoxinas, C3a e C5a, no sangue total humano, após tratamento com a PI-Bp

Amostras de sangue total humano foram tratadas com PBS, 100  $\mu$ g/ml de LPS ou 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, durante 30 minutos, a 37 °C; na sequencia foram coletados os plasmas, na presença de EDTA, e realizadas as dosagens das anafilatoxinas C3a e C5a. A **Figura 7** mostra que 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp foram capazes de induzir uma geração significativa de C3a e C5a no modelo de sangue humano total, assim como o controle positivo, o LPS, embora com diferenças significativas entre estes dois tratamentos.

**Figura 7** – Níveis de C3a/C3a-desArg e C5a/C5a-desArg no plasma humano, após os tratamentos experimentais



Amostras de sangue humano foram tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos e a 37 °C. Após a incubação, o plasma foi coletado para dosagem de C3a e C5a por ELISA. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de duplicatas, representativos de 3 experimentos independentes. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*\*) p<0,01, (\*\*) p<0,001 diferença estatística em relação ao controle. (###) p<0,001 diferença estatística entre os tratamentos com PI-Bp e LPS.

#### 4.6 Dosagem de SC5b-9, no sangue total humano, após tratamento com a PI-Bp

Assim como feito para a detecção das anafilatoxinas, o mesmo tratamento foi realizado para analisar a geração de SC5b-9 no plasma. Na **Figura 8** é possível notar o aumento na geração de SC5b-9 nos tratamentos do sangue com 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou com 100  $\mu$ g/ml de LPS, durante 30 minutos e a 37 °C. Tal resultado mostra a ativação da cascata do complemento pelos dois tratamentos.

Figura 8 – Níveis plasmáticos de SC5b-9 após os tratamentos experimentais



Amostras de sangue humano foram tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, o plasma foi coletado para dosagem de SC5b-9 por ELISA. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de duplicatas, representativos de 3 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle. (###) p<0,001 diferença estatística significativa entre os tratamentos com PI-Bp e LPS.

## 4.7 Análise da expressão de marcadores de superfície de leucócitos, após tratamento com a PI-Bp

#### 4.7.1 Expressão dos marcadores em linfócitos

As amostras de sangue foram tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, e incubadas por 30 minutos e a 37 °C. A análise da expressão dos marcadores de membrana de linfócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD3 e anti-CD19) foi feita por citometria de fluxo. A **Figura 9** mostra que a PI-Bp foi capaz de induzir um aumento de CD11b, CD14, C3aR, TLRs 2 e 4 em linfócitos.

Figura 9 - Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana em linfócitos



Amostras de sangue humano foram tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, os linfócitos foram analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de duplicatas, representativos de 4 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*) p<0,05, (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle (PBS).

#### 4.7.2 Expressão dos marcadores em monócitos

Na **Figura 10** nota-se um aumento significativo de todos os marcadores na superfície dos monócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD33), nas amostras tratadas com a PI-Bp, quando comparadas ao controle tratado com PBS. No entanto, pode se observar que a expressão de CD11b, C3aR e TLR4 foi significativamente menor do que o grupo tratado com LPS, enquanto que a de CD14 e TLR 2 foi similar a do controle positivo. A expressão de C5aR foi aumentada nos tratamentos com a PI-Bp, assim como LPS, no entanto, PI-Bp induziu um aumento deste receptor superior ao do LPS.

Figura 10 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana em monócitos



Amostras de sangue humano foram tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos e a 37 °C. Após a incubação, os monócitos foram analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4. Dados expressos como média ± desvio padrão de duplicatas, representativos de 4 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*) p<0,05, (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle (PBS). (#) p<0,05 diferença estatística significativa entre os tratamentos com a PI-Bp e LPS.

#### 4.7.3 Expressão dos marcadores em granulócitos

A **Figura 11** mostra que a PI-Bp induziu aumento significativo na expressão de CD11b, CD14, TLR 2, TLR 4 e C5aR nos granulócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD66b), quando comparado ao controle negativo, o PBS. No entanto, assim como o LPS, a PI-Bp induziu uma redução na expressão de C3aR. O LPS, nas condições utilizadas, induziu aumento significativo na expressão de CD11b, CD14, TLR2 e TLR4, mas não de C5aR, quando comparado ao controle negativo, nos granulócitos.

Figura 11 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana de granulócitos



Amostras de sangue humano foram tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos e a 37 °C. Após a incubação, os neutrófilos foram coletados e analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4. Dados expressos como média ± desvio padrão de duplicatas, representativos de 4 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*) p<0,05, (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle (PBS). (#) p<0,05, (###) p<0,001 diferença estatística significativa entre os tratamentos com a PI-Bp e LPS.

# 4.8 Dosagem das anafilatoxinas, C3a e C5a, no sangue total humano, após tratamento com PI-Bp, na presença ou ausência da compstatina/peptídeo controle

Amostras de sangue total humano foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina (inibidor do componente C3), peptídeo controle ou apenas PBS durante 30 minutos, a temperatura ambiente e, em seguida, tratadas com PBS, 100  $\mu$ g/ml de LPS ou 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, durante 30 minutos, a 37 °C. Na sequência foram coletados os plasmas, na presença de EDTA, e realizadas as dosagens das anafilatoxinas C3a e C5a. A Figura 12 mostra que a compstatina causou uma redução significativa na geração de C3a e C5a, quando comparado as amostras tratadas apenas com a toxina ou LPS. Nestas condições experimentais, o peptídeo controle não foi capaz de reduzir a geração das anafilatoxinas. A redução na expressão de anafilatoxinas das amostras tratadas, com a toxina ou LPS mais a compstatina, foi equivalente a do controle negativo (PBS), indicando que a inibição do complemento pode contribuir para a redução do processo inflamatório induzido pela PI-Bp.

**Figura 12** – Níveis de C3a/C3a-desArg e C5a/C5a-desArg no plasma após os tratamentos experimentais



Amostras de sangue humano foram incubadas por 30 minutos com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou PBS e, posteriormente, tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por mais 30 minutos e a 37 °C. Após o tratamento, o plasma foi coletado para dosagem de C3a e C5a por ELISA. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas, representativos de 3 experimentos independentes. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*\*\*) p<0,001, diferença estatística em relação ao controle negativo. (###) p<0,001 diferença estatística entre os tratamentos com a toxina e a toxina+compstatina.

## 4.9 Dosagem de SC5b-9, no sangue total humano, após tratamento com PI-Bp, na presença ou ausência da compstatina/peptídeo controle

Assim como feito para a detecção das anafilatoxinas, o mesmo tratamento foi realizado para analisar a geração de SC5b-9 no modelo de sangue total humano, incubado com a compstatina e tratado com a toxina. Na **Figura 13** é possível notar que no plasma das amostras incubadas com a compstatina antes do tratamento com a toxina, houve uma redução significativa na geração de SC5b-9. Tal resultado mostra que a ativação da cascata do complemento, induzida pela PI-Bp ou LPS, foi inibida pela compstatina, mas não pelo peptídeo controle.

Figura 13 – Níveis plasmáticos de SC5b-9 após os tratamentos experimentais



Amostras de sangue humano foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou apenas PBS, e, posteriormente, tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, o plasma foi coletado para dosagem de SC5b-9 por ELISA. Dados expressos como média ± desvio padrão de triplicatas, representativos de 3 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle negativo. (###) p<0,001 diferença estatística significativa entre os tratamentos com a toxina e a toxina+compstatina.

# 4.10 Análise da expressão de marcadores de superfície de leucócitos, no modelo de sangue total humano, após tratamento com PI-Bp, na presença ou ausência da compstatina/peptídeo controle

### 4.10.1 Expressão dos marcadores em linfócitos

As amostras de sangue foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou PBS, e em seguida tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, e incubadas por 30 minutos e a 37 °C. A análise da expressão dos marcadores de membrana de linfócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD3 e anti-CD19) foi feita por citometria de fluxo. A **Figura 14** mostra que a incubação com a compstatina seguida pelo tratamento com a toxina reduziu a expressão dos marcadores relacionados ao sistema Complemento, como o CD11b e C3aR, quando comparados ao controle negativo (PBS). A expressão de C5aR é naturalmente baixa em linfócitos e, portanto, não foi possível notar diferença entre os tratamentos. A expressão de CD14, TLR2 e 4 aumentou após os tratamentos com a PI-Bp e LPS, em relação ao controle negativo (PBS), e não sofreram influência da compstatina.





Amostras de sangue humano foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou apenas PBS e, posteriormente, tratadas com PBS, ou 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, os linfócitos foram analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4. Dados expressos como média ± desvio padrão de duplicatas, representativos de 4 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle (PBS). (##) p<0,01, (###) p<0,001 diferença estatística significativa entre os tratamentos com a toxina e a toxina+compstatina.

### 4.10.2 Expressão dos marcadores em monócitos

Na **Figura 15**, nota-se um aumento significativo de todos os marcadores na superfície dos monócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD33), nas amostras tratadas com PI-Bp ou LPS, quando comparadas ao PBS. No entanto, pode-se observar que a expressão de CD11b, C3aR e C5aR foi significativamente reduzida nas amostras incubadas com a compstatina, indicando que a ativação do complemento contribui para o aumento da expressão desses marcadores. Já a expressão de CD14, TLRs 2 e 4 não foi alterada com a incubação da compstatina, indicando a não participação do Complemento no aumento da expressão desses receptores.





Amostras de sangue humano foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou apenas PBS e, posteriormente, tratadas com PBS, ou 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, os monócitos foram analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e 4. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de duplicatas, representativos de 4 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*) 0,05 (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao PBS. (##) p<0,01, (###) p<0,001 diferença estatística significativa entre os tratamentos com a toxina e a toxina+compstatina.

### 4.10.3 Expressão dos marcadores em granulócitos

A **Figura 16** mostra que a PI-Bp também induziu aumento significativo na expressão de todos os marcadores analisados nos granulócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD66b), quando comparados ao controle negativo, o PBS. O tratamento das amostras com de PI-Bp ou LPS, na presença de compstatina, causou uma redução significativa da expressão de CD11b, C3aR e C5aR na superfície dos granulócitos. O aumento da expressão dos marcadores CD14, TLRs 2 e 4 pelo LPS ou PI-Bp não foi modulado negativamente pela presença de compstatina na reação.

Figura 16 – Ação da PI-Bp sobre a expressão dos marcadores de membrana de granulócitos



Amostras de sangue humano foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou apenas PBS e tratadas, posteriormente, com PBS, ou 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por 30 minutos, a 37 °C. Após a incubação, os granulócitos foram analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4. Dados expressos como média ± desvio padrão de duplicatas, representativos de 4 experimentos. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*) 0,05, (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001 diferença estatística significativa em relação ao controle (PBS). (###) p<0,001 diferença estatística significativa en testa e a toxina+compstatina.

### 4.11 Dosagem das citocinas pró-inflamatórias, no modelo de sangue total humano, após tratamento com PI-Bp, na presença ou ausência da compstatina/peptídeo controle

Amostras de sangue total humano foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina (inibidor do Complemento), peptídeo controle ou PBS durante 30 minutos, a temperatura ambiente e, em seguida, tratadas com PBS, 100  $\mu$ g/ml de LPS ou 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, durante 30 minutos, a 37 °C; na sequencia foram coletados os plasmas, na presença de EDTA, e realizadas as dosagens das citocinas. A **Figura 17** mostra que o tratamento com a PI-Bp, assim como o LPS, levou ao aumento de IL-10, IL-6 e IL-1 $\beta$ , quando comparado ao controle negativo (PBS). Um aumento na produção de IL-12p70 e TNF só foi detectado no tratamento com LPS. As amostras incubadas com a compstatina e tratadas, em seguida, com PI-Bp ou LPS apresentaram redução na produção das citocinas pró-inflamatórias aqui analisadas. Tais dados sugerem que a ativação do complemento contribui para a produção de citocinas no processo inflamatório induzido tanto pela PI-Bp quanto pelo LPS.



**Figura 17** – Níveis de citocinas pró-inflamatórias, no plasma, após os tratamentos experimentais

Amostras de sangue humano foram incubadas por 30 minutos com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou PBS e, posteriormente, tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por mais 30 minutos e a 37 °C. Após o tratamento, o plasma foi coletado para dosagem de citocinas pró-inflamatórias por CBA. Dados expressos como média ± desvio padrão de triplicatas, representativos de 3 experimentos independentes. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*) p<0,05, (\*\*) p<0,01, (\*\*\*) p<0,001, diferença estatística em relação ao controle negativo. (#) p<0,05, (##) p<0,01, (###) p<0,001 diferença estatística entre os tratamentos com a toxina e a toxina+compstatina.

## 4.12 Dosagem de quimiocinas, no modelo de sangue total humano, após tratamento com PI-Bp, na presença ou ausência da compstatina/peptídeo controle

Amostras de sangue total humano foram incubadas com 200  $\mu$ M de compstatina (inibidor do Complemento), peptídeo controle ou PBS durante 30 minutos, a temperatura ambiente e, em seguida, tratadas com PBS, 100  $\mu$ g/ml de LPS ou 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp, durante 30 minutos, a 37 °C; na sequencia foram coletados os plasmas, na presença de EDTA, e realizadas as dosagens das quimiocinas. A Figura 18 mostra que os tratamentos com PI-Bp ou LPS, quando comparados ao controle negativo (PBS), induziram aumentos significativos de MCP-1, MIG e IL-8, sendo que o LPS ainda promoveu um pequeno aumento de RANTES. Quando a compstatina foi adicionada à reação, foi possível notar uma redução significativa das quimiocinas MCP-1 e IL-8, nos tratamentos com PI-Bp e LPS. Além dessas, no tratamento com LPS, a compstatina promoveu uma pequena redução da produção de RANTES.



Figura 18 – Níveis de quimiocinas, no plasma, após os tratamentos experimentais

Amostras de sangue humano foram incubadas por 30 minutos com 200  $\mu$ M de compstatina, peptídeo controle ou PBS e, posteriormente, tratadas com PBS, 25  $\mu$ g/ml de PI-Bp ou 100  $\mu$ g/ml de LPS, por mais 30 minutos e a 37 °C. Após o tratamento, o plasma foi coletado para dosagem de quimiocinas por CBA. Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas, representativos de 3 experimentos independentes. Análise estatística realizada por ANOVA, complementada com teste de Tukey. (\*) p<0,05, (\*\*\*) p<0,001, diferença estatística em relação ao controle negativo. (#) p<0,05, (###) p<0,001 diferença estatística entre os tratamentos com a toxina e a toxina+compstatina.

### 5 DISCUSSÃO

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 80% dos envenenamentos no Brasil (BRAUD et al., 2000; LU et al., 2005) e seus venenos são compostos por uma mistura complexa de moléculas, incluindo serino- e metaloproteinases, sendo as metaloproteinases as enzimas proteolíticas mais abundantes nesses venenos (FOX; SERRANO, 2008). Algumas destas enzimas estão diretamente envolvidas nos processos decorrentes do envenenamento, como a coagulopatia, dermonecrose, edema e hemorragia, além de falência renal (GUTIÉRREZ et al., 2005; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

Diante dos dados publicados na literatura e para melhor entender o papel do Complemento no processo inflamatório desencadeado por esses venenos, foram realizados ensaios utilizando o modelo de sangue total humano descrito por Mollnes e colaboradores (2002), uma vez que esse permite analisar melhor a interação entre todos os componentes do sangue, incluindo citocinas e quimiocinas, e os componentes e vias de ativação do sistema complemento operando de forma ativa.

Brekke e colaboradores (2008) também demonstraram a ativação do sistema complemento e o aumento severo do processo inflamatório desencadeado por LPS (*E.coli*) em modelo de sangue total humano, no qual 18 dos 27 mediadores inflamatórios analisados, incluindo citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e quimiocinas (IL-8, MCP-1, IP-10, MIP-1 $\alpha/\beta$ ), mostraram um aumento bastante significativo, levando ao agravamento da sepse ou ao choque séptico. No entanto, a inibição do marcador de membrana de leucócitos, o CD14, combinada com anti-C2 e anti-fator D levou à redução do processo inflamatório desencadeado pelo LPS no modelo estudado. Considerando que C2 quando clivado, se liga ao C4b, formando a C3 convertase das vias clássica e das lectinas, e o fator D sendo responsável pela clivagem do fator B ligado ao complexo C3 formando, portanto, a C3 convertase da via alternativa, a inibição desses complexos prejudica significativamente a ativação das vias do sistema Complemento, resultando, na redução da sepse e do choque séptico (BARRATT-DUE et al, 2010; BREKKE et al., 2008).

Paralelo a esses dados, em outro estudo realizado pelo nosso grupo (PIDDE-QUEIROZ et al., 2013), foi demonstrado que uma metaloproteinase de classe PI, isolada do veneno da *B. pirajai*, era capaz de ativar a cascata do sistema complemento e também clivar diretamente componentes como C3 e C1-Inh (regulador do complemento), no soro humano

normal, o que poderia contribuir para o processo inflamatório observado nos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*.

Com base nas diferenças de tamanho e de domínios estruturais, as metaloproteinases de venenos foram classificadas em PI, PII e PIII (BJARNASON; FOX, 1995). As metaloproteinases de classe PI, com massa molecular variando entre 20 e 25 kDa, apresentam capacidade hemorrágica menor do que as de classe PIII, sugerindo que a presença de alguns domínios a mais contribua efetivamente para esse efeito. As proteínas da classe PIII apresentam massa molecular maior, variando entre 50 e 100 kDa, e são encontradas na forma monomérica (atrolisina-A, HF3 e bothropasina) e dimérica (VAP1) (FOX; SERRANO, 2005, 2008). A classe PIIId, antes denominada como PIV, apresenta duas cadeias de lectinas. As duas representantes desta classe (VLFXA e RVV-X) são capazes de ativar o fator X da coagulação (FOX; SERRANO, 2005, 2008).

As metaloproteinases hemorrágicas de venenos atuam na degradação da membrana basal dos capilares sanguíneos, levando ao extravasamento de sangue pelos capilares (BARAMOVA et al., 1989; MOREIRA et al., 1992). A hemorragia é decorrente da ação dessas enzimas sobre os componentes da cascata de coagulação, como o fibrinogênio e fibrina, levando a incoagulabilidade por consumo (HAMAKO et al., 1998; KAMIGUTI et al., 1994).

De acordo com a literatura, as metaloproteinases da classe PI podem apresentar atividades distintas. Assim, Bello et al. (2006) isolaram uma metaloproteinase da classe PI do veneno de *B. leucurus*, capaz de hidrolisar fibrinogênio, fibrina e fibronectina, mas não laminina, enquanto Rucavado et al. (1999) mostraram que a PI de *L. muta muta* não só hidrolisava fibronectina, como também laminina e colágeno tipo IV. Já a metaloproteinase PI do veneno da *B. jararacussu* não é capaz de induzir hemorragia local, miotoxicidade ou letalidade, mas apresenta atividade proteolítica sobre fibrinogênio, fibrina, e colágeno, além de inibir a agregação plaquetária (MARCUSSI et al., 2007). Esses dados indicam, portanto, que há variações de especificidade de substrato macromolecular entre as metaloproteinases da classe PI.

Com base nesses dados da literatura e nos resultados obtidos pelo grupo com a PI da *B. pirajai* em soro humano normal e, seguindo o protocolo de purificação estabelecido por Pidde-Queiroz e colaboradores (2013), uma nova purificação a partir do veneno bruto de *B*. *pirajai* foi realizada em duas etapas, por cromatografia de exclusão molecular em FPLC para obter uma nova partida de metaloproteinase PI dessa serpente (PI-Bp).

Durante a primeira purificação, observou-se que a fração 2 (Fr2) apresentava uma banda com massa molecular de ~23 kDa, o que corresponderia à massa de PI e, por isso, essa foi submetida à repurificação, resultando em 3 subfrações das quais 2 (Fr2-2 e Fr2-3) apresentaram perfis eletroforéticos idênticos. Ambas também mostraram atividade proteolítica significativa. As amostras de sangue humano total foram submetidas ao tratamento com 25  $\mu$ g/ml das duas subfrações (Fr2-2 e Fr2-3), separadamente, e nenhuma das duas foi capaz de induzir coagulação do sangue. Considerando a similaridade entre as duas subfrações, decidiu-se juntá-las em um pool, do qual uma alíquota foi encaminhada para o Setor de Espectrometria de Massas do Instituto Butantan, para identificação da(s) molécula(s) e, assim, foi confirmado que a amostra continha uma metaloproteinase de classe PI de *B. pirajai*, a mesma descrita anteriormente pelo nosso grupo (PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). Outra alíquota foi encaminhada a Seção de Controle Microbiológico (Serviço de controle de qualidade, Divisão Bioindustrial) do Instituto Butantan para detecção de LPS, sendo confirmada a ausência de LPS na amostra.

Amostras de sangue humano total foram tratadas com a PI-Bp, PBS (controle negativo) ou LPS (controle positivo) e, na sequência, analisadas a produção das anafilatoxinas bem como de TCC no plasma, e a expressão de marcadores nas populações de linfócitos, monócitos e granulócitos. Assim, de acordo com os dados aqui obtidos, é possível sugerir que a metaloproteinase de classe PI da *B. pirajai* (PI-Bp) é capaz de ativar o Sistema Complemento no sangue total humano, como foi demonstrado pela geração de SC5b-9, C3a/C3a-desArg e C5a/C5a-desArg. Os resultados também sugerem que a ativação do complemento possa estar envolvida na ativação leucocitária, como foi possível verificar pelas diferenças na expressão dos receptores de membrana dessas células tratadas com a PI isolada da *B. pirajai*.

Esses eventos podem ter um papel relevante no progresso dos sintomas do envenenamento botrópico e para confirmar a participação do complemento na alteração de expressão dos marcadores de superfície celular dos leucócitos, amostras de sangue foram incubadas com 200 µM de compstatina, peptídeo controle ou apenas PBS, antes de serem tratadas com a PI-Bp, PBS (controle negativo) ou LPS (controle positivo). A compstatina é um peptídeo que inibe a clivagem do C3, que é a molécula central para ativação de todas as

vias do Complemento (MOLLNES et al., 2002). Assim, o uso desse inibidor modula a ativação/geração de fragmentos biologicamente ativos do C, como de C3a/C3a-desArg, C5a/C5a-desArg e de SC5b-9.

Os resultados obtidos nas amostras incubadas com compstatina e tratadas com PI-Bp mostram uma redução bastante significativa na geração de anafilatoxinas e TCC, assim como na expressão dos marcadores de membrana relacionados ao Sistema Complemento, como o CD11b, que compõe o complexo CD11b/CD18 (CR3), capaz de interagir com iC3b (BELLER et al., 1982; WRIGHT et al., 1983), C3aR, o receptor para C3a e C5aR, receptor de C5a (anafilatoxina que é produto da clivagem de C5 pela C5 convertase, enzima que apresenta C3b como um dos componentes). Tais dados indicam a participação do complemento nos eventos pró-inflamatórios induzidos pela PI-Bp, assim como pelo LPS, no modelo de sague total huamno.

Também foi feita a quantificação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no plasma das amostras de sangue tratadas com a compstatina, peptídeo controle ou PBS e os resultados mostraram que as amostras tratadas com a PI-Bp e que não foram incubadas com a compstatina tiveram um aumento das citocinas IL-10, IL-6, e IL-1β, assim como das quimiocinas MCP-1, MIG e IL-8, revelando mais uma vez o potencial inflamatório da toxina, sendo que as citocinas e quimiocinas geradas podem, por sua vez, ativar outras vias e células do sistema imunológico.

A IL-1 $\beta$  é uma das primeiras citocinas produzidas, após lesão tecidual ou infecção, e é capaz de promover inflamação sistêmica, por meio da ativação da ciclooxigenase-2, com a formação de prostaglandinas, causando febre. Pode também induzir a produção de óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial, além de ativar os receptores B2, causando hiperalgesia inflamatória (OLIVEIRA et al., 2011). A IL-6, assim como a IL-1 $\beta$ , também causa febre, sendo um dos mais precoces mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda, sendo responsável pela maturação e ativação de neutrófilos e macrófagos e diferenciação de linfócitos T citotóxicos e células NK. A IL-10 pode inibir IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias, além de impedir a produção de IFN $\gamma$  (principal ativador de macrófagos) pelas células NK (ZHANG; AN, 2007).

As quimiocinas são secretadas por células sanguíneas e responsáveis pela migração

dos leucócitos ao local da infecção ou lesão. São divididas em 4 classes, de acordo com a presença e posição dos primeiros resíduos de cisteína. A MCP-1, que apresenta duas cisteínas adjacentes, é um potente fator quimiotático e ativador de monócitos, linfócitos T, células NK e eosinófilos. Pode também alterar a atividade dos neurônios pós-sinápticos e células da glia, facilitando a transmissão da dor (OLIVEIRA et al., 2011). A IL-8, com um aminoácido entre os dois resíduos de cisteína, é capaz de aumentar a expressão de GABA (ácido gama-aminobutírico), um importante inibidor em sinapses centrais (KRAYCHETE et al., 2006). A IL-8 é secretada principalmente por monócitos/macrófagos, podendo ser estimulada pela IL-1, sendo sua principal função o estímulo migratório das células do sistema imune, principalmente neutrófilos, levando também ao aumento da expressão de moléculas de adesão, além de aumentar o metabolismo oxidativo (KRAYCHETE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011). A MIG é estruturalmente similar a IL-8 pertencendo, portanto, pertencente a mesma classe. Estimulada por IFN- $\gamma$ , sua principal função é a migração de células T para o sitio DTH (reação de hipersensibiliade tardia) (WHITE; WILSON, 2008).

### 6 CONCLUSÃO

Com a inibição do Complemento, foi possível notar uma diminuição significativa dos níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-10 e das quimiocinas MCP-1 e IL-8, indicando uma possível redução do processo inflamatório e, portanto, dos efeitos do envenenamento. Os níveis encontrados de IL-10 (citocina reguladora) possivelmente estão relacionados a IL-1 $\beta$  (citocina pró-inflamatória), assim como a redução das quimiocinas, uma vez que houve a diminuição de estímulos e de leucócitos ativados.

Em conjunto, os resultados aqui obtidos mostram que a inibição do Sistema Complemento causa uma redução no processo inflamatório induzido por uma protease de classe PI do veneno de *Bothrops* e que o modelo de sangue total humano é uma boa ferramenta para os estudos das ações pró-inflamatórias de componentes de venenos. Tais resultados também sinalizam a possibilidade do uso de inibidores de complemento na terapia dos envenenamentos botrópicos.

### **REFERÊNCIAS**\*

ALPER, C. A.; BALAVITCH, D. Cobra venom factor: evidence for its being altered cobra C3 (the third component of complement). **Science**, v. 191, p. 1275-1276, 1976.

BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 275, p. 63-71, 1989.

BARRATT-DUE, A.; THORGERSEN, E. B; LINDSTAD, J. K.; PHARO, A.; BREKKE, O. L.; CHRISTIANSEN, D.; LAMBRIS, J. D.; MOLLNES, T. E. Selective inhibitions of TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  does not affect *E. coli*-induced inflammation in human whole blood. **Mol. Immunol.**, v. 47, n. 9, p. 1774-1782, 2010.

BELLER, D. L.; SPRINGER, T. A.; SCHREIBER, R. D. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. **J. Exp. Med**, v. 156, p. 1000-1009, 1982.

BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L. N.; MAGALHÃES, A.; FEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, p. 189-200, 2006.

BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; CAMACHO, E.; ROSA, J. C.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; SAMPAIO, S. V. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **J Proteomics**, v. 80, p. 250-267, 2013.

BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; MAMEDE, C. C. N.; ZOCCAL, K. F.; CINTRA, A. C. O.; FACCIOLI, L. H.; STANZIOLA,, L.; OLIVEIRA, F.; SAMPAIO, S. V. Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from *B. pirajai* venom. **Mol Immunol**, v. 68, p. 456-464, 2015.

<sup>\*</sup>ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração, Rio de Janeiro, 2002.

BJARNASON, J. B., FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidase: reprolysins. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 345-368, 1995.

BRADKIL, S.; TRANUM-JENSEN, J. Complement lysis: a hole is a hole. **Immunol. Today**, v. 12, p. 318-332, 1991.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

BREKKE, O. L.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; FUNG, M.; MOLLNES, T. E. The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in E. coli-induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. **J Leukoc Biol.**, v. 81, p. 1404-1413, 2007.

BREKKE, O. L.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; PHARO, A.; FUNG, M.; RIESENFELD, J.; MOLLNES, T. E. Combined inhibition of complement and CD14 abolish *E. coli*-induced cytokine-, chemokine- and growth factor-synthesis in human whole blood. **Mol Immunol.**, v. 45, p. 3804-3813, 2008.

CHANG, J.Y. The functional domain of hirudina, a thrombin-specific inhibitor. **FEBS Lett.**, v. 164, n. 2, p. 307-313, 1983.

CHRISTIANSEN, D.; BREKKE, O. L.; STENVIK, J.; LAMBRIS, J. D.; ESPEVIK, T.; MOLLNES, T. E. Differential effect of inhibiting MD-2 and CD14 on LPS- versus whole *E. coli* bacteria-induced cytokine responses in human blood. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 946, p. 237-251, 2012.

DAVIS, A. E.; ZALUT, C.; ROSEN, F. S. & ALPER, C. A. Human factor D of the alternative complement pathway. Physiochemical characteristics and N-terminal amino acid sequence. **Biochemistry**, v. 18, p. 5082-5087, 1979.

DISCIPIO, R. The binding of complement proteins C5, factor B, B1H and properdin to C3b bound to zymosan. **Biochem. J**, v. 199, p. 485-496, 1981a.

DISCIPIO, R. The conversion of human complement C5 into fragment C5b by the alternative pathway C5 convertase. **Biochem. J.**, v. 199, p. 497-504, 1981b.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, p. 34-50, 2010.

EGGERTSEN, G.; LUNDWALL, A.; HELLMAN, U.; SJÖQUIST, J. Antigenic relationships between human and cobra complement factors C3 and cobra venom factor (CVF) from the Indian cobra (*Naja naja*). J. Immunol., v. 131, p. 1920-1923, 1983.

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

FISHELSON, Z.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. C3 convertase of human complement: enhanced formation and stability of the enzyme generated with nickel instead of magnesium. **J. Immunol.**, v. 129, p. 2603-2607, 1982.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinase, key members of the M12 reprolysin family of metaloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909-920, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. 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, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

GORSKI, J. P.; HUBLI, T. E.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. The C4a: the third anaphylatoxin of the human complement system. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 5299-5302, 1979.

GÖTZE, O.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. The C3-activator system: an alternate pathway of complement activation. **J. Exp. Med.**, v. 134, p. 90-108, 1971.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.

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, p. 997-1011, 2005.

HAMAKO, J.; MATSUI, T., NISHIDA, S.; NOMURA, S.; FUJIMURA, Y.; ITO, M.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Purifications and characterization of kaouthiagin, a Von Willebrand factor-binding and –cleaving metalloproteinase from *Naja kaouthia* cobra venom. **Thromb. Haemost.**, v. 80, p. 499-505, 1998.

HAMZA, B.; IRIMIA, D. Whole blood human neutrophil trafficking in a microfluidic model of infection and inflammation. **Lab. Chip.**, v. 15, n. 12, p. 2625-2633.

HÅRDSTEDT, M.; LINDBLOM, S.; KARLSSON-PARRA, A.; NILSSON, B.; KORSGREN O. Characterization of innate immunity in an extended whole blood model of human islet allotransplantation. **Cell Transplant.**, v. 25, n. 3, p. 503-515, 2015.

ISENMAN, D. E. & COOPER, N. R. The structure and function of third component of human complement. I - The nature and extent of conformation changes accompanying C3 activation. **Mol. Immunol.**, v. 18, p. 331-339, 1981.

KAMIGUTI, A. S.; SLUPSKY, J. R.; ZUZEL, M.; HAY, C. R. Properties of fibrinogen cleaved by jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb. Haemost.**, v. 72, p. 244-249, 1994.

KERR, M. A. The second component of human complement. **Methods Enzymol.**, v. 80, p. 54-64, 1981.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem J.**, v. 397, p. 377-387, 2006.

KJAER, T. R.; THIEL, S.; ANDERSEN G. R. Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. **Mol. Immunol.**, v. 56, p. 412-422, 2013.

KOLEV, M.; FRIEC, G. L.; KEMPER, C. Complement – tapping into new sites and effector systems. **Nat Rev Immunol.**, v. 14, n. 12, p. 811-820, 2014.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Rev Bras Reumatol.**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

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.

LAW, S. K.; LEVINE, R. P. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 2701-2705, 1977.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 26, p. 379-385, 1988.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; OLIVEIRA, C. Z.; IZIDORO, L. F.; FULY, A. L.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v. 28, p. 2328-2339, 2007.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; SILVEIRA, D. S.; MAMEDE, C. C.; STANZIOLA, L.; OLIVEIRA, F. D.; PEREIRA-CROTT, L. S.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **Int. Immunopharmacol**., v. 15, n. 4, p. 764-771, 2013.

MEREGA, E.; PRISCO S. D.; SEVERI, P; KALFAS, F.; PITTALUGA, A. Antibody/receptor protein immunocomplex in human and mouse cortical nerve endings amplifies complement-induced glutamate release. **Neurosci. Lett.**, v. 600, p. 50-55, 2015.

MERLE, N. S.; CHURCH, S. E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. Front. Immunol., v. 6, p. 262, 2015a.

MERLE, N. S.; NOE, R.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement System Part II – Role in Immunity. **Front. Immunol**., v. 6, p. 257, 2015b.

MOLLNES, T. E.; BREKKE, O. L.; FUNG, M.; FURE, H.; CHRISTIANSEN, D.; BERGSETH, G.; LAPPEGÅRD, K. T.; KÖHL, J.; LAMBRIS J. D. Essential role of the C5a receptor in *E. coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. **Blood**, v. 100, p. 1869-1877, 2002.

MOREIRA, L.; GUTIÉRREZ, J. M.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Ultrastructural alterations in mouse capillary blood vessels after experimental injection of venom from the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.**, v. 57, p. 124-133, 1992.

MORIKIS, D.; ASSA-MUNT, N.; SAHU, A.; LAMBRIS, J. D. Solution structure of Compstatin, a potent complement inhibitor. **Protein Sci.**, v. 7, p. 619-627, 1998.

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.

MÜLLER-EBERHARD, H. J.; FJELLSTRÖM, K. E. Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. **J. Immunol**., v. 107, p. 1666-1672, 1971.

MÜLLER-EBERHARD, H. J. Molecular organization and function of the complement system. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 321-347, 1988.

NAGASAWA, S.; STROUD, R. M. Cleavage of C2 by C1s into the antigenically distinct fragments C2a and C2b: demonstration of binding of C2b to C4b. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 2998-3001, 1977.

OGLESBY, T. J.; ACCAVITTI, M. A.; VOLANAKIS, J. E. Evidence for a C4b binding site on the C2b domain of C2. **J. Immunol.**, v. 141, p. 926-931, 1988.

OLIVEIRA, C. M.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Cytokines and pain. **Rev Bras Anestesiol.**, v. 61, n. 2, p. 255-265, p. 137-142, 2011.

OSIPOV, A. V.; MORDVINTSEV, D. Y.; STARKOV, V. G.; GALEBSKAYA, L. V.; RYUMINA, E. V.; BEL'TYUKOV, P. P.; KOZLOV, L. V.; ROMANOV, S. V.; DOLJANSKY, Y.; TSETLIN, V. I.; UTKIN, Y. N. *Naja melanoleuca* cobra venom contains two forms of complement - depleting factor (CVF). **Toxicon**, v. 46, p. 394-403, 2005.

PIDDE-QUEIROZ, G.; FURTADO, M. de F.; FILQUEIRAS 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, p. 2537-2544, 2010.

PIDDE-QUEIROZ, G.; MAGNOLI, F.; PORTARO, F. C.; SERRANO, S. M.; LOPES, A. S.; PAES-LEME, A. F.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. PI 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, p. e2519, 2013.

PODACK, E. R.; TSCHOPP, T. Membrane attack by complement. **Mol. Immunol.**, v. 21, p. 589-603, 1984.

RUCAVADO, A.; FLORES-SHANCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHÃES, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, n. 9, p. 1297-1312, 1999.

SAAD, E.; BARROS, L. C.; BISCOLA, N.; PIMENTA, D. C.; BARRAVIERA, S. R.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JR, S. R. Intraspecific variation of biological activities in venoms from wild and captive *Bothrops jararaca*. **J Toxicol Environ Health A**., v. 75, n. 16-17, p. 1081-1090, 2012.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. L. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. **Toxicon**, v. 31, p. 733-742, 1993.

SCHUMAKER, U. N.; ZAVODSKY, P.; POON, P. H. - Activation of the first component of complement. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 21-42, 1987.

SILVA, W. Dias da; LEPOW, I. H. Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. J. **Exp. Med.**, v. 125, p. 921-926, 1967.

SILVA, W. Dias da; EISELE, J. W.; LEPOW, I. H. Complement as a mediator of inflammation. III - Purification of activity with anaphylatoxin properties generated by interaction of the first four components of complement and its identification as a cleavage product of C3. **J. Exp. Med.**, v. 116, p. 1027-1048, 1967.

SONG, W. C. Crosstalk between complement and toll-like receptors. **Toxicol Pathol**., v. 40, n. 2, p. 174-182, 2012.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Methods Enzymol.**, v. 45, p. 214-223, 1976.

TACK, B. F. The b-Cys-y-Glu thioester bond in human C3, C4 and beta-2-macroglobulin. Springer **Sem. Immunopathol.**, v. 6, p. 259-282, 1983.

TACK, B. F.; MORRIS, S. C.; PRAHL, J. W. Third component of human complement: structural analysis of polypeptide chains of C3 and C3b. **Biochemistry**, v. 18, p. 1497-1503, 1979.
TANAKA, G. D.; PIDDE-QUEIROZ, G.; FURTADO, M. de F.; VAN DEN BERG, C.; TAMBOURGI, D. V. *Micrurus* snake venoms activate human complement system and generate anaphylatoxins. **BMC Immunol.**, v. 16, p. 13-14, 2012.

TURNER, W. M. - Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of innate immune system. **Immunology Today**, v. 11, p. 532-539, 1996.

VOGEL, C. W.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 8292-8299, 1982.

WHITE, F. A.; WILSON, N. M. Chemokines as pain mediators and modulators. **Curr Opin Anaesthesiol.**, v. 21, n. 5, p. 580-585, 2008.

WRIGHT, S. D.; RAO, P. E.; VAN VOORHIS, W. C.; CRAIGMYLE, L. S.; IIDA, K.; TALLE, M. A.; WESTBERG, E. F.; GOLDSTEIN, G.; SILVERSTEIN, S. C. Identification of the C3bi receptor of human monocytes and macrophages by using monoclonal antibodies. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 80, p. 5699-5703, 1983.

ZELANIS, A.; ANDRADE-SILVA, D.; ROCHA, M.M.; FURTADO, M. F.; SERRANO, S. M. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PLoS Negl Trop Dis**., v. 6, n. 3, p. e1554, 2012.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. Int Anestiol Clin., v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, M.; TAKAHASHI, K.; ALICOT, E. M.; VORUP-JENSEN, T.; KESSLER, B.; JENSENIUS, J. C.; MOORE, F. D.; CARROLL, M. C. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. **J. Immunol**., v. 177, n. 7, p. 4727-4737, 2006.