UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos
brutos e componentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e
Bothrops pirajai

Lorena Rocha Ayres

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos
brutos e componentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e
Bothrops pirajai

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientada: Lorena Rocha Ayres

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ayres, Lorena Rocha

Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos brutos e componentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai*. Ribeirão Preto, 2010.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

98 p.:il; 30 cm

Orientadora: Pereira-Crott, Luciana Simon

1. Imunomodulação.
2. Sistema Complemento.
3. Linfócitos.
4. Quimiotaxia.
5. Venenos de Serpentes

Nome do aluno: Lorena Rocha Ayres

Título do trabalho: Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos brutos e componentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico esta dissertação
primeiramente a Deus, por
estar presente em todos os
momentos**

Aos meus pais, Helder e
Sônia, pois é o amor que
tenho por vocês que me faz
seguir em frente. Vocês me
fazem desejar as melhores
coisas dessa vida!

**Aos meus irmãos amados,
Heitor e Luísa, pelo
companheirismo e incentivo e
ao meu sobrinho Murilo, por
trazer paz e alegria a nossa
família**

**À minha orientadora, Luciana,
por todos os ensinamentos e
pela amizade**

Agradecimentos

À Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott, pela confiança, paciência e por sempre me incentivar.

Aos meus pais e aos meus irmãos, por todo amor, carinho e compreensão.

Aos meus avós, Felicidade e José, pois mesmo não estando mais entre nós, estão sempre guiando meus passos.

Aos meus avós, Antônio e Olívia, por toda dedicação à família e por me ensinarem sempre grandes lições de vida.

À equipe do laboratório de Imunologia Clínica, os alunos Álex, Andrea e Juliana e os funcionários, Tânia e Rubinho, por não serem para mim apenas colegas de trabalho, mas sim grandes amigos. Obrigada pelo companherismo e imenso carinho!

Aos amigos que vieram comigo de Alfenas, pelas lembranças de uma das melhores épocas de minha vida.

Aos amigos que fiz na organização do III Sinpospq em 2008, pelos momentos inesquecíveis.

Aos amigos da APG, por tudo que aprendemos juntos.

Às amigas Flávia e Julise, essenciais durante todo o tempo do meu mestrado, obrigada pela amizade sincera e pelo imenso incentivo.

A todos os meus familiares e amigos, por sempre torcerem por mim.

Aos Professores Dra. Suely Vilela e Dr. Andreimar Martins Soares e à funcionária Dra. Adélia pelo fornecimento dos venenos brutos e toxinas de serpentes, objetos de estudo desta dissertação.

À Profa. Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi, pela contribuição na elaboração do projeto.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, por ter me ensinado a trabalhar com culturas celulares.

À Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro e às suas alunas e queridas amigas Raquel e Sandrinha, pelas valiosas colaborações.

À Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim, por deixar seu laboratório sempre de portas abertas à nossa equipe.

À funcionária Aninha, do laboratório de Bioquímica, por sempre estar disposta a ajudar no que fosse preciso.

À funcionária Fabiana, pela atenção e auxílio nas análises dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao funcionário Alcides, do laboratório de Bioquímica, pelo auxílio na manipulação de animais.

Aos funcionários do Biotério Central e do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por sempre me atenderem quando precisei.

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação.

RESUMO

AYRES, L.R. **Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos brutos e componentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai***. 2010, 96f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos no Brasil. Seus venenos provocam efeitos locais em humanos e animais, como hemorragia, edema, dor e necrose, caracterizando uma resposta inflamatória, cujo mecanismo não está bem definido. Esses efeitos estão relacionados com a ação combinada de proteases, substâncias que induzem hemorragia e fosfolipases, bem como a liberação de mediadores endógenos gerados pelos venenos. Considerando que a ativação do sistema complemento (SC) e de funções celulares, como quimiotaxia, ativação, proliferação e citotoxicidade podem desempenhar papel importante nos processos inflamatórios e de lesão tecidual subsequentes ao envenenamento, o estudo propõe: a) investigar a capacidade dos venenos brutos de serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai* e das toxinas purificadas, serinoprotease de *B. jararacussu* (SPBj) e L-aminoácido oxidase de *B. pirajai* (LAAOBp), em modular a atividade do SC; b) avaliar a contribuição do efeito sobre o SC no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares humanos (PMN); c) avaliar o potencial citotóxico direto dos venenos e toxinas sobre células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC); d) analisar o efeito dos venenos sobre a modulação da expressão dos marcadores de ativação CD69, CD25 e HLA-DR em células T, B e *natural killer* (NK). Os resultados do ensaio de citotoxicidade mostraram que o veneno bruto de *B. jararacussu* foi citotóxico para PBMC apenas nas concentrações maiores, de 50 e 100µg/mL, não apresentando citotoxicidade nas outras concentrações testadas. A serinoprotease apresentou baixa citotoxicidade para essas células, o que sugere a necessidade de maiores investigações quanto aos mecanismos que levam a essa morte celular. O aumento da viabilidade celular encontrado nas amostras incubadas com veneno bruto e LAAO de *B. pirajai* sugere possível indução de proliferação celular, que necessita de maiores estudos. Os resultados obtidos sugerem que os venenos brutos de *B. jararacussu* e *B. pirajai* são capazes de ativar o SC como observado nos ensaios cinéticos da VC/VL e VA e de quimiotaxia de neutrófilos, onde ficou evidenciado que a migração celular foi devida a liberação dos fatores quimiotáticos do SC, C3a e C5a. e que suas respectivas toxinas, serinoprotease e LAAO apresentam efeitos moduladores sobre o SC humano, e estimulam investigações mais aprofundadas com a finalidade de se esclarecer os mecanismos de ação e identificar os componentes responsáveis pelos efeitos observados. Houve expressão aumentada de CD69, CD25 e HLA-DR nas células T CD4⁺ e CD8⁺, especialmente quando incubadas com veneno bruto de *B. jararacussu* e LAAO de *B. pirajai*, o que reflete ativação da resposta imune celular, e pode sugerir que este tipo de resposta desempenhe papel relevante na indução e/ou controle dos processos imunopatológicos decorrentes de envenenamentos por *B. jararacussu* e *B. pirajai*. Esta investigação visa fornecer subsídios para a possível utilização das toxinas para fins terapêuticos e como ferramentas para investigação dos mecanismos envolvidos nos processos fisiopatológicos que ocorrem em decorrência de picadas e também em outras doenças de caráter inflamatório.

Palavras-chave: imunomodulação, sistema complemento, neutrófilos, quimiotaxia, linfócitos, marcadores de ativação, venenos de serpentes, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai*.

ABSTRACT

AYRES, L.R. Modulation of events of humoral and cellular immunity by crude venom and components of *Bothrops jararacussu* and *Bothrops pirajai*. 2010, 96f. Master. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Snakes of the genus *Bothrops* are responsible for 90% of snakebites in Brazil. Their venoms cause local effects in humans and animals, such as hemorrhage, edema, pain and necrosis, characteristic of an inflammatory response. The mechanism is not well defined. These effects are related to the combined action of proteases, substances that induce bleeding and phospholipases, as well as release of endogenous mediators generated by the venoms. Considering that activation of the complement system (CS) and cellular functions such as chemotaxis, activation, proliferation and cytotoxicity, may play a role in inflammatory processes and tissue injury following envenomation, the study proposes: a) to investigate the ability of crude venom of *B. jararacussu* and *B. pirajai* and the purified toxins, serineprotease of *B. jararacussu* and L-amino acid oxidase (LAO) of *B. pirajai* in modulating the activity of the CS, b) to assess the contribution of the effect on CS in the recruitment of human polymorphonuclear leukocytes (PMN), c) to assess the direct cytotoxic potential of venoms and toxins on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), d) to analyse the effect of venoms on the modulation of the expression of activation markers CD69, CD25 and HLA-DR on T, B and natural killer (NK) cells. The results of cytotoxicity assay showed that the crude venom of *B. jararacussu* was cytotoxic to PBMC only at higher concentrations, 50 and 100µg/mL, showing no cytotoxicity in the other concentrations. The serineprotease showed low cytotoxicity to the cells, suggesting the need for further investigations about the mechanisms that lead to this cell death. The increase in cell viability found in samples incubated with crude venom of *B. pirajai* and LAO suggests the possibility of induction of cell proliferation, which needs further study. The results suggest that the crude venom of *B. jararacussu* and *B. pirajai* are capable of activating the CS as observed in kinetic assays of classical pathway/lectin pathway and alternative pathway and neutrophil chemotaxis assay, where it was shown that cell migration was due to release of CS chemotactic factors, C3a and C5a, and that their respective toxins, serineprotease and LAO have modulatory effects on human CS, and stimulate further research in order to clarify the mechanisms of action and identify the components responsible for the observed effects. There was increased expression of CD69, CD25 and HLA-DR on CD4⁺ and CD8⁺, especially when incubated with crude venom of *B. jararacussu* and LAO of *B. pirajai*. It reflects activation of cellular immune response and may suggest that this type of response play an important role in the induction and/or control of immunopathological processes arising from envenomation by *B. jararacussu* and *B. pirajai*. This research aims to provide subsidies to the possible use of the toxin for therapeutic purposes and as tools for investigating mechanisms involved in pathophysiological processes that occur as a result of snakebites and also in other diseases of inflammatory nature.

Keywords: immunomodulation, complement system, neutrophils, chemotaxis, lymphocytes, activation markers, snake venoms, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai*.

RESUMEN

AYRES, L.R. **Modulación de los acontecimientos de la inmunidad humoral y celular por el veneno bruto y los componentes del veneno de *Bothrops jararacussu* y *Bothrops pirajai***. 2010, 96F. Disertación. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Serpientes del genero *Bothrops*, son responsables del 90% de los accidentes por mordeduras de serpientes en el Brasil. Sus venenos causan efectos locales en los seres humanos y animales, tales como hemorragia, edema, dolor y necrosis, característica de una respuesta inflamatoria, cuyo mecanismo no está bien definido. Estos efectos están relacionados con la acción combinada de las proteasas (que son sustancias que inducen sangrado), fosfolipasas y liberación de mediadores endógenos generados por los venenos. Teniendo en cuenta que la activación del sistema del complemento (SC) y las funciones celulares como la quimiotaxis, la activación, proliferación y citotoxicidad pueden tener un papel en los procesos inflamatorios y de lesión tisular después de la intoxicación. Este trabajo propone: a) Investigar la capacidad de veneno bruto de *Bothrops jararacussu* y *Bothrops pirajai*, y sus toxinas purificadas, serinoproteasa de *B. jararacussu* y L-aminoácido oxidasa de *B. pirajai*, en la modulación de la actividad de lo SC, b) evaluar la contribución del efecto sobre lo SC en lo reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN), c) evaluar el potencial citotóxico directo de los venenos y toxinas en células mononucleares periféricas de humanos (PBMC), d) analizar el efecto de los venenos en la modulación de la expresión de marcadores de activación CD69, CD25 y HLA-DR en los linfocitos T, B y células natural killer (NK). Los resultados del ensayo de citotoxicidad, mostraron que el veneno bruto de *B. jararacussu* fueron citotóxicos para las PBMC, sólo en concentraciones más altas, 50 y 100µg/mL, sin mostrar citotoxicidad en las demás concentraciones. La serinoproteasa mostró baja citotoxicidad en estas células, lo que sugiere la necesidad de una mayor investigación sobre los mecanismos que llevan a esta muerte celular. El aumento de la viabilidad celular en las muestras incubadas con el veneno bruto y LAAO de *B. pirajai* sugiere la posible inducción de la proliferación celular, y son necesarios más estudios para soportar esta hipótesis. Los resultados sugieren que el veneno bruto de *B. jararacussu* y *B. pirajai* son capaces de activar el SC como se observó en ensayos de cinética de CV/VL y VA y en los experimentos de quimiotaxis de los neutrófilos, donde se demostró que la migración celular se debe a liberación de factores quimiotácticos que activan el SC, através de C3a, C5a y que sus respectivas toxinas, serinoproteasa y LAAO también tienen efectos moduladores sobre lo SC humano; las cuales estimulan a nuevas investigaciones para aclarar los mecanismos de acción y identificar los componentes responsables de los efectos observados. Hubo un aumento de expresión de CD69, CD25 y HLA-DR en células T CD4⁺ y CD8⁺, en especial cuando fueron incubadas con el veneno bruto de *B. jararacussu* y LAAO de *B. pirajai*, las cuales resultan en la activación de la respuesta inmune celular y puede sugerir que este tipo de respuesta tenga un papel importante en la inducción y/o control de los procesos inmunopatológicos de individuos que presentan casos de envenenamiento por *B. jararacussu* y *B. pirajai*. Estas investigaciones tienen como objetivo ofrecer subsidios para una posible utilización de las toxinas con fines terapéuticos y como herramientas para investigar los mecanismos que intervienen en los procesos fisiopatológicos producidas como consecuencia de las mordeduras por serpiente del genero *Bothrops* y también en otras enfermedades de carácter inflamatorio.

Palabras claves: inmunomodulación, sistema del complemento, neutrófilos, quimiotaxis, linfócitos, marcadores de activación, venenos de serpientes, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops pirajai*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema representativo das vias de ativação do SC	5
Figura 2.	Efeitos celulares do complexo de ataque à membrana, MAC	7
Figura 3.	Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> , avaliadas pelo ensaio de redução do MTT	26
Figura 4.	Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> , avaliadas pelo ensaio de redução do MTT	26
Figura 5.	Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de veneno bruto de <i>B. pirajai</i> , avaliadas pelo ensaio de redução do MTT	27
Figura 6.	Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de LAAO de <i>B. pirajai</i> , avaliadas pelo ensaio de redução do MTT	27
Figura 7.	Efeito do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica.	29
Figura 8.	Porcentagens de inibição da atividade hemolítica da via clássica do complemento humano, em função da concentração de veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	30
Figura 9.	Efeito do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> sobre a atividade hemolítica da via alternativa	31
Figura 10.	Efeito da serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica	32

Figura 11. Efeito da serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> sobre a atividade hemolítica da via alternativa	33
Figura 12. Efeito do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica	35
Figura 13. Porcentagens de inibição da atividade hemolítica da via clássica do complemento humano, em função da concentração de veneno bruto de <i>B. pirajai</i>	35
Figura 14. Efeito do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> sobre a atividade hemolítica da via alternativa	36
Figura 15. Efeito da LAAO de <i>B. pirajai</i> sobre a atividade hemolítica da via clássica	38
Figura 16. Efeito da LAAO de <i>B. pirajai</i> sobre a atividade hemolítica da via alternativa	39
Figura 17. Resposta quimiotática de neutrófilos ao veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	40
Figura 18. Resposta quimiotática de neutrófilos ao veneno bruto de <i>B. pirajai</i>	41
Figura 19. Efeito do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células T CD4 ⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR	42
Figura 20. Efeito do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células T CD8 ⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR	42
Figura 21. Efeito do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células B expressando CD69, CD25 e HLA-DR	43
Figura 22. Efeito do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células NK	43

Figura 23.	Efeito da serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células T CD4 ⁺ . expressando de CD69, CD25 e HLA-DR	44
Figura 24.	Efeito da serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células T CD8 ⁺ . expressando de CD69, CD25 e HLA-DR	44
Figura 25.	Efeito da serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células B. expressando de CD69, CD25 e HLA-DR	44
Figura 26.	Efeito da serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> na porcentagem de células NK	45
Figura 27.	Efeito do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células T CD4 ⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR	46
Figura 28.	Efeito do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células T CD8 ⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR	46
Figura 29.	Efeito do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células B expressando CD69, CD25 e HLA-DR	46
Figura 30.	Efeito do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células NK	47
Figura 31.	Efeito da LAAO de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células T CD4 ⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR	48
Figura 32.	Efeito da LAAO de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células T CD8 ⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR	48
Figura 33.	Efeito da LAAO de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células B expressando CD69, CD25 e HLA-DR	48
Figura 34.	Efeito da LAAO de <i>B. pirajai</i> na porcentagem de células NK	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados para análise das subpopulações de linfócitos	21
Tabela 2 -	Marcadores de ativação utilizados	22
Tabela 3 -	Atividade moduladora do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> , sobre a via clássica do complemento humano	29
Tabela 4 -	Atividade moduladora do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> , sobre a via alternativa do complemento humano	31
Tabela 5 -	Atividade moduladora de serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> , sobre a via clássica do complemento humano	32
Tabela 6 -	Atividade moduladora de serinoprotease de <i>B. jararacussu</i> , sobre a via alternativa do complemento humano	33
Tabela 7 -	Atividade moduladora do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> , sobre a via clássica do complemento humano	34
Tabela 8 -	Atividade moduladora do veneno bruto de <i>B. pirajai</i> , sobre a via alternativa do complemento humano	36
Tabela 9 -	Atividade moduladora de LAAO de <i>B. pirajai</i> , sobre a via clássica do complemento humano	37
Tabela 10 -	Atividade moduladora de LAAO de <i>B. pirajai</i> , sobre a via alternativa do complemento humano	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CVF	<i>Cobra venom factor</i>
HBSS	Solução salina tamponada de HANKS
LAAO	L-aminoácido oxidase
MAC	do inglês “ <i>membrane attack complex</i> ” ou complexo de ataque a membrana
MBL	do inglês “ <i>mannose binding lectin</i> ” ou lectina de ligação a manose
MN	Mononucleares
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)
NK	<i>natural killer</i>
PBMC	do inglês “ <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ” ou células mononucleares do sangue periférico
PBS	do inglês “ <i>phosphate buffered saline</i> ” ou solução salina tamponada com fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
SC	Sistema complemento
SDS	do inglês “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ” ou dodecil sulfato de sódio
SHN	Soro humano normal
TEA	Trietanolamina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VA	Via alternativa
VC	Via clássica
VL	Via das lectinas

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Resumen	iv
iLista figuras	vi
Lista de tabelas	ix
Lista de abreviaturas e siglas	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Venenos e toxinas de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Bothrops pirajai</i>	2
1.2 Sistema Complemento	4
1.3 Efeitos de Venenos sobre Células	7
1.3.1 Recrutamento de células inflamatórias	7
1.3.2 Opsonização e Fagocitose	8
1.3.3 Citotoxicidade e apoptose	8
1.3.4 Ativação e proliferação celular	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Geral	13
2.2 Específico	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Venenos e toxinas	15
3.2 Casuística	15
3.3 Animais	16
3.4 Modulação de atividade do SC humano por venenos e toxinas	16
3.4.1 Via Clássica/da Lectina (VC/VL)	16
3.4.2 Via Alternativa (VA)	17
3.4.3 Ensaio de atividade hemolítica (Método Cinético)	17
3.5 Quimiotaxia de neutrófilos dependente do SC	19
3.5.1 Preparo das amostras	19
3.5.2 Ensaio <i>in vitro</i>	19
3.6 Modulação de eventos celulares por venenos/toxinas	20

3.6.1	Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	20
3.6.2	Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo	21
3.6.3	Ensaio de Citotoxicidade (MTT)	22
3.7	Análise Estatística	23
4.	RESULTADOS	24
4.1	Ensaio de citotoxicidade	25
4.2	Ensaio de modulação da atividade hemolítica do SC pelo método cinético	28
4.3	Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos dependente do SC	39
4.4	Análise das subpopulações de linfócitos e avaliação dos marcadores de ativação celular por citometria de fluxo	41
5.	DISCUSSÃO	50
5.1	Ensaio de citotoxicidade	51
5.2	Ensaio do SC	52
5.3	Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo	55
6.	CONCLUSÃO	59
7.	REFERÊNCIAS	60
ANEXO A		71
ANEXO B		72
ANEXO C		73

1.INTRODUÇÃO

Venenos de serpentes são misturas complexas de componentes que apresentam uma vasta gama de ações tanto na presa como em vítimas humanas (QUEIROZ et al., 2008). Na América Latina, a maioria das picadas de serpentes é causada por membros do gênero *Bothrops* (ZAMUNER et al., 2001). No Brasil, as picadas de serpentes são problemas de saúde pública onde vinte mil casos provocados por serpentes peçonhentas são relatados todo ano, e aproximadamente 90% deles são provocados por serpentes do gênero *Bothrops* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Essas picadas produzem uma variedade de efeitos locais como edema, dor, hemorragia e necrose, e sistêmicos como coagulopatia, hipotensão, falência renal e hemorragia sistêmica que são mediados em grande parte por metaloproteinases e fosfolipases do veneno, embora outras enzimas, por exemplo, a L-aminoácido oxidase (LAAO) e enzimas que afetam a cascata de coagulação, possam estar também envolvidas (NASCIMENTO et al., 2007).

A principal causa de morte por picadas de serpentes do gênero *Bothrops* é a falência renal aguda. Vários estudos experimentais *in vitro* mostram que o veneno de *Bothrops* expressa um efeito deletério na função e morfologia renal (NASCIMENTO et al., 2007).

Os venenos de serpentes *Bothrops* provocam uma resposta inflamatória local característica, envolvendo edema e subsequente mobilização de leucócitos, cujo mecanismo não está bem descrito. Possivelmente esta mobilização decorre, entre outros mecanismos, da ativação do sistema complemento (SC), como já observado em estudos com venenos de *B. asper* (FARSKY et al., 2000).

O SC é um dos alvos dos venenos de serpentes. Soro tratado com veneno bruto de *B. atrox* perde sua atividade hemolítica (RODRIGUES et al., 2004). O fator do veneno de cobra (CVF), proteína não-tóxica do veneno de *Naja naja*, complexa-se com o fator B formando uma convertase bimolecular C3/C5 estável e resistente aos reguladores do complemento humano. Esta enzima ativa o complemento, depletando este sistema *in vivo* e *in vitro* (MORGAN; HARRIS, 2003).

1.1 Venenos e toxinas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai*

Envenenamento pela espécie *B. jararacussu* leva a sinais e sintomas semelhantes aos que ocorrem em picadas por outras espécies do gênero *Bothrops* e destaque tem sido dado aos processos agudos como hemorragia, edema e necrose.

A mionecrose é o efeito local mais evidente causado pelo veneno de *B. jararacussu* e a atrofia muscular é uma sequela comum provocada por picadas de animais dessa espécie (QUEIRÓZ; MARQUES; NETO, 2002).

Pouco se sabe sobre o veneno de *B. pirajai*, conhecida popularmente como “jararacussu da Bahia”, uma espécie encontrada no estado da Bahia, na região nordeste do Brasil. Morfologicamente, esta espécie é semelhante a *B. jararacussu* (COSTA et al., 1999).

Os venenos de serpentes são reconhecidos como fontes de substâncias biologicamente ativas mostrando uma imensa gama de atividades farmacológicas. Os componentes que se encontram em maior quantidade nos venenos são fosfolipase A₂, metaloproteases, serinoproteases, LAAOs, fatores de crescimento dos nervos (NGF), lectina tipo C, proteínas ricas em cisteína dentre outras (CORREA-NETTO et al., 2010). Dentre este conjunto complexo de componentes tóxicos e não tóxicos destaca-se a LAAO, que representa de 1 a 9% do total das proteínas do veneno (IZIDORO et al., 2006). LAAOs são flavoenzimas que catalizam a deaminação oxidativa estéreo-específica de um L-aminoácido a um α -cetoácido correspondente, via um intermediário imino ácido, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia. Essas enzimas são amplamente distribuídas em vários organismos como bactérias, fungos, algas verdes e estão envolvidas na utilização de fontes de nitrogênio (STÁBELI et al., 2004). A função das LAAOs em venenos de serpentes é ainda pouco compreendida, entretanto elas participam da indução de apoptose, afetam plaquetas e são consideradas como toxinas (DU; CLEMETSON, 2002). Além dessas atividades biológicas, também estão incluídas hemólise, hemorragia, edema e efeitos bactericidas (BRAGA et al., 2008).

Serinoproteases são abundantes em venenos de serpentes e têm sido isoladas e caracterizadas. Fox et al. (2006) mostraram através de análises proteômicas e de espectrometria de massas que 51,5% e 14% do total de componentes protéicos presentes no veneno de *B. jararaca* são metalo e serinoproteases, respectivamente. Além de compartilharem características estruturais semelhantes, estas serinoproteases atuam sobre proteínas da cascata da coagulação, com atividade semelhante à trombina no fibrinogênio, ativação do fator V, ativação da proteína C, fibrinólise, ativação do plasminogênio e indução da agregação plaquetária (SERRANO; MAROURI, 2005; PÉREZ et al., 2007). Além disso, devido aos seus

glicoconjugados, elas são estruturalmente estáveis e não perdem a atividade mesmo quando expostas a altas temperaturas (EBLE, 2010).

1.2 Sistema Complemento

O SC consiste de aproximadamente 30 proteínas séricas e de superfície celular que interagem umas com as outras de maneira altamente regulada, quando necessário, a fim de promover inflamação e destruir invasores como microrganismos e células estranhas. Pela sua capacidade de danificar tecidos, há também as proteínas regulatórias que controlam a ativação do complemento e através disso regulam negativamente os danos mediados pelo complemento (WAGNER; FRANK, 2010).

Dependendo do estímulo, sua ativação pode ocorrer pelas vias clássica (VC), alternativa (VA) e das lectinas (VL). A VC é ativada quando o C1, primeiro componente da cascata, se liga a uma molécula de anticorpo complexada a um antígeno. A VA é ativada por hidrólise espontânea do componente C3. A VL, mais recentemente descoberta, é ativada através do reconhecimento de carboidratos na superfície de microrganismos pela proteína plasmática humana ligante de manose (MBL, *mannose binding lectin*) (TURNER, 1996; CARROLL, 2004). A ativação do SC leva a proteólise sequencial conhecida como cascata enzimática com a geração de produtos com atividades biológicas como anafilaxia, quimiotaxia, opsonização, solubilização de imunocomplexos e modulação da resposta imune (WALPORT, 2001). A Figura 1 resume as vias de ativação, componentes e propriedades biológicas deste sistema.

Figura 1. Esquema representativo das vias de ativação do SC. Adaptado de Janeway et al. (2006), segundo Bitencourt (2006).

Além de seu papel na defesa do hospedeiro, o SC tem função importante em várias reações inflamatórias agudas e crônicas bem como em diferentes mecanismos patogênicos de dano de tecido associado a doenças autoimunes, isquêmicas e intervenções terapêuticas (KIRSCHFINK, 2001; MORGAN; HARRIS, 2003). Ativação errônea ou regulação insuficiente da cascata de complemento pode tornar sua ação destrutiva contra as células do hospedeiro. Como consequência, as

doenças citadas podem ser desencadeadas por desregulação do sistema complemento (RICKLIN; LAMBRIS, 2007).

A ativação do SC, por qualquer das três vias, leva à formação de produtos de clivagem que são importantes na quimiotaxia e ativação de fagócitos e na iniciação de uma resposta inflamatória adequada contra microrganismos invasores. As anafilatoxinas C3a e C5a são mediadores proinflamatórios em processos inflamatórios locais (HAAS; STRIJP, 2007), induzindo a quimiotaxia de leucócitos, a desgranulação de fagócitos, mastócitos e basófilos, a contração de músculo liso e o aumento de permeabilidade vascular. A resposta inflamatória é ainda amplificada pela geração subsequente de radicais de oxigênio e indução da síntese e liberação de metabólitos do ácido araquidônico e citocinas. Consequentemente, além de seu papel no *clearance* de microrganismos, anafilatoxinas desempenham papel importante em processos inflamatórios destrutivos que causam dano tissular e síndromes inflamatórias graves levando à falência de órgãos (MASTELLOS et al, 2005).

Outro evento comum às três vias de ativação é a formação do complexo C5b-9 (MAC, *Membrane Attack Complex*). A montagem do C5b-9 na membrana plasmática induz ativação celular com consequências fisiológicas e/ou fisiopatológicas importantes. Pode ocorrer dano de tecidos por lise celular ou apoptose, ou ainda uma combinação dos dois mecanismos. Efeitos opostos de indução ou inibição de apoptose foram observados *in vitro* (COLE; MORGAN, 2003). A Figura 2 resume os efeitos decorrentes da inserção do MAC na membrana da célula.

A geração de anafilatoxinas e de complexos C5b-9 pode ser responsável, pelo menos em parte, pelos sinais e sintomas decorrentes do envenenamento botrópico.

Figura 2. Efeitos celulares do complexo de ataque à membrana, MAC. Adaptado de Cole e Morgan, 2003.

1.3 Efeitos de venenos sobre células

1.3.1 Recrutamento de células inflamatórias

O recrutamento de células inflamatórias é o evento inicial da inflamação, um mecanismo de defesa do hospedeiro contra agentes nocivos. Durante a fase aguda da inflamação, neutrófilos são as primeiras células a se acumularem nos tecidos. Migração de leucócitos para o tecido é um processo de múltiplos passos, mediado pelas três maiores classes de moléculas de adesão (integrinas, selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas) expressas por leucócitos e células endoteliais. Esse processo, em contrapartida, é regulado por inúmeros mediadores de inflamação, que são liberados durante a reação inflamatória (FERNANDES et al., 2006).

Tem sido demonstrado que venenos de *Bothrops* induzem acúmulo significativo de leucócitos no local do tecido lesado. Entretanto, pouco se sabe sobre o estado de ativação dessas células no local de inoculação do veneno (ZAMUNER et al., 2001).

Bertazzi et al. (2005) mostraram que a incubação de soro normal humano e veneno de *Tityus serrulatus* induz migração de neutrófilos semelhante àquela induzida pela incubação com zimosan, utilizado classicamente como ativador do sistema complemento, mostrando que o veneno induz a quebra de C3 e C5, gerando os fragmentos ativos C3a e C5a. O aquecimento do soro a 56°C antes da

incubação com o veneno inibe essa migração sugerindo que produtos da ativação do complemento são responsáveis pela quimiotaxia. Resultados semelhantes foram obtidos com o veneno de *B. asper* e sua metaloproteinase BaP-1 (FARSKY et al., 2000), demonstrando que o soro incubado com essas substâncias induz quimiotaxia de neutrófilos, igualmente mediada por fragmentos derivados da ativação do complemento.

1.3.2 Opsonização e Fagocitose

A fagocitose é um evento central na resposta imune inata, desencadeado pela associação entre ligantes na superfície de patógenos e receptores na membrana de fagócitos (TOHYAMA; YAMAMURA, 2006). Fagocitose de patógenos é mediada por receptores do SC e por receptores Fc após opsonização com anticorpos. Todos esses receptores induzem rearranjo no citoesqueleto de actina que leva à internalização de partículas (UNDERHILL; OZINSKY, 1999).

Zamuner et al. (2001) investigaram os efeitos dos venenos de *B. asper* e de *B. jararaca* sobre a capacidade fagocítica dos leucócitos na cavidade peritoneal de ratos. Seus resultados mostraram que ambos os venenos aumentaram o englobamento de partículas de zimosan pelas células peritoneais polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN), com o envolvimento de receptores de complemento. Em contraste com esses resultados, Souza e Silva et al. (1996) mostraram que o veneno da serpente sul-americana *Crotalus durissus terrificus* reduz a capacidade de fagocitose por MN indicando que diferentes venenos induzem diferentes padrões de inflamação. Esses resultados contraditórios podem ser decorrentes de variações nas condições experimentais e instigam novas investigações.

1.3.3 Citotoxicidade e apoptose

As interações entre toxinas de venenos e leucócitos têm despertado interesse visto que se observa inflamação grave em pacientes picados por serpentes. Atividades citotóxicas de venenos têm sido relatadas e são atribuídas a diversas enzimas e toxinas, tais como fosfolipase A₂ (PLA₂), proteases, lectinas e cardiotoxinas (DU et al., 2006).

Oliveira et al. (2002) compararam a citotoxicidade *in vitro* do veneno de oito espécies de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* em cultura de células Vero mostrando diferentes padrões de toxicidade entre as diferentes espécies.

Nascimento et al. (2007) mostraram que veneno de *B. alternatus* é citotóxico em cultura de células renais de cães.

A apoptose é um processo fisiológico de morte celular que tem um papel importante para o sistema imune, mantendo o controle da autotolerância e da homeostase de populações de linfócitos. Caracteriza-se pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA e ativação das caspases. Este processo pode ser iniciado por diferentes estímulos provenientes de organelas intracelulares, como as mitocôndrias, que podem liberar fatores apoptóticos como citocromo c e ativar as caspases, chamada de via intrínseca, como também da ativação de receptores na membrana da célula, chamada de via extrínseca (MANIATI et al, 2008).

Muitas LAAOs demonstraram atividade indutora de apoptose e isso se deve parcialmente a geração de peróxido de hidrogênio (ANDE et al., 2006).

Metaloproteinase BaP1 de veneno de *B. asper* induz apoptose/*anoikis* em células endoteliais e esse processo leva à ruptura da membrana plasmática, um evento associado com necrose secundária (DIAZ et al., 2005). Tanjoni et al. (2005) sugerem que a toxina jararagina, isolada do veneno de *B. jararaca*, interfere nos mecanismos de sinalização celular levando à perda de adesão à matriz, seguida de apoptose. Este efeito é seletivo para células endoteliais, constituindo uma ferramenta útil para estudar a relação entre as mudanças na arquitetura do citoesqueleto e o fenômeno complexo denominado *anoikis*.

O MAC gerado pela ativação do SC foi primeiramente reconhecido pela sua habilidade de lisar células e causar morte celular; mais tarde foi observado que ele é capaz de ativar a inflamação induzindo neutrófilos a secretar leucotrienos, prostaglandinas (PGE₂) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de participar na modulação da apoptose e estimulação da proliferação celular (COLE; MORGAN, 2003; OLIVEIRA et al., 2006). Não foram encontrados relatos na literatura demonstrando associação direta do MAC a danos celulares induzidos por venenos de serpentes; entretanto, a associação desses eventos foi sugerida por Ishikawa et al. (2004) para veneno de águas-vivas.

Produtos de ativação do SC, portanto, podem modular diversos eventos celulares, como citotoxicidade, apoptose, proliferação e ativação de células mononucleares. Estes eventos podem desempenhar papel importante nos processos patogênicos decorrentes do envenenamento botrópico.

1.3.4 Ativação e proliferação celular

Uma característica importante da resposta imune adaptativa é a habilidade dos clones de linfócitos antígeno-específicos de proliferar rapidamente e se diferenciar em células efectoras. A ativação dos linfócitos T é o primeiro passo necessário ao desenvolvimento dessas respostas e atividades biológicas associadas com ativação dessas células incluem: expressão de marcadores de ativação e de receptores de citocinas na superfície celular, produção e secreção de citocinas e proliferação (COLLINS, 2000).

Marcadores de ativação de linfócitos são glicoproteínas de superfície celular expressas como marcadores fenotípicos ou identificadores de diferentes estágios de maturação da célula. Moléculas envolvidas na ativação ou regulação de linfócitos incluem HLA-DR, CD25 e CD69. HLA-DR é expresso em 48-60 horas sugerindo apresentação de antígeno (REA, MCNERLAN, ALEXANDER, 1999). CD69 é um marcador de ativação precoce expresso em linfócitos B e T e células NK que aumenta na maioria das células hematopoéticas após estimulação e pode ser detectado em até uma hora de estimulação de células T com mitógenos e antígenos purificados (ARVÅ; ANDERSSON, 1999). CD25, conhecido como cadeia α do receptor de IL-2, é expresso em células T convencionais após estimulação e tem sido utilizado para definir subpopulações de células T regulatórias ou supressoras, importantes na manutenção da autotolerância imunológica (SAKAGUCHI, 2005).

Portanto, ativação celular pode ser estudada analisando a cinética da expressão de marcadores de superfície após estimulação de células com diferentes substâncias. Adicionalmente, a imunofenotipagem de subpopulações de células linfóides tem sido útil para prever a imunotoxicidade de substâncias (BURCHIEL et al., 1999), especialmente quando combinada a ensaios tradicionais que avaliam função celular. Assim, o emprego de ensaios de proliferação celular pode fornecer informações valiosas quanto à função de linfócitos cultivados na presença de diferentes estímulos.

Mora et al. (2005) demonstraram que um homólogo de PLA₂ de veneno de *B. asper* é capaz de induzir dano na membrana e necrose, mas também de promover apoptose e proliferação celular em linhagem de células linfoblastóides. Alternagina-C isolada do veneno de *B. alternatus*, induz proliferação em células endoteliais humanas *in vitro*, e em altas concentrações pode inibir a sua proliferação (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2005). Crotapotina, uma fração do veneno de

Crotalus durissus terrificus, inibe a resposta proliferativa de linfócitos *in vitro* através da indução de secreção de PGE₂ por macrófagos (GARCIA et al., 2003).

Visto que componentes de venenos, bem como produtos gerados após sua ação podem representar papel importante no controle da resposta proliferativa e de outros eventos relacionados com a função de linfócitos, é interessante investigar possíveis efeitos dos venenos e toxinas na imunidade celular.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Dentro do projeto temático “Toxinas Animais: Estrutura, função e aplicações biotecnológicas” (FAPESP 2005/54855-0), o objetivo geral deste estudo é investigar a presença, nos venenos em questão, de substâncias com ação sobre o SC, quimiotaxia de neutrófilos e expressão de marcadores de linfócitos. Esta investigação visa fornecer subsídios para a possível utilização das toxinas para fins terapêuticos, e como ferramentas para investigação dos mecanismos envolvidos nos processos patológicos que ocorrem em decorrência de picadas e também em outras doenças de caráter inflamatório.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos deste estudo são investigar, usando sistemas *in vitro*, se os venenos de serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai* e suas toxinas purificadas, serinoprotease de *B. jararacussu* e L-aminoácido oxidase de *B. pirajai* são capazes de:

- modular a atividade do SC do soro humano;
- induzir quimiotaxia de neutrófilos dependente de produtos de ativação do SC;
- exercer efeitos citotóxicos diretos sobre PBMC;
- modular a expressão de marcadores fenotípicos e de ativação celular, incluindo receptores de citocinas, em linfócitos T, B e células NK.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Venenos e Toxinas

São objetos de estudo deste projeto os venenos brutos das serpentes *B. jararacussu* e *B. pirajai*. Venenos brutos liofilizados foram adquiridos dos serpentários Bioagents Proteínas Bioativas Ltda, Batatais-SP e Instituto Butantan-SP. Foram ainda testados componentes biologicamente ativos obtidos do veneno de *B. pirajai* (L-aminoácido oxidase) e *B. jararacussu* (serinoprotease) fornecidos pela Profa. Dra. Suely Vilela (coordenadora do Projeto Temático) e Prof. Dr. Andreimar Martins Soares (pesquisador principal do Projeto Temático). Estes componentes apresentaram grau de pureza maior que 90%.

3.2 Casuística

Para avaliação de atividades imunomoduladoras sobre o sistema complemento, migração de neutrófilos e ativação celular em linfócitos, foram colhidas amostras de sangue (10 mL) de voluntários adultos de ambos os sexos, na faixa etária de 20 a 50 anos, pertencentes à comunidade da FCFRP (alunos, funcionários e docentes), conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP – USP) (Protocolo CEP/FCFRP nº125 – Anexo A). Os voluntários foram integrados ao projeto somente após avaliação dos seguintes critérios de exclusão: história de doenças infecciosas recentes, doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias crônicas; uso de medicamentos que possam interferir nos resultados da pesquisa, em especial anti-inflamatórios. O sangue foi colhido assepticamente, por punção venosa na veia cubital do braço em tubos para coleta á vácuo após jejum de 8 horas. Os riscos deste procedimento para os sujeitos são mínimos. Pode haver pequeno desconforto devido à introdução da agulha para colher o sangue. Os materiais utilizados são descartáveis, não havendo riscos de contaminação. Os voluntários foram distribuídos como se segue:

- a) 20 doadores para preparação de um *pool* de soro humano normal (SHN), utilizado como fonte de complemento.
- b) 10 doadores para preparação de neutrófilos, utilizados nos experimentos de quimiotaxia dependente de complemento.
- c) 20 doadores para preparação de células mononucleares, utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e de ativação celular

3.3 Animais

Duas coelhas adultas da linhagem Nova Zelândia, pesando cerca de 3,3 kg, foram obtidas do Biotério Central do Campus da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto e mantidas no Biotério da FCFRP-USP para o fornecimento periódico de sangue, o qual foi utilizado nos ensaios hemolíticos da VA do SC. Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com os protocolos submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Campus USP-RP (Protocolo CEUA nº 08.1.362.53.0 - Anexo B).

3.4 Modulação de atividade do SC humano por venenos e toxinas

3.4.1 Via Clássica/da Lectina (VC/VL)

Sangue de três carneiros foi colhido por punção venosa na veia jugular em igual volume de solução de Alsever (anexo C, p.73). Este procedimento foi realizado pelo biólogo do Biotério Central do Campus USP-RP, mediante agendamento prévio, não havendo manipulação dos animais pelos pesquisadores envolvidos no projeto. O sangue total foi aliquotado em tubos de ensaio e conservado a 4°C. No dia do ensaio, alíquotas do sangue de carneiro foram centrifugadas (500 g, 10 min) e o sedimento, isto é, a papa de hemácias, lavado em tampão TEA-Ca²⁺Mg²⁺ (anexo C, p.73), preparando-se uma suspensão de hemácias a 5% com tampão. Esta suspensão contém aproximadamente 1,2x10⁹ células/mL (ALMEIDA & FIFE, 1976). A suspensão de hemácias foi misturada com volume apropriado de hemolisina, na titulação de 1:800, para sensibilização máxima. Esta suspensão de eritrócitos sensibilizados (EA) foi mantida a 4°C por 15 min e a absorbância a 700nm foi ajustada para 0,7 – 0,8 (Espectrofotômetro Beckman DU-70).

Foi utilizada uma hemolisina previamente preparada no laboratório. Para a produção dessa hemolisina foram imunizadas duas coelhas adultas, da linhagem Nova Zelândia, pesando cerca de 3,3 kg, aplicando-se 2 mL de suspensão de hemácias de carneiro a 10% em NaCl 0,15M estéril, por via endovenosa (veia marginal da orelha), no 1º e no 11º dias. Seis dias após a última injeção, as coelhas foram anestesiadas com xilazina (5 mg/kg) e cetamina (35 mg/kg), por via intramuscular, e o sangue colhido por punção cardíaca. O sangue permaneceu em repouso por aproximadamente 1 hora, para retração do coágulo, e o soro foi separado por centrifugação. Em seguida, o soro foi incubado por 30 minutos em banho a 56°C para inativação do complemento. Alíquotas foram preparadas

utilizando um volume de soro e o mesmo volume de glicerina e o material foi mantido a -20°C para posterior titulação de hemolisina.

O título de sensibilização máxima foi de 1:800, determinado segundo Almeida e Fife, 1976, utilizando-se hemácias de carneiro em tampão TEA-Ca²⁺-Mg²⁺.

3.4.2 Via Alternativa (VA)

Duas coelhas adultas, da linhagem Nova Zelândia, foram mantidas no Biotério da FCFRP-USP, para o fornecimento periódico de sangue, o qual foi utilizado nos ensaios hemolíticos da via alternativa. Uma vez por mês, 10mL de sangue de cada coelha foram colhidos, por punção da artéria central da orelha, em igual volume de solução de Alsever estéril. Após filtração em gaze, o sangue foi incubado com igual volume de solução quelante de cálcio e magnésio, TEA-EDTA (anexo C, p.73), por 15 minutos a 37°C. Após incubação as hemácias de coelho foram lavadas três vezes com solução TEA-Mg²⁺ (anexo C, p.73). As hemácias lavadas foram ressuspensas em solução de Alsever com 0,05% de azida sódica, para volume igual a duas vezes o volume de sangue original, distribuídas em alíquotas e armazenadas a 4°C. Nestas condições, as hemácias permanecem estáveis e apropriadas para o uso durante 15 dias. Para os ensaios hemolíticos, alíquotas da suspensão de hemácias foram lavadas três vezes com solução TEA-EGTA-Mg²⁺ (anexo C, p.74). As hemácias foram ressuspensas na mesma solução e a absorbância da suspensão ajustada entre 0,7 e 0,8 por leitura espectrofotométrica a 700 nm.

3.4.3 Ensaios de atividade hemolítica (Método Cinético)

O método cinético utiliza volume fixo de soro e a atividade hemolítica é determinada pela medida do tempo, em segundos, necessário para ocorrer lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação ($t_{1/2}$). Este método é baseado na mudança das propriedades de dispersão de luz das hemácias à medida que estas vão sofrendo hemólise, que é medida espectrofotometricamente em 700 nm, o que elimina a necessidade de centrifugação para leitura (CROTT et al., 1997).

Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue periférico de 18 voluntários, sendo 9 homens e 9 mulheres. O sangue de cada doador foi coletado separadamente e deixado coagular a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora. Os soros foram separados por centrifugação (500 g) por 10 minutos a 4°C, reunidos (*pool*), aliqüotados em tubos de polietileno e congelados a -80°C.

Para a VC/VL foi utilizado volume de 7 μL de SHN já padronizado no laboratório. Para o preparo dos controles, poços de microplacas de 96 cavidades receberam 193 μL do tampão adequado para a VC/VL (tampão TEA- Ca^{2+} - Mg^{2+}) e mais 7 μL do *pool* de SNH, em volume final de 200 μL . Diluições seriadas dos venenos, contendo diferentes concentrações, foram preparadas em tampão TEA- Ca^{2+} - Mg^{2+} , e em seguida os demais poços da microplaca receberam 193 μL de diluições seriadas do veneno e 7 μL de SHN em volume final de 200 μL . As placas foram mantidas a 37°C por uma hora. Após incubação, foi feita rápida pipetagem de 40 μL /poço de hemácias de carneiro sensibilizadas. As misturas foram homogeneizadas e medidas espectrofotometricamente a 700 nm, em leitor de microplacas (SpectraMax Plus- Molecular Devices).

Para a VA, foi utilizado volume de 60 μL de SHN já padronizado no laboratório. Para o preparo dos controles, poços de microplacas de 96 cavidades receberam 140 μL do tampão TEA-EGTA- Mg^{2+} e mais 60 μL do *pool* de SHN, em volume final de 200 μL . Os demais poços da microplaca receberam 140 μL de diluições seriadas do veneno em tampão TEA-EGTA- Mg^{2+} , e 60 μL de SHN em volume final de 200 μL . As placas foram mantidas a 37°C por uma hora. Após incubação, foi feita rápida pipetagem de 40 μL /poço de hemácias de coelho. As misturas foram homogeneizadas e medidas espectrofotometricamente a 700 nm, em leitor de microplacas (SpectraMax Plus- Molecular Devices).

Após homogeneização das misturas, iniciou-se o registro da absorbância em 700 nm (espectrofotômetro Beckman – DU70), acompanhando-se a cinética de lise durante 15 minutos. A partir dos resultados obtidos, foi calculado o valor de $t_{1/2}$ para cada poço, que corresponde ao tempo necessário para que a absorbância inicial da mistura da reação seja reduzida pela metade. Para cada diluição do veneno, a porcentagem de inibição da atividade hemolítica foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{inibição} = 100 - \frac{t_{1/2} \text{ do tubo controle} \times 100}{t_{1/2} \text{ de cada tubo com venenos/toxinas}}$$

A atividade dos venenos e toxinas sobre a VC/VL e a VA do sistema complemento foi expressa em valores de IC50, concentração que inibe 50% da hemólise, determinada através de cálculos de regressão linear utilizando os percentuais de inibição versus concentrações dos venenos.

3.5 Quimiotaxia de neutrófilos dependente do SC

3.5.1 Preparo das amostras

Os ensaios de quimiotaxia foram feitos apenas com os venenos brutos de *B. jararacussu* e *B. pirajai*, pois somente para estes compostos foi possível calcular a IC50 a partir dos resultados dos ensaios da VC/VL. Para realizar os ensaios de quimiotaxia com as toxinas seria necessária uma grande quantidade destas, o que tornaria o trabalho inviável. A quantidade de veneno bruto utilizada para este ensaio foi proporcional a quantidade que promoveu maior aumento de $t^{1/2}$ nos ensaios da VC/VL de acordo também com a quantidade de SHN utilizada para este ensaio.

Venenos brutos (400µg) diluídos no tampão da via clássica TEA- Ca^{2+} - Mg^{2+} em volume final de 100µL foram incubados por 40 min a 37°C com 120µL de SHN, 120µL SHN inativado a 56°C por 30 minutos ou 120µL de tampão da via clássica TEA- Ca^{2+} - Mg^{2+} . SHN incubado com 0,75mg de zymosan (anexo C, p.74) diluído em 100µL de tampão e SHN incubado em tampão nos mesmos volumes empregados para os venenos foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. O zymosan é um polissacarídeo responsável pela ativação do SC gerando fragmentos quimiotáticos. Após a incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e aquecidos a 56°C por 30 minutos para inativação do complemento residual. Estes sobrenadantes foram diluídos em solução salina tamponada de HANKS (HBSS) (anexo C, p.74), em diluição 1:5, e em seguida foram aplicados nas câmaras de Boyden para avaliação da atividade quimiotática.

3.5.2 Ensaio *in vitro*

O ensaio de quimiotaxia de neutrófilos foi realizado como previamente descrito (BOYDEN, 1962), em câmara de Boyden modificada, utilizando câmaras de migração feitas de acrílico. Neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico de voluntários saudáveis por método de gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque de duas densidades diferentes (Histopaque-1077 e Histopaque-1119; Sigma Diagnostics, Inc., Missouri, USA).

Após lavagem com HBSS, os neutrófilos foram ajustados para 2×10^6 células/mL. O compartimento inferior das câmaras foi preenchido com 0,2mL de SHN, após os diferentes tratamentos, e coberto com filtros de 13 mm de diâmetro e poros de 3 µm (SSWPO1300, Millipore Corp., Bedford, USA). O compartimento superior foi preenchido com 0,3mL da suspensão de neutrófilos purificados contendo 2×10^6

células/mL. Após incubação das câmaras por 30 min a 37°C em atmosfera umidificada, os filtros foram removidos, fixados em propanol-2, corados com hematoxilina de Harris, desidratados em propanol-2, clareados com xilol e montados entre lâmina e lamínula com auxílio de entelan (anexo C, p. 75) A migração foi determinada pela técnica leading front (ZIGMOND & HIRSCH, 1973), medindo-se a maior distância em micrômetros atravessada por três células por campo com uma objetiva de 100x. Foram examinados pelo menos dez campos por filtro. Em seguida os dados obtidos foram plotados em um gráfico utilizando o software Graphpad Prism versão 5.0 para Windows.

3.6 Modulação de eventos celulares por venenos/toxinas

3.6.1 *Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)*

O sangue total de voluntários saudáveis foi coletado à vácuo em tubos contendo heparina. PBMC foram isoladas do sangue por centrifugação em gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077) (Sigma Diagnostics, Inc., Missouri, USA). As células mononucleares foram lavadas com RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, USA) (anexo C, p.75) suplementado com 10% de soro bovino fetal uma vez a 500 g por 10 min e uma segunda vez a 200 g por 15 min, ambas a 4°C. Foram ressuspensas em 1 mL de RPMI e ajustadas para 5×10^6 células/mL após verificação da viabilidade pela técnica do corante azul de tripan. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibiótico/antimicótico (Invitrogen, Grand Island, USA) a 37°C e 5%CO₂ por diferentes períodos, na presença ou não de estímulo como a fitohemaglutininina (PHA), e de diferentes concentrações das toxinas/venenos. As células foram recuperadas após 24 horas para os ensaios de citotoxicidade, imunofenotipagem e análise de marcadores de ativação por citometria de fluxo. Os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e armazenados a -80°C para posterior dosagem de citocinas. Todo o processo foi realizado em capela de fluxo laminar com material estéril e todos os reagentes utilizados foram autoclavados ou filtrados em membrana Millipore (Millex HV 0,45 UM, 25 mm diâmetro) para evitar contaminação das culturas.

3.6.2 Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo

Foram realizadas análises por citometria de fluxo para identificar e quantificar populações de linfócitos e avaliar a expressão de marcadores de ativação celular nas células previamente incubadas com diferentes concentrações de venenos. Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD19 conjugados com FITC (*Fluorescein isothiocyanate*), anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 marcados com PE (*Phycoerythrin*) para identificar as subpopulações de linfócitos (Tabela 1). Anticorpos anti-CD25, anti-HLA-DR e anti-CD69 marcados com APC (*Allophycocyanin*) foram utilizados para identificar os marcadores de ativação celular (Tabela 2). As células coletadas dos poços de cultura na concentração de 2×10^5 e lavadas duas vezes com tampão de FACS (PBS-SBF-azida) (anexo C, p. 75), foram incubadas com 0,5µL de anticorpos monoclonais por 30 minutos a 4°C no escuro. Após devida incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão de FACS e ressuspensas em 100µL do mesmo tampão. Quando não foi possível realizar a análise por citometria no mesmo dia, as células foram incubadas *overnight* em PBS-formol (COLIGAN et al., 1991). As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo (FACSCanto, Becton-Dickinson) e os dados analisados pelo programa FACSDiva (Becton-Dickinson).

Tabela 1. Anticorpos utilizados para análise das subpopulações de linfócitos

<i>Anticorpos monoclonais específicos</i>	<i>Definição da subpopulação de linfócitos</i>
CD3 ⁺ /CD8 ⁺	Linfócitos T citotóxicos
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares
CD19 ⁺	Linfócitos B
CD3 ⁻ CD56 ⁺	Células NK

* CD3 e CD19 - anticorpos conjugados com FITC (isotiocianato de fluoresceína), CD4, CD8 e CD56 - anticorpos conjugados com PE (ficoeritrina)

Tabela 2. Marcadores de ativação utilizados

<i>Anticorpos monoclonais específicos</i>	<i>Especificidade</i>
CD25	Reconhece a cadeia α do receptor de IL-2
CD69	Reconhece o antígeno CD69 humano em células T, B e NK ativadas precocemente
HLA-DR	Reconhece o antígeno do complexo de histocompatibilidade principal humano classe II

* CD25, CD69, HLA-DR anticorpos conjugados com APC (aloficocianina)

3.6.3 Ensaio de Citotoxicidade (MTT)

O sangue total de voluntários saudáveis foi coletado à vácuo em tubos contendo heparina. PBMC foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077) (Sigma Diagnostics, Inc., Missouri, USA). As células mononucleares foram lavadas com RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal uma vez a 500 g por 10 min e uma segunda vez a 200 g por 15 min, ambas a 4°C, ressuspensas em 1 mL de RPMI e ajustadas para 5×10^6 células/mL após verificação da viabilidade pela técnica do corante azul de tripan. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibiótico/antimicótico a 37°C e 5%CO₂. PBMCs foram cultivadas em placas de 96 poços contendo $5,0 \times 10^5$ células/poço. Estas células foram tratadas com concentrações crescentes dos venenos/toxinas diluídos no mesmo meio de cultura por um período de 24 horas. Em seguida, 20 μ L do reagente 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (MTT) na concentração de 5mg/mL foram adicionados a cada poço e após quatro horas a 37°C, dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% foi adicionado para dissolver os cristais de formazan (MOSSMANN,1983). Absorbâncias foram lidas em 570 nm e os resultados foram expressos em porcentagens de viabilidade, usando amostras incubadas somente com o meio de cultura RPMI 1640 completo (com soro bovino fetal) como 100% do valor de viabilidade (controle positivo). A ciclofosfamida 25 mg/mL foi utilizada como controle negativo.

3.7 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios de quimiotaxia de neutrófilos foram analisados pelo teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados dos demais ensaios foram analisados pelo teste t de *Student* para amostras não pareadas. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Para as análises, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software Corporation, San Diego, California, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Ensaios de Citotoxicidade

Os efeitos de citotoxicidade *in vitro* dos venenos brutos de *B. jararacussu*, *B. pirajai*, serinoprotease de *B. jararacussu* e LAAO de *B. pirajai* foram testados usando o ensaio de viabilidade MTT, o qual é baseado na capacidade das células viáveis em reduzir compostos a base de tetrazolium (MARTIKAINEN et al., 1993). A redução do valor da densidade ótica durante o ensaio apresenta uma correlação direta com a taxa de inibição do crescimento e relação inversa com a taxa de proliferação. MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido em um corante insolúvel azul de formazan através da clivagem do anel de tetrazolium pela succinato desidrogenase mitocondrial (GOMES, 2007).

Os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios distintos. Como controle positivo, foi utilizado meio RPMI 1640 contendo apenas PBMC (100% de viabilidade). Como controle negativo foi utilizada uma solução de ciclofosfamida 25mg/mL.

Como mostrado na figura 3, foram realizados ensaios com veneno bruto de *B. jararacussu* nas seguintes concentrações: 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 e 100µg/mL. Nas concentrações mais elevadas, de 50 e 100µg/mL, observa-se diminuição da porcentagem de viabilidade de PBMC em relação ao controle positivo em 24 horas ($p < 0,05$). Na concentração de 50µg/mL a média de redução na porcentagem de viabilidade foi de 38% e na concentração de 100 µg/mL a média foi de 54,3%. Entretanto, nos poços contendo concentrações de 0,05, 5 e 10 µg/mL observou-se aumento na porcentagem de viabilidade, variando de 108 a 130,2%.

Os ensaios com a serinoprotease de *B. jararacussu* foram realizados nas seguintes concentrações: 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 e 10µg/mL. Na figura 4 observa-se que concentrações de 0,05, 0,1 e 5 µg/mL provocaram efeito citotóxico de maneira não dose-dependente ($p < 0,05$ em relação ao controle positivo), correspondendo respectivamente a 12,4, 9,9 e 9,3% de redução média da viabilidade.

O veneno bruto de *B. pirajai* foi utilizado nas seguintes concentrações: 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 e 100µg/mL. A figura 5 mostra que nenhuma das concentrações de veneno bruto de *B. pirajai* apresentou citotoxicidade nas condições analisadas. Várias concentrações de *B. pirajai* induziram aumento na porcentagem de viabilidade ($p < 0,05$), a exemplo do ocorrido com o veneno de *B. jararacussu*, variando de 110,4 a 120,8%.

Para os ensaios do MTT com LAAO de *B. pirajai* foram utilizadas as seguintes concentrações: 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$. Na figura 6, observa-se aumento nítido na porcentagem de viabilidade das células tratadas em todas as concentrações da toxina, variando de 160,4 a 237,3% ($p < 0,05$).

Figura 3. Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de veneno bruto de *B. jararacussu*, avaliadas pelo ensaio de redução do MTT. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão de 9 replicatas em três experimentos. Controle positivo: PBMC em meio de cultura. Controle negativo: CPA: ciclofosfamida 25 mg/mL. * $p < 0,05$ comparado com o controle positivo.

Figura 4. Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de serinoprotease de *B. jararacussu*, avaliadas pelo ensaio de redução do MTT. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão de 9 replicatas em três experimentos. Controle positivo: PBMC em meio de cultura. Controle negativo: CPA: ciclofosfamida 25 mg/mL. * $p < 0,05$ comparado com o controle positivo.

Figura 5. Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de veneno bruto de *B. pirajai*, avaliadas pelo ensaio de redução do MTT. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão de 9 replicatas em três experimentos. Controle positivo: PBMC em meio de cultura. Controle negativo: CPA: ciclofosfamida 25 mg/mL. * $p < 0,05$ comparado com o controle positivo.

Figura 6. Porcentagens de viabilidade de PBMC incubadas por 24h com diferentes concentrações de LAEO de *B. pirajai*, avaliadas pelo ensaio de redução do MTT. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão de 9 replicatas em três experimentos. Controle positivo: PBMC em meio de cultura. Controle negativo: CPA: ciclofosfamida 25 mg/mL. * $p < 0,05$ comparado com o controle positivo.

4.2 Ensaios de modulação da atividade hemolítica do SC pelo método cinético

Os ensaios hemolíticos do SC foram realizados mediante incubação prévia, de 1h a 37°C, dos venenos e toxinas com o SHN em tampão apropriado para cada via de ativação do SC. Como controle foi utilizado SHN incubado previamente com o tampão, utilizando o mesmo intervalo de tempo e temperatura. Para investigar se os venenos e toxinas apresentam atividade hemolítica direta, os mesmos foram incubados com hemácias de coelho ou de carneiro na ausência de SHN. Não ocorreu lise direta das hemácias.

Os ensaios hemolíticos do SC para a VC/VL foram realizados em triplicata e em três ensaios distintos, enquanto os ensaios para a VA foram realizados em triplicata em dois ensaios distintos.

4.2.1 Atividade do veneno bruto de *B. jararacussu* sobre a VC/VL

Para este ensaio foram utilizadas as seguintes concentrações de veneno bruto de *B. jararacussu*: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 120 µg/mL. Os valores de $t_{1/2}$ encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle (tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 1 e a Figura 7. O veneno bruto de *B. jararacussu* promoveu aumento no valor de $t_{1/2}$ em todas as concentrações ($p < 0,05$). O gráfico das porcentagens de inibição versus concentração do veneno está representado na figura 8. A média da IC50 dos três ensaios realizados para esse veneno foi de 91,22 µg/mL.

Tabela 3: Atividade moduladora do veneno bruto de *B. jararacussu*, sobre a via clássica do complemento humano

Concentração µg/mL	<i>t</i> 1/2 ^a <i>Ensaio I</i>	%I ^b <i>Ensaio I</i>	<i>t</i> 1/2 <i>Ensaio II</i>	%I <i>Ensaio II</i>	<i>t</i> 1/2 <i>Ensaio III</i>	%I <i>Ensaio III</i>
Controle	217,18	0	200,97	0	244,79	0
3,125	202,56	- 7,21	214,34	6,24	287,50	14,85
6,25	205,33	- 5,77	213,06	5,68	284,38	13,92
12,5	192,21	- 12,99	224,44	10,46	302,08	18,96
25,00	215,15	0,94	244,44	17,78	300,00	18,40
50,00	276,50	21,46	295,65	32,02	372,92	34,35
100,00	496,38	56,25	502,22	59,98	478,12	48,80
120,00	640,18	66,08	704,44	71,47	588,42	58,40
IC50 ^c	94,73		82,12		99,31	

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica.

^c A IC50 é determinada para cada ensaio através do cálculo de regressão linear, onde x define a concentração de veneno bruto (em µg/mL) necessária para produzir 50% de inibição da atividade hemolítica nas condições da reação.

Figura 7. Efeito do veneno bruto de *B. jararacussu* sobre a atividade hemolítica da via clássica. Cada coluna representa a média ± erro-padrão dos valores de *t*1/2 (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão. * $p < 0,05$ comparado com o controle. # $p < 0,0001$ comparado com o controle.

Figura 8. Porcentagens de inibição da atividade hemolítica da via clássica do complemento humano, em função da concentração de veneno bruto de *B. jararacussu*. A reta foi construída por regressão linear, onde x corresponde à quantidade do veneno (µg/mL) e y à média das porcentagens de inibição obtidas nos três ensaios realizados.

4.2.2 Atividade do veneno bruto de *B. jararacussu* sobre a VA

As concentrações de veneno bruto de *B. jararacussu* utilizadas neste ensaio foram as mesmas da VC/VL: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 120 µg/mL. Os valores de $t_{1/2}$ encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle (tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 2 e a Figura 9. O veneno bruto de *B. jararacussu* nas concentrações de 120, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL promoveu aumento no valor de $t_{1/2}$ ($p < 0,05$). Embora tenha ocorrido aumento significativo, não foi possível calcular o valor da IC₅₀, já que seria necessária a utilização de quantidades muito elevadas deste veneno.

Tabela 4. Atividade moduladora do veneno bruto de *B. jararacussu*, sobre a via alternativa do complemento humano

Concentração $\mu\text{g/mL}$	$t_{1/2}^a$ Ensaio I	%I ^b Ensaio I	$t_{1/2}$ Ensaio II	%I Ensaio II
Controle	372,92	0	375	0
3,125	395,83	5,79	377,08	0,55
6,250	404,17	7,73	364,42	- 2,90
12,500	387,5	3,76	416,67	10,00
25,000	395,83	5,79	402,08	6,73
50,000	412,50	9,60	412,50	9,09
100,000	431,25	13,53	425,00	11,76
120,000	416,67	10,50	456,25	17,80

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica.

Figura 9. Efeito do veneno bruto de *B. jararacussu* sobre a atividade hemolítica da via alternativa. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão dos valores de $t_{1/2}$ (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

4.2.3 Atividade da serinoprotease de *B. jararacussu* sobre a VC/VL

Os valores de $t_{1/2}$ encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle (tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 3 e a Figura 10. A serinoprotease não promoveu aumento significativo no valor de $t_{1/2}$ em

nenhuma das concentrações utilizadas, apenas uma discreta diminuição na concentração de 0,625µg/mL.

Tabela 5: Atividade moduladora da serinoprotease de *B. jararacussu*, sobre a via clássica do complemento humano

Concentração µg/mL	$t_{1/2}^a$ Ensaio I	%I ^b Ensaio I	$t_{1/2}$ Ensaio II	%I Ensaio II	$t_{1/2}$ Ensaio III	%I Ensaio III
Controle	230,73	0	214,58	0	234,38	0
0,625	225,00	- 2,55	220,83	2,83	233,33	- 0,45
1,25	225,00	- 2,55	218,75	1,91	237,50	1,31
2,50	195,83	- 17,82	222,92	3,74	259,38	9,64
5,00	195,83	- 17,82	218,75	1,91	262,50	10,71
10,00	203,13	- 13,59	225,00	4,63	262,50	10,71
20,00	207,29	- 11,31	213,54	- 0,49	277,08	15,41

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica.

Figura 10. Efeito da serinoprotease de *B. jararacussu* sobre a atividade hemolítica da via clássica. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão dos valores de $t_{1/2}$ (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão.

4.2.4 Atividade da serinoprotease de *B. jararacussu* sobre a VA

Os valores de $t_{1/2}$ encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle (tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 4 e a Figura

11. A serinoprotease, nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 µg/mL promoveu aumento no valor de $t_{1/2}$ ($p < 0,05$). Embora tenha ocorrido aumento significativo, não foi possível realizar o cálculo da IC₅₀, já que seria necessária a utilização de quantidades muito elevadas desta toxina.

Tabela 6: Atividade moduladora da serinoprotease de *B. jararacussu*, sobre a via alternativa do complemento humano

Concentração µg/mL	$t_{1/2}^a$ Ensaio I	%I ^b Ensaio I	$t_{1/2}$ Ensaio II	%I Ensaio II
Controle	395,83	0	391,97	0
0,625	445,67	11,18	385,42	1,70
1,25	454,17	12,94	389,58	- 0,61
2,50	476,00	16,84	408,33	4,01
5,00	447,92	11,63	414,58	5,45
10,000	462,50	14,42	418,75	6,40
20,000	470,83	15,93	439,58	10,83

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica.

Figura 11. Efeito da serinoprotease de *B. jararacussu* sobre a atividade hemolítica da via alternativa. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão dos valores de $t_{1/2}$ (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

4.2.5 Atividade do veneno bruto de *B. pirajai* sobre a VC/VL

Para este ensaio foram utilizadas as seguintes concentrações de veneno bruto de *B. pirajai*: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 120 µg/mL. Os valores de $t_{1/2}$

encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle (tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 5 e a Figura 12. O veneno bruto de *B. pirajai* nas concentrações de 120, 100, 50 µg/mL promoveu aumento no valor de $t_{1/2}$ ($p < 0,05$). O gráfico das porcentagens de inibição versus concentração do veneno está representado na figura 13. A média da IC₅₀ dos três ensaios realizados para esse veneno foi de 86,86 µg/mL.

Tabela 7: Atividade moduladora do veneno bruto de *B. pirajai*, sobre a via clássica do complemento humano

Concentração µg/mL	$t_{1/2}^a$ Ensaio I	%I ^b Ensaio I	$t_{1/2}$ Ensaio II	%I Ensaio II	$t_{1/2}$ Ensaio III	%I Ensaio III
Controle	225,92	0	191,36	0	244,79	0
3,125	220,49	- 2,47	174,14	- 9,88	246,87	0,84
6,25	216,66	- 4,27	167,63	- 14,15	265,62	7,84
12,5	217,99	- 3,64	174	- 9,97	272,92	10,31
25,00	241,93	6,62	190,20	- 0,61	318,75	23,20
50,00	320,29	29,46	240,32	20,37	323,44	24,32
100,00	628,06	64,03	493,98	61,26	494,79	50,53
120,00	916,55	75,35	757,18	74,73	745,31	67,15
IC₅₀^c		82,37		87,47		92,28

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica.

^c A IC₅₀^c é determinada para cada ensaio através do cálculo de regressão linear, onde x define a concentração de veneno bruto (em µg/mL) necessária para produzir 50% de inibição da atividade hemolítica nas condições da reação.

Figura 12. Efeito do veneno bruto de *B. pirajai* sobre a atividade hemolítica da via clássica. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão dos valores de t_{1/2} (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão. *p<0,05 comparado com o controle. #p<0,0001 comparado com o controle.

Figura 13. Porcentagens de inibição da atividade hemolítica da via clássica do complemento humano, em função da concentração de veneno bruto de *B. pirajai*. A reta foi construída por regressão linear, onde x corresponde à quantidade do veneno (µg/mL) e y à média das porcentagens de inibição obtidas nos dois ensaios realizados.

4.2.6 Atividade do veneno bruto de *B. pirajai* sobre a VA

As concentrações de veneno bruto de *B. pirajai* utilizadas neste ensaio foram as mesmas da VC: 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 e 120 µg/mL. Os valores de t_{1/2} encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle

(tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 6 e a Figura 14. O veneno, nas concentrações de 120, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL promoveu aumento no valor de $t_{1/2}$. Não foi possível realizar o cálculo da IC₅₀, pois haveria necessidade de se utilizar concentrações muito elevadas do veneno.

Tabela 8: Atividade moduladora do veneno bruto de *B. pirajai*, sobre a via alternativa do complemento humano

Concentração µg/mL	$t_{1/2}^a$ Ensaio I	%I ^b Ensaio I	$t_{1/2}$ Ensaio II	%I Ensaio II
Controle	277,77		372,92	
3,125	267,77	- 3,73	395,83	5,79
6,250	270,00	- 2,88	406,25	8,20
12,500	282,22	1,58	420,83	11,38
25,000	277,77	0,00	433,33	13,94
50,000	283,32	1,96	431,25	13,52
100,000	299,99	7,41	454,17	17,89
120,000	298,88	7,06	466,67	20,09

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica.

Figura 14. Efeito do veneno bruto de *B. pirajai* sobre a atividade hemolítica da via alternativa. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão dos valores de $t_{1/2}$ (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

4.2.7 Atividade da LAAO de *B. pirajai* sobre a VC/VL

As concentrações de LAAO utilizadas neste ensaio foram: 1,562, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 µg/mL. Os valores de $t_{1/2}$ encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle (tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 7 e a Figura 15. Todas as concentrações da toxina promoveram aumento significativo no valor de $t_{1/2}$. Entretanto, não foi possível realizar o cálculo da IC50, já que seria necessária a utilização de quantidades muito elevadas desta toxina.

Tabela 9: Atividade moduladora da LAAO de *B. pirajai*, sobre a via clássica do SC humano

Concentração µg/mL	$t_{1/2}^a$	%I ^b	$t_{1/2}$	%I	$t_{1/2}$	%I
	Ensaio I	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio II	Ensaio III	Ensaio III
Controle	235,42	0	214,58	0	244,79	0
1,562	283,33	16,91	243,75	11,97	279,17	12,32
3,125	300,00	21,53	266,67	19,53	310,04	21,05
6,25	270,83	13,07	224,44	4,39	302,08	18,96
12,50	310,42	24,16	264,58	8,90	285,42	14,24
25,00	320,83	26,62	272,92	21,38	301,04	18,68
50,00	310,42	24,16	281,25	23,70	326,04	24,92

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica.

Figura 15. Efeito da LAAO de *B. pirajai* sobre a atividade hemolítica da via clássica. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão dos valores de $t_{1/2}$ (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

4.2.8 Atividade da LAAO de *B. pirajai* sobre a VA

As concentrações de LAAO utilizadas neste ensaio foram: 1,562, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de $t_{1/2}$ encontrados nos ensaios foram comparados aos valores obtidos para o controle (tampão e SHN), conforme mostram a Tabela 8 e a Figura 16. As concentrações da toxina que promoveram aumento significativo no valor de $t_{1/2}$ foram: 6,25, 12,5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$). Entretanto, não foi possível realizar o cálculo da IC50, já que seria necessária a utilização de quantidades muito elevadas desta toxina.

Tabela 10: Atividade moduladora da LAAO de *B.pirajai*, sobre a via alternativa do SC humano

Concentração $\mu\text{g/mL}$	$t_{1/2}^a$ <i>Ensaio I</i>	$\%I^b$ <i>Ensaio I</i>	$t_{1/2}$ <i>Ensaio II</i>	$\%I$ <i>Ensaio II</i>
Controle	395,83	0	366,67	0
1,562	420,83	5,94	378,57	3,14
3,125	422,92	6,41	392,86	6,67
6,250	421,25	6,03	380,95	3,75
12,500	445,83	11,22	383,33	4,35
25,000	458,33	13,64	395,24	7,23
50,000	462,50	14,42	409,53	10,47

^a Média do tempo em segundos necessário para que ocorra a lise de 50% das hemácias presentes no meio de reação, n = 6 para o controle e n = 3 para os testes.

^b Porcentagem de inibição da atividade hemolítica

Figura 16. Efeito da LAAO de *B. pirajai* sobre a atividade hemolítica da via alternativa. Cada coluna representa a média $\pm$ erro-padrão dos valores de $t_{1/2}$ (s) obtidos para cada concentração do veneno. O Controle representa o SHN incubado em tampão. * $p < 0,05$ comparado com o controle.

4.3 Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos dependente do SC

Os venenos brutos de *B. jararacussu* e *B. pirajai* foram avaliados quanto à capacidade de gerar componentes quimiotáticos no soro devido à ativação do complemento. SHN foi previamente incubado com o tampão da via clássica (tampão D, controle negativo), zymosan (controle positivo) ou veneno bruto de *B. jararacussu* ou *B. pirajai* (400 μg). Para determinar o papel do SC na migração de neutrófilos, o veneno bruto de *B. jararacussu* foi também incubado com SHN inativado ou somente

tampão da via clássica. Após essa incubação a amostra foi diluída cinco vezes, depositada no compartimento inferior da câmara de Boyden, e o compartimento superior foi preenchido com uma suspensão de neutrófilos humanos. Como mostrado nas figuras 17 e 18, a migração provocada pelo soro pré-incubado com os venenos brutos foi semelhante àquela observada pelo soro ativado pelo zymosan. O soro aquecido a 56°C por 30min anteriormente a adição dos venenos induziu ligeira quimiotaxia. Quimiotaxia de neutrófilos não ocorreu em resposta ao veneno incubado com o tampão da via clássica na ausência de soro. Nos ensaios com *B. jararacussu* (fig. 17), a média das distâncias de migração dos controles negativos foi de 23,7µm, do controle positivo, 53,5µm, veneno bruto, 49,7µm, veneno bruto e SHN inativado, 28,0µm e veneno bruto e tampão, 27,1µm. Nos ensaios com *B. pirajai* (fig. 18), a média das distâncias de migração dos controles negativos foi de 23,5µm, do controle positivo, 50,4µm, veneno bruto, 48,1µm, veneno bruto e SHN inativado, 26,7µm e veneno bruto e tampão, 26,4µm.

Figura 17. Resposta quimiotática de neutrófilos ao veneno bruto de *B. jararacussu* (Bjus). SHN foi previamente incubado com o tampão da via clássica, (tampão D, controle negativo), zymosan (controle positivo) ou veneno bruto de *B. jararacussu* (400 µg). Para determinar o papel do SC na migração de neutrófilos, o veneno bruto de *B. jararacussu* foi também incubado com SHN inativado ou somente tampão da via clássica. Os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão de três experimentos em duplicata. * $p < 0.05$ comparado ao controle negativo.

Figura 18. Resposta quimiotática de neutrófilos ao veneno bruto de *B. pirajai* (Bpir). SHN foi previamente incubado com o tampão da via clássica, (tampão D, controle negativo), zymosan (controle positivo) ou veneno bruto de *B. pirajai* (400 µg). Para determinar o papel do SC na migração de neutrófilos, o veneno bruto de *B. pirajai* foi também incubado com o SHN inativado ou somente tampão da via clássica. Os valores são expressos com média $\pm$ erro padrão de três experimentos em duplicata. * $p < 0.05$ comparado ao controle negativo.

4.4 Análise das subpopulações de linfócitos e avaliação dos marcadores de ativação celular por citometria de fluxo

Foram analisadas as seguintes subpopulações de linfócitos: linfócitos T auxiliares ($CD3^+CD4^+$), linfócitos T citotóxicos ($CD3^+CD8^+$), linfócitos B ($CD19^+$) e células NK ($CD3^-CD56^+$). Os marcadores de ativação analisados foram CD25, CD69 e HLA-DR.

As culturas foram incubadas por 24 horas com concentrações crescentes dos venenos ou suas toxinas, as quais não foram tóxicas pelo MTT. Após esse período as células foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo. Três ensaios distintos foram realizados. Como controle negativo, foi utilizado um tubo contendo apenas PBMC sem estímulo. Como controle positivo, PHA 2µg/mL, conhecido mitógeno de linfócito T, foi utilizada.

4.4.1 Veneno Bruto de *Bothrops jararacussu*

As seguintes concentrações de veneno bruto de *B. jararacussu* foram utilizadas: 6,25, 12,5 e 25µg/mL. Houve aumento significativo, em relação ao controle, na porcentagem de células T $CD4^+$ expressando CD25 e CD69 nas

concentrações de 6,25 e 25µg/mL (fig.19). O veneno bruto induziu aumento da porcentagem de células CD4⁺ expressando HLA-DR em todas as concentrações (fig. 19) e de células CD8⁺ nas concentrações de 6,25 e 12,5µg/mL (fig.20). Não houve aumento significativo na porcentagem de células T CD8⁺ expressando CD25 e CD69 nas concentrações analisadas (fig.20), bem como na porcentagem de células B expressando CD25, CD69 e HLA-DR (fig.21). Com relação às células NK, houve diminuição na porcentagem dessas células na concentração de 25µg/mL, como observado na figura 22.

Figura 19. Efeito do veneno bruto de *B. jararacussu* na porcentagem de células T CD4⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. *p<0,05 comparado ao controle negativo.

Figura 20. Efeito do veneno bruto de *B. jararacussu* na porcentagem de células T CD8⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. *p<0,05 comparado ao controle negativo.

Figura 21. Efeito do veneno bruto de *B. jararacussu* na porcentagem de células B expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos.

Figura 22. Efeito do veneno bruto de *B. jararacussu* na porcentagem de células NK. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

4.4.2 Serinoprotease de *Bothrops jararacussu*

As seguintes concentrações de serinoprotease de *B. jararacussu* foram analisadas: 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL. Não houve diferença significativa na porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando CD25, CD69 e HLA-DR nas amostras analisadas em relação ao controle (fig.23 e 24), bem como na porcentagem de células B expressando CD25 e CD69 (fig.25). Houve aumento na porcentagem de células B expressando HLA-DR apenas na concentração de 12,5 µg/mL (fig. 25). Não houve aumento da porcentagem de células NK (fig. 26).

Figura 23. Efeito da serinoprotease de *B. jararacussu* na porcentagem de células T CD4⁺ expressando de CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. *p<0,05 comparado ao controle negativo.

Figura 24. Efeito da serinoprotease de *B. jararacussu* na porcentagem de células T CD8⁺ expressando de CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. *p<0,05 comparado ao controle negativo.

Figura 25. Efeito da serinoprotease de *B. jararacussu* na porcentagem de células B expressando de CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. *p<0,05 comparado ao controle negativo.

Figura 26. Efeito da serinoprotease de *B. jararacussu* na porcentagem de células NK. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5 μg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 μg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos.

4.4.3 Veneno Bruto de *Bothrops pirajai*

As seguintes concentrações de veneno bruto de *B. pirajai* foram analisadas: 6,25, 12,5 e 25 μg/mL. O veneno bruto não induziu alteração significativa na expressão de CD69 e HLA-DR em linfócitos T CD4⁺. Aumento significativo na expressão de CD25 em linfócitos T CD4⁺ foi verificado somente na concentração de 12,5 μg/mL (fig. 27). Não foi observada alteração na porcentagem de células T CD8⁺ expressando os marcadores de ativação, em relação ao controle (fig. 28). Ocorreu diminuição na porcentagem de células B expressando CD69 em todas as concentrações, porém não houve alteração significativa na porcentagem de células B expressando CD25 e HLA-DR (fig.29). Na figura 30 pode-se observar que não houve aumento da porcentagem de células NK.

Figura 27. Efeito do veneno bruto de *B. pirajai*. na porcentagem de células T CD4⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos. *p<0,05 comparado ao controle negativo.

Figura 28. Efeito do veneno bruto de *B. pirajai*. na porcentagem de células T CD8⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos. *p<0,05 comparado ao controle negativo.

Figura 29. Efeito do veneno bruto de *B. pirajai*. na porcentagem de células B expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos.

Figura 30. Efeito do veneno bruto de *B. pirajai* na porcentagem de células NK. PBMC foram cultivadas com o veneno bruto nas concentrações de 6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos.

4.4.4 LAAO de *Bothrops pirajai*

As seguintes concentrações de LAAO de *B. pirajai* foram analisadas: 3,125, 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Houve um aumento significativo na porcentagem de células T CD4⁺ expressando CD25 nas amostras incubadas com concentrações de 3,125 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ da toxina, em relação ao controle (fig.31). Houve aumento na porcentagem de células T CD4⁺ expressando HLA-DR e nas concentrações de 6,25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (fig.31). Não houve aumento significativo na porcentagem de células T CD8⁺ expressando CD25, CD69 e HLA-DR nas concentrações analisadas (fig. 32). Houve aumento na porcentagem de células B expressando CD25 apenas na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Não houve aumento da porcentagem de células B expressando CD69 e HLA-DR nas concentrações analisadas (fig.33), bem como não houve aumento da porcentagem de células NK como mostrado na figura 34.

Figura 31. Efeito da LAAO de *B. pirajai*. na porcentagem de células T CD4⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

Figura 32. Efeito da LAAO de *B. pirajai*. na porcentagem de células T CD8⁺ expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

Figura 33. Efeito da LAAO de *B. pirajai*. na porcentagem de células B expressando CD69, CD25 e HLA-DR. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5 µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média ± erro padrão de três experimentos. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo.

Figura 34. Efeito da LAAO de *B. pirajai*. na porcentagem de células NK. PBMC foram cultivadas com a toxina nas concentrações de 3,125, 6,25 e 12,5µg/mL por 24h. PBMC não estimuladas foram utilizadas como controle negativo. PHA (2µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos.

5.DISSCUSSÃO

Mais de um século de pesquisa tem mostrado que venenos de serpentes são fontes ricas de proteínas e peptídeos farmacologicamente ativos. O veneno de qualquer espécie deve conter mais de 100 proteínas e peptídeos tóxicos e não tóxicos diferentes, bem como toxinas não-protéicas tais como carboidratos, lipídeos, aminos e outras moléculas menores (WARRELL, 2010).

Na América Latina, a maioria das picadas de serpentes é causada por membros do gênero *Bothrops* (ZAMUNER et al., 2001). Existem muitos sinais e sintomas que aparecem em seguida ao envenenamento por este gênero que estão associados tanto a efeitos locais tais como mionecrose, hemorragia, edema e dermonecrose, como a alterações sistêmicas caracterizadas pela coagulopatia, hemorragia sistêmica, choque cardiovascular e falência renal aguda.

Os efeitos descritos acima são decorrentes de inúmeros componentes presentes no veneno tais como fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases, LAAOs, fatores de crescimento dos nervos (NGF), lectinas tipo C, proteínas ricas em cisteína dentre outros (CORREA-NETTO et al., 2010).

As toxinas animais representam ferramentas importantes para investigar vários mecanismos celulares e moleculares envolvidos em processos farmacológicos, inflamatórios e de intoxicação decorrentes de envenenamento por picadas destes animais (BERTAZZI et al., 2005). Várias proteínas isoladas destes venenos têm encontrado aplicação prática como agentes terapêuticos e no desenvolvimento de procedimentos diagnósticos (KINI, 2005; KOH et al., 2006).

Portanto estes estudos visam maior entendimento dos mecanismos que determinam o quadro inflamatório decorrente de picadas, e desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas para o tratamento das vítimas.

5.1 Ensaios de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi o primeiro ensaio realizado a fim de se obter uma faixa de concentrações dos venenos e toxinas que não apresentassem efeito citotóxico às PBMCs, para que essas concentrações fossem utilizadas nos ensaios posteriores.

O veneno bruto de *B. jararacussu*, nas concentrações mais elevadas, de 50 e 100µg/mL, e a toxina serinoprotease de *B. jararacussu*, nas concentrações de 0,05, 0,1 e 5 µg/mL induziram diminuição da porcentagem de viabilidade de PBMC em relação ao controle positivo em 24 horas (p<0,05). Estudos prévios com veneno

bruto de *B. jararaca* *in vitro* mostraram que todas as concentrações do veneno testadas, 2,5, 5, 10, 20, 40, 80µg causaram efeito tóxico em células peritoneais de camundongos, com maior toxicidade associada ao aumento das doses do veneno (SILVA et al, 2002). Efeito similar foi observado em células tumorais (SILVA et al, 2002). O mesmo estudo foi realizado *in vivo* em camundongos inoculados pela via intraperitoneal com células tumorais e tratados posteriormente com veneno bruto de *B. jararaca*, onde foi observada redução significativa do número de células tumorais no 11º e 14º dias. Ao mesmo tempo, foi observado aumento significativo do influxo de leucócitos PMN até o 14º e também um influxo de leucócitos MN no 11º e 14º dias (SILVA et al, 2002). Estes resultados sugerem que, embora o veneno bruto e sua toxina tenham induzido citotoxicidade *in vitro*, em células normais, existe a possibilidade destes não serem citotóxicos *in vivo*.

Algumas das concentrações de *B. pirajai* e todas as da LAAO induziram aumento na porcentagem de viabilidade, assim como algumas concentrações do veneno de *B. jararacussu*. Esse resultado pode ter ocorrido devido a uma possível indução de proliferação celular subsequente ao contato com os venenos ou substâncias. Componentes de venenos de serpentes, como por exemplo proteína recombinante ACLF, uma metalopeptidase fibrinolítica, não-hemorrágica de 23kDa, isolada do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix laticinctus*, tem demonstrado efeitos proliferativos em culturas celulares (SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Muitos dos mecanismos de atividade biológica da LAAO ainda não foram elucidados. Nos últimos anos, os efeitos celulares provocados pelas LAAOs têm sido muito estudados onde, em muitos casos, foi observado que elas induzem citotoxicidade e apoptose em células tumorais enquanto não afetam as células normais (ALVES et al, 2008).

Mais estudos são necessários para melhor entendimento sobre a ação desses venenos nos processos de citotoxicidade e proliferação de PBMC.

5.2 Ensaio do SC

Venenos de serpentes são compostos por misturas complexas de proteínas que afetam diferentes sistemas do organismo animal, dentre eles o SC. Há uma variedade de proteínas nos venenos de serpentes das famílias *Crotalidae* e *Viperidae* que modulam a ação do SC (SHOIBONOV et al, 2005). Entretanto, ainda

há muito o que se pesquisar com relação aos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (família *Viperidae*) e seus possíveis efeitos sobre o SC.

Neste estudo, primeiramente os venenos e toxinas foram avaliados quanto à potencial modulação da atividade hemolítica do SC, por meio de microensaio cinético, que mede a atividade hemolítica residual do SC após incubação prévia dos venenos/toxinas com SHN. Neste ensaio, mede-se o tempo necessário para que haja lise de 50% das hemácias presentes ($t_{1/2}$, em segundos). O $t_{1/2}$ é diretamente proporcional à porcentagem de redução da atividade hemolítica do sistema (BERTAZZI et al, 2005; CROTT et al, 1997).

Os resultados obtidos (aumentos de $t_{1/2}$) sugerem fortemente que os venenos brutos de *B. pirajai* e de *B. jararacussu*, em contato com o SHN na fase de pré-incubação, são capazes de induzir modulação da VC/VL do SC, reduzindo a atividade hemolítica do SHN em 72,41 e 65,32%, respectivamente, na concentração de 120 $\mu\text{g/mL}$. Esses achados são semelhantes a outro estudo que mostra que a atividade hemolítica de amostras de soro incubadas por 1 hora a 37°C com frações do veneno de *Bothrops atrox* foi reduzida mais de 85% (RODRIGUES et al., 2004).

Em relação à VA, observou-se redução significativa da atividade hemolítica com algumas concentrações de venenos, mas nenhuma delas atingiu 50% de inibição da atividade, não sendo possível calcular a IC50 nesses casos.

São vários os mecanismos pelos quais substâncias presentes em venenos animais podem modular o SC. Alguns exemplos são a clivagem direta de proteínas do SC, como C2, C3 e C4 e a estabilização da C3-convertase da VA, o que gera amplificação da cascata de ativação, a exemplo do que ocorre com o CVF (MÜLLER-EBERHARD & FJELLSTRÖM, 1971; EGGERTSEN et al, 1980). Consequências desses processos incluem a produção das anafilatoxinas C3a e C5a e de outros fragmentos de ativação, como C3b e C4b (DIAS-DA-SILVA et al, 1995). Proteína isolada de veneno de *Vipera lebetina* provocou diminuição da atividade hemolítica do soro humano verificada por ensaios envolvendo VC e VA. A perda da atividade do SC foi atribuída a uma clivagem proteolítica das cadeias α de C3 e C4, induzida pela proteína do veneno (GASMI et al, 1994). Segundo Tambourgi et al. (1994), venenos de serpentes da família *Elapidae* também contém componentes capazes de ativar o SC como foi observado pela redução da atividade hemolítica e a conversão do C3 em produtos com mobilidade eletroforética distinta da molécula nativa em amostras de soro humano tratados com esses venenos.

A toxina LAAO de *B. pirajai*, na concentração de 50 µg/mL provocou 24,26 e 12,45% de inibição da atividade hemolítica das VC/VL e VA, respectivamente. Estudos mostraram que outra toxina isolada, a metaloproteinase BaP-1 do veneno de *Bothrops asper*, foi responsável por ativar o SC, através da diminuição da atividade hemolítica do soro incubado com a toxina (FARSKY et al., 2000).

Uma serinoprotease denominada flavoxobin proveniente do veneno da serpente *Trimeresurus flavoviridis* mostrou-se responsável pela ativação da VA humana levando a formação de MAC com liberação de C3a e C5a. Foi identificada como heteróloga de C3 convertase que cliva direta e seletivamente C3 em C3b e C3a (YAMAMOTO et al, 2002). A serinoprotease de *B. jararacussu* não apresentou modulação significativa do SC pela VC/VL em nenhuma das concentrações analisadas, entretanto apresentou, embora discreta, modulação significativa da VA, como observado no resultado acima.

Entretanto, os resultados não permitem concluir se os efeitos observados devem-se à ativação prévia do SC durante a incubação do SHN com o veneno, à inativação de componentes ou a possíveis bloqueios nas vias de ativação e/ou proteínas de controle do sistema. Para desvendar o mecanismo de ação desses compostos sobre o complemento, outras estratégias de investigação se fazem necessárias. Uma delas é a medida direta ou indireta dos possíveis fragmentos gerados. A quimiotaxia de neutrófilos dependente do SC avalia indiretamente a formação de C3a e C5a, que são mediadores quimiotáticos potentes.

No presente trabalho, a capacidade dos venenos brutos de induzir migração de neutrófilos foi avaliada para confirmar se houve realmente a ativação do SC e, consequentemente, a geração de seus fatores quimiotáticos.

Para tanto, os venenos foram incubados com o SHN por 40 min a 37°C e foi observada indução de quimiotaxia de neutrófilos semelhante àquela induzida pelo zymosan, o que leva a conclusão de que os venenos brutos induzem clivagem dos componentes C3 e C5 do SC, gerando os componentes ativos C3a e C5a. O soro aquecido a 56 °C anteriormente a incubação com os venenos induziu aumento muito discreto na distância de migração de neutrófilos. Com relação aos venenos brutos incubados com o tampão não houve aumento significativo na migração de neutrófilos, o que sugere que houve ativação devido a liberação dos fatores quimiotáticos derivados do SC.

Os resultados mostram que os venenos brutos de *B. jararacussu* e de *B. pirajai* são capazes de ativar o SC como observado pelos ensaios cinéticos da VC/VL e da VA do SC e pela indução da quimiotaxia de neutrófilos. Esses resultados são importantes, pois podem contribuir para melhor compreensão do mecanismo de ação dessas substâncias embora estudos mais aprofundados sejam necessários.

Ainda, o microensaio cinético aqui utilizado mostrou-se bastante útil para a medida da modulação da atividade hemolítica por venenos e toxinas de serpentes, tornando possível a análise simultânea de muitas amostras e requerendo volumes menores de reagentes quando comparado com ensaios hemolíticos tradicionais.

5.3 Análise de subpopulações de linfócitos e avaliação de marcadores de ativação celular por citometria de fluxo

Várias são as metodologias atualmente empregadas para quantificar a ativação e a proliferação celulares *in vitro*. Dentre elas, algumas utilizam componentes radioativos, os quais requerem precauções especiais de segurança, além de envolver várias etapas com grandes chances de erro. A redução de sais de tetrazólio, como o MTT constitui-se de metodologia alternativa, porém não permite estudos posteriores com as células, uma vez que compromete sua viabilidade. A citometria de fluxo surge como uma metodologia atraente, pois permite a manutenção das condições vitais das células, favorecendo investigações mais aprofundadas (JUNIOR et al, 2006). Devido a essa versatilidade, os marcadores de ativação foram investigados através dessa metodologia.

Marcadores de ativação são moléculas celulares cuja expressão pode ser induzida em células T, B e NK, dentre outras, através de estímulo provocado por patógenos durante a infecção ou por mitógenos (REA, MCNERLAN, ALEXANDER, 1999).

O CD69 é um dos marcadores de superfície celular expressos mais precocemente, o qual pode ser detectado em uma ou duas horas e sua expressão pode persistir por pelo menos três dias. A expressão do CD69 pode ser induzida na maioria das células hematopoéticas (ZIEGLER; RAMSDELL; ALDERSON, 1994). O CD25, a cadeia α do receptor de IL-2, é um marcador de ativação tardio, induzido durante a ativação da célula linfóide, alcançando pico de 96 horas após estímulo com PHA. É expresso em células T, B e monócitos ativados (DONG et al. 2010). O HLA-DR, antígeno do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) humano de

classe II, é expresso em células B, monócitos, macrófagos e aparece durante a fase tardia de ativação de células T e NK ativadas (TOMKINSON, 1987).

No presente estudo, foi analisado o efeito dos venenos brutos de *B. jararacussu*, *B. pirajai* e suas respectivas toxinas serinoprotease e LAAO nos linfócitos T, B e NK, onde foi verificada a capacidade destes de induzir ativação destas células através da quantificação dos marcadores de ativação CD69, CD25 e HLA-DR. Como controle de ativação foi utilizado o PHA, um mitógeno comumente utilizado, o qual é uma lectina de planta capaz de ativar células T e que quando ativa células T CD4⁺ é também capaz de induzir ativação de células B (CLEMENT, et al., 1983; LICASTRO, DAVIS, MORINI, 1993).

Através do presente estudo foi possível verificar que os venenos de serpentes e suas toxinas, promovem ativação de células T, como evidenciado pelo aumento da porcentagem de células T expressando CD25, CD69 e HLA-DR. Observou-se ativação preferencial das células CD4⁺.

O veneno bruto de *B. jararacussu* induziu aumento na porcentagem de células T CD4⁺ expressando CD25, CD69 e HLA-DR em quase todas as concentrações, enquanto que o mesmo não induziu aumento da porcentagem de células expressando HLA-DR nas concentrações de 6,25 e 12,5µg/mL. Considerando que algumas concentrações deste veneno induziram aumentos na porcentagem de viabilidade nos ensaios do MTT, pode-se sugerir, novamente, provável indução de proliferação celular e subsequente ativação das células T CD4⁺.

São poucos os estudos sobre o efeito de venenos de serpentes e suas toxinas na imunidade celular. Estudo com três desintegrinas, isoladas de venenos de serpentes, *flavovidin*, isolada de *Trimesurus flavoridis*, *kristin*, isolada de *Agkistrondon rhodostome* e *echistatin*, purificada de *Echis carinatus*, mostrou que estas foram capazes de ativar células T humanas *in vitro*, aumentando a expressão do marcador de ativação precoce, CD69, na superfície da célula (NETO et al., 2007). Outro trabalho utilizando análise por citometria de fluxo mostrou que a cardiotoxina III, a principal cardiotoxina isolada do veneno da cobra Taiwan (*Naja naja atra*), aumenta significativamente a expressão de células CD4 e diminui a expressão de células CD8 e CD25 em linfócitos ativados com PHA, mas isso não ocorre em linfócitos não tratados (SU et al, 2003).

Como observado nos resultados deste trabalho, a expressão aumentada de CD69, CD25 e HLA-DR nas células T CD4⁺ e CD8⁺, especialmente quando

incubadas com veneno bruto de *B. jararacussu* e LAAO de *B. pirajai*, refletem ativação da resposta imune celular, e pode sugerir que este tipo de resposta desempenhe papel relevante na indução e/ou controle dos processos imunopatológicos decorrentes de envenenamentos por *B. jararacussu* e *B. pirajai*.

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados é possível concluir que:

- As toxinas, serinoprotease e LAAO apresentam efeitos moduladores sobre o SC humano enquanto que os venenos brutos de *B. jararacussu* e *B. pirajai* são capazes de ativar o SC como observado nos ensaios cinéticos da VC/VL e VA e de quimiotaxia de neutrófilos, onde ficou evidenciado que a migração celular foi devida a liberação dos fatores quimiotáticos do SC, C3a e C5a. Os resultados obtidos estimulam investigações mais detalhadas para o esclarecimento dos mecanismos de ação e para o isolamento e identificação dos componentes responsáveis pelos efeitos observados.
- Os resultados do ensaio de citotoxicidade mostraram que o veneno bruto de *B. jararacussu* foi citotóxico para PBMC, nas concentrações de 50 e 100µg/mL e que a serinoprotease apresenta baixa citotoxicidade para essas células, o que sugere a necessidade de maiores investigações quanto aos mecanismos que levam a essa morte celular. O aumento da viabilidade celular encontrado nas amostras incubadas com veneno bruto de *B. pirajai* e com LAAO exige ensaios adicionais que possam confirmar se esse veneno e sua toxina estão realmente provocando proliferação dessas células.
- A expressão aumentada de CD69, CD25 e HLA-DR nas células T CD4⁺ e CD8⁺, especialmente quando incubadas com veneno bruto de *B. jararacussu* e LAAO de *B. pirajai*, refletem ativação da resposta imune celular, e pode sugerir que este tipo de resposta desempenhe papel relevante na indução e/ou controle dos processos imunopatológicos decorrentes de envenenamentos por *B. jararacussu* e *B. pirajai*.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.O.; FIFE JR., E.H. Quantitatively standardized complement fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. **Pan Am. Health Org. Science. Public.** , v 319, 92p., 1976.

ALVES, R.M.; ANTONUCCI, G.A.; PAIVA, H.H.; CINTRA, A.C.; FRANCO, J.J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E.P.; DORTA, D.J.; GIGLIO, J.R.; ROSA, J.C.; FULY, A.L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, New York, v.151, p. 542-550, 2008.

ANDE, S.R.; KOMMOJU, P.R.; DRAXL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death by L-amino oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, London, v.11, p.1439-1451, 2006.

ARVÅ, E.; ANDERSSON, B. Kinetics of cytokine release and expression of lymphocyte cell-surface activation markers after *in vitro* stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with *Streptococcus pneumoniae*. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v.49, p.237-243, 1999.

BERTAZZI, D.T.; DE ASSIS-PANDOCHI, A.I., TALHAFFERRO, V.L.; CALEIRO SEIXAS AZZOLINI, A.E.; PEREIRA CROTT, L.S.; ARANTES, E.C. Activation of the complement system and leukocyte recruitment by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Int. Immunopharmacol.**, Amsterdam, v.5, p.1077-1084, 2005.

BOYDEN, S. The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v.115, p. 453-466, 1962.

BITENCOURT, C.S. **Sistema complemento e resposta de produção de anticorpos em ratos hipertireoideos**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 111p.

BRAGA, M.D.; MARTINS, A.M.; AMORA, D.N.; DE MENEZES, D.B.; TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; MARANGONI, S.; ALVES, C.D.; BARBOSA, P.S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, Oxford, v.51, p.199-207, 2008.

BURCHIEL, S.W.; LAUER, F.T.; GURULÉ, D.; MOUNHO, B.J.; SALAS, V.M. Uses and future applications of flow cytometry in immunotoxicity testing. **Methods**, v.19, p.28-35, 1999.

CARROLL, M.C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nat. Immunol.**, New York, v.5, p.981-986, 2004.

CLEMENT, L.T.; DAGG, M.K.; LEHMEYER, J.E.; KIYOTAKI. Two phenotypically distinct suppressor T cell subpopulations inhibit the induction of B cell differentiation by phytohemagglutinin. **J. Immunol.** Baltimore, v. 131, p. 1214-1217, 1983

COLE, D.S., MORGAN, B.P. Beyond lysis: how complement influences cell fate. **Clin. Sci.**, London, v.104, p.455-466, 2003.

COLIGAN, J.E.; KRUISBEEK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M.; STROBER, W. **Current Protocol in Immunology.**, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

COLLINS, D.P. Cytokine and cytokine receptor expression as a biological indicator of immune activation: important considerations in the development of in vitro model systems. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.243, p.125-145, 2000.

CORREA-NETTO, C.; TEIXEIRA-ARAUJO, R.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; DE-SIMONE, S.G.; SOARES, M.R.; FOGUEL, D.; ZINGALI, R.B. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**. Oxford, v.55, p. 1222-1235, 2010.

COSTA, P.D.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L., DA CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**, Oxford, v.37, p.1143-1153, 1999.

CROTT, L.S.P.; LUCIANO-VALIM, Y.M.; SILVA, C.L.; BARBOSA, J.E. Interactions of F1 fractions from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis* with human complement and with human neutrophils. **Mycopathologia**, The Hague, v.140(1), p.19-27, 1997.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V.; CAMPOS, A.C.M.R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Complement activation by animal venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, New York, v.14, p.375-400, 1995.

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

DONG, H.; ROWLAND, I.; TUOHY, K.M.; THOMAS, L.V.; YAQOOB, P. Selective effects of lactobacillus casei Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. **Clin. Exp. Immunol.** doi:10.1111/j.1365.2249.2010.04173.x , 2010.

DO BRASIL MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, Fundação Nacional de Saúde, 2001.

DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, Oxford, v.40, p.659-665, 2002.

DU, X.Y.; SIM, D.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells Mol. Dis.**, La Jolla, v.36, p.414-421, 2006.

EBLE, J.A. Matrix meets toxinology. **Matrix Biol.** Amsterdam, v. 29, p.239-247, 2010.

EGGERSTSEN, G.; FOHLMAN, J.; SJOQUIST, J. *In vitro* studies on complement inactivation by snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v.18, p.87-96, 1980.

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

FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C. de F. Inflammatory effects of BaP-1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, Oxford, v.47, p.549-559, 2006.

FOX, J.W.; MA, L.; NELSON, K.; SHERMAN, N.E.; SERRANO, S.M. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonant mass spectrometry for exploring viperid venoms proteomes. **Toxicon**, Oxford, v.47, p.969-985, 2006.

GARCIA, F.; TOYAMA, M.H.; CASTRO, F.R.; PROENÇA, P.L.; MARANGONI, S.; SANTOS, L.M. Crotafolin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE₂ synthesis. **Toxicon**, Oxford, v.42, p.433-437, 2003.

GASMI, A.; LOUZIR, H.; KAROUI, H.; EL AYEB, M.; DELLAGI K. Purification from *Vipera lebetina* (desert adder) venom of a protein that depletes human complement. **Nat. Toxins**, New York, v.2, p. 44-48, 1994.

GOMES, A.; CHOUDHURY, S.R.; SAHA, A.; MISHRA, R.; GIRI, B.; BISWAS, A.K.; DEBNATH, A.; GOMES, A. A heat stable protein toxin (*drCT-I*) from the Indian Viper (*Daboia russelli russelli*) venom having antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activities. **Toxicon**, Oxford, v. 49, p. 46-56, 2007.

HAAS, P.-J.; STRIJP, J.V. Anaphylatoxins - Their role in bacterial infection and inflammation. **Immunol. Res.**, Basel, v.37, p.161-175, 2007.

ISHIKAWA, T.; VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.; NICULESCU, F.; BURNETT, J.W. Two new actions of sea nettle (*Chrysaora quinquecirrha*) nematocyst venom: studies on the mechanism of actions on complement activation and on the central nervous system. **Toxicon**, Oxford, v.44, p.895-899, 2004.

IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v.14, p.7034-7043, 2006.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SCHLOMCHIK, M.J. **Imunobiologia**: O sistema imune na saúde e na doença. 6ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

JUNIOR, J.C.M.; FLORÃO, A.; MATTANA, F.V.R.; ROCHA, F.H.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, A.M. A citometria de fluxo como instrument de avaliação de atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, Curitiba, v. 16, p. 645-655, 2006.

KINI, R.M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, Basel, v.34, p. 200-204, 2005.

KIRSCHFINK, M. Targeting complement in therapy. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v.180, p.177-189, 2001.

KOH, D.C.I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their application in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v.63, p.3030-3041, 2006.

LICASTRO, F.; DAVIS, L.J.; MORINI, M.C. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T-lymphocytes affect immune response. **Int. J. Biochem.** Bristol, v. 25, p. 845-852, 1993.

MANIATI, E.; POTTER, P.; ROGERS, N.J.; MORLEY, B.J. Control of apoptosis in autoimmunity. **J. Pathol.** London, v. 214, p. 190-198, 2008.

MARTIKAINEN P.; MARTIKAINEN, K.; NYMAN, NEVALAINEN, T.J., Toxic effects of human pancreatic and snake and bee venom phospholipases A₂ on MCF-7 cells in culture. **Toxicon**, Oxford, v.31, p. 835–843, 1993.

MASTELLOS, D.; ANDRONIS, C.; PERSIDIS, A.; LAMBRIS, J.D. Novel biological networks modulated by complement. **Clin. Immunol.**, Orlando, v.115, p.225-235, 2005.

MORA, R.; VALVERDE, B.; DÍAZ, C; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops asper* snake venom induces

proliferation, apoptosis and necrosis in lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, Oxford, v.45, p.651-660, 2005.

MORGAN, B.P.; HARRIS, C.L. Complement therapeutics; history and recent progress. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.40, p.159-170, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.65, p.55-63, 1983.

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

NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI, G.C.JR.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v.85, p.591-605, 2007.

NETO, E.H.; COELHO, A.L.J.; SAMPAIO, A.L.F.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MARCINKIEWICZ, C.; DE FREITAS, M.S.; BARJA-FIDALGO, C. Activation of human T lymphocytes via integrin signaling induced by RGD-disintegrins. **Biochim Biophys Acta**. Amsterdam. v.2 , p. 176-184, 2007.

OLIVEIRA, G.H.; BRANN, C.N.; BECKER, K.; THOHAN, V.; KOERNER, M.M.; LOEBE, M.; NOON, G.P.; TORRE-AMIONE, G. Dynamic expression of the membrane attack complex (MAC) of the complement system in failing human myocardium. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.97, p.1626-1629, 2006.

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

PÉREZ, A.V.; SARAVIA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C.D.; SOARES, A.M.; GUTIÉRREZ, J.M. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a

serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, Oxford, v.49, p.1063-1069, 2007.

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

QUEIRÓZ, L.S.; MARQUES, M.J.; NETO, H.S. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v.40, p.1483-1486, 2002.

REA, I.M.; MCNERLAN, S.E.; ALEXANDER, H.D. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on cd31 lymphocytes and relationship to serum TNF- α , IFN- γ , and sIL-2R levels in aging. **Exp. Gerontol.** Oxford, v. 4, p. 79-93, 1999.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J.D. Complement-target therapeutics. **Nat. Biotechnol.**, New York, v.25, p.1265-1275, 2007.

RODRIGUES, F.G.; Petretski, J.H.; KANASHIRO, M.M.; LEMOS, L.; SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low mass proteinase. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.40, p. 1149-1156, 2004.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat. Immunol.**, New York, v.6, p.345-352, 2005.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; CREPIN, M.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates $\alpha 2 \beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.38, p.1505-1511, 2005.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; MORAES, C.K. Effect of rACLF, a recombinant snake venom metallopeptidase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. **Toxicon**, Oxford, v.48, p.641-648, 2006.

SERRANO, S.M.T.; MAROURI, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specific, a paradox to be solved. **Toxicon**, Oxford, v.45, p.1115-1132, 2005.

SHOIBONOV, B.B.; OSIPOV, A.V.; KRYUKOVA, E.V.; ZINCHENKO, A.A.; LAKHTIN, V.M.; TSETLIN, V.I.; UTKIN, Y.N. Oxiagin from the *Naja oxiana* cobra venom is the first reprotolysin inhibiting the classical pathway of complement. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.42, p.1141-1153, 2005.

SILVA, R.J.; SILVA, M.G.; VILELA, L.C.; FECCHIO, D. Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. **Mediators Inflamm.**, Oxford, v. 11 p. 99-104, 2002.

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

STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v.12, p.2881–2886, 2004.

SU, SHU-HUI; SU SHU-JEM; LIN SHINE-REN; CHANG, KEE-LUNG. Cardiotoxin-III selectively enhances activation-induced apoptosis of human CD8⁺ T lymphocytes. **Toxicol Appl Pharmacol.** New York. v. 193, p. 97-105, 2003.

TAMBOURGI, D.V.; DOS SANTOS, M.C.; FURTADO, M. DE F.; DE FREITAS, M.C.; DA SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. **Br J Pharmacol.**, London, v.112, p.723-727, 1994.

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

TOHYAMA, Y.; YAMAMURA, H. Complement-mediated phagocytosis--the role of Syk. **IUBMB Life**, London, v.58, p.304-308, 2006.

TOMKINSON, C.B.; WAGNER, D.K.; NELSON, D.L.; SULLIVAN, J.L. Activated lymphocytes during acute Epstein-Barr virus infection. **J. Immunol.** Baltimore. v. 139, p. 3802-3807, 1987.

TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecular of the innate immune system. **Immunol. Today**, Amsterdam, v. 17, p. 532-540, 1996.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: Complexity in action. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v.20, p.825-852, 1999.

WAGNER, E.; FRANK, M.M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nature Reviews**. v. 9, p. 43-56, 2010.

WALPORT, M. J. Complement: First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.344, n.14, 2001.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, London, v. 375, p. 77-88, 2010.

YAMAMOTO, C.; TSURU, D.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M.; HATTORI, S.; KIM, S. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunobiology**, London, v.107, p. 111-117, 2002.

ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MUSCARÁ, M.N.; TEIXEIRA, S.A.; TEIXEIRA, C.F. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, Oxford, v.39, p.1505-1513, 2001.

ZIEGLER, S.F.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M.R. The activation antigen CD69. **Stem Cells**, Basel, v.12, p.456-465, 1994.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **J. Exp. Med.**, New York, v. 137, p.387-410, 1973.

Of. CEP nº. 17/2008/FCFRP/USP
rlq

Ribeirão Preto, 11 de junho de 2008.

À Senhora

Prof.a Dr.a LUCIANA SIMON PEREIRA CROTT

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Assunto: **Aprovação de protocolo de pesquisa.**

Prezada Professora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP, em sua 65ª Sessão Ordinária, realizada em 10/6/2008, aprovou o projeto de pesquisa intitulado “MODULAÇÃO DE EVENTOS DA IMUNIDADE HUMORAL E CELULAR POR VENENOS BRUTOS E COMPONENTES DOS VENENOS DE *Bothrops jararacussu* E *Bothrops pirajai*”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP nº. 125.

Em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou interrupção do mesmo.

Atenciosamente,

Prof.ª. Dr.ª. MARIA REGINA TORQUETI TOLOI
Coordenadora do CEP – FCFRP/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 08.1.362.53.0), intitulado: "Modulação de Eventos da Imunidade Humoral e Celular por Venenos Brutos e Componentes dos Venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai*", de autoria de **Lorena Rocha Ayres** e de **Luciana Simon Pereira Crott**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04.06.2008.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2008

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretaria da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO C**1. Solução de Alsever**

Citrato Trissódico.2H ₂ O	8,0g
Cloreto de Sódio	4,2g
Glicose (anidro)	20,5g
Água Destilada	q.s.p. 1000mL
Ajustar pH 6,1 com solução de ácido cítrico H ₂ O a 10%	
Esterilizar em autoclave a 109°C por 15 minutos	

2. Tampão TEA-Ca²⁺-Mg²⁺

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,22g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,23g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

3. Tampão TEA-EDTA

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75g
EDTA.2H ₂ O.....	37,2g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

4. Tampão TEA-Mg²⁺

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4,93g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

5. Tampão TEA-EGTA-Mg²⁺

Trietanolamina	28,0mL
NaCl	75g
EGTA	30,42g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	4,93g
Azida Sódica	0,50g
Água destilada	q.s.p. 1000mL (10x conc.)
HCl.....	q.s.p. pH 7,4 (final)

Para o preparo das soluções de trabalho, os tampões acima descritos foram diluídos 10 vezes com água destilada e acrescidos de 0,1% de gelatina.

6. Preparo do Zymosan

Zymosan.....	20mg
Salina.....	10mL

Ferver em banho-maria durante 30 min

Desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10mL de tampão TEA-Ca²⁺-Mg²⁺

Estocar a solução em geladeira

7. Solução balanceada de Sais de Hanks (HBSS)

NaCl	8,0g
KCl	0,4g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,185g
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	0,1g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1g
Na ₂ HPO ₄	0,048g
KH ₂ PO ₄	0,06g
Glicose	1,0g
NaHCO ₃	0,350g
Água destilada	q.s.p. 1000mL
Acertar pH a 7,2	

8. Sequência de coloração dos filtros

- Enxágue rápido com HBSS
- Propanol-2..... 5min
- Água destilada..... 2min
- Hematoxilina de Harris..... 2min
- Enxágue rápido com água destilada
- Água destilada..... 2min
- Propanol-2..... 4min
- Propanol-2..... 4min
- Xilol..... 5min

Montar entre lâmina e lamínula com auxílio de Entellan (Merck)

9. Meio RPMI

RPMI	10,4g (um pacote)
NaHCO ³	2,0g
HEPES	2,38g
Antibiótico/antimicótico	10 mL
Glutamina 2mM.....	10 mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Para o meio RPMI completo, suplementar com 10% de soro bovino fetal (inativado a 56°C por 30 minutos).

Acertar pH a 7,2 – 7,4.

10. Tampão de FACS (PBS-SBF-azida)

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na ₂ HPO ₄	1,15g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Soro Bovino Fetal.....	10mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Acertar pH a 7,4