

THYAGO BISPO LEONEL

Papel do sistema complemento na inflamação induzida pelo
veneno da serpente *Bothrops jararaca*

Trabalho apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Toxinologia do
Instituto Butantan, para obtenção de
título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2022

THYAGO BISPO LEONEL

Papel do sistema complemento na inflamação induzida pelo
veneno da serpente *Bothrops jararaca*

Trabalho apresentado ao Programa de
Pós-graduação em Toxinologia do
Instituto Butantan, para obtenção de
título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Denise V. Tambourgi

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Leonel, Thyago Bispo

Papel do sistema complemento na inflamação induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* / Thyago Bispo Leonel; orientador(a) Denise Vilarinho Tambourgi -São Paulo, 2022.

94 p.: il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências (PPGTox) - Toxinologia. Linha de pesquisa: Toxinas e sistemas biológicos.

Versão para qualificação e defesa

1. Sangue total humano 2. Inflamação. 3. *Bothrops jararaca*. 4. Inibidores do Sistema Complemento I. Tambourgi, Denise Vilarinho. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências (PPGTox) - Toxinologia. IV. Título.

CDD 615.9

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Thyago Bispo Leonel, aluno de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação/tese após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação/tese após a data da defesa:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, de de 2022

.....
aluno

De acordo:.....
Orientadora: Dra. Denise V. Tambourgi

POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: Thyago Bispo Leonel

DATA DO EXAME:...../...../.....

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Denise V. Tambourgi (Presidente)	_____	()	()
Angela Silva Barbosa	_____	()	()
Olga Célia Martinez Ibañez	_____	()	()

DECISÃO FINAL: APROVADO () REPROVADO ()

Comentários da Banca (opcional):

APROVAÇÃO/CERTIFICADO DE ISENÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA:



SECRETARIA MUNICIPAL DA
SAÚDE DE SÃO PAULO -
SMS/SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PAPEL DO SISTEMA COMPLEMENTO NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO VENENO DA SERPENTE Bothrops jararaca

Pesquisador: THYAGO BISPO LEONEL

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 18965819.7.0000.0086

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.813.859

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado, do Instituto Butantan, em que serão realizados testes "in vitro", utilizando sangue total de 4 voluntários saudáveis, adultos jovens, de ambos os sexos, com idade entre 18-40 anos, de qualquer grupo sanguíneo e etnia. Os voluntários serão recrutados via e-mail institucional no Instituto Butantan.

Cada participante doará 40mL de sangue, divididos em 8 coletas de 5mL cada, durante um período de 2 anos, com intervalo entre as coletas de 3 meses.

Objetivo da Pesquisa:

PRIMÁRIO: Analisar a ação do veneno de Bothrops jararaca sobre o Sistema Complemento, assim como dos receptores de superfície celular envolvidos na imunidade inata.

SECUNDÁRIOS:

- 1) Investigar o envolvimento do Sistema Complemento nos efeitos pró-inflamatórios induzidos pelo veneno da serpente Bothrops jararaca utilizando o ensaio de sangue total humano;
- 2) Observar a produção de anafilatoxinas produzidas em decorrência da ativação do Sistema Complemento pelo veneno da serpente Bothrops jararaca utilizando o ensaio de sangue total humano;
- 3) Analisar a expressão de marcadores de superfície celular em granulócitos, como TLRs 2 e 4;

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

CEP: 01.223-010

Telefone: (11)3397-2464

E-mail: smscep@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.813.859

CD11b; CD14; C3aR e C5aR, estimulados no modelo de sangue total pelo veneno da serpente Bothrops jararaca ;

4) Constatar a produção de quimiocinas e citocinas pelos leucócitos estimulados no modelo de sangue total pelo veneno da serpente Bothrops jararaca;- 5) Promover modulação destes parâmetros pelo uso de inibidores específicos do sistema Complemento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram adequadamente analisados riscos e benefícios da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A metodologia descrita está adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A Folha de Rosto está corretamente preenchida, foram identificadas instituição proponente e coparticipante, autorização para realização da pesquisa foi adequadamente apresentada.

TCLE, Cronograma, orçamento detalhado e fonte financiadora estão adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Para início da coleta dos dados, o pesquisador deverá se apresentar na mesma instância que autorizou a realização do estudo (Coordenadoria, Supervisão, SMS/Gab, etc).

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

De acordo com a Res. CNS 466/12, o pesquisador deve apresentar os relatórios parciais e final através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	28/01/2020		Aceito

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar
Bairro: Vila Buarque **CEP:** 01.223-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2464 **E-mail:** smscep@gmail.com

Continuação do Parecer: 3.813.859

Básicas do Projeto	ETO_1361756.pdf	09:12:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO4.pdf	08/01/2020 15:20:08	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito
Outros	Respostas_as_pendencias_apontadas_no_parecer_do_CEP_SMS.pdf	08/01/2020 15:19:35	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO3.pdf	16/12/2019 21:23:35	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVR E_E_ESCLARECIDO.pdf	11/10/2019 17:55:46	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito
Outros	Respostasapendenciasapontadasnopar ecerdoCEPSMS.pdf	11/10/2019 17:54:42	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.pdf	12/08/2019 14:56:12	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/08/2019 14:54:18	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	12/08/2019 14:43:10	THYAGO BISPO LEONEL	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Janeiro de 2020

Assinado por:

SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador(a))

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 8º andar

Bairro: Vila Buarque

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

E-mail: smscep@gmail.com

À minha querida mãe, Tiana (*in memoriam*),
pelo amor e gentileza essenciais para
minha formação.

Agradeço!

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste projeto tornou-se possível através da contribuição de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

À Dra. Denise V. Tambourgi, expresso gratidão por ter me acolhido como integrante do seu grupo. Sua orientação, generosidade e perseverança foram elementos intensamente presentes em todos esses anos de projeto. Além disso, não posso deixar de agradecer pela maneira como liderou o laboratório de imunquímica em todo o período de pandemia do coronavírus (COVID-19), sempre prezando pela saúde dos estudantes, colaboradores e conseqüentemente de seus familiares.

Elaine Rodrigues, Lia Aguiar e Daiane Silva, muito obrigado pelo entusiasmo, respeito e apreço. À Guilherme Yoshikawa, Alécio Rodrigues, Osmair Conti, Márcia Franco, Ana Freire, Ana Claudia Santana, Rosana Shoji, Isadora Villas Boas, Giselle Pidde, Paula Pohl, Bruna Fernandes, Fábio Magnoli, Severino Ramos e Luiz Sardinha, agradeço por todo o suporte dado nos mais diversos eventos que ocorreram no laboratório de Imunoquímica.

Joel Gabrili, Felipe França e Carla Baptistão, sou imensamente grato por sempre estarem dispostos a partilharem seu tempo, ensinamentos, sugestões e escuta, em diferentes etapas dos meus ensaios. Esses fatores colaboraram de maneira importante na obtenção dos resultados inseridos no projeto. Felipe Guidolin, Kemily Godoi, Cinthya Lima e Dayanne Fernandes, obrigado pelas conversas agradáveis, conselhos e encorajamento.

Angela Megale, Luiz Gonçalves e Angela Barbosa, sou grato pelas sugestões conferidas na minha qualificação.

Ao programa de Pós-graduação em Toxinologia, abarcando os membros do colegiado, funcionários da secretaria, docentes permanentes, docentes colaboradores, pós-doutorandos, alunos de mestrado e doutorado.

Agradeço aos meus pais, Sebastiana e Antônio, que, com respeito, humildade, amor e dedicação, fizeram-me melhor. A vocês, todo meu amor e gratidão. Às minhas irmãs, Leila e Luciana, sou grato por todo apoio, incentivo e carinho.

*"Novas folhas, novas flores, na infinita
benção do recomeço"*

Chico Xavier

RESUMO

Leonel, Thyago Bispo. Papel do sistema complemento na inflamação induzida pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*. 2022. 92 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

O gênero *Bothrops*, família Viperidae, integra um grupo de serpentes com mais de 30 espécies e subespécies, amplamente distribuídas na região neotropical, ocorrendo desde o Sul do México até o norte da Argentina e em algumas ilhas do Caribe. No Brasil, em 2021, foram responsáveis por cerca de 70% dos mais de 29.000 acidentes ofídicos registrados. O veneno das serpentes deste gênero possui amplo repertório de moléculas em sua composição, como metaloproteases, serinoproteases, lectina do tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), entre outras. As manifestações clínicas do envenenamento são complexas e caracterizadas por efeitos locais proeminentes, incluindo dor, edema, equimose, bolhas, abscessos e necrose, que podem evoluir para perda tecidual, incapacidade física ou amputação. Sinais sistêmicos também podem ocorrer, tais como hemorragia, coagulopatia, choque e insuficiência renal aguda. A administração parenteral do antiveneno polivalente comercial constitui o único recurso terapêutico cientificamente validado para o tratamento dos acidentes ofídicos. Contudo, apesar da efetiva neutralização dos efeitos sistêmicos, esse tratamento ainda se mostra ineficiente na reversão das manifestações clínicas locais. O rápido desenvolvimento das manifestações clínicas locais é acompanhado pela presença de mediadores do processo inflamatório, originados a partir de tecidos lesados pelo veneno botrópico. Estudos do nosso grupo mostraram que o veneno da *Bothrops jararaca* é capaz de ativar o sistema complemento, sugerindo que essa ativação possa contribuir para os sintomas observados nesses envenenamentos. Considerando o importante papel que o sistema complemento desempenha na reposta inflamatória, o presente estudo teve como objetivo analisar a ação do veneno da serpente *B. jararaca* sobre o sistema complemento e receptores de superfície celular envolvidos na imunidade inata. Para isto, utilizamos o modelo *ex-vivo* de sangue total humano, proposto por Mollnes e colaboradores (2002) e, recentemente, adaptado por Johnson e colaboradores (2018). Com este modelo, por meio de imunoenaios, foram avaliadas a ativação do sistema complemento: a partir da geração de anafilatoxinas e complexo terminal do complemento solúvel (sTCC /SC5b-9); produção de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF- α) e quimiocinas (IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, RANTES); expressão de receptores de leucócitos, como TLRs 2 e 4; CD14; CD11b; C3aR e C5aR; modulação destes parâmetros pelo uso de inibidores específicos do sistema complemento (Cp40, PMX205). O veneno da *B. jararaca* foi capaz de induzir ativação do sistema complemento no modelo de sangue total humano, gerando aumento significativo na produção das anafilatoxinas C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg, C5a/C5a-desArg e sTCC. Nos leucócitos, o veneno da *B. jararaca* induziu aumento da expressão de TLR2 e redução da expressão de C5aR. A expressão de CD11b, CD14, C3aR e TLR4 não foi alterada pela ação do veneno. A inibição do componente C3 pelo Cp40 resultou na redução para níveis basais de C3a/C3a-desArg e do sTCC nas amostras estimuladas com o veneno. O Cp40 também causou uma redução significativa nos níveis de C5a/C5a-desArg, mas não de C4a/C4a-desArg. A exposição ao veneno da *B. jararaca* induziu a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias como TNF- α , IL-8, MCP-1 e MIG no modelo de sangue total humano. O tratamento com Cp40

promoveu uma redução significativa na produção de TNF- α , IL-8 e MCP-1. O uso do antagonista do receptor 1 de C5a, PMX205, promoveu redução para níveis basais de TNF- α e IL-8 em amostras estimuladas com veneno. Em conclusão, os dados aqui apresentados sugerem que a ativação do sistema complemento, promovida pelo veneno da serpente *B. jararaca* no modelo de sangue total humano, contribui significativamente para o processo inflamatório. O controle de vários parâmetros inflamatórios pelo uso do Cp40, inibidor do componente C3, e do PMX205, antagonista do receptor 1 de C5a, indicam que a inibição do complemento possa ser uma possível ferramenta terapêutica no envenenamento por *B. jararaca*.

Palavras-chave: Sangue total humano, Inflamação, *Bothrops jararaca*, Sistema Complemento e Inibidores.

ABSTRACT

Leonel, Thyago Bispo. Role of the complement system in *Bothrops jararaca* snake venom-induced inflammation. 2022. 92 p. Dissertation (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

The genus *Bothrops*, family Viperidae, integrates a group of snakes with more than 30 species and subspecies, widely distributed in the neotropical region, occurring from southern Mexico to northern Argentina and some islands of the Caribbean. In Brazil, in 2021, they were responsible for around 70% of the more than 29,000 snakebites registered. The snake venom of this genus has a wide repertoire of molecules in its composition, such as metalloproteases, serineproteases, type C lectin, bradykinin-enhancing peptides (BPPs), among others. The clinical manifestations of the envenomation are complex and characterized by prominent local effects, including pain, edema, ecchymosis, blisters, abscesses and necrosis, which can progress to tissue loss, physical disability or amputation. Systemic signs can also occur, such as hemorrhage, coagulopathy, shock, and acute kidney failure. Parenteral administration of commercial polyvalent antivenom is the only scientifically validated therapeutic tool for the treatment of snakebites. However, despite the effective neutralization of the systemic effects, this treatment is still ineffective in reversing local clinical manifestations. The rapid development of local clinical manifestations is accompanied by the presence of mediators of the inflammatory process, originated from tissues damaged by the bothropic venom. Studies from our group have shown that the *Bothrops jararaca* venom is able to activate the complement system, suggesting that this activation may contribute to the symptoms observed in these envenomations. Considering the important role that the complement system plays in the inflammatory response, this study aimed to analyze the action of *B. jararaca* snake venom on the complement system and cell surface receptors involved in innate immunity. For this, we used the *ex-vivo* human whole blood model proposed by Mollnes et al. (2002) and recently adapted by Johnson et al. (2018). With this model, by means of immunoassays, it was evaluated the complement system activation: from the generation of anaphylatoxins and soluble terminal complement complex (sTCC /SC5b-9); the production of cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF- α) and chemokines (IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, RANTES); the expression of leukocyte receptors such as TLRs 2 and 4; CD14; CD11b; C3aR and C5aR; the modulation of these parameters by the use of specific inhibitors of the complement system (Cp40, PMX205). The *B. jararaca* venom was able to induce activation of the complement system in the human whole blood model, generating a significant increase in the production of anaphylatoxins C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg, C5a/C5a-desArg and sTCC. In leukocytes, the venom of *B. jararaca* induced increased expression of TLR2 and reduced expression of C5aR. The expression of CD11b, CD14, C3aR and TLR4 was not altered by the action of the venom. Inhibition of the C3 component by Cp40 resulted in a reduction to basal levels of C3a/C3a-desArg and sTCC in samples stimulated with the venom. Cp40 also caused a significant reduction in the levels of C5a/C5a-desArg, but not of C4a/C4a-desArg. Exposure to *B. jararaca* venom induced the production of inflammatory cytokines and chemokines such as TNF- α , IL-8, MCP-1 and MIG in the human whole blood model. Treatment with Cp40 promoted a significant reduction in the production of TNF- α , IL-8 and MCP-1. The use of the C5a receptor 1 antagonist, PMX205, promoted a reduction to basal levels of TNF- α and IL-

8 in samples stimulated with venom. In conclusion, the data presented here suggest that the activation of the complement system, promoted by the venom of the snake *B. jararaca* in the human whole blood model, significantly contributes to the inflammatory process. The control of several inflammatory parameters by Cp40, an inhibitor of the C3 component, and of PMX205, a C5a receptor 1 antagonist, indicate that complement inhibition may be a possible therapeutic tool in *B. jararaca* envenomation.

Keywords: Human whole blood, Inflammation, *Bothrops jararaca*, Complement System and Inhibitors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i>.....	18
1.2 O veneno botrópico	21
1.3 Resposta inflamatória	24
1.4 Sistema complemento.....	26
1.5 Utilização de inibidores do complemento no tratamento de doenças.....	29
1.6 Modelo <i>Ex vivo</i> de Sangue Total Humano.....	31
2 OBJETIVO	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Veneno.....	34
3.2 Atividade proteolítica	34
3.3 Modelo de sangue total humano	35
3.3.1 <i>Inibição do sistema complemento com Cp40.....</i>	<i>35</i>
3.3.2 <i>Inibição do receptor 1 de C5a (C5aR1) pelo PMX205</i>	<i>36</i>
3.4 Dosagem de anafilatoxinas e sTCC.....	36
3.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas	36
3.6 Análise da expressão de marcadores de superfície em leucócitos	37
3.7 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS.....	38
4.1 Análise da atividade proteolítica do veneno da <i>B. jararaca</i>.....	38
4.2 Ensaio de coagulação sanguínea na presença do peptídeo GPRP.....	38
4.3 Dosagem de anafilatoxinas em sangue total humano tratado com veneno da <i>B. jararaca</i>	39
4.4 Dosagem do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) em sangue total humano tratado com veneno da <i>B. jararaca</i>	44
4.5 Quantificação de citocinas em sangue total humano tratado com veneno da <i>B. jararaca</i>.....	46
4.6 Quantificação de quimiocinas em sangue total humano tratado com veneno da <i>B. jararaca</i>.....	48
4.7 Análise da expressão de marcadores de superfície de leucócitos, após tratamento com veneno da <i>B. jararaca</i>.....	52
4.7.1 <i>Expressão de marcadores em monócitos.....</i>	<i>52</i>
4.7.2 <i>Expressão de marcadores em granulócitos.....</i>	<i>54</i>
4.8 Ação do veneno da <i>B. jararaca</i> no modelo de sangue total humano na	

presença do Cp40.....	56
4.8.1 <i>Inibição da ativação do sistema complemento pelo Cp40.....</i>	56
4.8.2 <i>Produção de citocinas e quimiocinas em sangue total humano estimulado com veneno da B. jararaca na presença de Cp40.....</i>	59
4.9 Ação do veneno da B. jararaca no modelo de sangue total humano na presença do PMX205.....	61
4.9.1 <i>Papel do C5a na produção de citocinas e quimiocinas induzidas pelo veneno da B. jararaca.....</i>	61
4.10 Expressão de marcadores na superfície de leucócitos após tratamento com veneno da B.jararaca na presença de inibidores do sistema complemento.....	63
4.10.1 <i>Papel do sistema complemento na expressão de marcadores na superfície de monócitos e granulócitos, após tratamento com veneno da B. jararaca na presença de CP40 ou PMX205.....</i>	63
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos são um importante desafio de saúde pública em diversas regiões do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). Estima-se que anualmente ocorram, aproximadamente, 1,8 a 2,7 milhões de envenenamentos, resultando entre 81.000 a 138.000 mortes e cerca de três vezes mais amputações e outras incapacidades permanentes a cada ano (CHIPPAUX, 1998; KASTURIRATNE, 2008). Os países mais afetados pelos acidentes ofídicos estão localizados na zona intertropical, com persistência exclusiva nas comunidades de baixa renda, marginalizadas e politicamente sem poder, onde as principais populações afetadas são homens adultos em atividades agrícolas e crianças (HARRISON et al., 2009; WEN et al., 2015, GUTIÉRREZ et al., 2017).

Devido ao notável impacto social e econômico, em 9 de junho de 2017, após a 10ª reunião do grupo consultivo estratégico e técnico para doenças tropicais negligenciadas (Genebra, 29 e 30 de março de 2017), o ofidismo foi incluído na categoria de doenças tropicais negligenciadas prioritárias da Organização Mundial da Saúde (OMS), da qual atualmente fazem parte outras 19 enfermidades (CHIPPAUX, 2017).

Em 2019, novas diretrizes de prevenção e controle dos acidentes ofídicos foram elaboradas pela Organização Mundial da Saúde para reduzir em 50% a mortalidade e a incapacidade antes de 2030. Para isso, quatro objetivos foram traçados: (1) capacitar e envolver as comunidades; (2) garantir tratamento seguro e eficaz; (3) fortalecer os sistemas de saúde e (4) aumentar parcerias, coordenação e recursos de colaboração (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

As serpentes (Reino, Animalia; Filo, Chordata; Subfilo, Vertebrata; Classe, Reptilia; Ordem, Squamata; Subordem, Serpentes, Linnaeus, 1758) estão incluídas em vinte famílias, com 456 gêneros e mais de 2.900 espécies (CARDOSO et al., 2003; SILVA & TAMBOURGI, 2011). Distribuídos na maioria dos continentes, exceto na Antártida, esses animais são caracterizados por apresentarem uma morfologia alongada, corpo recoberto com escamas epidérmicas, em número, tamanho e disposição frequentemente específicas para cada espécie. Não possuem ouvidos

externos e pálpebras móveis, seus membros superiores estão totalmente ausentes, e membros posteriores são rudimentares (CARDOSO et al., 2003). O prolongamento do corpo é alcançado por um número de vértebras, que normalmente variam entre 120 e 240, embora esse número possa ser superior a 500. Essas numerosas vértebras estão posicionadas cada uma com um par de costelas na região do pescoço e tronco, criando uma notável flexibilidade corporal que permite uma locomoção ondulatória eficaz na água, no solo, em arbustos e árvores (VITT; CALDWELL, 2014).

Todas as serpentes são carnívoras, predando tanto vertebrados quanto invertebrados. Com grande elasticidade nos movimentos cranianos, especialmente nas articulações da mandíbula que são unidas entre si apenas por um ligamento elástico, e com o crânio, pelos ossos móveis quadrado e supratemporal, podem engolir presas grandes, algumas com até 3,5 vezes seu diâmetro (CARDOSO et al., 2003). Utilizam o corpo e a boca como aparato de captura de seu alimento podendo, assim, apanhar com a boca e simplesmente engolir, segurar com a boca e com auxílio do corpo imobilizar e causar asfixia, ou ainda injetar substâncias de alta toxicidade que incapacitam e/ou matam a presa (VITT; CALDWELL, 2014).

Dentre as várias famílias de serpentes, apenas Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae, Crotalidae e Colubridae possuem espécies peçonhentas (SILVA, TAMBOURGI, 2011); ou seja, aquelas que produzem secreções tóxicas em glândulas especializadas e através de dentes modificados (presas) as inoculam, podendo determinar sérias alterações locais (na região da picada) e sistêmicas no homem e em outras espécies animais (MACKESSY; BAXTER, 2006).

1.1 Serpentes do gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops*, família Viperidae, integra um grupo de serpentes com mais de 30 espécies e subespécies, amplamente distribuídas na região neotropical, ocorrendo desde o Sul do México até o Norte da Argentina e em algumas ilhas do Caribe (WÜSTER et al., 2002; CARDOSO et al., 2003). Algumas espécies, por sua abundância e distribuição geográfica, apresentam maior importância clínica, como *Bothrops asper*, na América Central, *Bothrops atrox* e *Bothrops jararaca* na América do Sul (CARDOSO et al., 2003).

De acordo com o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Ministério da Saúde), no Brasil, em 2021 foram notificados 29.152 acidentes ofídicos, sendo o gênero *Bothrops* responsável por aproximadamente 70% dos casos, seguido pelos gêneros *Crotalus* (9,0%), *Lachesis* (1,0%) e *Micrurus* (1,0%). Ainda, cerca de 13,0% dos acidentes notificados não especificaram o gênero das serpentes envolvidas e outros 6,0% foram causados por serpentes não peçonhentas.

Em nosso país, a *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (*B. jararaca*) representa uma das espécies cujo acidente em humanos é de maior gravidade (CAMPBELL; LAMAR, 1989), estando, sobretudo, vinculada aos acidentes registrados nas regiões Sudeste, e habitando desde o Sul da Bahia até o Noroeste do Rio Grande do Sul (Figura 1) (CARDOSO et al. 1993; RIBEIRO; JORGE, 1997; PETRICEVICH et al., 2000).

Figura 1 - Distribuição geográfica da serpente *B. Jararaca* nos estados do Brasil.



Fonte: FUNASA, 2001

Essas serpentes apresentam corpo delgado, ágil, e comprimento total máximo de 160 cm, mas que geralmente fica abaixo desta medida (GOMES, 1993). Cabeça triangular em forma de lança, fosseta loreal, presas inoculadoras bem desenvolvidas, cauda lisa e ausência de chocalho (FUNASA, 2001), além de uma padronagem de cores muito variável, com manchas marrons escuras em ambos os lados do corpo em um padrão triangular; entremeadas por áreas claras, cinzas, oliváceas, amareladas ou beges (Figura 2) (GOMES, 1993). Habitam principalmente zonas rurais e periféricas de grandes cidades, escolhendo ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, e locais onde haja facilidade para proliferação de pequenos roedores. De hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares, quando ameaçadas, revelam comportamento agressivo, desferindo botes sem produzir ruídos (SAZIMA,1992; FUNASA, 2001).

Figura 2 - Exemplar da serpente *Bothrops jararaca*.



Fonte: <http://dedoverde.com.br/scales/joomla/index.php/pt-br/serpentes>

As manifestações clínicas do envenenamento provocado pelas serpentes *B. jararaca* são complexas e caracterizadas por efeitos locais proeminentes, incluindo dor, edema, equimose, bolhas, abscessos e necrose, que podem evoluir para perda tecidual, incapacidade física ou amputação (Figura 3).



Figura 3 - Manifestações locais do acidente botrópico. **A)** bolhas hemorrágicas no membro superior esquerdo, cerca de 12 horas após a picada. **B)** Desenvolvimento de síndrome compartimental no membro superior esquerdo, 24 horas após a picada, necessitando de fasciotomia. **C)** Edema e necrose no membro superior esquerdo e gangrena do quarto dedo. **D)** O mesmo paciente mostrado em C, após a amputação do quarto dedo (na fase de cicatrização). Fonte: WEN et al., 2015.

Sinais sistêmicos também podem ocorrer, tais como hemorragia (sangramento gengival, hematúria e epistaxe), coagulopatia, choque e insuficiência renal aguda (ROSENFELD, 1971; RIBEIRO; JORGE, 1997; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000).

A administração parenteral do antiveneno polivalente comercial constitui o único recurso terapêutico cientificamente validado para o tratamento dos acidentes ofídicos (FUNASA, 2001). O soro antibotrópico, produzido pelo Instituto Butantan, é preparado por meio da hiperimunização de cavalos com um pool dos venenos das

serpentes *B. alternatus* (12,5%), *B. jararaca* (50%), *B. jararacussu* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. neuwiedi* (12,5%) (QUEIROZ et al., 2008). A quantidade de antiveneno administrada em cada paciente está relacionada com o nível de gravidade do caso, que é classificado em leve, moderado e grave, de acordo com as manifestações clínicas (BRASIL, 2017). Contudo, apesar da efetiva neutralização dos efeitos sistêmicos, esse tratamento ainda se mostra ineficiente na reversão das manifestações clínicas locais. Estudos com modelos experimentais, realizados com o propósito de avaliar a eficácia do antiveneno polivalente comercial na inibição dos efeitos locais, revelaram que o edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* e *B. asper* é dificilmente neutralizado, mesmo em situações onde o antiveneno específico fora pré-incubado com veneno e, posteriormente, inoculado nos animais (GUTIÉRREZ et al., 1981; PICOLO et al., 2002).

O rápido desenvolvimento das manifestações locais é acompanhado pela presença de mediadores do processo inflamatório, originados a partir de tecidos lesados pelo veneno botrópico (TEIXEIRA, 2009; MOREIRA et al., 2012). O antiveneno possui especificidade para as principais toxinas presentes no veneno circulante, e devido a essa característica, é capaz de neutralizá-las, mas não exerce o mesmo efeito sobre os mediadores inflamatórios (ROSENFELD, 1971).

1.2 O veneno botrópico

A peçonha é um instrumento utilizado, por diferentes famílias de serpentes, na imobilização, morte e digestão da sua caça ou proteção contra possíveis predadores (CALVETE et al., 2009). São secreções tóxicas armazenadas em pares especializados de glândulas exócrinas conectadas às presas por dutos (MACKESSY; BAXTER, 2006).

Nas serpentes do gênero *Bothrops* tais secreções possuem ampla variabilidade de composição e ação biológica entre as espécies (QUEIROZ et al., 2008). As proteínas e peptídeos equivalem a mais de 90% do peso seco da peçonha. Outros componentes presentes em menores níveis são metais, carboidratos, nucleotídeos, aminas biogênicas e níveis muito baixos de aminoácidos e lipídios (MARKLAND, 1998).

O veneno botrópico apresenta três ações principais: 1) proteolítica, fonte inicial de lesões locais caracterizadas por edema, bolhas e necrose; 2) coagulante, atua de maneira similar à trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina, ativando protrombina e fator X, promovendo alterações na coagulação sanguínea; 3) hemorrágica, alterando a membrana basal dos capilares próximos ao local da picada (ROSENFELD, 1971; RIBEIRO; JORGE, 1997; HATI et al., 1999). Carvalho e colaboradores (2017) mostraram, por meio de análise proteômica, a presença de um total de 46 diferentes classes de proteínas no veneno da serpente *B. jararaca*. As proteínas mais abundantemente identificadas pertenciam às seguintes classes: metaloproteases (SVMPs, do inglês *snake venom metalloproteinases*) (incluindo desintegrinas originárias do eventual processamento dessas proteínas), serinoproteases (SVSPs, do inglês *snake venom serine proteinases*), lectina tipo C de serpente, proteína secretória rica em cisteína, fosfolipase A2, L-aminoácido oxidase, fator de crescimento endotelial vascular do veneno de serpente e peptídeos natriuréticos potenciadores da bradicinina. Dentre essas várias proteínas presentes no veneno botrópico, as metalo- e serinoproteases são as enzimas que apresentam maior diversidade de sequência de aminoácidos e associação direta na patogênese do envenenamento (KINI, 2006; MOURA-DA-SILVA et al., 2007; ZYCHAR et al., 2010; PIDDE-QUEIROZ et al., 2013).

As glândulas de veneno de serpentes sintetizam uma variedade de serinoproteases ácidas e básicas. As SVSPs funcionam com um mecanismo catalítico comum que inclui um resíduo reativo de serina que desempenha um papel-chave de nucleófilo na formação de um complexo acil-enzima transitório. Este complexo é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo (SERRANO; MAROUN, 2005). Essas proteínas são encontradas no veneno de serpentes da família Viperidae, desempenhando papel importante na defesa, ataque, incapacitação e digestão da presa. Afetam várias funções fisiológicas, como a agregação plaquetária, a coagulação sanguínea, a fibrinólise, o sistema complemento, a pressão arterial e o sistema nervoso (KINI, 2006; MACKESSY, 2010).

As metaloproteases compreendem uma classe de enzimas com atividade catalítica dependente de íons de zinco (KINI, 2006). Com presença predominante no veneno de serpentes da família Viperidae, essas enzimas são responsáveis pela

clivagem de importantes proteínas teciduais, como laminina, nidogênio, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanos presentes na membrana basal endotelial. Os efeitos biológicos da ação das metaloproteases envolvem modulação do processo hemostático, efeitos cardiovasculares, hemorrágicos e miotóxicos, dentre outros (MOURA-DA-SILVA et al., 2007; FOX; SERRANO, 2008).

As metaloproteases foram divididas em três principais grupos, PI a PIII, com possíveis subgrupos, de acordo seu domínio organizacional. A classe PIa, possui somente o domínio metaloprotease, com região catalítica HEXXHXXGXXH altamente conservada. A classe PII possui além do domínio metaloprotease, o domínio desintegrina-símile RGD, e foi subdividida em “a”, “b”, “c”, “d”, e “e”. A classe PIIa é expressa com o domínio desintegrina, porém, após modificações pós-traducionais, essas moléculas sofrem um processamento proteolítico, o qual libera o domínio desintegrina-*like*; a classe PIIb possui o domínio desintegrina como parte da estrutura da proteína sem sofrer proteólise; a classe PIIc é a forma homodimérica da PIIb; a classe PIIId representa um precursor que também passa pelo processamento proteolítico e libera desintegrinas homodiméricas; e a classe PIIe compreende metaloproteases que, além de apresentarem processamento proteolítico, liberam domínio heterodimérico desintegrina-*like* RGD. A classe PIII representa as metaloproteases compostas pelos domínios metaloprotease, desintegrina-*like* e um domínio rico em cisteína, podendo ainda apresentar o domínio lectina-*like*. As proteases dessa classe podem ser subdivididas em quatro subgrupos: na classe PIIIa, os domínios desintegrina-*like* e rico em cisteína não são processados e fazem parte da molécula junto ao domínio metaloprotease; na PIIIb, estes domínios são processados e considerados livres; a classe PIIIc é a forma dimérica da PIIIa; e a classe PIIId contém ainda, além dos domínios metaloprotease, desintegrina-*like* e rico em cisteína, um domínio lectina-*like* (composto por um heterodímero) ligados por pontes dissulfeto à cadeia principal (Figura 4) (FOX; SERRANO, 2008).

Além dos efeitos biológicos citados acima, as metaloproteases presentes nos venenos das serpentes, desempenham também um papel fundamental na indução da resposta inflamatória (TEIXEIRA et al.,2005).

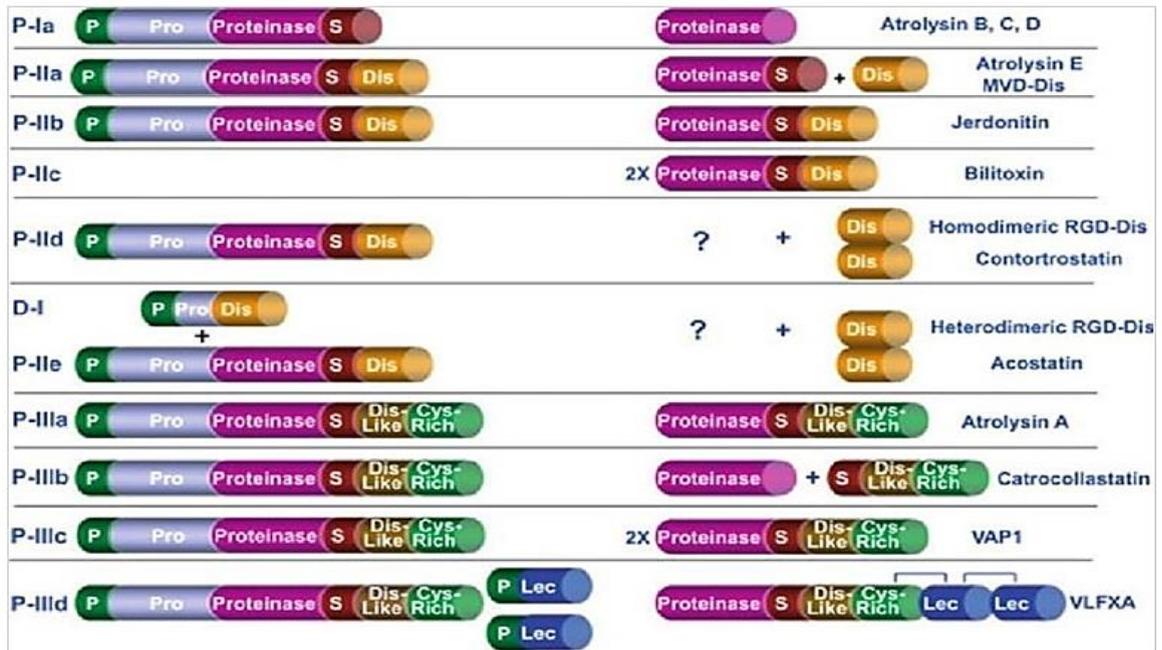


Figura 4 - Classificação das metaloproteases. As metaloproteases são sintetizadas na forma latente como precursores multimodulares que sofrem diferentes estágios de processamento. **P**: pré-domínio, **Pro**: pró- domínio, **Proteinase**: domínio metaloprotease. **S**: sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico e desintegrina ou tipo-desintegrina, **Dis**: desintegrina, **Dis-Like**: domínio tipo-desintegrina, **Cys-Rich**: domínio rico em cisteínas, **Lec**: domínio ligante de lectina. Fonte: Fox e Serrano (2008).

1.3 Resposta inflamatória

A inflamação é um processo elaborado por tecidos vascularizados do corpo, frente a uma lesão. Independentemente da causa, a inflamação sempre busca restaurar a homeostase, estabelecendo os estágios de cura e reconstituição de tecido danificado (MEDZHITOV, 2008).

Essa resposta à lesão/infecção é composta por dois principais mecanismos reversíveis, (1) alterações vasculares e (2) eventos celulares. Estes mecanismos têm o intuito principal de favorecer o movimento direcionado de leucócitos do meio extravascular para o tecido infectado ou lesionado. Quando ativados nos tecidos, esses leucócitos passam a fagocitar agentes ofensivos, destruir bactérias e outros microrganismos, e eliminar os tecidos necróticos e substâncias estranhas. No entanto, os mesmos mecanismos que operam para eliminar os microrganismos e células mortas, que é o papel fisiológico da inflamação, quando estimulados de forma prolongada ou inadequada conduzem a efeitos deletérios (KUMAR et al., 2010).

As alterações vasculares, iniciadas após a lesão, são caracterizadas pelo aumento do fluxo sanguíneo com vasoconstrição. Em seguida, a ocorrência de vasodilatação, acompanhada pelo aumento da permeabilidade vascular, principalmente das vênulas pós-capilares, levando ao extravasamento do fluido plasmático rico em proteínas, que dá origem ao edema (TEIXEIRA et al., 2009). A mobilização, inicialmente, de um grande número de neutrófilos, seguido pelos monócitos, do sangue para os tecidos, é regulada por diferentes moléculas, que desempenham papéis predominantes nas diferentes etapas desse processo, as selectinas na adesão intermitente dos leucócitos à superfície do endotélio vascular (o fenômeno de “rolamento”); quimiocinas (normalmente ligadas aos proteoglicanos) na ativação dos leucócitos para aumentar a avidéz das integrinas; integrinas em firme adesão; e CD31 (PECAM-1) na transmigração (KUMAR et al., 2010, ABBAS et al., 2015). Estas reações (alterações vasculares e eventos celulares) são cuidadosamente orquestradas por mediadores solúveis que estimulam e regulam a resposta inflamatória, fundamentalmente, produzidos em reação ao reconhecimento de estruturas moleculares compartilhadas por classes de microrganismos, chamadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), ou moléculas endógenas produzidas ou liberadas por células danificadas ou mortas, chamadas de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (SAADI,2002). A interação de tais ligantes aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), expressos nas células (p.ex., receptores do tipo Toll (TLRs); tipo NOD (NLRs); tipo RIG (RLRs)) ou na forma solúvel (p.ex., complemento; pentraxinas; colectinas; ficolinas), é de suma importância para as funções atribuídas à resposta imune inata (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; AGRAWAL et al., 2009; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011; ABBAS et al., 2015). Os diversos mediadores envolvidos na resposta inflamatória (Quadro 1), podem ser derivados de células: incluindo aminas vasoativas (serotonina, histamina), metabólitos lipídicos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), fator ativador plaquetário, citocinas (p.ex., TNF- α , IL-1, IL-6) e quimiocinas (p.ex., CCL2 / MCP-1, CXCL8 / IL-8). Existem também aqueles que são derivados de proteínas plasmáticas: compreendendo os fragmentos do complemento, cininas e proteases ativadas durante a coagulação (CABRAL, 2005; KUMAR et al., 2010; ABBAS et al., 2015).

Quadro 1: Ações dos Principais Mediadores da Inflamação

Mediador	Fonte(s)	Principais Ações
Derivados de células		
Histamina	Mastócitos, basófilos, plaquetas	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasoconstrição
Prostaglandinas	Mastócitos, granulócitos	Vasodilatação, dor, febre
Leucotrienos	Mastócitos, granulócitos	Aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, adesão e ativação de leucócitos
Fator ativador plaquetário	granulócitos, mastócitos	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aderência de leucócitos, quimiotaxia, desgranulação, explosão oxidativa
Espécies reativas do oxigênio	Leucócitos	Destruição de micróbios, lesão tecidual
Óxido nítrico	Endotélio, macrófagos	Relaxamento do músculo liso vascular, morte de micróbios
Citocinas (TNF, IL-1, IL-6)	Macrófagos, células endoteliais, mastócitos	<i>Local:</i> Ativação endotelial (expressão de moléculas de adesão) <i>Sistêmica:</i> febre, anormalidades metabólicas, hipotensão (choque)
Quimiocinas	granulócitos, macrófagos ativados	Quimiotaxia, ativação de leucócitos
Derivados de proteínas plasmáticas		
Complemento	Plasma (produzido no fígado)	Ativação e quimiotaxia de leucócito, opsonização, vasodilatação (estimulação de mastócito)
Cininas	Plasma (produzido no fígado)	Aumento da permeabilidade vascular, contração do músculo liso, vasodilatação, dor
Proteases ativadas durante a coagulação	Plasma (produzido no fígado)	Ativação endotelial, recrutamento de leucócitos

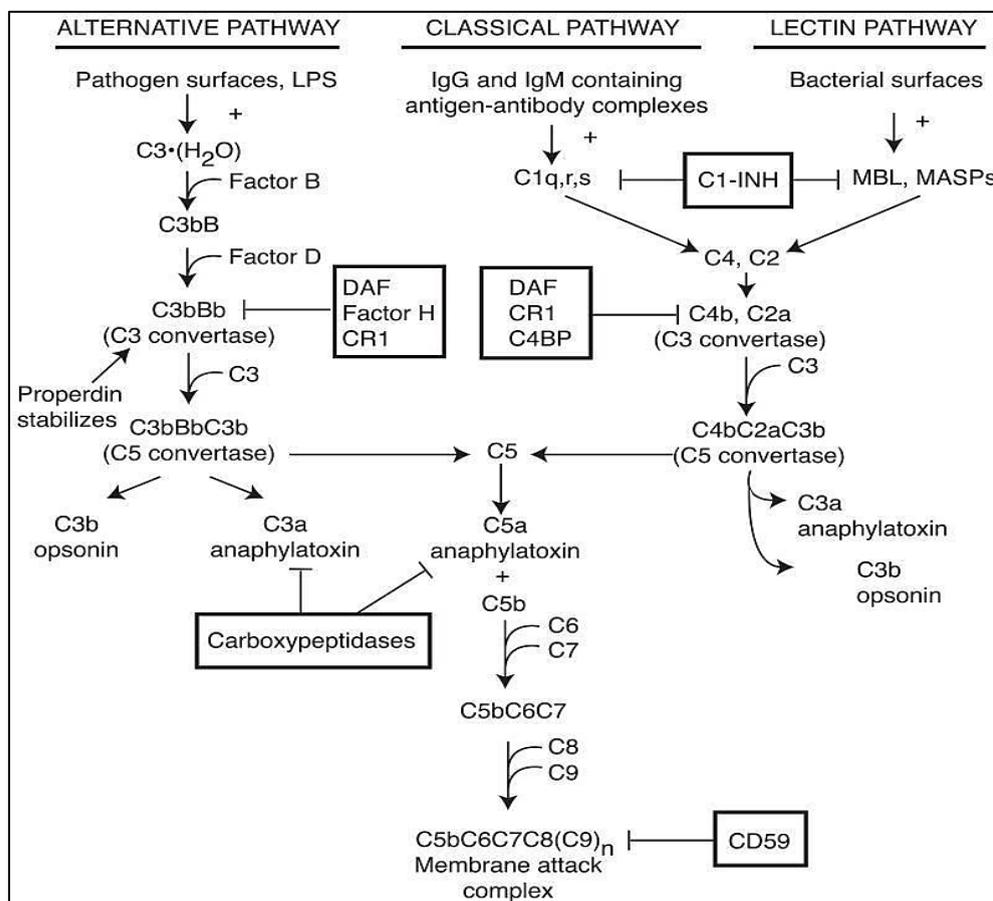
Fonte: KUMAR et al.,2010.

1.4 Sistema complemento

O sistema complemento é composto por cerca de mais de 40 proteínas séricas e de superfície celular que interagem umas com as outras e com outras moléculas, gerando complexos de enzimas com atividade proteolítica, as quais ativam, amplificam e regulam funções importantes na resposta imune e inflamatória (ARBORE; KEMPER; KOLEV, 2017). Sua ativação convencional pode ser iniciada por três vias (Esquema 1): (i) Via Alternativa (VA), ativada pela ligação de moléculas de C3 modificadas pela hidrólise (C3-H₂O) a diversas superfícies ativadoras, na ausência de anticorpos ligados ao antígeno; (ii) Via Clássica (VC), ativada pela ligação da proteína C1q do complexo macromolecular, C1, aos domínios CH₂ do anticorpo IgG ou a domínios CH₃ do anticorpo IgM que estão ligados ao antígeno; (iii) Via das Lectinas (VL), ativada pela ligação de polissacarídeos microbianos às proteínas

ligadoras de manose (MBL), na ausência de anticorpos ligados ao antígeno (RICKLIN et al., 2010; SARMA; WARD, 2010).

Todas as três vias resultam na formação de C3-convertase (C3bBb na VA e C4bC2a na VC e VL), clivagem do componente C3 com geração da opsonina C3b e da anafilatoxina C3a. C3b está envolvido na formação da C5-convertase (C3bBbC3b na VA e C4bC2aC3b na VC e VL), que por sua vez cliva C5 gerando C5b e a anafilatoxina C5a. Na etapa terminal, C5b interage com C6, C7, C8 e várias moléculas de C9 para formar o complexo de ataque à membrana (C5b-9n ou MAC), que gera poros hidrofílicos e induz a lise celular (SARMA; WARD, 2010; ABBAS et al., 2015).



Esquema 1: Representação das três vias de ativação do sistema complemento: Via Clássica, Alternativa e das Lectinas. Fonte: SARMA; WARD, 2010.

As funções biológicas do sistema complemento dependem da interação de suas proteínas com receptores originários em diversas linhagens celulares (Quadro 2). Suas principais atividades baseiam-se na promoção da fagocitose via opsonização, indução da quimiotaxia, inflamação e citólise (RICKLIN et al., 2010). As anafilatoxinas, C3a, C4a e C5a são fragmentos biologicamente ativos, constantemente liberados

durante a ativação do sistema complemento. Esses pequenos peptídeos (10-14 kDa) são mediadores pró-inflamatórios potentes, exercendo seus efeitos através da interação com receptores específicos em vários tipos celulares. Todos os três peptídeos são capazes de se ligar aos mastócitos e induzir desgranulação, com liberação de aminas vasoativas e leucotrienos no sítio infeccioso. A interação das anafilotoxinas aos seus respectivos receptores, C3aR, C5aR1 e C5aR2, presentes em leucócitos e células endoteliais vasculares, desencadeia eventos importantes na condução da resposta inflamatória, incluindo recrutamento de células imunológicas para o sítio de lesão, indução de explosão oxidativa e aumento da permeabilidade vascular (MONSINJON et al., 2003; MERLE et al., 2015; HAWKSWORTH et al., 2017).

Quadro 2: Principais receptores do complemento

Receptor do complemento	Ligante	Atividade	Distribuição celular
CR1 (CD35)	C3b, C4b	Acelera o declínio de convertases; cofator para FI; facilita a remoção de imunocomplexos ou partículas revestidas com C3b ou C4b; facilita a apresentação de antígenos de células B	Eritrócitos, leucócitos, células epiteliais do pigmento da retina, queratinócitos da pele e podócitos renais
CR2 (CD21)	iC3b, C3dg, C3d	Coestimulação das células B; indução e manutenção da memória imunológica; tolerância das células B	Células epiteliais, células B, FDCs
CR3 (CD11b/CD18, MAC-1)	iC3b	Aderência de leucócitos; fagocitose de partículas revestidas com iC3b; modulação da produção de IL-12 por APCs (células apresentadoras de antígeno)	Leucócitos, FDCs
CR4 (CD11c/CD18)	iC3b	Aderência de leucócitos; fagocitose de partículas revestidas com iC3b	Leucócitos, FDCs
C3aR	C3a	Migração celular; regeneração de tecidos; ativação de eosinófilos e macrófagos; regulação das respostas de neutrófilos; regulação positiva da produção de IL-10 por APCs (células apresentadoras de antígeno)	Granulócitos, monócitos, macrófagos, subpopulações de DCs pulmonares e intestinais, células T humanas ativadas
C5aR1 (CD88)	C5a, C5a desArg	Migração celular; regeneração de tecido; ativação de células imunes; modulação da produção de IL-12 por APCs; modulação de respostas PRRs	Granulócitos, monócitos, macrófagos, células NK e NKT, subconjuntos de DCs, células endoteliais, células epiteliais, células T humanas
C5aR2	C5a, C5a desArg	Evidências apontam para a regulação da ativação do C5aR1	Granulócitos, monócitos, macrófagos, subconjuntos de DCs, células T e B humanas

APCs.: células apresentadoras de antígeno, CR.: receptor do complemento, DC.: célula dendrítica, FDCs.: células dendríticas foliculares, FI.: fator I, NK.: natural killer, PRRs.: receptores de reconhecimento de padrões, TCC: complexo terminal do complemento.

Fonte: REIS et al., 2019.

Um estudo *in vitro*, realizado com amostras de venenos de 19 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, presentes no Brasil, demonstrou que todos os venenos

foram capazes de ativar a via Clássica do sistema complemento, na ausência de anticorpos sensibilizantes. Alguns destes venenos ativaram outras vias do sistema (via Alternativa, via das Lectinas). A atividade de metaloproteases e serinoproteases foi fundamental na geração de grande quantidade das anafilotoxinas C3a, C4a e C5a. Além da ativação da cascata, a clivagem direta de C3 e C4 ou inativação do regulador C1-INH, contribuíram para tal evento. Inibidores de metalo- e serinoproteases impediram a clivagem de C3 e C4 por ação dos venenos, confirmando a atuação destas enzimas sobre o sistema complemento (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010, 2013; TAMBOURGI, VAN DEN BERG, 2014).

1.5 Utilização de inibidores do complemento no tratamento de doenças

A ativação do complemento culmina na liberação de vários produtos biologicamente ativos, incluindo pequenos peptídeos e grandes complexos que agem diretamente sobre o alvo, eliminando-o ou removendo-o através da ativação de outros componentes da resposta imune. Os resultados finais da ativação do complemento são dependentes da extensão e persistência deste processo e, naturalmente, uma grande ativação pode resultar em extensos danos teciduais (WOODRUFF et al., 2011). Devido a isto, nos últimos 10-15 anos, grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas que previnam ou controlem os danos causados pela ativação do sistema complemento (WOODRUFF et al., 2011).

Entre os componentes do complemento, C3 e C5 têm sido considerados importantes alvos moleculares a serem neutralizados (Figura 5), devido à sua contribuição biológica em danos teciduais e celulares mediados pelo complemento. No presente existe uma variedade de moléculas capazes de inibir C3, C5, C5a e seus receptores (C5aR). Entre estes novos antagonistas está o Cp40, um análogo do inibidor peptídico de C3, a compstatina, que apresentou uma forte eficácia em vários modelos de doenças humanas, como sepse (GUSTAVSEN et al., 2016), choque hemorrágico (VAN GRIESVEN et al., 2019), doença periodontal (MAEKAWA et al., 2014; HAJISHENGALLIS et al., 2019), hemoglobinúria paroxística noturna (MASTELLOS et al., 2014), inflamação induzida por hemodiálise (REIS et al., 2015), Glomerulopatia C3 (C3G) (MASTELLOS et al., 2015), síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) da COVID-19 (MASTAGLIO et al., 2020), bem como no envenenamento por serpentes (SILVA DE FRANÇA et al., 2021). Além disso,

derivados de compstatina estão atualmente em desenvolvimento clínico e avaliação para o tratamento de várias doenças (VAN GRIESVEN et al, 2019).

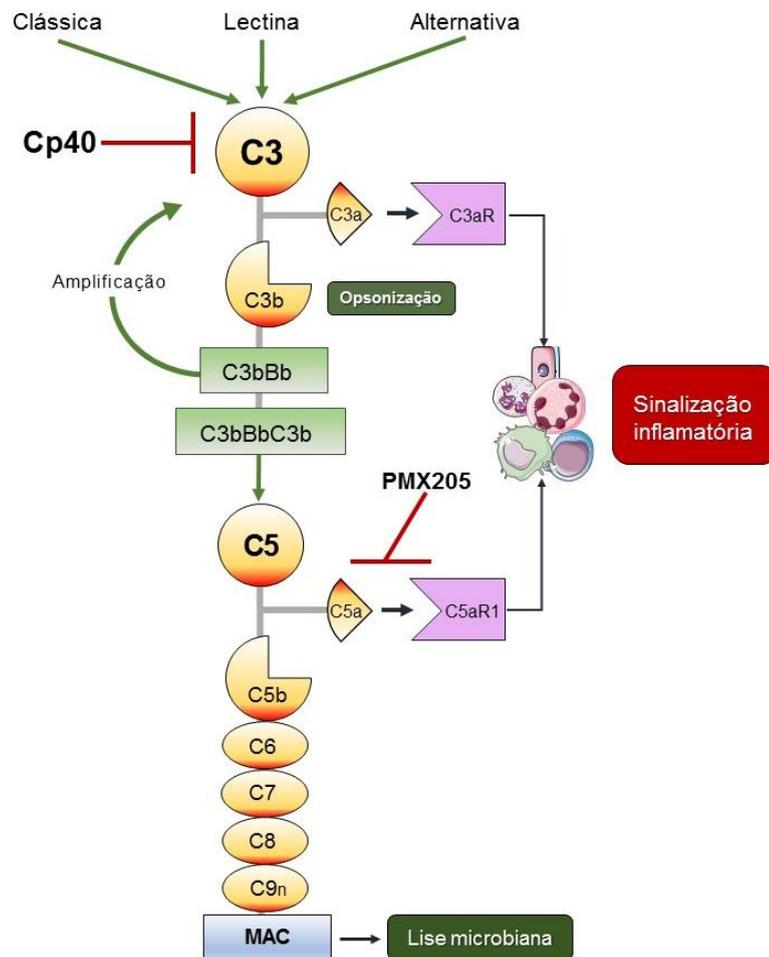


Figura 5 -Inibição do complemento: as vias Clássica (VC), Lectina (VL) e Alternativa (VA) convergem para ativar o C3, levando à geração de fragmentos biologicamente ativos. Estes incluem as anafilatoxinas C3a e C5a, que ativam respectivamente C3aR e C5aR1. O fragmento C3b promove a opsonização de microrganismos. A clivagem de C5 por suas convertases (C4b2a3b; C3bBb3b) também gera C5b que na via terminal inicia a montagem do complexo de ataque à membrana SC5b-9 (MAC), que induz a lise microbiana. Na via alternativa a C3 convertase, C3bBb, também está envolvida em uma alça de amplificação para todas as vias do complemento. A compstatina e drogas derivadas, como Cp40, bloqueiam a ativação de C3, inibindo assim todas as atividades subsequentes de C3. O peptídeo antagonista do C5aR1, PMX205, inibe a interação C5a-C5aR1, bloqueando a sinalização inflamatória. Fonte: Adaptado de HAJISHENGALLIS et al., 2016.

O PMX53, um hexapeptídeo cíclico, ativo oralmente e metabolicamente estável, tem demonstrado eficácia no tratamento de várias doenças inflamatórias, incluindo artrite, injúrias de isquemia e reperfusão, sepse, doença intestinal inflamatória e doenças do sistema nervoso central, entre outras (WOODRUFF et al.,

2002; WOODRUFF et al., 2004; HUBER-LANG et al., 2002; WOODRUFF et al., 2003; WOODRUFF et al., 2010). Estudos sobre modificações do resíduo de fenilalanina de PMX53 resultaram na descoberta de um novo antagonista, o PMX205 (hydrocinnamate-[OpdChaWR]), que aumentou a lipofilicidade, a estabilidade metabólica do composto, e sua potência em modelo de doença inflamatória intestinal (WOODRUFF et al., 2005). Além disto, o PMX205 apresentou maior capacidade de entrada no cérebro do que PMX53, o que tem possibilitado o seu uso em vários modelos de doenças neurodegenerativas (WOODRUFF et al., 2006; BECK et al., 2010; FONSECA et al., 2009). Atualmente, estes antagonistas peptídicos têm sido os inibidores mais utilizados para o estudo do C5aR1/CD88 (HAWKSWORTH et al., 2017; KUMAR et al., 2020).

1.6. Modelo *Ex vivo* de Sangue Total Humano

Experimentalmente, o modelo de sangue total humano vem sendo empregado na avaliação da interação entre os receptores do tipo Toll (TLRs) e o sistema complemento (MOLLNES et al., 2002; BREKKE et al., 2007, 2008).

Estabelecido *in vitro*, este modelo elaborado por Mollnes e colaboradores (2002) utilizou *Escherichia coli* (*E. coli*) para induzir ativação do sistema complemento e receptores do tipo Toll (TLRs). Em seguida, analisou a resposta inflamatória através da quantificação de citocinas, fatores de crescimento e populações celulares presentes no sangue. Foram também analisados a expressão de moléculas relacionadas aos receptores TLR2 e TLR4, como o CD14, e complemento, como os receptores de anafilatoxinas, C3aR e C5aR, e o CD11b, todos presentes em monócitos e granulócitos.

Contudo, é importante a manutenção de condições experimentais que permitam as interações mútuas entre os componentes. Desta maneira, a escolha do anticoagulante em estudos de envolvimento do complemento em processos inflamatórios é altamente importante, pois vários anticoagulantes (tanto agentes de ligação ao cálcio quanto heparina) interferem na ativação do complemento e, portanto, são inadequados para esse fim (MOLLNES et al., 2002).

A hirudina, um inibidor de trombina altamente específico, derivado da sanguessuga *Hirudo medicinalis*, tem sido utilizada na pesquisa de sangue *in vitro*

durante a última década. Disponível na forma recombinante, sob o nome de lepirudina (Refludan), esse inibidor se liga à trombina e a inativa irreversivelmente. O fato de se ligar exclusivamente à trombina e não afetar o restante da cascata de coagulação, a cascata do complemento, ou as células sanguíneas, torna a lepirudina ideal para o trabalho em estudos sobre o sistema complemento (MOLLNES et al., 2002, BEXBORN et al., 2009).

Com base na importância que esse modelo apresenta para a compreensão do processo inflamatório sistêmico, nosso grupo desenvolveu então um estudo sobre a ação do veneno da aranha *Loxosceles* e de seu principal componente, as esfingomielinases D, no intuito de elucidar o papel do sistema complemento, bem como dos receptores de superfície celular na resposta imune inata neste envenenamento (MANZONI DE ALMEIDA et al, 2018). Contudo, quando se tentou aplicar esse mesmo modelo para avaliar a ação do veneno da *B. jararaca*, utilizando lepirudina como anticoagulante, não houve êxito na inibição da cascata da coagulação. Este fenômeno pode ser explicado pela forte presença de serinoproteases com atividade similar à trombina, denominadas Trombina-like, que provocam a clivagem das cadeias α ou β do fibrinogênio, o que leva a uma rápida coagulação (SERRANO; MAROUN, 2005; MACKESSY, 2010), e não permitindo o uso deste modelo para estudo do veneno da *B. jararaca*.

Em 2018 foi estabelecido, por Johnson e colaboradores, um novo modelo de sangue total que utiliza como anticoagulante o peptídeo GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro), um inibidor dos primeiros passos da polimerização da fibrina (FURLAN et al., 1983; PRATT et al., 1997). Tal inibidor se mostrou adequado para uso em tal modelo, uma vez que assim como a lepirudina, não afetou a atividade do complemento (JOHNSON et al, 2018). Experimentos preliminares do nosso grupo mostraram que tal peptídeo permitiria a análise do veneno *B. jararaca* no modelo de sangue total.

2 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo analisar a ação do veneno da serpente *B. jararaca* sobre o sistema complemento e receptores de superfície celular envolvidos na imunidade inata, utilizando o modelo *ex vivo* de sangue total humano, proposto por Mollnes e colaboradores (2002) e, recentemente, adaptado por Johnson e colaboradores (2018), e que usa como anticoagulante o peptídeo GPRP. Para tanto, foram avaliadas (i) a ativação do sistema complemento: através da geração de anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC; SC5b-9); (ii) produção de citocinas e quimiocinas; (iii) expressão de alguns receptores de leucócitos, como TLRs 2 e 4; CD14; CD11b; C3aR e C5aR; (iv) modulação destes parâmetros pelo uso de inibidores específicos do sistema complemento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Veneno

O veneno da serpente *B. jararaca* foi fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, na forma liofilizada, e mantido a -20 °C. Os teores de endotoxinas e proteínas foram determinados usando o kit de ensaio PYROGENTTM Plus Gel Clot LAL Assay (Lonza, EUA) e kit de ensaio de proteína por BCA (Pierce), respectivamente, de acordo com as recomendações dos fabricantes. A endotoxina estava presente no veneno em um nível abaixo da sensibilidade do ensaio ($< 0,125$ EU/mL). A concentração proteica das amostras de veneno foi ajustada para 5 mg/mL, com solução salina estéril, sendo as alíquotas estocadas a -80 °C, até o momento do uso.

3.2 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* foi avaliada utilizando-se substratos peptídicos de fluorescência apagada (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer), que permitem uma análise rápida e sensível, empregando pouco volume de veneno e substrato. Para isso, o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp foi dissolvido em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, diluído em água Milli-Q, de modo a permitir a utilização de volumes sem que a concentração do solvente orgânico ultrapassasse 5% do volume final de incubação (100 μ L). Para o ensaio, amostras do veneno (0,5 μ g) foram incubadas com amostras do peptídeo (5,0 μ M) em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), utilizando placas de 96 poços. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento termo-estabilizado, sob agitação (ARAÚJO et al., 2000). A reação foi medida por fluorescência ($\lambda_{em} = 420$ nm and $\lambda_{ex} = 320$ nm) em espectrofluorímetro (FLUOstar OPTIMA Multi-Mode Microplate Reader – BMG LABTECH, Offenburg, Alemanha). O aumento da fluorescência foi monitorado, continuamente, por 25 minutos e a atividade proteolítica específica das amostras expressa pela média de unidades de fluorescência por minuto (UF/min).

3.3 Modelo *Ex vivo* de sangue total humano

Os ensaios utilizando o modelo de sangue total humano foram desenvolvidos segundo os protocolos estabelecidos por Mollnes e colaboradores (2002) e Brekke e colaboradores (2007, 2008) e, recentemente, adaptados por Johnson e colaboradores (2018). Com o parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (nº 3.813.859). O sangue foi coletado de voluntários saudáveis, em tubos de polipropileno contendo o peptídeo GPRP (GenOne Biotechnologies, Brasil; 8 mg por mL de sangue). Para o ensaio, foi utilizado o volume total de 1 mL, sendo 720 µL de sangue, 140 µL de solução salina estéril e 140 µL de solução salina estéril contendo concentrações crescentes do veneno de *B. jararaca*. As amostras foram incubadas a 37 °C, por 30, 60 ou 120 minutos, sob agitação. Após a incubação, foram coletadas alíquotas de 500 µL para análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo. O material restante foi centrifugado a 405x g e a 4°C, por 10 minutos, para obtenção do plasma. Após essa etapa, para inibir a atividade de proteases, foi adicionado ao plasma EDTA (concentração final 10 mM), e este foi alíquotado, sendo as amostras armazenadas a -80 °C.

3.3.1 Inibição do sistema complemento com Cp40

O Cp40 ((H-DTyr-Ile- [Cys-Val-Trp (Me) -Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys] -mlle-NH₂) é um peptídeo cíclico não imunogênico de 14 aminoácidos, que se liga ao C3 e bloqueia sua ligação e clivagem pela C3 convertase, inibindo a geração de moléculas biologicamente ativas (PRIMIKYRI et al., 2017). O Cp40 foi gentilmente cedido pelo Professor John Lambris (Universidade da Pensilvânia, EUA).

Amostras de sangue total humano (72% do volume total, v/v), dispostas em tubos tipo falcon de 15 mL (Corning Inc.- NY, EUA) contendo GPRP (GenOne Biotechnologies, Brasil; 8 mg por mL de sangue) foram pré-incubadas com o inibidor Cp40 (20 µM) e solução salina estéril durante 5 minutos à temperatura ambiente (14% do volume total, v/v). Na sequência as amostras foram tratadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 µg/mL) ou solução salina estéril (controle negativo) (14% do volume total, v/v), durante 60 minutos a 37 °C. Após incubação, o material foi centrifugado a 405x g e a 4 °C, por 10 minutos, para obtenção do plasma. Após essa etapa, foi adicionado ao plasma EDTA (concentração final 10 mM), e este foi alíquotado, sendo as amostras armazenadas a -80 °C.

3.3.2 Inibição do receptor 1 de C5a (C5aR1) pelo PMX205

PMX205 é um hexapeptídeo cíclico (c[Arg-Trp-D-Cha-Pro-Orn] -Hca) antagonista do receptor 1 de C5a (C5aR1) que foi gentilmente cedido pelo Dr. Trent Woodruff da Escola de Ciências Biomédicas, Universidade de Queensland, Austrália.

Amostras de sangue total humano (72% do volume total, v/v), dispostas em tubos tipo falcon de 15 mL (Corning Inc.- NY, EUA) contendo GPRP (GenOne Biotechnologies, Brasil; 8 mg por mL de sangue) foram pré-incubadas com solução salina estéril, PMX205 (10 μ M) ou veículo de diluição do PMX205 (Glicose 5% - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 5 minutos à temperatura ambiente (14% do volume total, v/v). Na sequência as amostras foram tratadas com veneno de *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril (controle negativo) (14% do volume total, v/v), durante 60 minutos a 37 °C. Após a incubação, o material foi centrifugado a 405x *g* e a 4 °C, por 10 minutos, para obtenção do plasma. Após essa etapa, foi adicionado ao plasma EDTA (concentração final 10 mM), e este foi aliquoteado, sendo as amostras armazenadas a -80 °C.

3.4 Dosagem de anafilatoxinas e sTCC

A presença de C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg e C5a/C5a-desArg nas amostras de plasmas coletadas, como acima descrito, foi avaliada utilizando o *BD CBA Human Anaphylatoxin Kit*, seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, Califórnia, EUA). A presença do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) foi avaliada, por ELISA, nas amostras de plasma dos ensaios de sangue total humano, utilizando o *MicroVue SC5b-9 Plus EIA kit*, seguindo as instruções do fabricante (Quidel Corporation, Califórnia, EUA).

3.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas

A presença das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF- α no plasma foi determinada com o kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines* seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, Califórnia, EUA). A presença das quimiocinas IL-8/CXCL8, IP-10, MCP-1, MIG, RANTES no plasma humano foi determinada com o kit *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokines*, seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, Califórnia, EUA).

3.6 Análise da expressão de marcadores de superfície em leucócitos

As amostras, submetidas aos tratamentos acima descritos, foram analisadas quanto a expressão dos marcadores CD11b, CD14, C5aR1, C3aR, TLR2 e TLR4 na superfície dos leucócitos, marcados com anticorpos específicos para as populações de monócitos (CD33) e granulócitos (CD66b). Para tanto, após tratamento do sangue, as hemácias foram lisadas com tampão de lise BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Na sequência, as células foram centrifugadas a 405 g a 4 °C, por 10 minutos, ressuspendidas e marcadas com anticorpos monoclonais da BD Biosciences (Califórnia, EUA) ou eBioscience (Califórnia, EUA), diluídos na proporção 1:5: anti-CD11b PE (clone VIM12), anti-CD14 FITC (clones 61D3 e Tük4) e anti-CD33 APC; 1:10: anti-C5aR FITC (clone 8D6), anti-C3aR PE (clone 17), anti-TLR2 PE (clone TL2.1) e anti-TLR4 PE (clone HTA125); e 1:20: CD3 APC-Cy7, CD19 PE-Cy7 e CD66b Alexa647. Foram utilizados também, como controle isotópico, anticorpos monoclonais *mouse* IgG1k PE, *mouse* IgG2ak FITC (BD Biosciences, Califórnia, EUA). Após 30 minutos de incubação, no escuro e a temperatura ambiente, foram adicionados 275 µL de tampão de FACS, em seguida, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, Califórnia, EUA), utilizando o software BD FACSDiVa, versão 4.1 (BD Bioscience, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como mediana de intensidade de fluorescência (MFI), determinada a partir da aquisição de 20 mil eventos.

3.7 Análise estatística

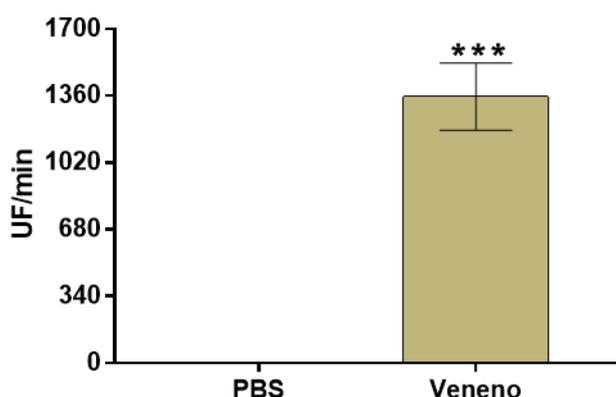
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism, versão 9.3.1 (La Jolla, Califórnia, EUA). Comparações entre grupos foram realizadas com o teste *t* *student* ou One-way ANOVA, complementada com o teste de Tukey de comparações múltiplas. Nos testes realizados, foram consideradas como diferenças estatisticamente significativas, valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da atividade proteolítica do veneno da *B. jararaca*

A atividade proteolítica do veneno da *B. jararaca* foi avaliada utilizando-se substratos peptídicos de fluorescência apagada (FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), que permitem uma análise rápida e sensível, empregando pouco volume de veneno e substrato. Como observado na Figura 6, o veneno de *B. jararaca* em contato com substrato testado (Abz-FRSSRQ-EDDnp), apresentou uma atividade proteolítica específica de 1.355 ± 98.55 UF/min.

Figura 6 – Atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* sobre o substrato FRET.



Atividade proteolítica do veneno da *B. jararaca* (0,5 µg) comparada com a do tampão PBS (controle negativo), sobre o substrato FRET (Abz-FRSSRQ-EDDnp – 5,0 µM). A fluorescência foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{EX}=320$ e $\lambda_{EM}=420$ nm) em intervalos de 30 segundos, por 25 minutos. UF/min= Unidades de Fluorescência por minuto. Dados expressos com média \pm SEM de triplicatas. Análise estatística realizada com o teste *t* de Student. (***) $p < 0,001$: diferença estatística em relação ao controle negativo (PBS).

4.2 Ensaio de coagulação sanguínea na presença do peptídeo GPRP

Para o ensaio de coagulação, foi utilizado um volume total de 1 mL de sangue tratado ou não, na presença de concentrações crescentes do peptídeo GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro). As amostras foram incubadas a 37 °C por 60 minutos e, na sequência,

analisadas por 4 horas quanto a presença de coágulos. Como mostrado na Quadro 3, a concentração de 8 mg/mL do peptídeo GPRP se mostrou a ideal para inibição da coagulação sanguínea.

Quadro 3 - Coagulação de amostras de sangue em diferentes concentrações do peptídeo GPRP.

Incubação	GPRP/sangue				
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	6 mg/mL	8 mg/mL
37 °C - 60 minutos	+	+	+	+	-

Presença de coágulos [+]; Ausência de coágulos [-].

4.3 Dosagem de anafilatoxinas em sangue total humano tratado com veneno da *B. jararaca*

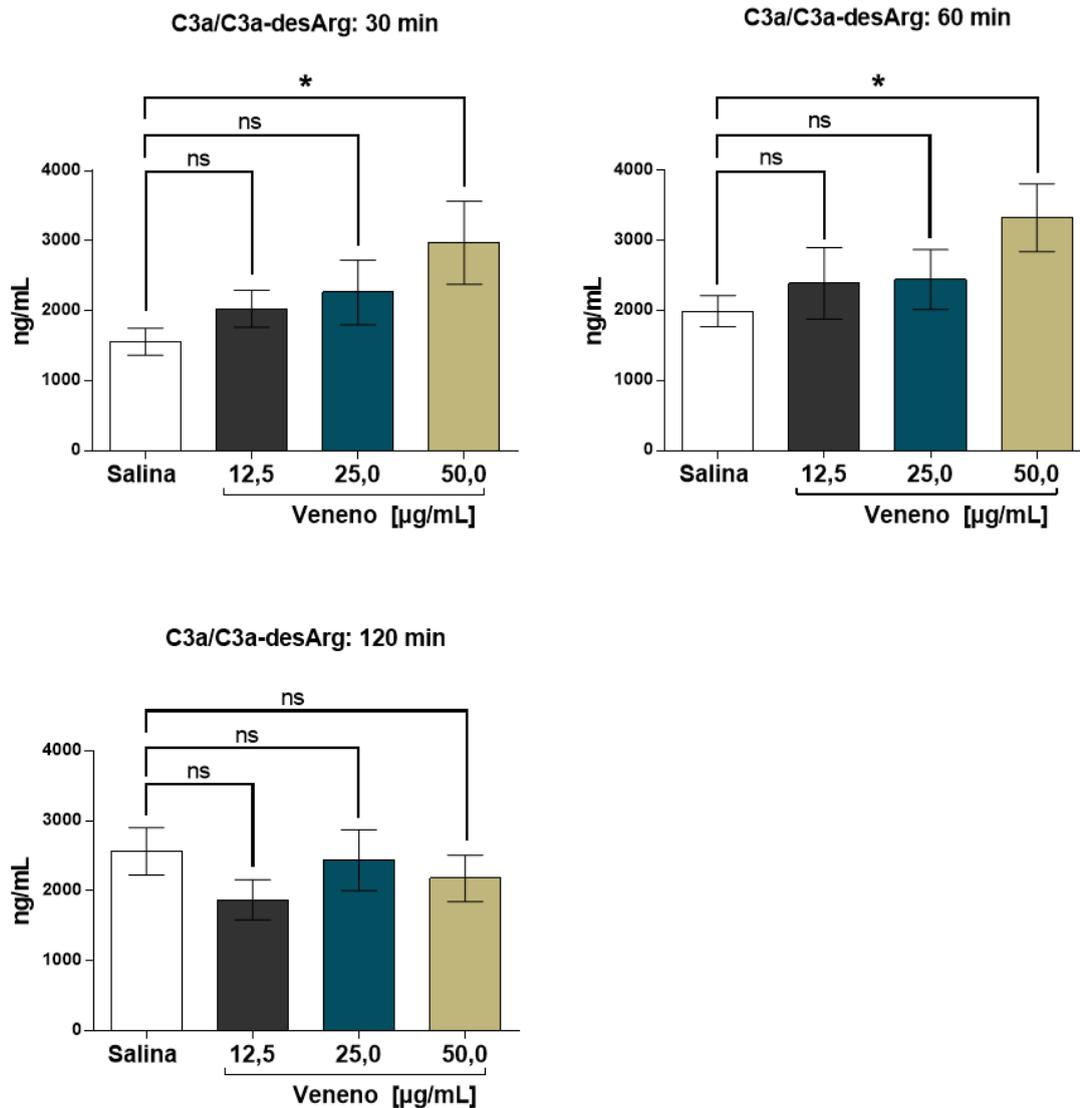
A presença das anafilatoxinas C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg e C5a/C5a-desArg foi quantificada nos plasmas obtidos das amostras de sangue total humano, tratadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* (12,5 µg/mL; 25,0 µg/mL; 50,0 µg/mL) ou com solução salina estéril (controle negativo), durante 30, 60 e 120 minutos, a 37 °C.

O veneno da *B. jararaca*, incubado por um período de 30 e 60 minutos, na concentração de 50,0 µg/mL induziu aumento significativo na produção de C3a/C3a-desArg, quando comparado com o controle negativo. No entanto, nenhum aumento significativo na produção desta anafilatoxina foi observado no período de 120 minutos. As mostras tratadas com o veneno nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25,0 µg/mL não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo em nenhum dos três períodos utilizados (Figura 7).

Em relação a C4a/C4a-desArg, amostras de sangue humano tratado como veneno da *B. jararaca*, por um período de 30 minutos, não apresentaram aumento significativo na produção desta anafilatoxina em nenhuma das concentrações utilizadas. Na concentração de 50,0 µg/mL, o veneno induziu aumento significativo na produção de C4a/C4a-desArg em 60 e 120 minutos de incubação, quando comparado ao controle negativo. Amostras tratadas com o veneno nas concentrações de 12,5 µg/mL e 25,0 µg/mL não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo nos tempos testados (Figura 8).

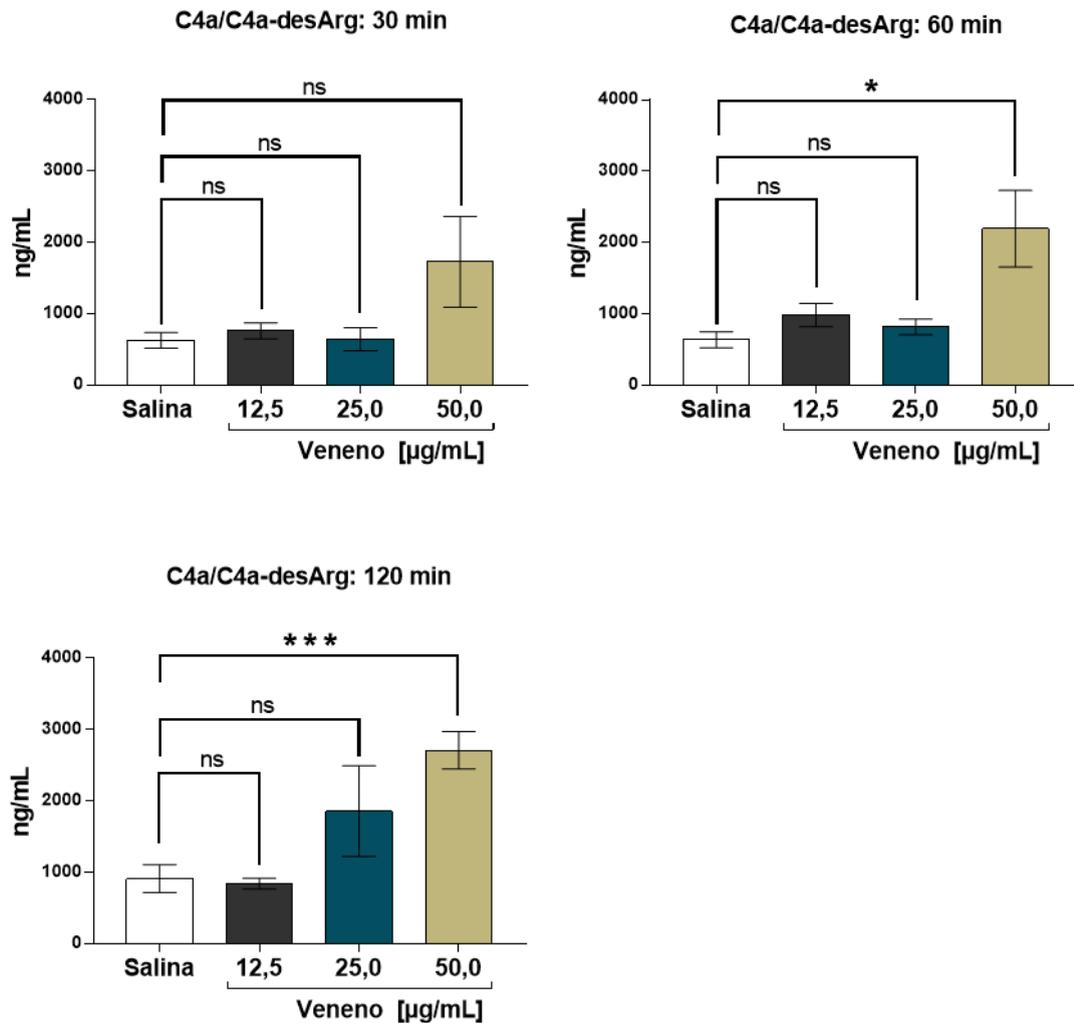
O veneno da *B. jararaca* induziu aumento significativo na produção de C5a/C5a-desArg quando incubado por um período de 30 minutos, em todas as concentrações utilizadas, quando comparados ao controle negativo. Com 60 minutos de incubação, somente o veneno na concentração de 50,0 µg/mL induziu aumento significativo na produção de C5a/C5a-desArg, quando comparado com o controle negativo. Com 120 minutos de incubação, o veneno não induziu aumento significativo na produção de C5a/C5a-desArg em nenhuma das concentrações utilizadas, quando comparado com o controle negativo (Figura 9).

Figura 7 - Níveis de C3a/C3a-desArg no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



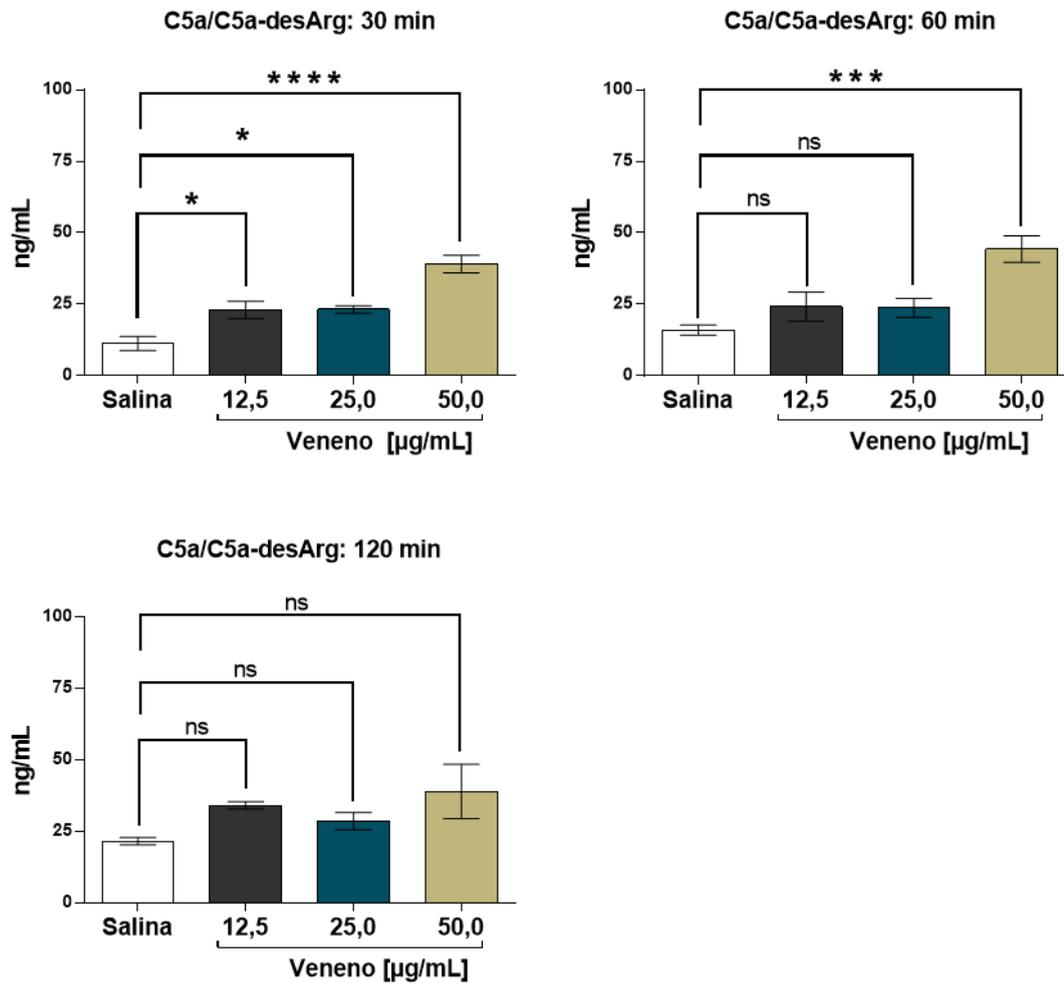
Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:5000), a produção de C3a/C3a-desArg foi avaliada *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Ensaio representativo de três experimentos independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

Figura 8 - Níveis de C4a/C4a-desArg no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:5000), a produção de C4a/C4a-desArg foi avaliada por *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,0005$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

Figura 9 - Níveis de C5a/C5a-desArg no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



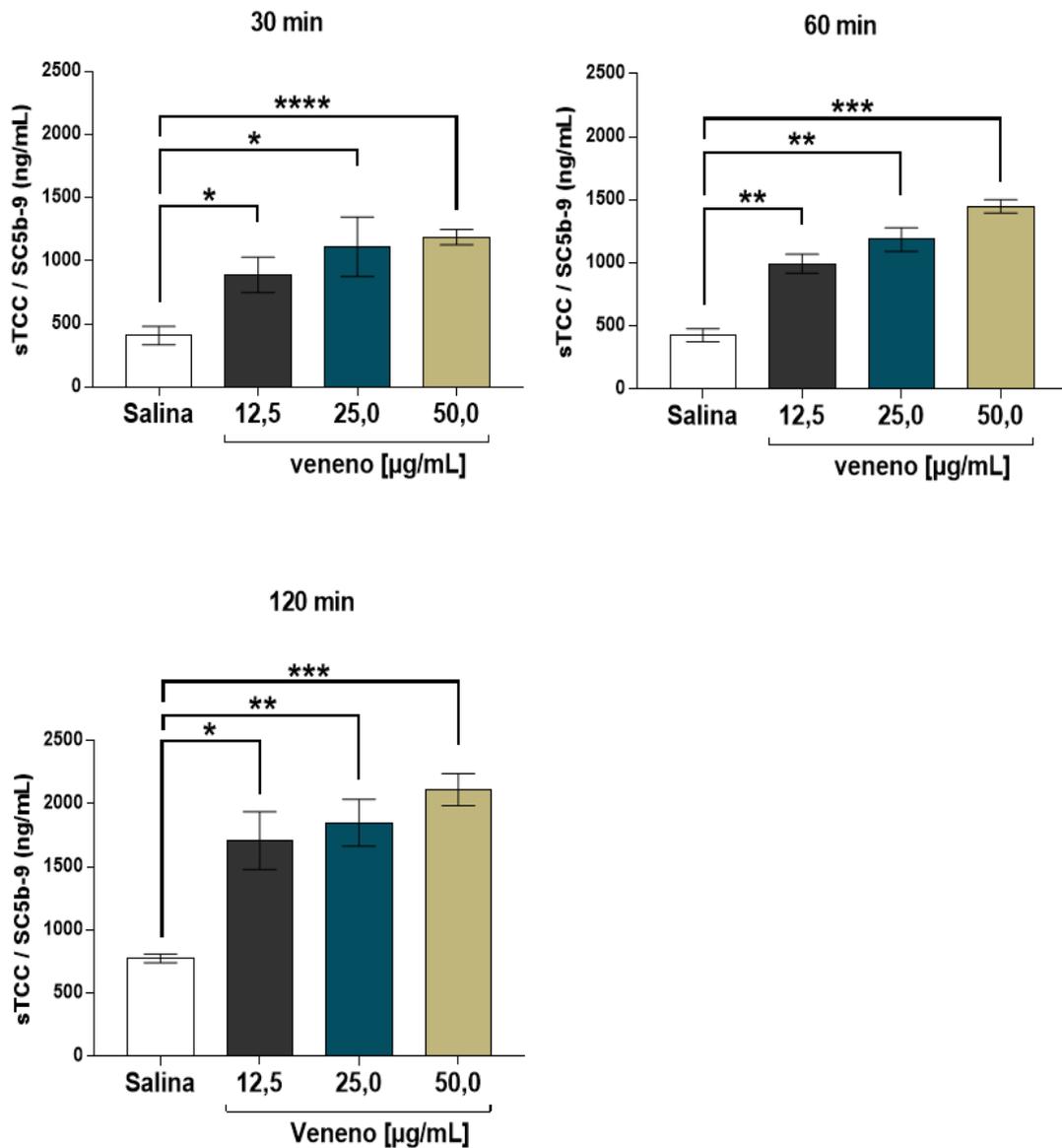
Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:1000), a produção de C5a/C5a-desArg foi avaliada por *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,0005$; (****) $p < 0,0001$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

4.4 Dosagem do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) em sangue total humano tratado com veneno da *B. jararaca*

A presença do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) foi quantificada em amostras de plasma, obtidas nos ensaios de sangue humano total, tratadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* (12,5 µg/mL; 25,0 µg/mL; 50,0 µg/mL) ou em solução salina estéril (controle negativo), durante 30, 60 e 120 minutos, a 37 °C.

Com 30, 60 e 120 minutos de incubação, o veneno foi capaz de induzir aumento significativo na produção de sTCC, nas três concentrações utilizadas (12,5 µg/mL; 25,0 µg/mL; 50,0 µg/mL), quando comparado ao controle negativo (Figura 10).

Figura 10 - Níveis de sTCC no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B.jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:40), a presença do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) foi analisada por ELISA. Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$; (***) $p < 0,0005$; (****) $p < 0,0001$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

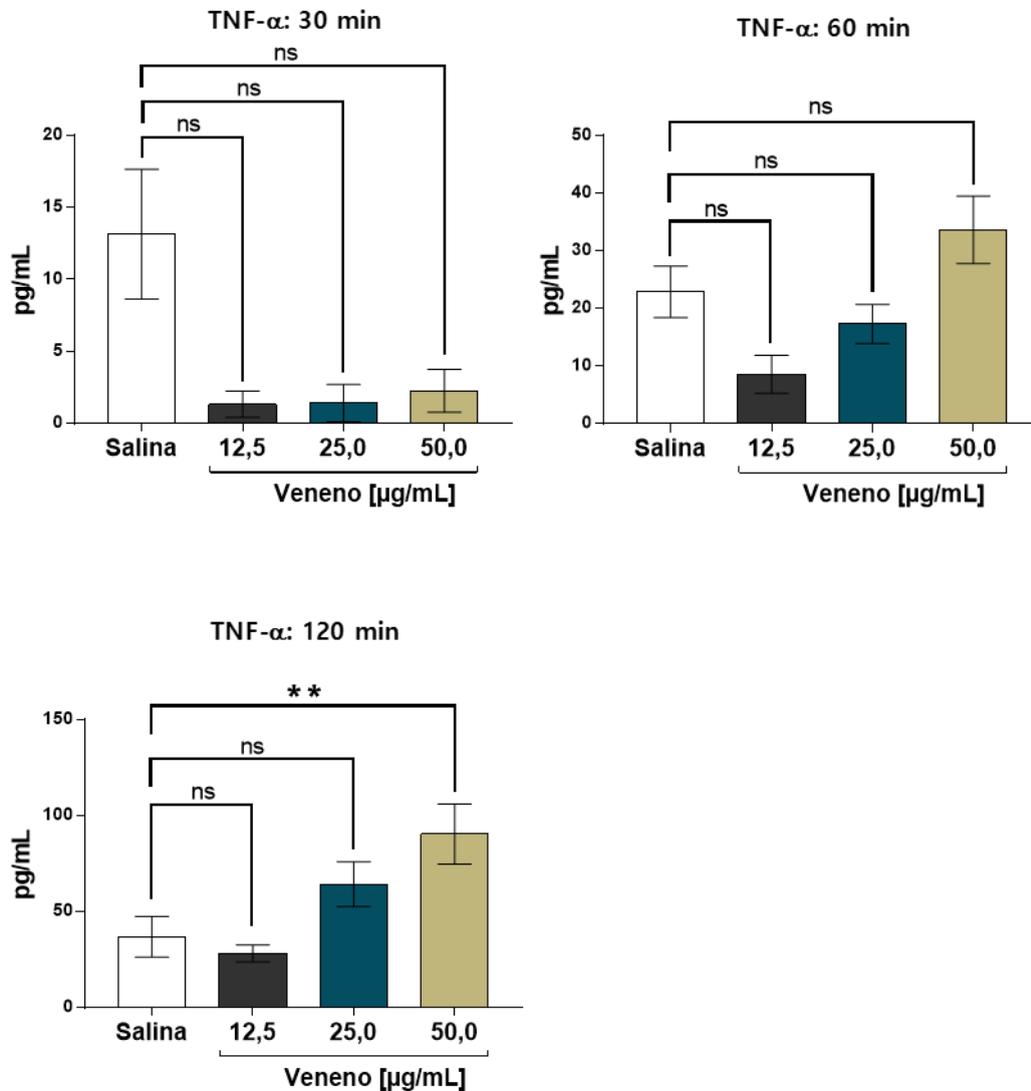
4.5 Quantificação de citocinas em sangue total humano tratado com veneno da *B. jararaca*

A presença das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 e TNF- α foi avaliada em amostras de plasma, obtidas dos ensaios de sangue total humano, tratadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* (12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25,0 $\mu\text{g/mL}$; 50,0 $\mu\text{g/mL}$) ou em solução salina estéril (controle negativo), durante 30, 60 e 120 minutos, a 37 °C.

O veneno de *B. jararaca*, incubado por um período de 30 e 60 minutos, nas concentrações de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 25,0 $\mu\text{g/mL}$ e 50,0 $\mu\text{g/mL}$, não induziu aumento significativo na produção de TNF- α , quando comparado ao controle negativo. Com 120 minutos de incubação, somente a concentração de 50,0 $\mu\text{g/mL}$ induziu aumento significativo na produção de TNF- α , quando comparado ao controle negativo (Figura 11).

Os níveis das outras citocinas testadas (IL-12p70, IL-10, IL-6 e IL-1 β) estavam abaixo do limite de detecção dos ensaios (dados não mostrados).

Figura 11 - Níveis de TNF- α no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno de *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de TNF- α foi avaliada por *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (**) $p < 0,005$ diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

4.6 Quantificação de quimiocinas em sangue total humano tratado com veneno da *B. jararaca*

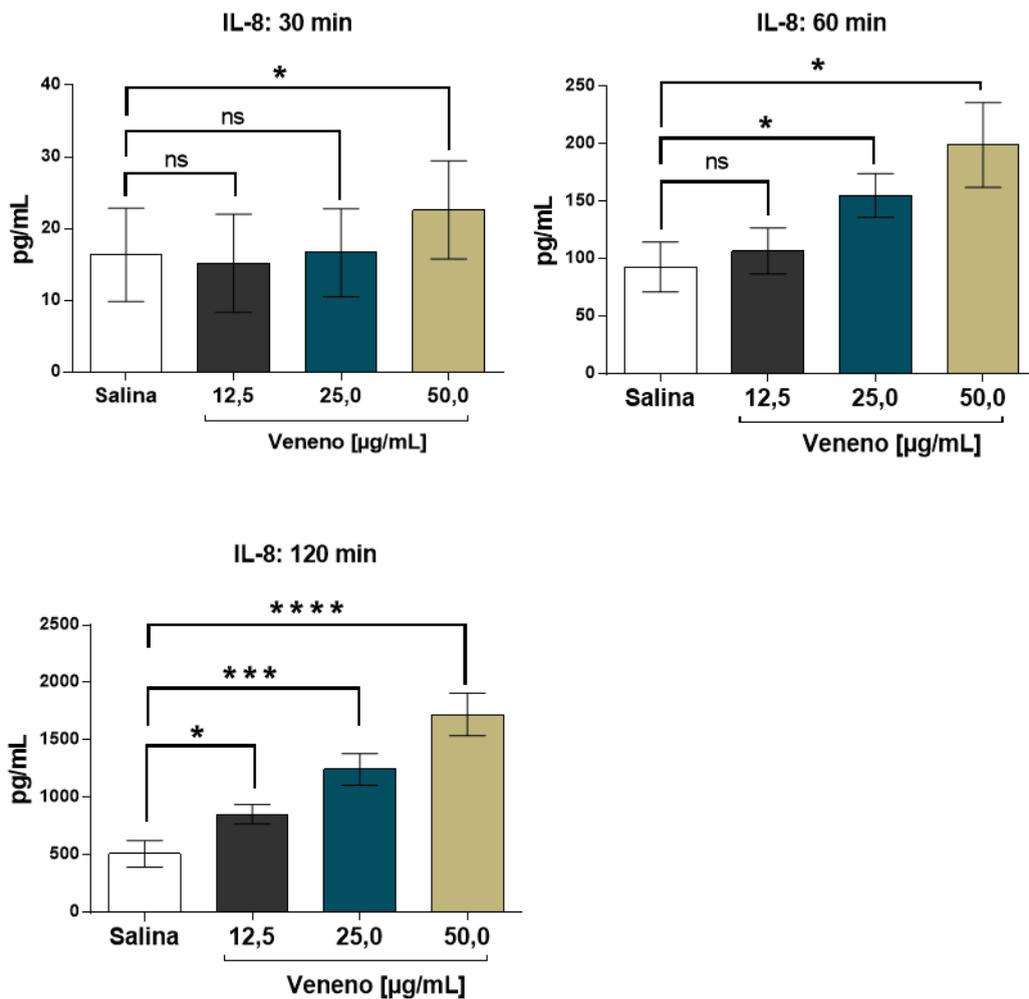
A presença das quimiocinas IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, RANTES foi avaliada em amostras de plasma, obtidas nos ensaios de sangue humanos, tratadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* (12,5 µg/mL; 25,0 µg/mL; 50,0 µg/mL) ou em solução salina estéril (controle negativo), durante 30, 60 e 120 minutos, a 37 °C.

O veneno de *B. jararaca*, quando incubado por um período de 30 minutos, induziu aumento significativo na produção de IL-8, quando comparado com o controle negativo, somente na concentração de 50,0 µg/mL. Quando incubado por 60 minutos, o veneno nas concentrações de 25,0 µg/mL e 50,0 µg/mL induziu aumento significativo na produção de IL-8, comparado ao controle negativo. Com 120 minutos de incubação, o veneno nas três concentrações utilizadas (12,5 µg/mL; 25,0 µg/mL; 50,0 µg/mL), induziu aumento significativo de IL-8, quando comparado com o controle negativo (Figura 12).

O veneno de *B. jararaca* induziu aumento significativo na produção de MCP-1 quando incubado por um período de 30, 60 e 120 min, em todas as concentrações utilizadas, quando comparadas ao controle negativo (Figura 13).

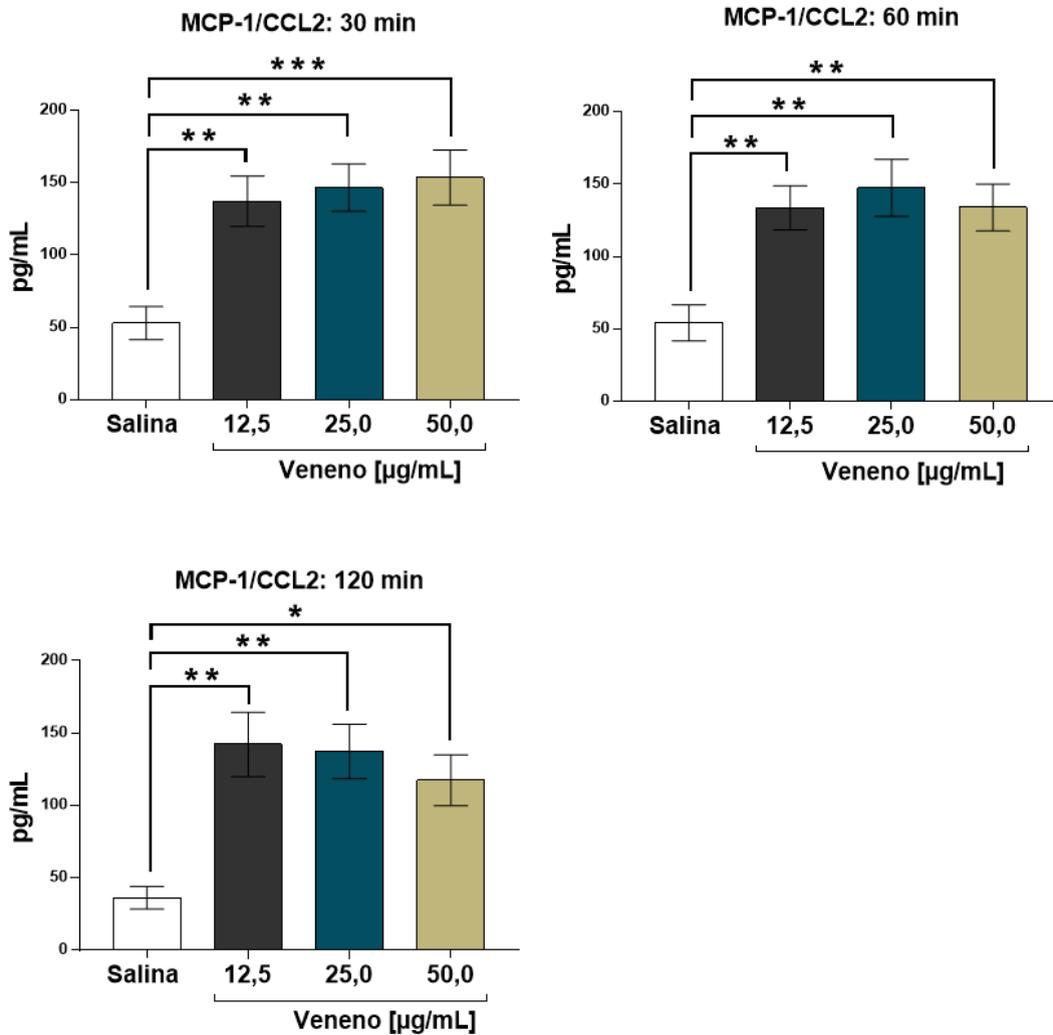
O veneno da *B. jararaca*, incubado por um período de 30 e 60 minutos, nas concentrações de 12,5 µg/mL, 25,0 µg/mL e 50,0 µg/mL induziu aumento significativo na produção de MIG, quando comparado com o controle negativo. Com 120 minutos de incubação, o veneno da *B. jararaca* não induziu aumento significativo na produção de MIG em nenhuma das concentrações utilizadas, quando comparado ao controle negativo (Figura 14).

Figura 12 - Níveis de IL-8 no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



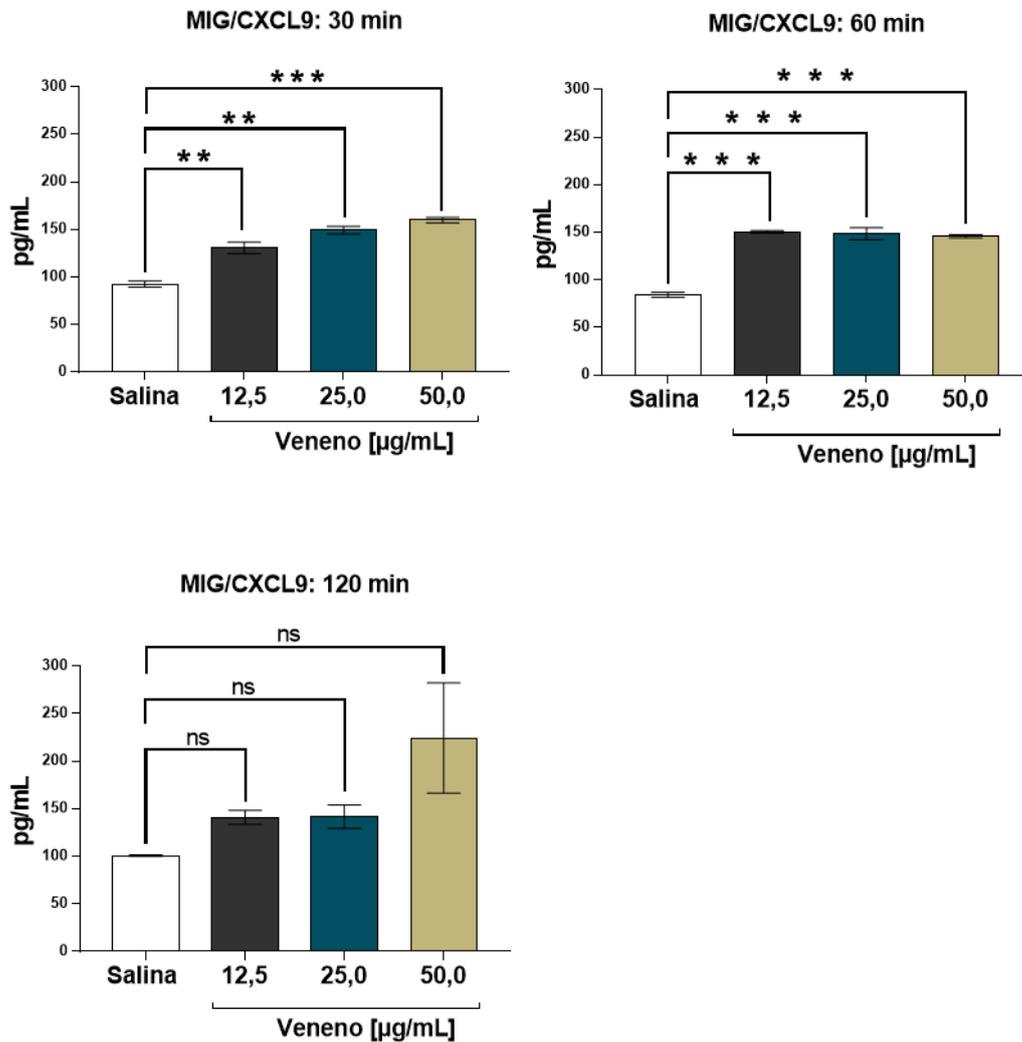
Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de IL-8 foi avaliada por *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,0005$; (***) $p < 0,0001$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

Figura 13 - Níveis de MCP-1 no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de MCP-1 foi avaliada por *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$; (***) $p < 0,0005$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

Figura 14 - Níveis de MIG no plasma humano, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* durante 30, 60 e 120 minutos.



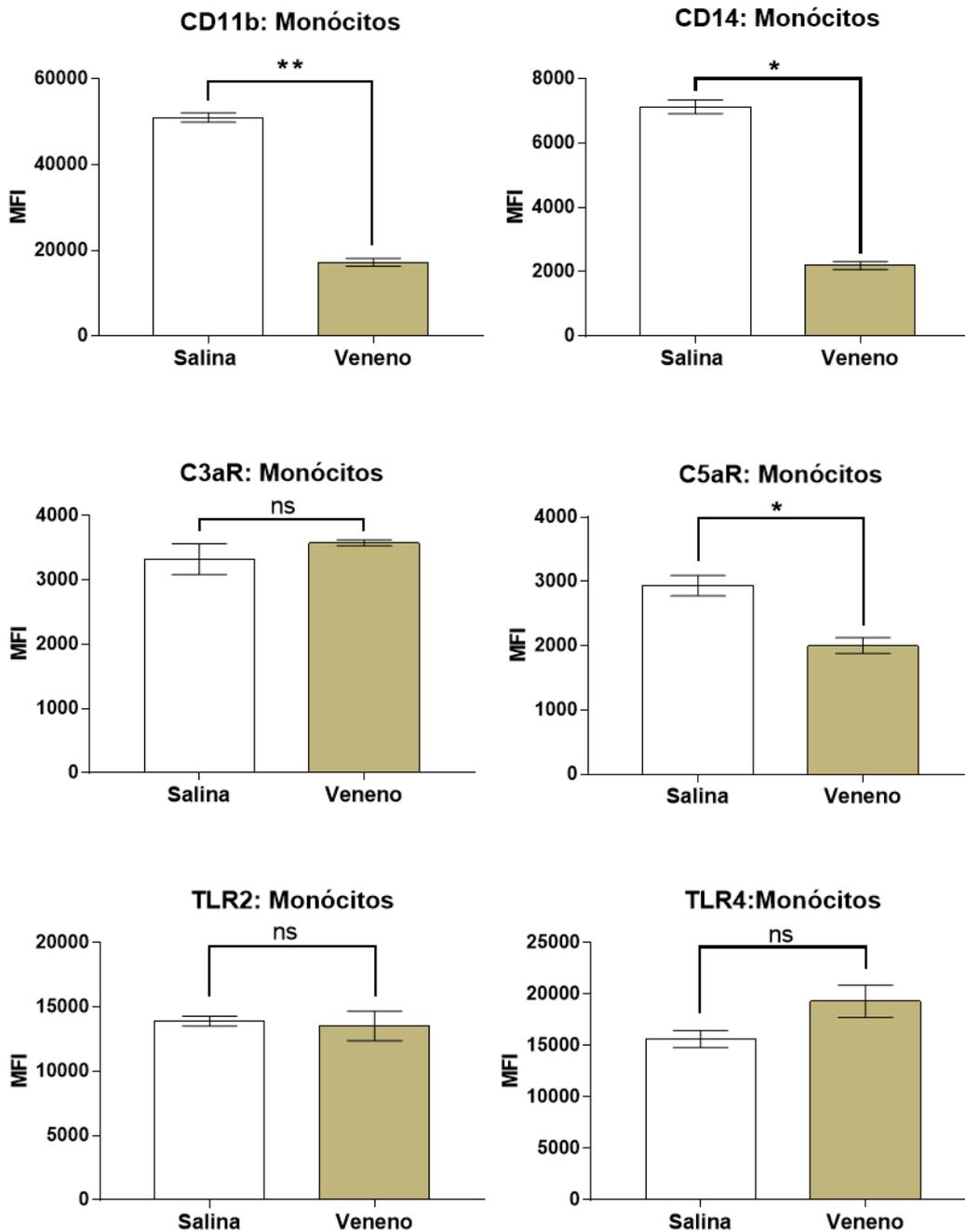
Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram incubadas com concentrações crescentes do veneno da *B. jararaca* ou solução salina estéril, durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de MIG foi avaliada por *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (**) $p < 0,005$; (***) $p < 0,0005$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

4.7 Análise da expressão de marcadores de superfície de leucócitos, após tratamento com veneno da *B. jararaca*

4.7.1 Expressão de marcadores em monócitos

A expressão dos marcadores de superfície CD11b, CD14, C5aR, C3aR, TLR2 e TLR4 foi avaliada em amostras de sangue humano tratadas com veneno da *B. jararaca* (50 µg/mL) ou solução salina estéril (controle negativo), durante 60 minutos a 37 °C. A análise da expressão dos marcadores na superfície de monócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD33) foi realizada por citometria de fluxo e os resultados expressos como mediana de intensidade de fluorescência (MFI) após aquisição de 20 mil eventos. A Figura 15 mostra que o veneno da *B. jararaca* induziu redução na expressão de CD11b, CD14 e C5aR em monócitos. C3aR, TLR2 e TLR4 não apresentaram diferença significativa na expressão quando comparados ao controle negativo (solução salina estéril).

Figura 15 – Expressão de marcadores de superfície em monócitos, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca*.

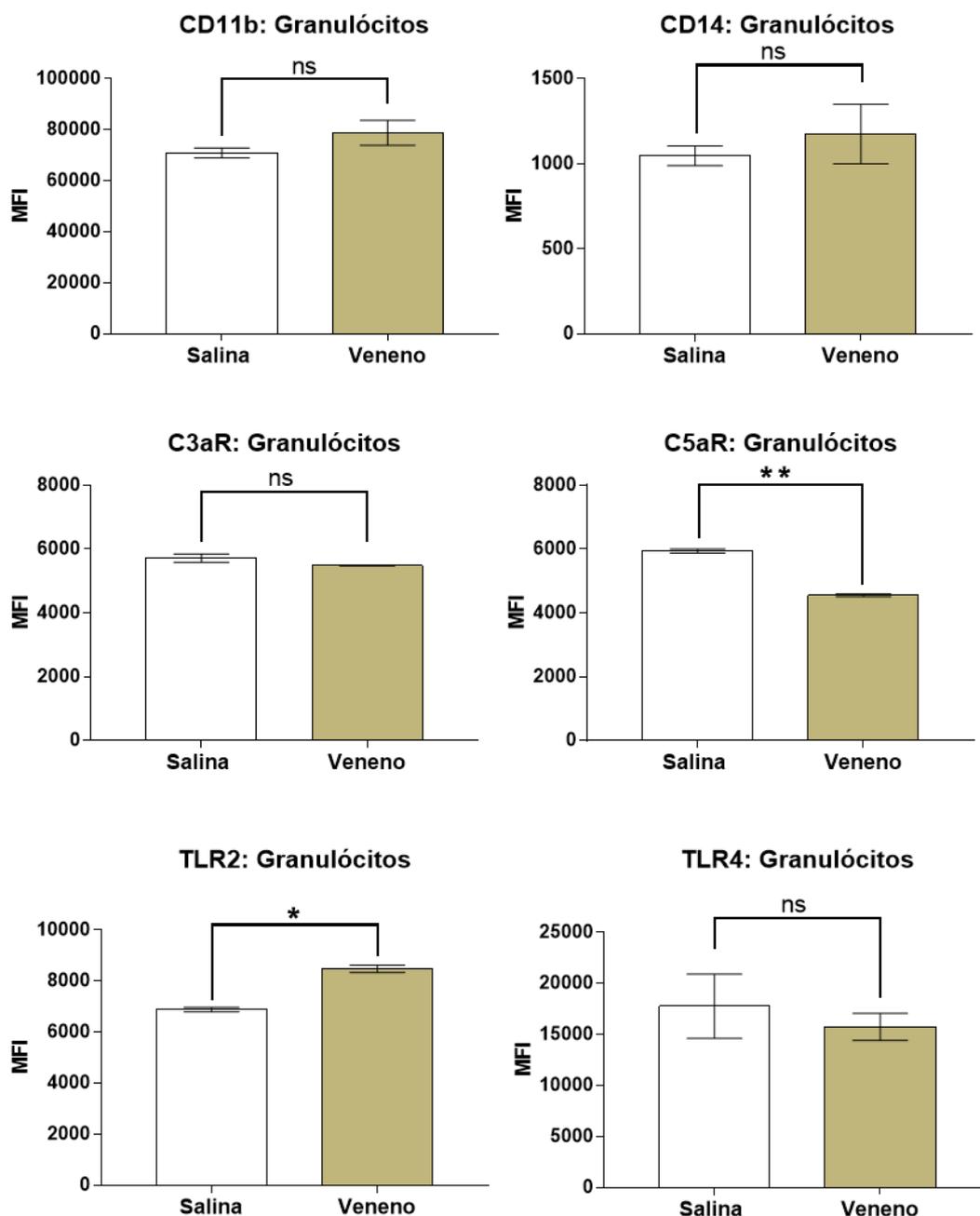


Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram tratadas com veneno de *B. jararaca* (50 µg/mL) ou solução salina estéril (controle negativo), durante 60 minutos a 37 °C. Após incubação, os monócitos foram analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4. Resultados expressos como média ± SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste *t* de Student. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

4.7.2 Expressão de marcadores em granulócitos

A expressão dos marcadores de superfície CD11b, CD14, C5aR, C3aR, TLR2 e TLR4 foi avaliada em amostras de sangue humano tratadas com veneno da *B. jararaca* (50 µg/mL) ou solução salina estéril (controle negativo), durante 60 minutos a 37 °C. A análise da expressão dos marcadores na superfície de granulócitos (marcados com anticorpos específicos anti-CD66b) foi realizada por citometria de fluxo e os resultados expressos como mediana de intensidade de fluorescência (MFI) após aquisição de 20 mil eventos. A Figura 16 mostra que o veneno da *B. jararaca* induziu aumento na expressão de TLR2, e redução na expressão de C5aR. Enquanto CD11b, CD14, C3aR e TLR4 não apresentaram diferença significativa na expressão quando comparados ao controle negativo (solução salina estéril).

Figura 16 – Expressão de marcadores de superfície em granulócitos, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca*.



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram tratadas com veneno da *B. jararaca* (50 µg/mL) ou solução salina estéril (controle negativo), durante período de 60 minutos a 37 °C. Após incubação, os granulócitos foram analisados quanto à expressão de CD11b, CD14, C3aR, C5aR, TLR2 e TLR4. Resultados expressos como média ± SEM de duplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste *t* de Student. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$: diferença estatística em relação ao controle negativo (salina).

4.8 Ação do veneno da *B. jararaca* no modelo de sangue total humano na presença do Cp40

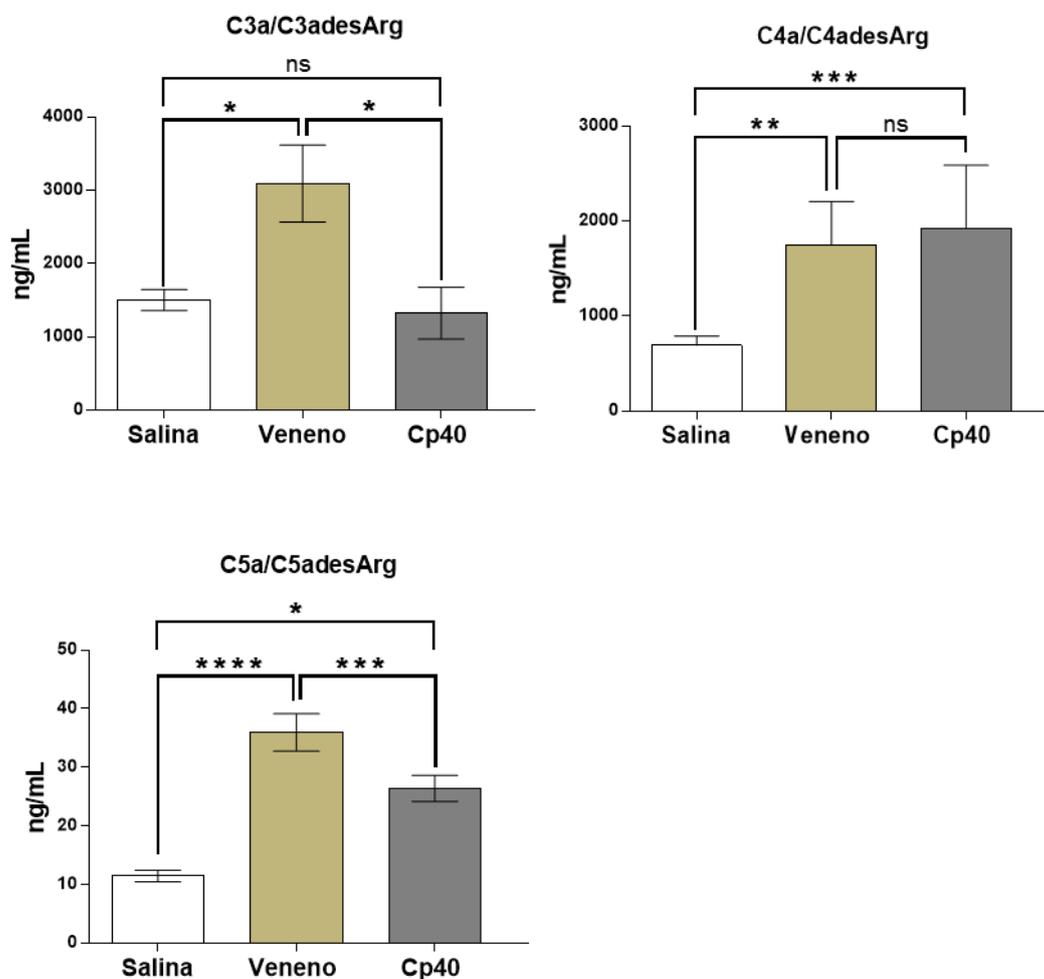
4.8.1 Inibição da ativação do sistema complemento pelo Cp40

O Cp40 é um peptídeo cíclico não imunogênico de 14 aminoácidos, que se liga ao C3 e bloqueia sua ligação e clivagem pela C3 convertase, inibindo a geração de moléculas biologicamente ativas.

Com o propósito de avaliar se o Cp40 era capaz de inibir a ativação do sistema complemento, estimulada pelo veneno da *B. jararaca* e, conseqüentemente, a geração de anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a) e do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9), amostras de sangue humano, previamente tratadas com GPRP, foram pré-incubadas com Cp40 (20 µM) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 µg/mL) ou solução salina estéril (controle negativo) durante 60 minutos a 37 °C.

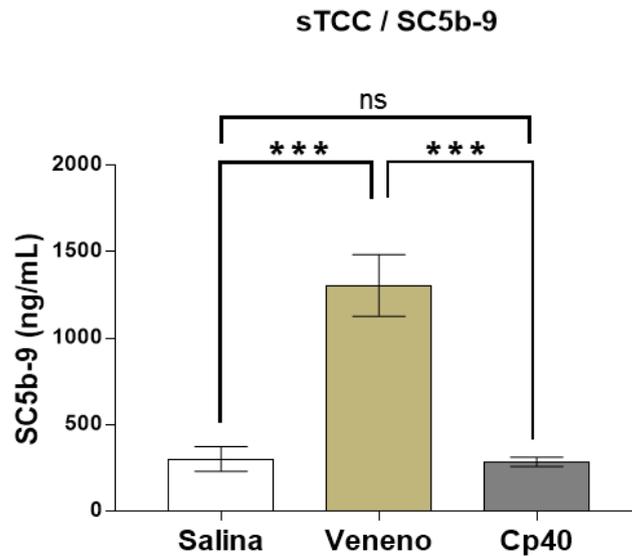
A Figura 17 mostra que o Cp40 foi capaz de inibir, significativamente, a geração das anafilatoxinas C3a/C3a-desArg e C5a/C5a-desArg, estimulada pelo veneno, quando comparado ao controle negativo. No entanto, a geração de C4a/C4a-desArg não foi reduzida, pelo contrário, houve aumento expressivo deste fragmento na presença do Cp40. A presença do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, sC5b-9) teve seus níveis reduzidos significativamente na presença do Cp40 (Figura 18).

Figura 17 – Produção de anafilatoxinas em sangue humano estimulado com veneno da serpente *B. jararaca* na presença do Cp40



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram pré-incubadas com o inibidor Cp40 (20 μ M) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril, durante 60 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma, a produção das anafilatoxinas C3a/C3a-desArg (1:5000), C4a/C4a-desArg (1:5000) e C5a/C5a-desArg (1:1000) foi avaliada por *Cytometric Bead Array* (CBA). Os resultados foram representados como média \pm SEM de triplicatas. Dados representativos de três ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) p<0,05; (**) p< 0,005; (***) p < 0,0005.

Figura 18 – Produção de sTCC (SC5b-9) em sangue humano estimulado com veneno da serpente *B. jararaca* na presença do Cp40



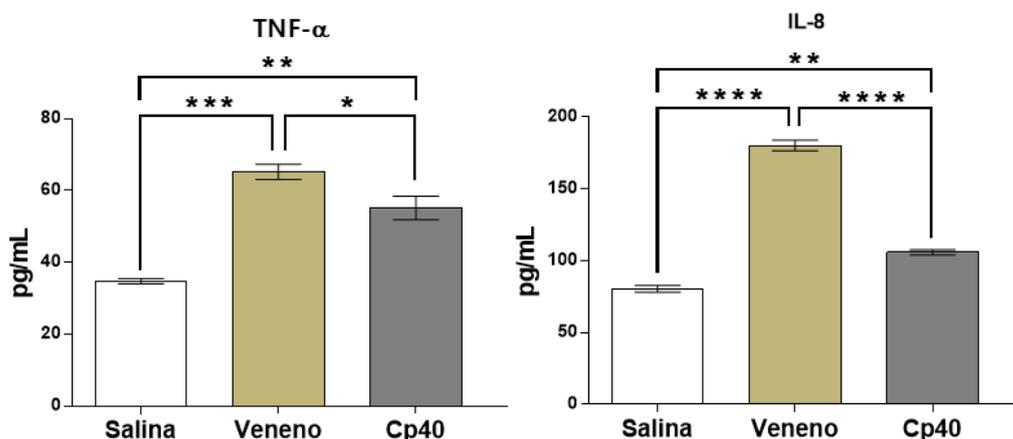
Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram pré-incubadas com o inibidor Cp40 (20 μ M) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril, durante 60 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:40), a presença do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) foi analisada por ELISA. Resultados foram representados com média \pm SEM de triplicatas. Dados representativos de dois ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (***) $p < 0,0005$.

4.8.2 *Produção de citocinas e quimiocinas em sangue total humano estimulado com veneno da B. jararaca na presença de Cp40*

De modo a avaliar se a inibição do sistema complemento, com o Cp40, poderia influenciar a produção de citocinas (TNF- α) e quimiocinas (IL-8, MCP-1 e MIG), estimuladas pelo veneno da *B. jararaca*, amostras de sangue humano, previamente tratadas com GPRP, foram pré-incubadas com Cp40 (20 μ M) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril (controle negativo) durante 60 minutos a 37 °C.

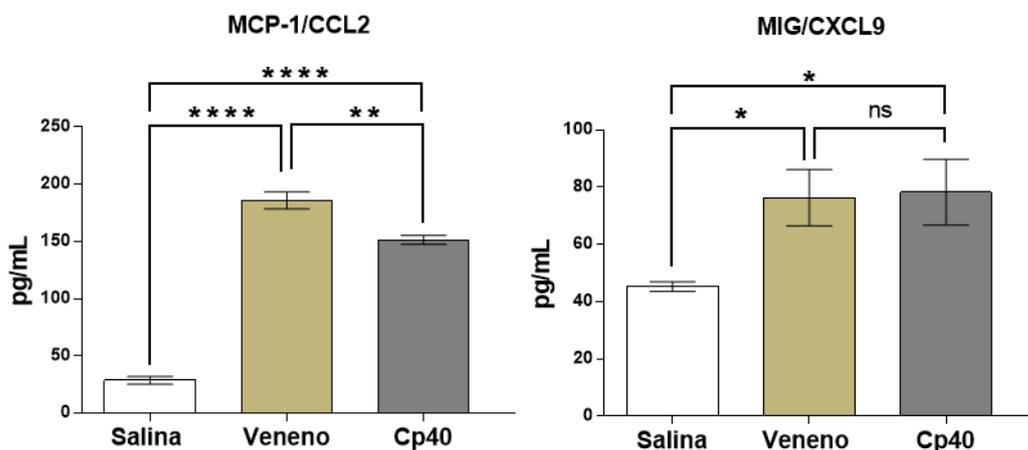
As Figuras 19 e 20 mostram que na presença do Cp40 houve uma diminuição significativa nos níveis de TNF- α , IL-8 e MCP-1 estimulados pelo veneno, quando comparados ao controle negativo. No entanto, o Cp40 não influenciou a produção da quimiocina MIG (Figura 20).

Figura 19 – Níveis de TNF- α e IL-8 em sangue humano estimulado com veneno da serpente *B. jararaca* na presença do Cp40



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram pré-incubadas com o inibidor Cp40 (20 μ M) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril, durante 60 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de TNF- α e IL-8 foi avaliada pelo *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados como média \pm SEM de triplicatas. Ensaio representativo de três experimentos independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$; (***) $p < 0,0005$; (****) $p < 0,0001$.

Figura 20 – Níveis de MCP-1 e MIG em sangue humano estimulado com veneno da serpente *B. jararaca* na presença do Cp40



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram pré-incubadas com o inibidor Cp40 (20 μ M) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril, durante 60 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de MCP-1 e MIG foi avaliada pelo *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de triplicatas. Ensaio representativo de três experimentos independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,005$; (****) $p < 0,0001$.

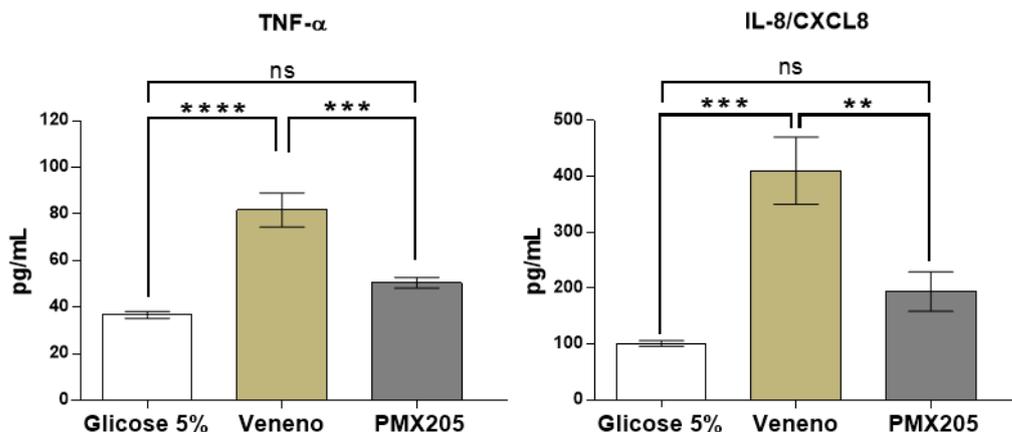
4.9 Ação do veneno da *B. jararaca* no modelo de sangue total humano na presença do PMX205

*4.9.1 Papel do C5a na produção de citocinas e quimiocinas induzidas pelo veneno da *B. jararaca**

Com o objetivo de avaliar o papel do C5a, na produção das citocinas (TNF- α) e quimiocinas (IL-8, MCP-1 e MIG), amostras de sangue humano, tratadas com GPRP, foram pré-incubadas com PMX205 (10 μ M), antagonista do C5aR1, e incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou controle negativo (solução salina estéril + glicose 5%). Para verificar se o veículo do PMX205 (solução salina estéril + glicose 5%) não era capaz de influenciar nos resultados, incluímos um grupo controle (veneno + veículo), que recebeu o estímulo do veneno na presença dos mesmos volumes do veículo utilizados na pré-incubação com o antagonista PMX205.

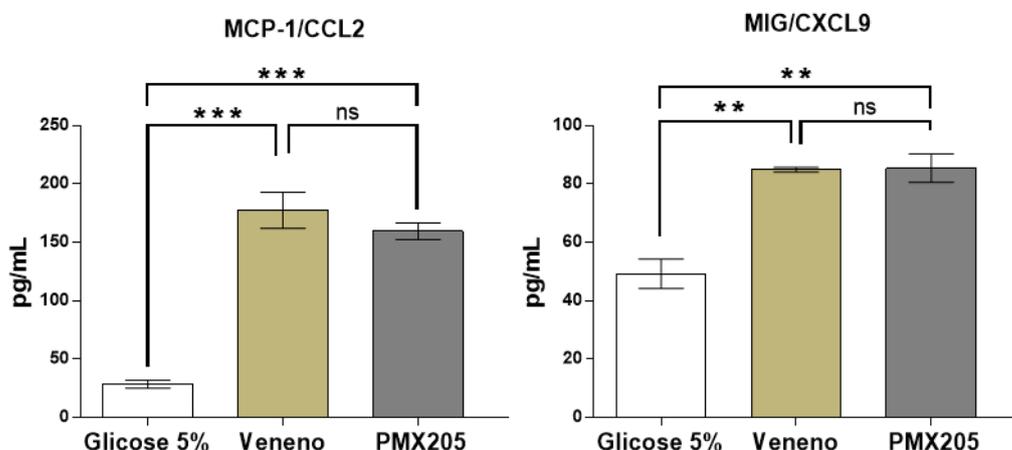
A Figura 21 mostra que a inibição do receptor de C5a, pelo PMX205, promoveu redução para níveis basais de TNF- α e IL-8 em amostras estimuladas com o veneno. No entanto, o PMX205 não influenciou na produção de MCP-1 e MIG (Figura 22).

Figura 21 – Níveis de TNF- α e IL-8 em sangue humano estimulado com veneno da serpente *B. jararaca* na presença do PMX205



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram pré-incubadas com o inibidor PMX205 (10 μ M) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril + glicose 5%, durante 60 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de TNF- α e IL-8 foi avaliada pelo *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de triplicatas. Dados representativos de dois ensaios independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (**) $p < 0,005$; (***) $p < 0,0005$; (****) $p < 0,0001$.

Figura 22 – Níveis de MCP-1 e MIG em sangue humano estimulado com veneno da serpente *B. jararaca* na presença do PMX205



Amostras de sangue humano, contendo GPRP (8 mg/mL), foram pré-incubadas com o inibidor PMX205 (10 μ M) e, então, incubadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) ou solução salina estéril + glicose 5%, durante 60 minutos a 37°C. Após coleta e diluição do plasma (1:2), a presença de MCP-1 e MIG foi avaliada pelo *Cytometric Bead Array* (CBA). Resultados foram representados com média \pm SEM de triplicatas. Ensaio representativo de dois experimentos independentes. Análise estatística realizada com o teste one-way Anova, seguido de comparações múltiplas de Tukey. (ns) não significativo; (**) $p < 0,005$; (***) $p < 0,0005$.

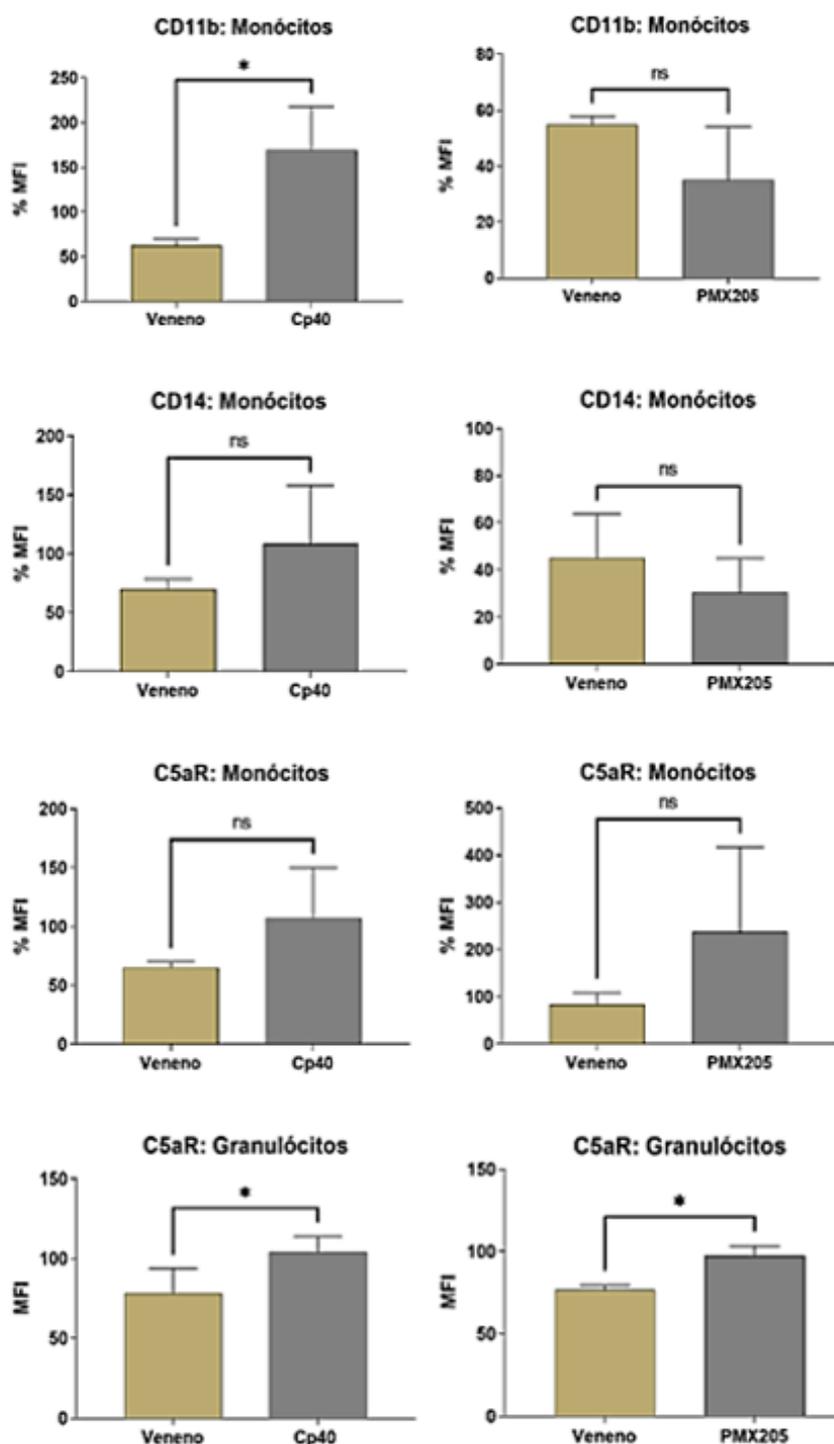
4.10 Expressão de marcadores na superfície de leucócitos após tratamento com veneno de *B. jararaca* na presença de inibidores do sistema complemento

*4.10.1 Papel do sistema complemento na expressão de marcadores na superfície de monócitos e granulócitos, após tratamento com veneno de *B. jararaca* na presença de CP40 ou PMX205*

Com o objetivo de avaliar o papel do sistema complemento na expressão de marcadores CD11b, CD14, C5aR, C3aR, TLR2 e TLR4 em populações de monócitos e granulócitos, amostras de sangue humano contendo GPRP (8 mg/mL) foram pré-incubados com inibidor de Cp40 (20 μ M) ou com PMX205 (10 μ M) e depois incubados com solução salina estéril (veículo Cp40), solução salina estéril + solução de glicose a 5% (veículo PMX205) ou veneno de *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) por 60 minutos a 37°C.

A figura 23 mostra que o CP40, inibidor do componente C3 do sistema complemento, reverteu a redução da expressão de CD11b e C5aR1 induzida pelo veneno da *B. jararaca* em monócitos, enquanto PMX205, antagonista do receptor 1 do C5a, melhorou a expressão de C5aR1 nos granulócitos.

Figura 23 – Expressão de marcadores de superfície em monócitos e granulócitos, após tratamento com veneno da serpente *B. jararaca* na presença de CP40 ou PMX205



Amostras de sangue humano contendo GPRP (8 mg/mL) foram pré-incubadas com inibidor Cp40 (20 μ M) ou com PMX205 (10 μ M) e depois incubadas com salina (veículo do Cp40), salina + 5% de glicose (veículo PMX205) ou veneno da *B. jararaca* (50,0 μ g/mL) durante 60 minutos a 37 °C. Após a incubação, as células foram analisadas para a expressão de CD11b, CD14 e C5aR. Os resultados foram expressos como % de MFI \pm SEM (em relação a MFI das amostras tratadas somente com o veículo) de duplicatas de três experimentos independentes. Análise estatística realizada com o teste *t* de Student. (ns) não significativo; (*) $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O sistema complemento desempenha um papel importante na defesa contra patógenos e na homeostase tecidual. No entanto, quando ativado de maneira intensa e persistente, pode também ser fonte causadora de sérios danos inflamatórios.

Estudos conduzidos por nosso grupo, utilizando soro humano normal (NHS), mostraram que a atividade das metalo- e serinoproteases presentes no veneno das serpentes do gênero *Bothrops* eram fundamentais para a ativação do sistema complemento, clivagem direta de C3, C4 ou inativação do regulador C1-INH (do inglês, *C1 esterase inhibitor*), resultando na geração de amplas concentrações de anafilatoxinas (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010, 2013; TAMBOURGI, VAN DEN BERG, 2014). Delafontaine e colaboradores (2018) demonstraram também a importância das SVMPs para estes efeitos, visto que 1,10 Phe, um inibidor desta classe de proteases, reduziu drasticamente a geração de C5a e formação de complexo terminal do complemento solúvel (sTCC) em soro humano normal incubado com o veneno de *B. lanceolatus*. Além disso, o C5a gerado pela clivagem direta do C5 humano purificado, por proteases do veneno desta serpente, era altamente funcional, promovendo a ativação de neutrófilos, como caracterizado pelo aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} . Outros autores investigaram a ação do veneno de *B. atrox* e de duas toxinas (Batroxase, metaloprotease de classe P-I; BatroxPLA2, fosfolipase A2 ácida) sobre o sistema complemento. Neste estudo mostraram resultados semelhantes aos do nosso grupo, ou seja, que o veneno e a metaloprotease de classe P-I (Batroxase) eram capazes de modular as três vias de ativação (VA, VC e VL), hidrolisar componentes do complemento e de gerar fragmentos biologicamente ativos (MENALDO et al, 2016). Esses resultados sugerem que a ativação do sistema complemento possa desempenhar um importante papel no processo inflamatório observado nos acidentes botrópicos.

O modelo de sangue total humano, estabelecido por Mollnes e colaboradores (2002) e Brekke e colaboradores (2007, 2008), inicialmente elaborado para estudar o papel do complemento em um modelo de sepse bacteriana, mostrou ser também uma plataforma experimental útil para investigação e modulação da inflamação sistêmica estimulada por venenos e toxinas animais, conforme demonstrado pelos estudos do nosso grupo com o veneno da aranha *Loxosceles* e sua principal toxina

(Esfingomielinase D) (MANZONI DE ALMEIDA et al, 2018) e com uma metaloprotease de classe P-I (C-SVMP), purificada do veneno da *Bothrops pirajai* (LUCHINI et al, 2019).

Uma adaptação realizada por Johnson e colaboradores (2018), envolvendo a substituição da lepirudina pelo GPRP, um peptídeo inibidor dos primeiros passos da polimerização da fibrina (FURLAN et al., 1983; GALLISTL, MUNTEAN, ZENZ, 1995; PRATT et al., 1997, GEFFEN et al., 2011), abriu a possibilidade da realização de estudos com o veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. O veneno botrópico é caracterizado por exercer um efeito pró-coagulante *in vitro*, determinado pela presença de toxinas com atividade similar à da trombina, ativadores do fator II e do fator X, além de outras toxinas pró-coagulantes (MARKLAND, 1998). As toxinas com atividade similar à da trombina, denominadas *trombina-like*, provocam a clivagem das cadeias α ou β de fibrinogênio, o que leva a uma rápida coagulação (SERRANO; MAROUN, 2005; MACKESSY, 2010). Assim, no presente estudo, o GPRP foi utilizado como anticoagulante, e conseguimos superar a ação da toxina *trombina-like* e avaliar a ação pró-inflamatória do veneno bruto da serpente *B. jararaca* no modelo *ex vivo* de sangue total humano.

Para avaliar a ativação do sistema complemento, a dose de veneno e período de incubação mais adequados para os nossos ensaios, amostras de sangue total humano, anticoagulado com GPRP, foram tratadas com concentrações crescentes do veneno de *Bothrops jararaca* (12,5 $\mu\text{g/mL}$; 25,0 $\mu\text{g/mL}$; 50,0 $\mu\text{g/mL}$), ou com solução salina estéril (controle negativo), por 30, 60 ou 120 minutos a 37 °C. Em seguida, a geração de anafilatoxinas e complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) foi analisada. Com base nos dados obtidos, é possível sugerir que o veneno de *B. jararaca* induz ativação do sistema complemento no modelo experimental *ex vivo* de sangue total humano, fato que pode contribuir na reação inflamatória que ocorre nos envenenamentos botrópicos. Tal afirmativa se baseia no aumento significativo da produção de C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg e C5a/C5a-desArg nas amostras tratadas com as três concentrações do veneno, quando comparadas com o controle negativo, solução salina estéril (Figuras 7, 8, 9). O mesmo fenômeno pode ser observado pelo aumento da produção do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC, SC5b-9) (Figura 10). Em geral, a melhor concentração

de veneno e período de incubação foram de 50,0 µg/mL e 60 minutos, respectivamente, os quais foram escolhidos para os ensaios com inibidores do complemento.

As anafilatoxinas, C3a, C4a e C5a são fragmentos biologicamente ativos constantemente liberados durante a ativação do sistema complemento. Esses mediadores possuem um espectro de atividades pró-inflamatórias que envolvem a desgranulação dos mastócitos, aumento da permeabilidade vascular, regulação da expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia, ativação de leucócitos, produção de espécies reativas ao oxigênio; citocinas e quimiocinas, aumento da fagocitose e regeneração tecidual (GUO; WARD, 2005; SARMA; WARD, 2010; HAWKSWORTH et al., 2017). Esse amplo conjunto de efeitos promovidos pelas anafilatoxinas é mediado pela expressão dos receptores acoplados a proteína G (C3aR e C5aR1 [CD88]) que quando ativados de maneira exacerbada, podem contribuir no desenvolvimento de diversas doenças imunoinflamatórias (MANTHEY et al., 2009; REIS et al., 2019). No envenenamento botrópico, a geração de infiltrado leucocitário e edema representam reações inflamatórias locais características (GUTIÉRREZ et al., 1986, FARSKY et al., 1997, OTERO et al., 2002; COSTA et al., 2002; FERNANDES et al., 2006), e que surgem acompanhadas pela presença abundante das anafilatoxinas, destacando o papel desses mediadores nas manifestações induzidas pelo veneno (FARSKY et al., 2000; TAMBOURGI; VAN DEN BERG, 2014; DELAFONTAINE et al., 2018). Já o complexo terminal do complemento (TCC, sC5b-9) representa o produto final da cascata e é gerado pela interação do C5b com C6, C7, C8 e várias moléculas de C9, formando o complexo de ataque à membrana (sC5b-9 ou MAC), capaz de gerar poros na membrana celular e favorecer a lise (SARMA; WARD, 2010). Além disso, a ligação do TCC às células endoteliais, fornece estímulos capazes de induzir a expressão e liberação de moléculas envolvidas na migração leucocitária (TEDESCO et al., 1997; DOBRINA et al., 2002).

A migração leucocitária em resposta a um estímulo inflamatório constitui umas das primeiras linhas de defesa montadas pela imunidade inata. Sendo este evento mediado por mecanismos diretos ou indiretos. Os últimos envolvem a presença de citocinas e outros agentes quimiotáticos liberados por mastócitos, macrófagos e

células endoteliais, após reconhecimento do antígeno (MATSUKAWA et al., 2000; ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011).

Os resultados aqui obtidos demonstram que a exposição ao veneno botrópico regulou positivamente a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-8 em níveis significativos, principalmente nas amostras tratadas com a maior concentração do veneno (50 μ g/mL). Essa produção foi intensificada, sobretudo, no período de 120 minutos de incubação (Figuras 11, 12).

O Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é sintetizado, predominantemente, por monócitos / macrófagos ativados e linfócitos T, como uma proteína de 26 kDa, pró-TNF, associada à membrana plasmática, e quando clivada, a forma solúvel tem massa molecular relativa de 17 kDa (IDRISS et al., 2000). É uma citocina com potente ação em vários tipos celulares e desempenha um papel crítico na patogênese de diversas doenças inflamatórias, incluindo artrite reumatoide, doença de Crohn, psoríase, asma, doenças cardiovasculares e pulmonares (BRADLEY, 2008). Sua interação com células endoteliais adjacentes aos tecidos de infecção e/ou lesão, por meio de um de dois distintos receptores (TNFR1; CD120a, TNFR2; CD120b), medeia a liberação das quimiocinas (p.ex., IL-8, MCP-1 e IP-10), e expressão de diferentes combinações de moléculas de adesão para leucócitos, incluindo E-selectina, ICAM-1, VCAM-1 (WATERS; POBER; BRADLEY, 2013) e CD11b/CD18 (CR3; MAC-1) (MIYATA; IWABUCHI; WATANABE; SATO; NAGAOKA, 1999). Em virtude da capacidade do TNF- α de induzir a expressão de classes distintas de moléculas de adesão, essa citocina pode ser um fator colaborativo para a infiltração de leucócitos quando na presença do veneno botrópico. Ademais, o TNF- α é capaz de ativar a expressão do ciclo-oxigenase 2 nas células endoteliais, aumentando a produção de PGI₂, resultando em efeitos vasodilatadores (MARK, 2001).

No contexto de envenenamento, a capacidade do gênero *Bothrops* de induzir produção de citocinas inflamatórias é bem estabelecida e demonstrada por diversos estudos *in vivo*, na qual, concentrações significativamente elevadas de TNF- α , IL-6, IL-10, puderam ser observadas em animais injetados intraperitonealmente com os venenos da *B. jararaca* (PETRICEVICH et al., 2000; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002), *B. asper* (PETRICEVICH et al., 2000; ZAMUNER et al., 2005) e *B. atrox* (MOREIRA et al., 2012). Outros autores, buscando compreender os mecanismos de confluência

entre inflamação e coagulação, conseguiram detectar níveis expressivos de TNF- α , IL-1 β , IL-6, em suspensão rica em células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) após tratamento com BJcuL, uma lectina do veneno da *B. jararacussu* (CEZARETTE; SARTIM; SAMPAIO, 2020). Embora, nossos ensaios não tenham detectado níveis significativos de IL-6 e IL-10, uma hipótese para explicar tal discrepância possa ser o tempo em que a geração destas citocinas foi avaliada, 120 minutos, que talvez não seja o período mínimo ideal para detecção dessas moléculas.

A IL-8/CXCL8 é um membro da família das quimiocinas que atua através da interação com os receptores CXCR1 e CXCR2, expressos na superfície de diferentes tipos celulares. A IL-8 pode ser secretada por uma ampla variedade de células, após estimulação apropriada incluindo monócitos, células endoteliais, linfócitos T, fibroblastos, células tumorais, células epiteliais, hepatócitos, células sinoviais e queratinócitos (RUSSO et al., 2014). Nos tecidos, a IL-8 é produzida em abundância por fagócitos mononucleares em reação a diversos agentes pró-inflamatórios, tais como LPS, IL-1, TNF- α , IL-7, GM-CSF, IL-3, concanavalina A, fitohemaglutinina, zimosan, imunocomplexos e bactérias (KUNKEL et al., 1991; BAGGIOLINI, 1993). No processo inflamatório agudo, a IL-8 desempenha papel importante nos fenômenos relacionados ao recrutamento e ativação dos neutrófilos, reorganização do citoesqueleto, nas alterações nos níveis de Ca²⁺ intracelular, ativação de integrinas, liberação de enzimas granulares e explosão oxidativa. (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1993; HARADA et al., 1994). Ávila-Agüero e colaboradores (2001) observaram níveis séricos aumentados de IL-8, IL-6, e TNF- α em estudo clínico com pacientes não adultos acidentados pelas serpentes *B. asper* ou *B. insularis*.

Níveis significativos das quimiocinas MCP-1 e MIG também foram observados em nossos ensaios. A geração dessas quimiocinas foi induzida pelo veneno logo após os primeiros 30 minutos de incubação das amostras, e não apresentou declínio acentuado em seus níveis até os 120 minutos (Figuras 13, 14). A proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), também conhecida por CCL2, faz parte de uma grande família de proteínas estruturalmente homólogas que medeiam e regulam o movimento de leucócitos do sangue para os tecidos. O recrutamento dos monócitos é altamente regulado por esta quimiocina que, em altas concentrações, desencadeia explosão oxidativa, gerando espécies reativas de oxigênio (DESHMANE, AMINI, SAWAYA,

2008; GRIFFITH; SOKOL; LUSTER, 2014). A monocina induzida por IFN- γ (MIG; CXCL9) é um membro da subfamília CXC de quimiocinas inflamatórias produzidas por células dendríticas, linfócitos B e macrófagos, e que por meio do receptor CXCR3, estimula em especial o recrutamento de linfócitos T para locais de infecção e/ou lesão (PARK et al.,2002, HARDISON et al.,2006). Um estudo acerca da doença reumática cardíaca (DR), uma condição caracterizada por inflamação crônica do miocárdio provocada por lesões pós-infecção pela bactéria *Streptococcus pyogenes*, das quais as deformidades valvares são a seqüela crônica mais importante, demonstrou enfaticamente o envolvimento de MIG/CXCL9 na migração de células T isoladas para o tecido de lesão (FAÉ et al.,2013).

Dados dos ensaios obtidos tanto na dosagem das citocinas, quanto das quimiocinas, revelam a capacidade que o veneno tem de evocar, no modelo de sangue total humano, uma resposta inflamatória sistêmica aguda.

Além da geração de mediadores pró-inflamatórios, o modelo de sangue total humano também nos permitiu verificar o padrão de ativação de leucócitos avaliando a expressão de moléculas da superfície celular. Processo de suma importância, que já possibilitou avaliar a capacidade inflamatória promovida por bactérias gram-negativas e seus produtos (lipopolissacarídeo, LPS) (MOLLNES et al., 2002; BREKKE et al., 2007) e de venenos animais e suas toxinas (MANZONIDE-ALMEIDA et al., 2018; LUCHINI et al., 2019), e investigar se essa ação direta ou indireta sobre os leucócitos, acontece por meio da ativação do sistema complemento ou de outros mediadores endógenos.

A participação do sistema complemento nos eventos pró-inflamatórios induzidos pelo veneno da *B. jararaca*, e a interação sinérgica com receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern recognition receptors*, PRRs), e expressão de alguns marcadores na superfície de populações de leucócitos, como TLRs 2 e 4; CD14; CD11b; C3aR e C5aR foi analisada por citometria de fluxo.

Os receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like receptor*, TLRs) fazem parte de uma família conservada de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (TAKEDA; AKIRA, 2003). Todos os subtipos de TLRs atualmente descritos (10 em humanos e 13 em camundongos) são proteínas transmembrana do tipo I,

caracterizadas por um domínio extracelular rico em leucina e um domínio de homologia do receptor Toll/II-I (TIR) em suas caudas citoplasmáticas, essencial para a sinalização (KAWAI; AKIRA, 2010; NIE et al., 2018). Esses receptores, amplamente expressos na membrana de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK e muitos outros tipos celulares (DELNESTE; BEAUVILLAIN; JEANNIN, 2007), são responsáveis por iniciar a resposta imune inata após reconhecimento de estruturas microbianas conservadas (padrões moleculares associados ao patógeno, PAMPs), moléculas endógenas produzidas ou liberadas por células danificadas ou mortas (padrões moleculares associados ao dano, DAMPs) e moléculas oriundas de venenos de animais (padrões moleculares associados ao veneno, VAMPs) (KAWAI; AKIRA, 2010, 2011; ZOCCAL et al., 2014).

Uma ampla regulação da sinalização dos receptores do tipo Toll pelo sistema complemento foi previamente demonstrada em um estudo *in vivo*. Neste, os autores administraram diferentes ligantes de TLRs em camundongos com deficiência no fator de aceleração de decaimento (DAF), um regulador de membrana do complemento. Os ligantes LPS (TLR4), Zimozan (TLR2/6) e oligonucleotídeo CpG (TLR9) induziram, de forma dependente do complemento, a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β no plasma dos camundongos deficientes (ZHANG et al., 2007, HAJISHENGALLIS; LAMBRIS. 2016). Resultado semelhante foi observado nos camundongos selvagens tratados simultaneamente com ligantes de TLRs e fator do veneno de cobra (do inglês cobra *venom factor*, CVF), um potente ativador do complemento, com níveis plasmáticos elevados das citocinas pró-inflamatórias, apontando que o complemento pode ampliar a resposta inflamatória em associação com os receptores do tipo Toll (ZHANG et al., 2007, HAJISHENGALLIS; LAMBRIS. 2016). Trabalhos posteriores mostraram o envolvimento dos receptores de anafilatoxinas (C3aR e C5aR1 [CD88]) e CR3 (CD11b/CD18; MAC-1) na regulação das atividades de sinalização dos TLRs (KAGAN; MEDZHITOV, 2006; ZHANG et al., 2007; LAPPEGÅRD et al., 2009; LAU et al., 2015; HAJISHENGALLIS; LAMBRIS. 2016).

Em nossos ensaios, as amostras de sangue humano foram tratadas com veneno da *B. jararaca* (50,0 $\mu\text{g/mL}$) ou solução salina estéril (controle negativo), durante 60 minutos, na presença de anticorpos específicos para as populações celulares e para os marcadores de interesse (TLRs 2 e 4; CD14; CD11b; C3aR e

C5aR). Os resultados mostram uma redução significativa na expressão dos receptores em monócitos (Figura 15) (CD11b, CD14 e C5aR) e granulócitos (Figura 16) (C5aR) podendo ser observada em amostras tratadas com veneno quando comparadas com o controle negativo (solução salina estéril). Similarmente, no modelo experimental de sepse induzida em roedores por ligadura / punção cecal (CLP), GUO e colaboradores (2003) demonstraram uma importante redução nos níveis de C5aR em neutrófilos sanguíneos, pelo menos em parte, promovida pela presença acentuadamente aumentada de C5a, que regulou a internalização de C5aR, e cuja intensidade se correlacionou com a letalidade nos animais. A clivagem e inativação do C5aR por ação de serinoproteases de neutrófilos (do inglês *Neutrophil serine proteases*, NSPs) foi investigada em células mielomonocíticas U937 e neutrófilos isolados. Nesse estudo, os autores trataram essas populações celulares com diferentes serinoproteases de neutrófilos (NSPs), tais como elastase neutrofílica (NE); proteinase 3 (PR3); catepsina G (CG) em concentrações comumente encontradas no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) de pacientes com fibrose cística (CF), além da anafilatoxina C5a. A partir dos resultados obtidos, foram elaborados dois modelos convergentes para disfunção de neutrófilos mediada por C5a e NSPs. No primeiro, uma geração excessiva de C5a induz a liberação de NSPs, as quais clivam e inativam C5aR nas próprias células e nas adjacentes. No segundo, o excesso de infiltrado leucocitário, associado à secreção excessiva de NSPs por células necróticas, resulta na clivagem e inativação do C5aR nas próprias células e nas adjacentes (VAN DEN BERG et al., 2014). A expressão e função do C5aR também foi investigada em neutrófilos isolados tratados com o veneno da aranha *Loxosceles*. Os resultados demonstraram que o C5aR sofre clivagem por ação de metaloproteases endógenas da família das Adamlisinas (ADAMs) induzidas pelas esfingomielinases D (SMases D). No entanto, a adição do veneno de *Bothrops pirajai*, rica fonte de metaloproteases, não reduziu a expressão de C5aR (VAN DEN BERG et al., 2012).

A diminuição da expressão de CD11b e CD14 na superfície de monócitos, induzida pelo veneno, pode sugerir presença de precursores de células dendríticas mieloides nesta população, que podem ter iniciado um processo de diferenciação em células dendríticas imaturas em resposta ao veneno, apesar do curto período de incubação. De acordo com Patterson e colaboradores (2005), precursores de células

dendríticas mielóides purificados a partir de sangue e cultivados *in vitro* com GM-CSF e IL-4 se diferenciam rapidamente em duas populações fenotipicamente distintas, e o subtipo imaturo é CD11b-/low e CD14-. O papel das células dendríticas na patogênese do envenenamento por serpentes não é claro, mas sabe-se que toxinas, como a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, podem ativar células dendríticas e promover imunomodulação (FREITAS et al., 2021). Além disso, as células dendríticas exercem um papel essencial no desenvolvimento de reações alérgicas às abelhas e outros venenos altamente alergênicos, devido à sua capacidade de direcionar resposta imune de células T *helper* (DEMERS et al., 2009). Em nosso modelo, a possível diferenciação de precursores de células dendríticas pelo veneno da *B. jararaca* e seu papel no envenenamento permanecem desconhecidos.

De modo a avaliar a participação do sistema complemento nesses eventos pró-inflamatórios induzidos pelo veneno de *B. jararaca*, outros ensaios foram conduzidos na presença dos inibidores Cp40 e PMX205. A utilização do Cp40, um inibidor altamente específico do componente C3 do complemento, induziu a redução a níveis basais de C3a/C3a-desArg e sTCC em amostras estimuladas pelo veneno (Figura 17, 18). Também foi possível observar uma redução significativa nos níveis de C5a/C5a-desArg, mas não de C4a/C4a-desArg (Figura 17). A não alteração na geração do C4a/C4a-desArg pode estar relacionada com a ação direta de metaloproteases presentes no veneno botrópico capazes de clivar componentes do sistema complemento (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010, 2013).

Luchini e colaboradores (2019), utilizando também o modelo *ex vivo* de sangue total humano (MOLLNES et al., 2002), investigaram os eventos pró-inflamatórios provocados pela C-SVMP (uma metaloprotease de classe P-I purificada do veneno da *B. pirajai*), e o papel do sistema complemento nesse processo através do uso de inibidores. Os resultados demonstraram a capacidade da C-SVMP na indução da ativação do sistema complemento (gerando de níveis significativos de C3a / C3a desArg, C5a / C5a desArg e sTCC/SC5b-9), elevação da produção das citocinas IL-1 β e IL-6 e das quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 e CXCL9/MIG, e regulação da expressão dos marcadores na superfície de leucócitos. Com relação ao padrão de ativação leucocitária, uma considerável regulação positiva na expressão dos marcadores CD11b, CD14, TLR2, TLR4, C3aR e C5aR em monócitos e granulócitos

pode ser observada nas amostras de sangue tratado com C-SVMP (25,0 µg/mL) no período de 30 minutos a 37 °C. A adição de compstatina, um inibidor de C3, causou uma redução significativa na produção de IL-1β, CXCL8/IL-8 e CCL2/MCP-1 em células tratadas com C-SVMP (LUCHINI et al., 2019).

Podemos sugerir que o sistema complemento está envolvido na síntese da maioria dos mediadores inflamatórios detectados em nosso estudo, como demonstrado pela inibição do componente C3 / C3b via Cp40, que resultou na diminuição significativa da produção de TNF-α, IL-8 e MCP-1 (Figura 19, 20), ou pela utilização do antagonista do receptor 1 do C5a (C5aR1), PMX205, que promoveu a redução a níveis basais de TNF-α e IL-8 (Figura 21). Os dados reunidos sinalizam que o eixo C5a-CaR1 é essencial para a produção dos mediadores TNF-α e IL-8 induzidos pelo veneno botrópico neste modelo *ex vivo*. O PMX205 não reduziu a produção MCP-1, sugerindo que a produção desse mediador não é influenciada pelo eixo C5a-C5aR1. O fato de que nem Cp40 nem PMX205 reduziram a produção de MIG/CXCL9 (Figura 20,22) sugere que a produção desse mediador não é influenciada pelo C3 ou eixo C5a-C5aR1. O CP40 foi capaz de reverter a expressão reduzida de CD11b e C5aR1 induzida por *B. jararaca* em monócitos, enquanto PMX205 foi capaz de melhorar a expressão de C5aR1 em granulócitos (Figura 23).

Recentemente, nosso grupo avaliou o papel do sistema complemento nos eventos inflamatórios induzidos por veneno de *Naja annulifera* (SILVA DE FRANÇA et al., 2021). Esse veneno induziu ativação do complemento mediada pela ação de SVMPs. A ativação do eixo C5a-C5aR1 no tecido subcutâneo dos animais injetados com o veneno desencadeou a produção de LTB4, PGE2 e TXB2, que foram responsáveis pelo edema. Além disso, a geração de C5a induzida pelo veneno levou à produção da quimiocina CXCL1, juntamente com um aumento nos níveis teciduais de MPO. Sinalização de C5aR1 em camundongos submetidos ao envenenamento também foi responsável pelos eventos de leucocitose, neutrofilia, monocitose e lesão pulmonar aguda, como demonstrado pelo uso de PMX205 nestes ensaios.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados aqui apresentados sugerem que a ativação do sistema complemento, promovida pelo veneno da serpente *B. jararaca* no modelo de sangue total humano, contribui significativamente para o processo inflamatório. O controle de vários parâmetros inflamatórios pelo uso do Cp40, inibidor do componente C3, e do PMX205, antagonista do receptor 1 de C5a, indicam que a inibição do complemento possa ser uma possível ferramenta terapêutica no envenenamento por *B. jararaca*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AGRAWAL, Alok et al. Pattern recognition by pentraxins. Target pattern recognition in innate immunity, p. 98-116, 2009.

ARBORE, G.; KEMPER, C.; KOLEV, M. Intracellular complement– the complosome – in immune cell regulation. **Molecular immunology**, v. 89, p. 2-9, set, 2017.

ÁVILA-AGÜERO, María L. et al. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. **Pediatric emergency care**, v. 17, n. 6, p. 425-429, 2001.

BAGGIOLINI, Marco; CLARK-LEWIS, Ian. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS letters**, v. 307, n. 1, p. 97-101, 1992.

BAGGIOLINI, Marco; DEWALD, Beatrice; MOSER, Bernhard. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines—CXC and CC chemokines. **Advances in immunology**, v. 55, p. 97-179, 1993.

BECK, K.D.; NGUYEN, H. X.; GALVAN, M. D.; SALAZAR, D. L.; WOODRUFF, T. M.; ANDERSON, A. J. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. **Brain**, v. 133, n. 2, p. 433- 447, jan, 2010.

BEXBORN, F.; ENGBERG, A. E.; SANDHOLM, K.; MOLLNES, T. E.; HONG, J.; NILSSON, K. Hirudin versus heparin for use in whole blood in vitro biocompatibility models. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 89, n. 4, p.951-959, jun, 2009.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BREKKE, O. L.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; FUNG, M.; MOLLNES, T. E. The role of complement C3opsonization, C5a receptor, and CD14 in E. coli-induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 6, p. 1404-1413, mar, 2007.

BREKKE, O. L.; CHRISTIANSEN, D.; FURE, H.; PHARO, A.; FUNG, M.; RIESENFELD, J., MOLLNES, T.E. Combined inhibition of complement and CD14 abolish E. coli-induced cytokine-, chemokine-and growth factor-synthesis in human whole blood. **Molecular immunology**, v. 45, n. 14, p. 3804-3813, ago, 2008.

CABRAL, G. A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life sciences**, v. 77, n. 14, p. 1699-1710, ago, 2005.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1736-1743, mar, 2009.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. 1989.

CARDOSO, J. L. C.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T., LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; CHUDZINSKI, A. M. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 86, n. 5, p. 315-325, maio, 1993.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. D. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003.

CEZARETTE, G. N.; SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Inflammation and coagulation crosstalk induced by BJcuL, a galactose-binding lectin isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **International journal of biological macromolecules**, v. 144, p. 296-304, 2020.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health organization**, v. 76, n. 5, p. 515, 1998.

CHIPPAUX, J.P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 38, ago, 2017.

COSTA, E. P. et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, n. 1, p. 13-17, 2002.

DELAFONTAINE, Marie et al. Venom from *Bothrops lanceolatus*, a snake species native to martinique, potently activates the complement system. **Journal of immunology research**, v. 2018, 2018.

DEMERS, Louise et al. Coping strategies and social participation in older adults. *Gerontology*, v. 55, n. 2, p. 233-239, 2009.

DESHMANE, S. L., KREMLEV, S., AMINI, S., SAWAYA, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP- 1): an overview. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DOBRINA, Aldo et al. Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 99, n. 1, p. 185-192, 2002.

ELIFIO-ESPOSITO, Selene et al. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. *BMC immunology*, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2011.

FAÉ, Kellen C. et al. CXCL9/Mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. **Inflammation**, v. 36, n. 4, p. 800-811, 2013.

FARSKY, S. H.; GONÇALVES, L. R. C.; 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 leukocyte recruitment. **Mediators of inflammation**, v. 9, n. 5, p. 213- 221, 2000.

FARSKY, Sandra HP et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 185-193, 1997.

FERNANDES, Cristina Maria et al. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from Bothrops asper snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 549-559, 2006.

FONSECA, M. I.; AGER, R. R.; CHU, S. H.; YAZAN, O.; SANDERSON, S. D.; LAFERLA, F. M.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M.; TENNER, A. J. Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. **J. The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1375-1383, jun, 2009.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

FREITAS, Amanda P. et al. The modulatory effect of crotoxin and its phospholipase A2 subunit from *Crotalus durissus terrificus* venom on dendritic cells interferes with the generation of effector CD4+ T lymphocytes. **Immunology Letters**, v. 240, p. 56-70, 2021.

FUNASA, MdS. Manual de Diagnóstico e Tratamento por Animais Peçonhentos. 2001.

FURLAN, M.; RUPP, C.; BECK, E. A. Inhibition of fibrin polymerization by fragment D is affected by calcium, Gly-Pro-Arg and Gly-His-Arg. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 742, n. 1, p. 25-32, jan, 1983.

GOMES, N.; PUORTO, G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, n. 1, p. 69-100, 1993.

GRIFFITH, Jason W.; SOKOL, Caroline L.; LUSTER, Andrew D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 659-702, 2014.

GUO, Ren-Feng et al. Neutrophil C5a receptor and the outcome in a rat model of sepsis. **The FASEB journal**, v. 17, n. 13, p. 1-17, 2003.

GUSTAVSEN, Alice et al. Combined inhibition of complement and CD14 attenuates bacteria-induced inflammation in human whole blood more efficiently than antagonizing the Toll-like receptor 4–MD2 complex. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 1, p. 140-150, 2016.

GUTIÉRREZ, José María et al. Snakebite envenoming. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-21, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M., RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, set, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O.; PORTILLA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, v. 19, n. 4, p. 493-500, dez, 1981.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Experimental and molecular pathology**, v. 62, n. 1, p. 28-41, fev, 1995.

GUTIÉRREZ, José María; CHAVES, Fernando; CERDAS, Luis. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Revista de biología tropical**, v. 34, n. 2, p. 209-214, 1986.

HAJISHENGALLIS, George et al. Complement-dependent mechanisms and interventions in periodontal disease. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 406, 2019.

HAJISHENGALLIS, George; LAMBRIS, John D. More than complementing Tolls: complement–Toll-like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. **Immunological reviews**, v. 274, n. 1, p. 233-244, 2016.

HARADA, A; SEKIDO, N; AKAHOSHI, T; WADA, T; MUKAIDA, N; MATSUSHIMA, K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 56, n. 5, p. 559-564, 1994.

HARDISON, Jenny L. et al. The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity**, v. 74, n. 1, p. 125-134, 2006.

HARRISON, R. A.; HARGREAVES, A.; WAGSTAFF, S. C.; FARAGHER, B.; LALLOO, D. G. Snake envenoming: a disease of poverty. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 12, p. e569, dez, 2009.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. **Critical reviews in toxicology**, v. 29, n. 1, p. 1-19, jan, 1999.

HAWKSWORTH, O. A.; LI, X. X.; COULTHARD, L. G.; WOLVETANG, E. J.; & WOODRUFF, T. M. New concepts on the therapeutic control of complement anaphylatoxin receptors. **Molecular immunology**, v. 89, p. 36-43, set, 2017.

HUBER-LANG, M. S.; RIEDEMAN, N. C.; SARMA, J. V.; YOUNKIN, E. M.; MCGUIRE, S. R.; LAUDES, I.J.; LU, K. T.; GUO, R. F.; NEFF, T. A.; PADGAONKAR, V. A.; LAMBRIS, J. D.; SPRUCE, L.; MASTELLOS, D.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 12, p. 1567- 1574, out, 2002.

IDRISS, Haitham T.; NAISMITH, James H. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). **Microscopy research and technique**, v. 50, n. 3, p. 184-195, 2000.

JANEWAY JR, Charles A.; MEDZHITOV, Ruslan. Innate immune recognition. Annual review of immunology, v. 20, n. 1, p. 197-216, 2002.

JOHNSON C, PISCHKE SE, MOLLNES TE, NILSSON, PH. Comparison of two *ex vivo* human whole blood models reveals the effect of thrombin in complement activation and inflammation. **Mol. Immunol**, 167, 2018.

KAGAN, Jonathan C.; MEDZHITOV, Ruslan. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 943-955, 2006.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R., DE SILVA, H. J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS medicine**, v. 5, n. 11, p. e218, nov, 2008.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KINI, R. Manjunatha. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochemical Journal*, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.

KÖHL, J. Drug evaluation: the C5a receptor antagonist PMX-53. **Current opinion in molecular therapeutics**, v. 8, n. 6, p. 529, 2006.

KUMAR, Himanshu; KAWAI, Taro; AKIRA, Shizuo. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, v. 30, n. 1, p. 16-34, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2010.

KUNKEL, Steven L. et al. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. **Experimental lung research**, v. 17, n. 1, p. 17-23, 1991.

LAPPEGÅRD, Knut Tore et al. Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 37, p. 15861-15866, 2009.

LAU, Corinna et al. CD14 and complement crosstalk and largely mediate the transcriptional response to *Escherichia coli* in human whole blood as revealed by DNA microarray. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117261, 2015.

LUCHINI, L.G.; PIDDE-QUEIROZ, G.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; TAMBOURGI, D. V. Complement system inhibition modulates the pro-inflammatory effects of a snake venom metalloproteinase. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1137, 2019.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: the venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology**, v. 245, n. 3-4, p. 147-159, nov, 2006.

MACKESSY, S. P.; Thrombin-like enzymes in snake venoms. **Toxins and Hemostasis**. Springer, Dordrecht, p. 519-557, ago, 2010.

MANTHEY, Helga D. et al. Complement component 5a (c5a). **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 11, p. 2114-2117, 2009.

MANZONI-DE-ALMEIDA, D.; SQUAIELLA-BAPTISTÃO, C. C.; LOPES, P. H.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. *Loxosceles* venom Sphingomyelinase D activates human blood leukocytes: Role of the complement system. **Molecular immunology**, v. 94, p. 45-53, fev, 2018.

MARK, Karen S.; TRICKLER, William J.; MILLER, Donald W. Tumor necrosis factor- α induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 3, p. 1051-1058, 2001.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, dez, 1998.

MASTAGLIO, Sara et al. The first case of COVID-19 treated with the complement C3 inhibitor AMY-101. **Clinical Immunology**, v. 215, p. 108450, 2020.

MASTELLOS, Dimitrios C. et al. Complement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: exploiting our current knowledge to improve the treatment landscape. **Expert review of hematology**, v. 7, n. 5, p. 583-598, 2014.

MASTELLOS, Dimitrios C. et al. Compstatin: a C3-targeted complement inhibitor reaching its prime for bedside intervention. **European journal of clinical investigation**, v. 45, n. 4, p. 423-440, 2015.

MATSUKAWA, A. Hogaboam CM, Lukacs NW, and Kunkel SL. **Chemokines and innate immunity**. **Rev Immunogenet**, v. 2, p. 339-358, 2000.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428, jul, 2008. MERLE, N. S.; NOE, R.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L. T. Complement system part II: role in immunity. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 257, maio, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de vigilância em saúde.2017.

MIYATA, Ryukou et al. Short exposure of intestinal epithelial cells to TNF- α and histamine induces Mac-1-mediated neutrophil adhesion independent of protein synthesis. **Journal of leukocyte biology**, v. 66, n. 3, p. 437-446, 1999.

MOLLNES, T. E.; BREKKE, O. L.; FUNG, M.; FURE, H.; CHRISTIANSEN, D.; BERGSETH, G.; LAMBRIS, J. D. Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1869- 1877, maio, 2002.

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

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M. C.; NASCIMENTO, N. G.; DA SILVA, H. B.; FERNANDES, C. M.; LIMA, M. R. D. I.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12-20, jul, 2012.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. 28, p. 2893-2905, out, 2007.

NICOLAU, C. A.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; JUNQUEIRA, M.; PERALES, J.; VALENTE, R. H. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 214-231, 2017.

NIE, Li et al. Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1523, 2018.

OTERO, Rafael et al. Complications of Bothrops, Porthidium, and Bothriechis snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-1114, 2002.

PARK, Matthew K. et al. The CXC chemokine murine monokine induced by IFN- γ (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 3, p. 1433-1443, 2002.

PATTERSON, Steven et al. Human BDCA-1-positive blood dendritic cells differentiate into phenotypically distinct immature and mature populations in the absence of exogenous maturational stimuli: differentiation failure in HIV infection. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8200-8209, 2005.

PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C. F.; TAMBOURGI, D. V.; & GUTIÉRREZ, J. M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, n. 9, p. 1253-1266, 2000.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1221-1228, out, 2002.

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

PIDDE-QUEIROZ, G.; MAGNOLI, F. C.; PORTARO, F. C. V.; SERRANO, S. M. T.; VAN DEN BERG, C.; TAMBOURGI, D. V. PI snake venom metalloproteinase is able to activate the complement system by direct cleavage of central components of the cascade. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2519, out, 2013.

PRATT, K. P.; COTE, H. C. F.; CHUNG, D. W.; STENKAMP, R. E.; & DAVIE, E. W. The primary fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30-kDa C-terminal γ chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 14, p. 7176-7181, jul, 1997.

PRIMI KYRI, Alexandra et al. Method development and validation for the quantitation of the complement inhibitor Cp40 in human and cynomolgus monkey plasma by UPLC-ESI-MS. *Journal of Chromatography B*, v. 1041, p. 19-26, 2017.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.; MARIA DE FÁTIMA, D. F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, dez, 2008.

REIS, Edimara S. et al. new insights into the immune functions of complement. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 8, p. 503-516, 2019.

REIS, Edimara S. et al. Therapeutic C3 inhibitor Cp40 abrogates complement activation induced by modern hemodialysis filters. **Immunobiology**, v. 220, n. 4, p. 476-482, 2015.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero Bothrops: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 475-480, fev, 1997.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K., LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 785, ago, 2010.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. **Venomous animals and their venoms**, v. 2, p. 345-384, 1971.

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

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **International journal of experimental pathology**, v. 79, n. 4, p. 245, ago, 1998.

RUSSO, Remo C. et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert review of clinical immunology**, v. 10, n. 5, p. 593-619, 2014.

SAADI, S.; WRENSHALL, L. E.; PLATT, J. L. Regional manifestations and control of the immune system. **The FASEB journal**, v. 16, n. 8, p. 849-856, jun, 2002.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell and tissue research**, v. 343, n. 1, p. 227-235, jan, 2010.

SAZIMA, I. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. **Biology of the Pitvipers**, v. 4, p. 199-216, 1992.

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

SILVA DE FRANÇA, Felipe et al. C5a-C5aR1 axis activation drives envenomation immunopathology by the snake *naja annulifera*. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 1138, 2021.

SILVA, W. Dias da; TAMBOURGI, D.V. The humoral immune response induced by snake venom toxins. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 10, n. 5, p. 343-357, out, 2011.

TAKEDA, K.; KAISHO, T. akira S. **Toll-like receptors. annu rev immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAMBOURGI, D. V.; VAN DEN BERG, C. W. Animal venoms/toxins and the complement system. **Molecular immunology**, v. 61, n. 2, p. 153-162, out, 2014.

TAMBOURGI, Denise V. et al. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 9, p. 4459-4466, 1995.

TAMBOURGI, Denise V. et al. Sphingomyelinases in the venom of the Spider *Loxosceles intermedia* Are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent Hemolysis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 251, n. 1, p. 366-373, 1998.

TEDESCO, F., PAUSA, M., NARDON, E., INTRONA, M., MANTOVANI, A., DOBRINA, A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. **The Journal of experimental medicine**, v. 185, n. 9, p. 1619-1628, 1997.

TEIXEIRA, C. D. F. P.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; & ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 181-184, mar, 2005.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 988-997, dez, 2009.

VAN DEN BERG, Carmen W. et al. C5a receptor is cleaved by metalloproteases induced by sphingomyelinase D from *Loxosceles* spider venom. **Immunobiology**, v. 217, n. 9, p. 935-941, 2012.

VAN DEN BERG, Carmen W. et al. Mechanism of neutrophil dysfunction: neutrophil serine proteases cleave and inactivate the C5a receptor. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1787-1795, 2014.

VAN GRIENSVEN, M.; RICKLIN, D.; DENK, S.; HALBGEBAUER, R.; BRAUN, C. K.; SCHULTZE, A.; MESSERER, D. Protective effects of the complement inhibitor compstatin Cp40 in hemorrhagic shock. **Shock**, v. 51, n. 1, p. 78-87, Jan, 2019.

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles**. Academic Press, 2014.

WATERS, John P.; POBER, Jordan S.; BRADLEY, John R. Tumour necrosis factor in infectious disease. **The Journal of pathology**, v. 230, n. 2, p. 132-147, 2013.

WEN, F. H.; MONTEIRO, W. M.; DA SILVA, A. M. M.; TAMBOURGI, D. V.; DA SILVA, I. M.; SAMPAIO, S., LACERDA, M. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003701, maio, 2015.

WOODRUFF, T. M.; AGER, R. R.; TENNER, A. J.; NOAKES, P. G.; TAYLOR, S. M. The role of the complement system and the activation fragment C5a in the central nervous system. **Neuromolecular medicine**, v. 12, n. 2, p. 179-192, jun, 2010.

WOODRUFF, T. M.; ARUMUGAM, T. V.; SHIELS, I. A.; REID, R. C.; FAIRLIE, D. P.; TAYLOR, S. M. A potent human C5a receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model of inflammatory bowel disease. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5514-5520, nov, 2003.

WOODRUFF, T. M.; ARUMUGAM, T. V.; SHIELS, I. A.; REID, R. C.; FAIRLIE, D. P.; & TAYLOR, S. M. Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia- reperfusion in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 116, n. 1, p. 81-90, jan, 2004.

WOODRUFF, T. M.; CRANE, J. W.; PROCTOR, L. M.; BULLER, K. M.; SHEK, A. B.; DEVOS, K.; TAYLOR, S. M. Therapeutic activity of C5a receptor antagonists in a rat model of neurodegeneration. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 9, p. 1407-1417, jul, 2006.

WOODRUFF, T. M.; NANDAKUMAR, K. S.; TEDESCO, F. Inhibiting the C5–C5a receptor axis. **Molecular immunology**, v. 48, n. 14, p. 1631-1642, ago, 2011.

WOODRUFF, T. M.; POLLITT, S.; PROCTOR, L. M.; STOCKS, S. Z.; MANTHEY, H. D.; WILLIAMS, H.M.; TAYLOR, S. M. Increased potency of a novel complement factor 5a receptor antagonist in a rat model of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 314, n. 2, p. 811-817, ago, 2005.

WOODRUFF, T. M.; STRACHAN, A. J.; DRYBURGH, N.; SHIELS, I. A.; REID, R. C.; FAIRLIE, D. P.; TAYLOR, S. M. Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen- induced monarticular arthritis in the rat. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 9, p. 2476-2485, set, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control: executive summary**. World Health Organization, 2019.

WÜSTER, W.; SALOMÃO, M. D. G.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; THORPE, R. S.; DUCKETT, G. J., PUORTO, M. G., WARRELL, D. Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. **Biology of the Vipers**, p. 111-128, 2002.

ZAMUNER, Stella R.; TEIXEIRA, Catarina FP. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators of inflammation**, v. 11, n. 6, p. 351-357, 2002.

ZAMUNER, Stella Regina et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 806-813, 2005.

ZHANG, Xinhua et al. Regulation of Toll-like receptor–mediated inflammatory response by complement in vivo. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 110, n. 1, p. 228-236, 2007.

ZOCCAL, Karina Furlani et al. TLR2, TLR4 and CD14 recognize venom-associated molecular patterns from *Tityus serrulatus* to induce macrophage-derived inflammatory mediators. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88174, 2014.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; & GONÇALVES, L. R. C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 227-234, mar, 2010.