UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ÂNGELA ALICE AMADEU MEGALE

**Propriedades inflamatórias do veneno da serpente *Bitis arietans*:
contribuição dos mediadores lipídicos no envenenamento *in vivo* e ação
de toxinas isoladas do veneno em macrófagos humanos**

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

São Paulo

2019

ÂNGELA ALICE AMADEU MEGALE

**Propriedades inflamatórias do veneno da serpente *Bitis arietans*:
contribuição dos mediadores lipídicos no envenenamento *in vivo* e ação
de toxinas isoladas do veneno em macrófagos humanos**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva

Co-orientadora: Dra. Fernanda C. Vieira Portaro

Versão original.

São Paulo

2019

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

Ficha catalográfica elaborada pelo (a) autor (a)

Alice Amade Megale, Ângela

Propriedades inflamatórias do veneno da serpente *Bitis arietans*: contribuição dos mediadores lipídicos no envenenamento *in vivo* e ação de toxinas isoladas do veneno em macrófagos humanos / Ângela Alice Amadeu Megale; orientador Wilmar Dias da Silva; co-orientadora Fernanda Calheta Vieira Portaro. – São Paulo, 2019.
203 p.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Bitis arietans*. 2. Veneno. 3. Inflamação. 4. Mediadores lipídicos. 5. Toxinas purificadas. I. Dias da Silva, Wilmar, orientador. II. Calheta Vieira Portaro, Fernanda, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ângela Alice Amadeu Megale

Titulo da Tese: Propriedades inflamatórias do veneno da serpente *Bitis arietans*: contribuição dos mediadores lipídicos no envenenamento *in vivo* e ação de toxinas isoladas do veneno em macrófagos humanos.

Orientador: Dr. Wilmar Dias da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

AGRADECIMENTOS

*Agradeço ao meu querido orientador, **Dr. Wilmar Dias da Silva**, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho. Sempre serei grata por todo seu incentivo e esforço para que eu pudesse crescer como cientista a cada dia, me fornecendo apoio, incontáveis ensinamentos e, sobretudo, liberdade intelectual para que eu pudesse seguir sempre aprendendo coisas novas e construir meu caminho nesse longo, árduo, entretanto, apaixonante caminho científico. É realmente um privilégio trabalhar ao lado de um cientista tão talentoso, perspicaz e humano como ele. Dentre uma infinidade de ensinamentos, creio que o mais importante é uma mensagem implícita que ele nos passa em todas as discussões: ciência é algo muito maior que interesses próprios, é algo a ser compartilhado e aprimorado a fim de se obter o melhor resultado possível em benefício da sociedade;*

*À minha co-orientadora, **Dra. Fernanda C. V. Portaro**, pelos ensinamentos, convívio e contribuição para a conquista deste título. Sua experiência e apoio foram fundamentais, principalmente para o desenvolvimento do segundo capítulo desta tese. Meu agradecimento também a todos do seu grupo: **Alexandre Kuniyoshi, Roberto Kodama, Daniela Cajado, Cristiane Castilho e Bruno Duzzi**, que são adoráveis e sempre dispostos a ajudar; agradeço especialmente ao Alexandre que dedicou muito do seu tempo para me introduzir no “mundo das toxinas purificadas”, sem ele teria sido muito mais difícil, obrigada!*

*À **Dra. Sonia Jancar** e ao Laboratório de Imunofarmacologia do ICB-USP, os meus mais sinceros agradecimentos. Seu apoio foi crucial para a realização dos ensaios in vivo e desenvolvimento do primeiro capítulo da tese. Agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório, pelo convívio e por todas as suas lousas contendo resultados, próximas etapas, novas hipóteses, conclusões... por ter não apenas me fornecido espaço e material necessários para o andamento da tese, mas, principalmente, por ter investido seu tempo em discussões científicas que só expandiram minha mente. Eu não tenho palavras para descrever o quão fui bem recebida em seu laboratório, onde pude aprender mais do que eu esperava e também fazer novos amigos: **João Pedro Tôrres, Ildefonso Alves, Theresa Ramalho, Nayara Pereira e Ana Chiacetti**, aos quais agradeço pelo agradável convívio e por sempre estarem dispostos a ajudar. Sem dúvida, eu não poderia deixar de fazer um agradecimento especial à especialista de laboratório, **Marlise B. A. Montes**, sem ela não teria sido possível fazer todos*

os experimentos in vivo em tão pouco tempo. Além de adorável e gentil, é uma excelente profissional, que trabalha muito e o tempo todo. Muito obrigada, Marlise! Por ter conseguido reservar tanto tempo para os nossos experimentos, pelos ensinamentos e por toda a ajuda e parceria;

*Agradeço ao pesquisador **Fábio Carlos Magnoli**, pela purificação das toxinas do veneno, etapa crucial para o desenvolvimento do segundo capítulo desta tese, bem como pelo agradável convívio e aprendizado;*

*Ao **Dr. Anderson de Sá Nunes**, por gentilmente ter nos ajudado com os experimentos de permeabilidade vascular;*

*À **Dra. Denise Tambourgi**, por ter aberto as portas do Laboratório de Imunoquímica e por fornecer toda a estrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho;*

*Ao **Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant'anna**, por ser sempre uma inspiração;*

*Aos amigos, alunos e funcionários do **Laboratório de Imunoquímica** – Instituto Butantan: **Alécio Rodrigues, Ana Cláudia, Ana Freire, Ana Tung, Carla Squaiella, Daiane Silva, Elaine Rodrigues, Giuliano Bonfá, Isadora Villas-Boas, Joaquim Martins, Jorge Mário da Costa, Lia Aguiar, Márcia Franco, Osmair Elder da Silva, Priscila Hess, Rosana Shoji, Severino Ramos, Thiago Leonel**; aos “Wilmetes”: **Felipe Guidolin, Kemily Godoi e Marcos Jorge Magalhães**; e ao recém-chegado, **Luiz Sardinha**; obrigada por todas as conversas agradáveis, apoio e companhia. Vocês estarão sempre no meu coração;*

*Ao meu amigo, **Felipe França**, meu agradecimento especial por todas as conversas sobre veneno e inflamação, nossa paixão; pelas muitas e grandes risadas, pelo carinho e por ser essa pessoa de personalidade marcante que eu adoro!*

*Especialmente também agradeço ao **Guilherme Yoshikawa**, pela amizade, por ser uma pessoa agradável que alegra a todos e, também, por ter emprestado por um bom tempo o seu note; me ajudou muito Gui, obrigada!*

Agradeço à **Dra. Catarina Pereira Teixeira** pela gentileza em nos emprestar um kit para a dosagem de PGE_2 ;

À secretária da pós-graduação, **Maria Eni do Sacramento**, agradeço pelo auxílio contínuo e pelo carinho;

Agradeço à minha mãe, **Josefa Alice Amadeu**, pelo amor incondicional e esforços dedicados à nossa família, sem ela eu não conseguiria chegar até aqui. Me inspiro em sua garra, força e amor para continuar trilhando meu caminho; quero te dar muito orgulho e retribuir tudo o que a senhora é e faz por todos nós. Eu te amo de uma maneira que sou incapaz de descrever em palavras;

Ao meu melhor amigo e esposo, e por muita sorte minha, também meu companheiro de laboratório desde a graduação, **Joel José Megale Gabrili**, que aflora o melhor de mim. Caminhar ao seu lado é um presente! Sempre agradeço a Deus e a vida por ter você. Obrigada por me amar, me respeitar e me apoiar em todas as decisões. Quero ser para você tão maravilhosa quanto você é para mim. Eu te amo infinito...

Às minhas amadas irmãs, **Ana Paula** e **Ana Cristina**, obrigada por sempre terem cuidado de mim, por estarem ao meu lado, por terem nos presenteado com nossos anjinhos: **Mateus**, **Yasmim** e **Larissa** e por terem me dado dois irmãos: **Francisco** e **Joely**. Agradeço muito o constante apoio e carinho. Amo muito vocês;

À minha tia querida, **Severina Alice da Conceição**, agradeço por todo seu amor e carinho. Te amo!

Às minhas amigas: **Camila**, **Micheli**, **Giselle**, **Thalita** e **Andressa**, que compartilham comigo, desde a adolescência, momentos bons e ruins, os quais nos fizeram amadurecer e nos tornar cada vez mais companheiras de vida; que me entendem, me apoiam e me alegram. Nossa amizade me traz a leveza que uma amizade sincera deve ter, que recarrega as energias e me faz sentir imensamente grata e sortuda por tê-las em minha vida. Amo vocês;

Agradeço a **Deus** por ter me dado força e sabedoria para a conclusão desta tese, na qual pude aprimorar meus conhecimentos científicos na busca da compreensão dos processos

biológicos envolvidos no envenenamento. Defender esta tese e ter aprendido tanto ao longo destes últimos quatro anos foi uma satisfação e, com certeza, um grande sonho realizado;

Finalmente, agradeço o apoio financeiro da FAPESP (CeTICS, nº 2013/07467-1), do CNPQ (nº 301853/2017-7), da CAPES (PROEX-ICB-USP) e da Fundação Butantan, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

“Na vida, não existe nada a temer; mas a entender”

Marie Curie

RESUMO

MEGALE, Ângela Alice Amadeu. **Propriedades inflamatórias do veneno da serpente *Bitis arietans*: contribuição dos mediadores lipídicos no envenenamento *in vivo* e ação de toxinas isoladas do veneno em macrófagos humanos**. 2019. 203 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bitis arietans é uma serpente de importância médica encontrada em toda a África subsaariana e em savanas e pastos do Marrocos e da Arábia ocidental. O envenenamento é caracterizado por reações locais e sistêmicas, incluindo inflamação e distúrbios hemostáticos e cardiovasculares, os quais podem levar a morte ou incapacidades permanentes. No entanto, o mecanismo subjacente ao envenenamento é pouco explorado, especialmente com relação ao envolvimento do processo inflamatório, tornando-se justificáveis a caracterização dos componentes e o modo de ação deste veneno. Portanto, o presente trabalho teve como um dos objetivos estudar as reações agudas promovidas pelo veneno da serpente *B. arietans* e a contribuição dos mediadores lipídicos para estes eventos. Em modelo de peritonite, o veneno induziu inflamação *in vivo*, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal, acompanhados pela produção dos eicosanoides LTB₄, LTC₄, TXB₂ e PGE₂, bem como pela produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1. Devido à hemorragia, é possível que outros componentes plasmáticos, como as plaquetas, tenham extravasado para a cavidade. A partir de intervenções farmacológicas e uso de camundongos *knockout*, este estudo mostrou que os mediadores lipídicos interferem de maneira significativa nestes eventos. A inibição da geração de leucotrienos não é suficiente para atenuar a inflamação aguda. Por outro lado, prostanoídes metabolizados por COX-1, possivelmente o TXB₂, contribuem para o aumento do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal. Ao passo que animais deficientes do receptor do PAF (PAFR^{-/-}) apresentaram redução tanto do número de leucócitos PMNs, quanto da produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1. Os fármacos utilizados para a inibição destes mediadores podem contribuir de maneira positiva e, sobretudo, complexa no controle das reações agudas provocadas pelo veneno. Além disso, os mediadores lipídicos parecem estar envolvidos com a modulação da hemorragia local. Paralelamente, foram purificadas e caracterizadas uma serino protease (SVSP), fibrinogenolítica e cininogenolítica, bem como uma metaloprotease (SVMP), fibrinogenolítica e capaz de hidrolisar a fibronectina, as quais podem estar envolvidas com a hemorragia e distúrbios cardiovasculares e com o dano tecidual provocado pelo veneno. Em macrófagos humanos, a SVSP induziu a produção de TNF, IL-6 e IL-1β, além das quimiocinas IL-8, IP-10, MCP-1 e RANTES, potentes mediadores inflamatórios. Por outro lado, a SVMP induziu a produção de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória, além de IL-1β, IL-8, MCP-1 e RANTES, embora em níveis significativamente menores que a SVSP. Nos macrófagos, o veneno induziu a produção de TNF, IL-1β e PGE₂. Em conjunto, os dados indicam que: 1) o veneno de *B. arietans* é capaz de induzir inflamação e hemorragia *in vivo*, as quais são parcialmente moduladas pelos mediadores lipídicos; 2) a SVSP purificada do veneno é importante para a indução da resposta inflamatória; e 3) que os macrófagos são uma importante fonte dos mediadores inflamatórios induzidos tanto pelo veneno, quanto pela SVSP. Deste modo, os resultados obtidos auxiliam na compreensão dos mecanismos envolvidos no envenenamento e podem ser úteis para o estudo de novas terapias complementares ao antiveneno no tratamento dos acidentes por *B. arietans*, uma vez que a inflamação e a hemorragia desempenham um papel importante no envenenamento e contribuem para o agravamento dos sintomas.

Palavras-chave: *Bitis arietans*. Veneno. Inflamação. Mediadores lipídicos. Toxinas purificadas.

ABSTRACT

MEGALE, Ângela Alice Amadeu. **Inflammatory properties of the *Bitis arietans* snake venom: contribution of lipid mediators in vivo envenomation and the action of toxins purified from the venom upon human macrophages.** 2019. 203 p. Thesis (Ph. D in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Bitis arietans is a medical importance snake found throughout sub-Saharan Africa and in savannas and pastures of Morocco and western Arabia. The envenomation is characterized by local and systemic reactions, including inflammation as well as hemostatic and cardiovascular disturbances, which can lead the victims to death or permanent disabilities. However, the mechanism underlying the envenomation is unclear, especially regarding to the involvement of the inflammatory process, justifying the characterization of components and the mode of action of this venom. Therefore, the present work had as one of the aim to study the acute reactions promoted by *B. arietans* snake venom and the contribution of lipid mediators for these events. In the peritonitis model, the venom induced in vivo inflammation, characterized by increased vascular permeability and the number of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in the peritoneal cavity, accompanied by the production of the eicosanoids LTB₄, LTC₄, TXB₂ and PGE₂, as well as the local and systemic production of IL -6 and MCP-1. Due to hemorrhage, it is possible that other plasma components, such as platelets, have leaked out into the cavity. By pharmacological interventions and use of knockout mice, this study showed that lipid mediators significantly interfere in these events. Inhibition of leukotriene generation is not sufficient to attenuate acute inflammation. On the other hand, prostanoids metabolized by COX-1, possibly TXB₂, contribute to the increase of PMN leukocytes number in the peritoneal cavity. While PAF receptor deficient mice (PAFR^{-/-}) showed a reduction in both the PMN leukocytes number and the local and systemic production of IL 6 and MCP-1. The drugs used for the inhibition of these mediators can contribute in a positive and, above all, complex way in the control of the acute reactions provoked by the venom. In addition, lipid mediators seem to be involved in the modulation of local hemorrhage. In parallel, a serine protease (SVSP), fibrinogenolytic and kininogenolytic, as well as a metalloproteinase (SVMP), fibrinogenolytic and capable of hydrolyzing fibronectin, were purified and characterized, which may be involved in the hemorrhage and cardiovascular disorders and tissue damage promoted by the venom. In human macrophages, SVSP induced the production of TNF, IL-6 and IL-1 β , besides the chemokines IL-8, IP-10, MCP-1 and RANTES, potent inflammatory mediators. On the other hand, the SVMP induced the production of IL-10, an important anti-inflammatory cytokine, as well as IL-1 β , IL-8, MCP-1 and RANTES, though at lower levels than SVSP. In macrophages, the venom induced the production of TNF, IL-1 β and PGE₂. Taken together, the data indicate that: 1) *B. arietans* venom promoted inflammation and local hemorrhage in vivo, which are partially modulated by lipid mediators; 2) the SVSP purified from the venom is important for the induction of this inflammatory response; and 3) macrophages are an important source of inflammatory mediators induced by both venom and SVSP. Therefore, the obtained results help in understanding of the mechanisms involved in the envenomation and can be useful for the study of new complementary therapies to the antivenom in the treatment of *B. arietans* accidents, since inflammation and hemorrhage play an important role in envenomation and contribute to the worsening of symptoms.

Keywords: *Bitis arietans*. Venom. Inflammation. Lipid mediators. Purified toxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vital Brazil Mineiro da Campanha: Um dos grandes nomes da Ciência Brasileira	26
Figura 2 - Distribuição das principais serpentes do gênero <i>Bitis</i> no continente africano	31
Figura 3 - Espécimes de <i>Bitis arietans</i>	32
Figura 4 - Acidentes causados por <i>Bitis arietans</i>	34
Figura 5 - Paciente acidentada com espécime de <i>B. arietans</i> mantida em cativeiro	34
Figura 6 - Ulceração extensa no membro acidentado	35
Figura 7 - Aumento da permeabilidade vascular em camundongos 129 SvE	68
Figura 8 - Contagem de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE	69
Figura 9 - O veneno de <i>B. arietans</i> promove aumento da expressão gênica de IL-6, IL-1 β , COX-1, COX-2 e 5-LO em camundongos 129 SvE	70
Figura 10 - Produção de eicosanoides na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE	71
Figura 11 - Produção de citocinas e quimiocinas na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE	72
Figura 12 - Detecção de IL-6 e MCP-1 no plasma de camundongos 129 SvE	72
Figura 13 - Hemorragia na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE	73
Figura 14 - Contagem de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6	74
Figura 15 - O veneno de <i>B. arietans</i> estimula o aumento da expressão gênica de IL-6, IL-1 β , COX-1 e COX-2 em camundongos C57BL/6	75
Figura 16 - Produção de eicosanoides na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6	76
Figura 17 - Produção de citocinas e quimiocinas na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6	77
Figura 18 - Concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1 em camundongos C57BL/6	77
Figura 19 - Hemorragia na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6	78
Figura 20 - Produção de eicosanoides após tratamento com MK-886	79
Figura 21 - O tratamento com MK-886 diminui o número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal	80
Figura 22 - O tratamento com MK-886 reduziu a produção local de IL-6 e MCP-1	81
Figura 23 - O tratamento com MK-886 reduziu a concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1	81
Figura 24 - O tratamento com MK-886 aumentou a hemorragia local	82
Figura 25 - Os animais 5-LO ^{-/-} têm permeabilidade vascular elevada	82

Figura 26 - Nos animais deficientes da enzima 5-LO não houve diminuição do número de leucócitos na cavidade peritoneal	83
Figura 27 - Não há diferença significativa na produção local de IL-6 e MCP-1 nos animais deficientes de 5-LO	84
Figura 28 - Os animais 5LO ^{-/-} têm mais IL-6 e MCP-1 sistêmica	85
Figura 29 - Expressão gênica da enzima 5LO	86
Figura 30 - Produção de eicosanoides nos animais deficientes de 5-LO	86
Figura 31 - A hemorragia na cavidade peritoneal induzida pelo veneno é maior em animais deficientes da enzima 5-LO	87
Figura 32 - Produção de eicosanoides após tratamento com WEB-2086	88
Figura 33 - O tratamento com WEB-2086 não alterou o número de leucócitos na cavidade peritoneal	89
Figura 34 - O tratamento com WEB-2086 diminui a produção local de IL-6	90
Figura 35 - O tratamento com WEB-2086 diminui a concentração sistêmica de IL-6	90
Figura 36 - O tratamento com WEB-2086 não alterou a hemorragia local.....	91
Figura 37 - A quantidade de leucócitos encontrados na cavidade peritoneal após o estímulo com o veneno é parcialmente dependente de ligantes de PAFR	92
Figura 38 - A produção local de IL-6 e MCP-1 é parcialmente dependente de ligantes do PAFR	93
Figura 39 - A concentração sistêmica de IL-6 é parcialmente dependente de ligantes do PAFR	94
Figura 40 - A hemorragia na cavidade peritoneal é atenuada em animais PAFR ^{-/-}	95
Figura 41 - Produção de eicosanoides após tratamento com indometacina	96
Figura 42 - Produção de PGE ₂ em 4 h após tratamento com indometacina.....	96
Figura 43 - O tratamento com indometacina reduz o número de leucócitos na cavidade peritoneal	97
Figura 44 - O tratamento com indometacina reduz a produção local de IL-6.....	98
Figura 45 - O tratamento com indometacina reduz a concentração sistêmica de IL-6	98
Figura 46 - O tratamento com indometacina acentua a hemorragia local.....	99
Figura 47 - Expressão proteica de COX-1/2 nas células peritoneais	100
Figura 48 - Houve redução do número de leucócitos na cavidade peritoneal após o tratamento com SC-560.....	101
Figura 49 - O tratamento com SC-560 não alterou a produção local de IL-6 e MCP-1	102

Figura 50 - O tratamento com SC-560 não alterou a concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1	102
Figura 51 - A hemorragia na cavidade peritoneal induzida pelo veneno não aumentou após o tratamento com SC-560	103
Figura 52 - Componentes do veneno da serpente <i>Bitis arietans</i>	115
Figura 53 - Perfil eletroforético do veneno de <i>Bitis arietans</i>	134
Figura 54 - Perfil cromatográfico do veneno de <i>Bitis arietans</i>	135
Figura 55 - Inibição seletiva da atividade proteolítica das frações do veneno	137
Figura 56 - Perfil cromatográfico da fração três isolada do veneno de <i>Bitis arietans</i>	138
Figura 57 - Inibição da atividade proteolítica de F3-1	140
Figura 58 - Perfil eletroforético de F3-1, a SVSP purificada do veneno de <i>B. arietans</i>	140
Figura 59 - Identificação da SVSP por espectrometria de massas	141
Figura 60 - Neutralização da atividade proteolítica da SVSP com antiveneno experimental	142
Figura 61 - Clivagem do fibrinogênio humano pela SVSP	143
Figura 62 - Clivagem do peptídeo homólogo ao cininogênio pela Kn-Ba, a SVSP purificada do veneno de <i>Bitis arietans</i>	144
Figura 63 - Perfil cromatográfico da fração cinco isolada do veneno de <i>Bitis arietans</i>	145
Figura 64 - Inibição da atividade proteolítica de F5-4	146
Figura 65 - Perfil eletroforético de F5-4, a SVMP purificada do veneno de <i>B. arietans</i>	147
Figura 66 - Identificação da SVMP por espectrometria de massas	148
Figura 67 - Neutralização da atividade proteolítica da SVMP com antiveneno experimental	149
Figura 68 - Clivagem do fibrinogênio humano pela SVMP	150
Figura 69 - Clivagem da fibronectina humana pela SVMP	151
Figura 70 - Diferenciação de pré-monócitos THP-1 em macrófagos	153
Figura 71 - Expressão de CD11b em macrófagos diferenciados	153
Figura 72 - Produção de citocinas em macrófagos humanos tratados com o veneno de <i>B. arietans</i>	155
Figura 73 - Produção de citocinas em macrófagos humanos tratados com a SVSP purificada do veneno de <i>B. arietans</i>	157
Figura 74 - Produção de citocinas em macrófagos humanos tratados com a SVMP purificada do veneno de <i>B. arietans</i>	158

Figura 75 - Comparação das citocinas produzidas em resposta às maiores doses de veneno, SVSP e SVMP purificadas	159
Figura 76 - Produção de quimiocinas em macrófagos humanos tratados com o veneno de <i>B. arietans</i>	161
Figura 77 - Produção de quimiocinas em macrófagos humanos tratados com a SVSP purificada do veneno de <i>B. arietans</i>	162
Figura 78 - Produção de quimiocinas em macrófagos humanos tratados com a SVMP purificada do veneno de <i>B. arietans</i>	163
Figura 79 - Comparação das quimiocinas produzidas em resposta às maiores doses de veneno, SVSP e SVMP purificadas.....	164
Figura 80 – Produção de PGE ₂ em macrófagos humanos tratados com as maiores doses de veneno, SVSP e SVMP purificadas.....	165
Figura 81 – Hemograma de animais C57BL/6 tratados com o veneno.....	200

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Distribuição das principais serpentes de interesse médico no continente africano e Oriente Médio	30
Tabela II - Rendimento e atividade proteolítica das frações do veneno sobre substratos FRET	136
Tabela III - Atividade proteolítica e rendimento das subfrações de F3	139
Tabela IV - Atividade proteolítica e rendimento das subfrações de F5	146
Tabela V - Resumo do processo de purificação e rendimento das proteínas de interesse....	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\times g$	Força g
5-LO	Enzima 5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AAG	Molécula análoga ao diacilglicerol
AAS	Ácido acetilsalicílico
Abz	Ácido O-aminobenzoico
ADAMs	Proteínas com domínio disintegrina e metaloproteinase (do inglês: <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>)
APCs	Células apresentadoras de antígeno (do inglês: <i>antigen-presenting cells</i>)
BPPs	Peptídeos potenciadores de bradicinina (do inglês: <i>bradykinin-potentiating peptides</i>)
cDNA	DNA complementar (<i>chromatography</i>)
Cn	Cininogênio
COX-1/2	Enzimas ciclo-oxigenases 1 e 2
CYP	Citocromo P450
Da	Dálton
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos (do inglês: <i>damage-associated molecular patterns</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDDnp	N-(2,4-dinitrofenil)-etilenodiamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>ethylene diamine tetracetic acid</i>)
EET	Ácido epoxieicosatrienoico (do inglês: <i>epoxyeicosatrienoic acid</i>)
F(ab') ₂	Fragmento de ligação ao antígeno oriundo de anticorpos submetidos a digestão com pepsina
Fc	Fibronectina
FDR	Taxa de falsas descobertas (do inglês: <i>false discovery rate</i>)
FLAP	Proteína ativadora de 5-LO (do inglês: <i>5-LO activating protein</i>)
Fn	Fibrinogênio

FRET	Substrato de supressão intramolecular de fluorescência (do inglês: <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G (do inglês: <i>G protein-coupled receptors</i>)
HETE	Ácido hidroxiieicosatetraenoico (do inglês: <i>hydroxyeicosatetraenoic acid</i>)
HPETE	Ácido hidroperoxiieicosatetraenoico (do inglês: <i>hydroperoxyeicosatetraenoic acid</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês: <i>High performance liquid chromatography</i>)
HX	Hepoxilinas
Indometacina	Inibidor não-seletivo de COX-1 e 2
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida (do inglês: <i>inducible nitric-oxide synthase</i>)
LDH	Lactato desidrogenase
LOX	Lipoxigenase
LTA ₄ H	LTA ₄ hidrolase
LTC ₄ S	LTC ₄ sintase
LTQ	Quadrupolo de armadilha linear (do inglês: <i>linear trap</i>)
LTs	Leucotrienos
LX	Lipoxina
MK-886	Inibidor da proteína ativadora de 5-LO (FLAP)
MMP	Metaloprotease de matriz (do inglês: <i>matrix metalloprotease</i>)
MNs	Leucócitos mononucleares
MS	Espectrometria de massas (do inglês: <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem (do inglês: <i>tandem MS</i>)
Nimesulide	Inibidor seletivo de COX-2
nLC	Cromatografia nano-líquida (do inglês: <i>nano-liquid</i>)
NLR	Receptores do tipo NOD (do inglês: <i>Nod-like receptors</i>)
NO	Óxido nítrico (do inglês: <i>nitric oxide</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas (do inglês: <i>platelet-activating factor</i>)
PAF-AHs	PAF-acetilhidrolases
PAFR	Receptor do PAF

PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês: <i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>)
PGI	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PHE	1,10 Fenantrolina (do inglês: <i>1,10-phenanthroline</i>)
PLA ₂	Fosfolipase A ₂ (do inglês: <i>phospholipase A₂</i>)
PLT	Plaquetas
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato (do inglês: <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PMNs	Leucócitos polimorfonucleares
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês: <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PPARs	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (do inglês: <i>peroxisome proliferator-activating receptors</i>)
PRRs	Receptor de reconhecimento de padrões (do inglês: <i>pattern-recognition receptors</i>)
qPCR	PCR quantitativo <i>quadropole</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
Rpm	Rotações por minuto
SC-560	Inibidor seletivo de COX-1
SD	Desvio padrão
SEM	Erro padrão
SFB	Soro fetal bovino
SVMP	Metaloprotease de veneno de serpente (do inglês: <i>snake venom metalloprotease</i>)
SVSP	Serino protease de veneno de serpente (do inglês: <i>snake venom serine protease</i>)
TLEs	Enzimas semelhantes a trombina (do inglês: <i>thrombin-like enzymes</i>)
TLRs	Receptores do tipo Toll (do inglês: <i>Toll-like receptors</i>)
TXs	Tromboxanos
VAMPs	Padrões moleculares associados a venenos (do inglês: <i>venom-associated molecular patterns</i>)
WEB-2086	Antagonista do receptor do PAF

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	26
1.1 Ofidismo e saúde pública	27
1.2 Serpentes africanas	29
1.2.1 O gênero <i>Bitis</i> spp.	30
1.3 <i>Bitis arietans</i>	32
1.3.1 Patogênese do envenenamento	33
1.3.2 Tratamento	36
CAPÍTULO 1 - Contribuição da resposta inflamatória para a patologia do envenenamento por serpentes	38
1.1 INTRODUÇÃO	38
1.1.1 Inflamação	38
1.1.2 Mediadores lipídicos	42
1.1.2.1 Eicosanoides	42
1.1.2.1.1 Prostanoides	43
1.1.2.1.2 Leucotrienos	47
1.1.2.2 Fator ativador de plaquetas	49
1.1.3 Venenos de viperídeos e inflamação	51
1.2 OBJETIVO	58
1.2.1 Objetivos específicos	58
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	59
1.3.1 Veneno	59
1.3.1.1 Dosagem protéica pelo método BCA	59
1.3.1.2 Análise da presença de endotoxina	59
1.3.2 Animais	60
1.3.3 Inoculação de veneno e obtenção de sangue e do exsudato peritoneal	60
1.3.3.1 Análises no exsudato peritoneal	61
1.3.3.1.1 Contagem total e diferencial de leucócitos	61
1.3.3.1.2 Dosagem de hemoglobina	62
1.3.3.1.3 Extração de RNA e PCR quantitativo	62
1.3.3.1.4 Western Blotting para análise da expressão proteica de COX-1/2	63
1.3.3.1.5 Dosagem de mediadores lipídicos	64
1.3.3.1.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas	64

1.3.3.2 Dosagem de IL-6 e MCP-1 no plasma	65
1.3.4 Avaliação do aumento da permeabilidade vascular	65
1.3.5 Intervenções farmacológicas.....	65
1.3.5.1 Preparo dos inibidores utilizados nos tratamentos	66
1.3.6 Análise estatística.....	66
1.4 RESULTADOS	67
1.4.1 Perfil inflamatório induzido pelo veneno de <i>B. arietans</i>	67
1.4.1.1 Análise da permeabilidade vascular, aumento de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios na cavidade peritoneal	67
1.4.2 Contribuição dos mediadores lipídicos no envenenamento.....	78
1.4.2.1 Contribuição dos leucotrienos no envenenamento.....	79
1.4.2.2 Contribuição do PAFR e seus ligantes no envenenamento	87
1.4.2.3 Contribuição dos prostanoídes no envenenamento	95
1.4.2.3.1 Contribuição de COX-1 no envenenamento.....	99
1.5 DISCUSSÃO	104
1.6 CONCLUSÃO.....	113
CAPÍTULO 2 - Purificação e caracterização de toxinas do veneno e avaliação dos efeitos pró-inflamatórios sobre macrófagos humanos	114
2.1 INTRODUÇÃO	114
2.1.1 Composição do veneno	114
2.1.1.1 Metaloproteases	116
2.1.1.2 Serinoproteases	118
2.1.1.3 Ação de toxinas isoladas de veneno sobre células do sistema imune	120
2.2 OBJETIVOS	122
2.2.1 Objetivo geral.....	122
2.2.2 Objetivos específicos.....	122
2.2.2.1 Obtenção das toxinas purificadas	122
2.2.2.2 Avaliação do efeito das toxinas purificadas sobre o processo inflamatório.....	122
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	123
2.3.1 Veneno	123
2.3.2 Análise da presença de endotoxina no veneno e toxinas purificadas.....	123
2.3.3 Antiveneno.....	123
2.3.4 Fracionamento do veneno	124
2.3.4.1 Isolamento de toxinas do veneno por cromatografia de exclusão molecular	124

2.3.4.1.1 Dosagem protéica pelo método de BCA	125
2.3.4.1.2 Perfil eletroforético do veneno e das frações obtidas	125
2.3.5 Atividade enzimática das frações obtidas por cromatografia	125
2.3.5.1 Atividade proteolítica sobre substratos FRET	125
2.3.5.2 Inibição da atividade proteolítica com inibidores seletivos.....	126
2.3.6 Purificação das toxinas de interesse.....	126
2.3.7 Validação das toxinas purificadas.....	127
2.3.7.1 Atividade proteolítica sobre substratos FRET	127
2.3.7.2 Inibição da atividade proteolítica com inibidores seletivos.....	127
2.3.7.3 Análise do perfil eletroforético.....	127
2.3.7.4 Inibição da atividade proteolítica com antiveneno	127
2.3.7.5 Identificação das toxinas purificadas por espectrometria de massas	128
2.3.7.6 Atividade proteolítica das toxinas purificadas sobre substratos biologicamente ativos	128
2.3.7.6.1 Clivagem do fibrinogênio humano.....	128
2.3.7.6.2 Clivagem do peptídeo sintético homólogo ao cininogênio pela SVSP purificada ..	129
2.3.7.6.3 Clivagem da fibronectina humana pela SVMP purificada	129
2.3.8 Ação da SVSP e da SVMP purificadas sobre macrófagos humanos	130
2.3.8.1 Cultura de pré-monócitos humanos da linhagem THP-1	130
2.3.8.2 Diferenciação das células THP-1 com PMA.....	130
2.3.8.2.1 Expressão de CD11b nos macrófagos diferenciados.....	130
2.3.8.3 Tratamento dos macrófagos com a SVSP e a SVMP purificadas e com o veneno de <i>B. arietans</i>	131
2.3.8.4 Viabilidade pelo método de LDH	131
2.3.8.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas	132
2.3.8.6 Quantificação de mediadores lipídicos	133
2.3.9 Análise estatística.....	133
2.4 RESULTADOS	134
2.4.1 Análise eletroforética e fracionamento do veneno de <i>Bitis arietans</i> e caracterização de componentes com atividade enzimática.....	134
2.4.1.1 Análise do perfil eletroforético do veneno	134
2.4.1.2 Fracionamento do veneno	134
2.4.1.3 Rendimento e atividade proteolítica das frações do veneno de <i>Bitis arietans</i>	135
2.4.1.4 Inibição seletiva da atividade proteolítica das frações do veneno de <i>Bitis arietans</i> ..	136

2.4.2 Purificação e identificação de uma serino protease do veneno de <i>Bitis arietans</i> ...	138
2.4.2.1 Segunda etapa de cromatografia da fração 3: obtenção da SVSP purificada.....	138
2.4.2.1.1 <u>Rendimento e atividade proteolítica das subfrações de F3</u>	139
2.4.2.1.2 <u>Inibição da atividade proteolítica de F3-1</u>	139
2.4.2.1.3 <u>Perfil eletroforético de F3-1</u>	140
2.4.2.2 <u>Identificação da serino protease (SVSP) por espectrometria de massas</u>	141
2.4.2.3 <u>Neutralização da atividade proteolítica da SVSP purificada com antiveneno</u>	142
2.4.2.4 <u>Atividade da SVSP purificada sobre substratos fisiológicos</u>	143
2.4.2.4.1 <u>Atividade da SVSP sobre o fibrinogênio humano: distúrbios hemostáticos</u>	143
2.4.2.4.2 <u>Atividade da SVSP sobre o peptídeo homólogo ao cininogênio: liberação de cininas vasodilatadoras</u>	144
2.4.3 Purificação e identificação de uma metaloprotease do veneno de <i>Bitis arietans</i> ...	144
2.4.3.1 Segunda etapa de cromatografia da fração 5: obtenção da SVMMP purificada	144
2.4.3.1.1 <u>Rendimento e atividade proteolítica das subfrações de F5</u>	145
2.4.3.1.2 <u>Inibição da atividade proteolítica de F5-4</u>	145
2.4.3.1.3 <u>Perfil eletroforético de F5-4</u>	146
2.4.3.2 <u>Identificação da metaloprotease (SVMMP) por espectrometria de massas</u>	147
2.4.3.3 <u>Neutralização da atividade proteolítica da SVMMP purificada com antiveneno</u>	148
2.4.3.4 <u>Atividade da SVMMP purificada sobre substratos fisiológicos</u>	150
2.4.3.4.1 <u>Atividade da SVMMP sobre o fibrinogênio humano: distúrbios hemostáticos</u>	150
2.4.3.4.2 <u>Atividade da SVMMP sobre a fibronectina humana: ação sobre componentes de matrix extracelular</u>	151
2.4.4 Resumo das etapas de purificação e rendimento das toxinas	151
2.4.5 Efeitos das toxinas purificadas sobre macrófagos humanos	152
2.4.5.1 <u>Cultivo das células THP-1 e processo de diferenciação dos macrófagos</u>	152
2.4.5.1.1 <u>Expressão de CD11b nos macrófagos</u>	153
2.4.5.2 <u>Citotoxicidade sobre macrófagos humanos</u>	154
2.4.5.3 <u>Produção de citocinas inflamatórias</u>	154
2.4.5.4 <u>Produção de quimiocinas</u>	160
2.4.5.5 <u>Produção de PGE₂ e LTB₄</u>	165
2.5 DISCUSSÃO	166
2.6 CONCLUSÃO	173
CONCLUSÃO GERAL	174
REFERÊNCIAS	175

APÊNDICE A 197

APÊNDICE B..... 198

APÊNDICE C 199

ANEXO A..... 201

ANEXO B..... 202

ANEXO C..... 203

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do perfil inflamatório induzido pelo veneno da serpente africana *Bitis arietans*", protocolada sob o CEUA nº 4669091117, sob a responsabilidade de **Wilmar Dias da Silva e equipe; Ângela Alice Amadeu Megale; Marlise Bonetti Agostinho Montes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 05/12/2017.

We certify that the proposal "Characterization of Inflammatory profile induced by african *Bitis arietans* snake venom", utilizing 160 Isogenics mice (160 females), protocol number CEUA 4669091117, under the responsibility of **Wilmar Dias da Silva and team; Ângela Alice Amadeu Megale; Marlise Bonetti Agostinho Montes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 12/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **36 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	129 SvE	Idade ou peso:	20 a 22 g
		N amostral:	40
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	129 SvE ALOX 5	Idade ou peso:	20 a 22 g
		N amostral:	40
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6	Idade ou peso:	20 a 22 g
		N amostral:	40
Origem:	Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6 PAFR	Idade ou peso:	20 a 22 g
		N amostral:	40

São Paulo, 05 de dezembro de 2017

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

PREFÁCIO

O envenenamento por serpentes é um problema de saúde pública que afeta, especialmente, áreas rurais de países da África, Ásia, Oceania e América Latina. A Organização Mundial de Saúde classifica estes acidentes como doenças tropicais negligenciadas, devido à elevada ocorrência nas comunidades mais pobres e marginalizadas e, conseqüentemente, com pouca voz política. Na África, uma das principais serpentes de importância médica é a *Bitis arietans*, devido sua ampla distribuição e gravidade do envenenamento. No entanto, apesar da relevância dos acidentes, o mecanismo subjacente ao envenenamento é pouco explorado, especialmente com relação ao envolvimento do processo inflamatório, tornando-se justificáveis a caracterização dos componentes e o modo de ação deste veneno. Portanto, este trabalho teve como objetivo elucidar as reações inflamatórias agudas promovidas pelo veneno, incluindo a contribuição de mediadores endógenos, bem como a ação de toxinas isoladas do veneno sobre células do sistema imune.

Para melhor compreensão, este trabalho conta com uma introdução geral sobre a epidemiologia dos envenenamentos ofídicos, com ênfase na patologia do envenenamento pela serpente *Bitis arietans*, seguido por dois capítulos: o capítulo 1 que apresenta os estudos *in vivo* com o veneno e a participação de mediadores endógenos nestes eventos; e o capítulo 2 que apresenta a purificação e caracterização de duas toxinas isoladas do veneno e seus efeitos pró-inflamatórios sobre macrófagos humanos, o qual é seguido por uma conclusão geral. Ao final do trabalho, constam nos apêndices a publicação decorrente da purificação e caracterização da serino protease do veneno, bem como o trabalho no qual um anticorpo monoclonal anti-PLA₂ de *B. arietans* foi produzido e caracterizado.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde sua criação, o Instituto Butantan (1901, São Paulo, Brasil) e o Instituto Vital Brazil (1919, Niterói, Brasil), ambos fundados pelo médico e sanitarista brasileiro Vital Brazil Mineiro da Campanha (1865-1950), investem esforços substanciais para o estudo de toxinas animais de interesse médico (Figura 1). São instituições consideradas referenciais de excelência na formação de pesquisadores, produção de medicamentos e divulgação e popularização de ciência no país. Responsável pela descoberta da especificidade dos soros antivenenos e sempre preocupado com a saúde pública, ao receber a patente deste projeto em 1917, o Dr. Vital Brazil decidiu imediatamente doá-la ao governo brasileiro.^{1,2}

O Instituto Butantan foi o primeiro produtor de soros antivenenos da América Latina e estimulou o avanço de pesquisas na área do ofidismo.³ Até os dias atuais, nenhum método de neutralização de peçonha é mais eficaz do que o proposto por Vital Brazil em 1898; contudo, os antivenenos não são capazes de neutralizar todos os efeitos do envenenamento. Portanto, cabe aos pesquisadores em atividade compreenderem a composição dos venenos, bem como suas atividades biológicas, visando expandir o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais as toxinas do veneno geram danos e, desta forma, aprimorar a qualidade dos antivenenos e terapias de suporte, que desde o final do século XIX, salvam inúmeras vidas.

Figura 1 – Vital Brazil Mineiro da Campanha: Um dos grandes nomes da Ciência Brasileira

Formado em medicina pela Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro em 1891, o médico e pesquisador Vital Brazil (A) após suas missões sanitárias no interior de São Paulo, ingressou no Instituto Bacteriológico (atual Adolfo Lutz) em 1897. Atuou no diagnóstico e combate da peste bubônica na cidade de Santos, onde contraiu e se curou da doença. Em dezembro de 1899, iniciou a implantação de um laboratório para produção de soro “antipestoso” em um velho rancho na então distante Fazenda Butantan, atual Instituto Butantan, fundado em 1901. Nesta época, Vital Brazil já possuía estudos avançados sobre o problema do ofidismo e tratamento soroterápico (B).^{2,4}

1.1 Ofidismo e saúde pública

O ofidismo é considerado um grave problema de saúde pública, afetando indivíduos em praticamente todo o mundo. Embora a maioria dos acidentes envolvendo animais peçonhentos seja causada por picadas de insetos, aranhas e escorpiões, 80% das mortes são decorrentes de envenenamentos por serpentes, seguida por picadas de escorpiões, responsáveis por 15% das mortes.⁵

Amplamente distribuídas, as serpentes são encontradas em quase todos os continentes, incluindo muitos rios e oceanos, com exceção apenas de algumas ilhas e ambientes congelados e com alta altitude.⁶ No entanto, em países subdesenvolvidos e com clima tropical e sub-tropical situados na África, Ásia, Oceania e América Latina, a incidência é maior, causando elevado índice de morbidade e mortalidade. Dentre eles, a maior taxa de mortalidade é encontrada no Sul e Sudoeste da Ásia e na África Subsaariana.⁷⁻⁹

O número total de casos é sempre uma estimativa, pois não se sabe ao certo a quantidade real. Dados de incidência confiáveis provêm de países desenvolvidos, cuja taxa de acidentes é mínima. Nas áreas mais atingidas há um grave problema de notificação, em virtude da elevada porcentagem de pacientes que optam pela medicina tradicional, praticada por indivíduos conhecidos como “*curandeiros*”, ou em decorrência de pacientes que morrem antes de serem submetidos a algum tratamento.^{7, 10} Por isso, estudos utilizam diferentes formas de quantificar os casos, baseando-se em registros hospitalares, em conjunto ou não com dados da literatura ou aplicação de estimativas baseadas nos dados recuperados, o que resulta em números consideravelmente distintos de acidentes.^{7, 10, 11} De maneira geral, dados epidemiológicos sobre envenenamentos devem considerar: a) espécie e comportamento do animal; b) hábitos e atividades da população local; c) abordagens terapêuticas; e d) acurácia na coleta e apresentação dos dados.¹⁰

De acordo com Kasturiratne (2008),⁷ empregando metodologia estatística aplicada a informações obtidas de 160 publicações extraídas de 68 países, no mundo estimam-se cerca de 400.000 envenenamentos por serpentes/ano. Destes, aproximadamente 20.000 vão a óbito. Todavia, considerando os casos não notificados, esses números podem chegar a mais de 1.800.000 envenenamentos e 94.000 mortes/ano. Nas áreas mais afetadas, conseqüentemente menos desenvolvidas, a alta taxa de morbidade e mortalidade se deve às condições precárias da saúde pública e ausência de antiveneno, o qual é o único tratamento específico. Como consequência, muitas vítimas sobrevivem com permanentes sequelas físicas e psicológicas, além de incapacidades para o trabalho.

Apenas na África subsaariana, por ano estimam-se, em média, cerca de 250 mil casos de envenenamentos por serpentes, dos quais 95% ocorrem em regiões rurais. Destes, a taxa de mortalidade gira em torno de 12 mil pessoas, podendo chegar até 32.000 mortes; ao passo que o número de amputações decorrentes das complicações do envenenamento ultrapassa os 9 mil casos. No entanto, devido aos problemas relacionados à notificação mencionados anteriormente, estima-se que o número real seja de três a cinco vezes maior.^{7, 10}

Estes acidentes acometem principalmente indivíduos jovens que desenvolvem atividades agrícolas, ocupação mais comum na maioria dos países africanos,⁵ o que resulta na incapacitação de muitos deles, seguido de consequente impacto financeiro pessoal, familiar e sobre a economia local. No entanto, devido à alta taxa de crianças na população africana, 30,5% e 61,4% dos casos são descritos em indivíduos do sexo masculino menores de 15 anos, em regiões urbanas e rurais, respectivamente. A maioria das picadas é localizada nos membros inferiores, 58,1%¹² a 76,2%¹⁰ dos casos, e a frequência geral de administração de antiveneno é de apenas 31,7%, com uma ampla variação de 0 a 100% de acordo com as políticas de saúde local. Embora muitos países da África Subsaariana não tenham acesso ao tratamento específico, ou em muitos casos fazem uso de antivenenos de baixa qualidade, a mortalidade é significativamente diminuída com sua administração, em torno de 2,8% contra em média 11.6% de mortes em indivíduos não tratados.^{10, 13}

Como dito, alguns países africanos não têm acesso aos antivenenos. Já em outros, como a África do Sul, o uso é restrito devido a alta porcentagem de efeitos adversos, podendo ocorrer em mais de 70 % dos casos dependendo da qualidade do antiveneno.^{14, 15} Em decorrência disso, por muito tempo, a utilização dos antivenenos caiu em desuso por se pensar que eles eram mais perigosos do que o próprio veneno. Felizmente, esta perspectiva tem mudado. Sabe-se que a baixa eficiência do tratamento se deve ao uso inadequado do soro antiofídico, com injeções intramusculares ou subcutâneas ou em quantidades insuficientes¹⁶ e, sobretudo, no caso da África, devido a contaminações e ao deficiente processo de purificação, bem como por não serem produzidos utilizando venenos de serpentes nativas.¹⁷

Apesar do alarmante número de envenenamentos e mortes decorrentes de picadas de serpentes, autoridades nacionais e internacionais de saúde não investem esforços suficientes para a resolução do problema.⁷ Deste modo, apesar de não ser uma doença infectocontagiosa, foi oportuna a inclusão do ofidismo, em junho de 2009, na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS).¹⁸

1.2 Serpentes africanas

As serpentes são predadores que evoluíram em paralelo com suas presas, o que levou ao desenvolvimento de muitos métodos de captura, dos quais o envenenamento é o mais especializado. Responsável pela captura, digestão e, também defesa, o aparato de inoculação de veneno consiste das presas, glândulas de veneno e do veneno, propriamente dito.¹⁹

As serpentes de interesse médico pertencem a quatro famílias: Elapidae, Viperidae, Colubridae e Atractaspididae,^{20, 21} no entanto, a maioria dos envenenamentos na África é decorrente de viperídeos (*Echis* sp. e *Bitis* spp.) e elapídeos (*Naja* spp. e *Dendroaspis* spp.).¹³ De maneira geral, os acidentes causados por membros da família Viperidae causam coagulopatias,²²⁻²⁵ ao passo que os acidentes elapídicos causam principalmente efeitos neurotóxicos.^{26, 27}

O continente africano abriga diversas espécies de serpentes, embora a maioria delas seja considerada inofensiva. Ao todo, são encontradas em torno de 400 espécies, destas, aproximadamente 100 são de interesse médico e 30 causam acidentes em humanos. A região Oeste da savana africana é a mais afetada por estes acidentes (Tabela 1), causados principalmente por serpentes dos gêneros *Echis* sp. (*E. ocellatus*, *E. leucogaster* e *E. jogeri*), *Naja* sp. (*N. nagricollis* e *N. katiensis*) e *Bitis* sp. (*B. arietans*).^{28, 29}

Existe uma considerável influência sazonal nos acidentes causados por serpentes. Por ser uma ameaça ocupacional, atingem principalmente áreas rurais, onde as taxas de envenenamento são influenciadas por temperatura e chuva, as quais determinam ciclos anuais da agricultura. De acordo com Blaylock (2004),¹² os acidentes mais severos ocorrem entre a primavera e o início do verão, quando as serpentes estão saindo do período de hibernação de inverno.

Em muitas áreas do continente africano, as serpentes são uma iminente ameaça ocupacional, de tal forma que dificilmente uma família tenha escapado dos efeitos letais ou de mutilações decorrentes do envenenamento.¹⁷

Tabela I. Distribuição das principais serpentes de interesse médico no continente africano e Oriente Médio

REGIÃO		ESPÉCIES
NORTE/ ORIENTE MÉDIO		<u>Atractaspididae</u> : <i>Atractaspis andersonii</i> ; <u>Elapidae</u> : <i>Naja arabica</i> , <i>N. haje</i> , <i>N. oxiana</i> ; <u>Viperidae</u> : <i>Bitis arietans</i> ; <i>Cerastes cerastes</i> , <i>C. gasperettii</i> ; <i>Daboia mauritanica</i> ₁ , <i>D. palaestinae</i> ₁ ; <i>Echis borkini</i> , <i>E. carinatus</i> , <i>E. coloratus</i> , <i>E. omanensis</i> , <i>E. pyramidum</i> ; <i>Macrovipera lebetina</i> , <i>Montivipera xanthina</i> ₁ ; <i>Pseudocerastes persicus</i>
ÁFRICA SUBSAARIANA	CENTRAL	<u>Elapidae</u> : <i>Dendroaspis jamesoni</i> , <i>D. polylepis</i> ; <i>Naja anchietae</i> ₁ , <i>N. haje</i> , <i>N. melanoleuca</i> , <i>N. nigricollis</i> ; <u>Viperidae</u> : <i>Bitis arietans</i> , <i>B. gabonica</i> ₁ , <i>B. nasicornis</i> ; <i>Echis leucogaster</i> , <i>E. ocellatus</i> , <i>E. pyramidum</i>
	LESTE	<u>Elapidae</u> : <i>Dendroaspis angusticeps</i> , <i>D. jamesoni</i> , <i>D. polylepis</i> ; <i>Naja anchietae</i> , <i>N. annulifera</i> , <i>N. ashei</i> ₁ , <i>N. haje</i> , <i>N. melanoleuca</i> , <i>N. mossambica</i> , <i>N. nigricollis</i> ; <u>Viperidae</u> : <i>Bitis arietans</i> , <i>B. gabonica</i> ₁ , <i>B. nasicornis</i> ; <i>Echis pyramidum</i>
	SUL	<u>Elapidae</u> : <i>Dendroaspis angusticeps</i> , <i>D. polylepis</i> ; <i>Naja anchietae</i> , <i>N. annulifera</i> , <i>N. mossambica</i> , <i>N. nigricincta</i> , <i>N. nivea</i> ; <u>Viperidae</u> : <i>Bitis arietans</i>
	OESTE	<u>Elapidae</u> : <i>Dendroaspis jamesoni</i> , <i>D. polylepis</i> , <i>D. viridis</i> ; <i>Naja haje</i> , <i>N. katiensis</i> , <i>N. melanoleuca</i> , <i>N. nigricollis</i> , <i>N. senegalensis</i> ; <u>Viperidae</u> : <i>Bitis arietans</i> , <i>B. gabonica</i> ₁ , <i>B. nasicornis</i> , <i>B. rhinoceros</i> ; <i>Cerastes cerastes</i> ; <i>Echis jogeri</i> , <i>E. leucogaster</i> , <i>E. ocellatus</i>

Note que espécie *B. arietans* (negrito) está presente em toda a África Subsaariana. Populações isoladas são também encontradas no norte do continente e na Península Arábica, mais especificamente no Marrocos e na Arábia Saudita, respectivamente.^{28, 29}

1.2.1 O gênero *Bitis* spp.

A maioria dos acidentes com humanos na África Subsaariana é causada por serpentes do gênero *Bitis*, família Viperidae, que se encontram amplamente distribuídas neste continente (Figura 2).²¹ O veneno dos viperídeos é altamente complexo e contém numerosos componentes com ações enzimáticas e não-enzimáticas, os quais, em sua maioria, são proteínas e peptídeos que permitem a rápida imobilização, morte e digestão da presa.³⁰

O gênero *Bitis* é composto por 17 espécies encontradas exclusivamente na África e na região oeste da Arábia Saudita.^{31, 32} Possuem uma ampla diversidade de tamanhos, variando da pequena *B. schneideri*, que atinge no máximo 28 centímetros, até a enorme *B. gabonica*,

que pode chegar a 2 metros de comprimento, sendo talvez o maior exemplar da família Viperidae no mundo.²⁹

Baseados em análises de sequências do DNA mitocondrial, o gênero foi dividido em quatro grupos monofiléticos (subgêneros): *Bitis* (*B. arietans*); *Calechidna* (*B. albanica*, *B. armata*, *B. atropos*, *B. caudalis*, *B. cornuta*, *B. heraldica*, *B. inornata*, *B. peringueyi*, *B. rubida*, *B. schneideri*, *B. xeropaga*); *Macrocerastes* (*B. rhinoceros*, *B. gabonica*, *B. nasicornis*, *B. parviocula*); e *Keniabitis* (*B. worthingtoni*).^{31, 32}

Contudo, devido sua ampla distribuição e pela gravidade do envenenamento, a espécie *B. arietans* é considerada uma das principais espécies de importância médica do continente africano, causando mais acidentes e mortes em humanos e animais do que todas as demais serpentes africanas juntas.^{21, 28, 33, 34}

Figura 2 - Distribuição das principais serpentes do gênero *Bitis* no continente africano

A espécie *Bitis arietans* é encontrada praticamente em toda a África Subsaariana, bem como em regiões do Marrocos e Arábia Saudita. Já a subespécie *Bitis arietans somalica* é restrita à Somália e a partes da Etiópia e do Quênia. Difere da *Bitis arietans* apenas pela presença de estruturas subcaudais semelhantes a quilhas, que provavelmente auxiliam no enrolamento do animal.²¹

1.3 *Bitis arietans*

As serpentes da espécie *Bitis arietans* (Figura 3) são animais de grande porte, cujo tamanho pode variar de 30-132 cm (média de 86,8 cm),³⁴ embora existam espécimes que podem atingir até 2 metros de comprimento.²¹ Possuem coloração dorsal diversificada, variando entre preto, marrom, avermelhada e alaranjada, em diferentes tons. Seu corpo é coberto por estruturas afiadas em formato de U ou V, que formam anéis em volta da cauda. A parte ventral possui coloração pálida contendo marcas enegrecidas.²¹ Quando se sentem ameaçadas, possuem uma característica peculiar de inflar e desinflar seus corpos, ao mesmo tempo em que sopram e assoviam, e por esta razão, são popularmente conhecidas como “*Puff adder*” (do inglês, víboras sopro).^{21, 29, 35}

Figura 3 - Espécimes de *Bitis arietans*

Espécimes de *Bitis arietans*: (A) Espécime com coloração alaranjada, Abuja, Nigéria;²¹ (B) Animal em posição de ataque, evidenciando sua dentição solenóglifa;³⁶ (C) Espécime com coloração preta e marrom;³⁶ e (D) Vista dorsal das narinas voltadas para a parte superior da cabeça, Garki, Nigéria.²¹

Estas serpentes ocupam uma diversa gama de habitats, sobretudo regiões com densa população humana e animal. São encontradas em savanas e pastagens do Marrocos, no sudoeste da Arábia Saudita e em praticamente todo o continente africano, com exceção apenas das regiões do Saara e florestas tropicais.²⁹ Deste modo, além do elevado número de

acidentes envolvendo seres humanos e animais de interesse para a agropecuária, não é rara a ocorrência de acidentes envolvendo animais domésticos.^{21, 28, 37}

1.3.1 Patogênese do envenenamento

De maneira geral, alterações hematológicas são os efeitos mais comuns decorrentes de envenenamentos por serpentes da família Viperidae. Em alguns casos, estas alterações podem desencadear hemorragias graves, incluindo hemorragias intracranianas, as quais são frequentemente fatais.^{20, 24, 25}

Com relação aos acidentes com *B. arietans*, as vítimas podem apresentar efeitos locais e/ou sistêmicos. Os sintomas locais incluem dor intensa,^{34, 35, 38, 39} inchaço,^{34, 35, 38, 39} formação de bolhas,^{34, 38}, equimose,^{34, 35, 38} hemorragia no local da picada, que ocorre na presença ou não de coagulopatias,^{34, 35, 38} necrose,^{34, 35, 38} e aumento do tamanho dos linfonodos drenantes.³⁴ Entre os efeitos sistêmicos: febre,^{34, 38} leucocitose neutrofílica,^{34, 38} trombocitopenia,^{34, 38} anemia, possivelmente pelo sangramento espontâneo e hemólise,^{34, 38} hipotensão^{34, 38} e arritmias, mais comumente bradicardia.³⁴ Em cachorros, além de hemorragia subcutânea e falência múltipla de órgãos, devido hipovolemia severa, também foram observados danos ao miocárdio e inflamação sistêmica³⁷.

Como mostra a figura 4A, o inchaço é frequentemente extenso e pode se estender por todo o membro acidentado até o tronco. No local da picada é possível observar a formação de bolhas (Figura 4B) e o aparecimento de áreas necrosadas (Figura 4C), as quais podem se estender e complicar o quadro, exigindo a amputação da região da picada, bem como partes ou até o membro em sua totalidade.²¹ Especialmente em acidentes nos pés e tornozelos, alguns casos podem evoluir para a chamada síndrome compartimental (Figura 4D), que se caracteriza pelo aumento da pressão no interior de um compartimento fechado, ocasionando dor extrema devido ao aumento de pressão sobre os nervos e podendo culminar em necrose isquêmica do tecido afetado.²¹

Na figura 5, seguem fotos de um estudo de caso com uma paciente que sofreu uma picada de um espécime de *B. arietans* de 18 meses de idade mantido em cativeiro. É possível ver o sangramento espontâneo no membro afetado (Figura 5A) e uma lesão necrótica bastante proeminente (Figura 5B), que, neste caso, culminou na amputação do dedo do indivíduo acidentado.³⁸

Figura 4 - Acidentes causados por *Bitis arietans*

(A) Acidente causado por *Bitis arietans* em um garoto de sete anos, Zaria, Nigéria. Desenvolvimento de extenso inchaço no braço e tronco após 22 horas; (B) No mesmo paciente, é mostrada a formação de bolhas no local da picada; (C) Paciente não submetido a tratamento apresentando necrose local no sítio da picada (20 dias após o acidente), Zaria, Nigéria e (D) Síndrome do compartimento tibial anterior negligenciada, paciente abandonou o hospital após o tratamento inicial.²¹

Figura 5 - Paciente acidentada com espécime de *B.arietans* mantida em cativeiro

(A) Quatro horas e meia após o envenenamento pôde ser observado sangramento espontâneo e inchaço desde o dedo envenenado até o pescoço. (B) Necrose proeminente após 42 horas do acidente.³⁸

Adicionalmente, casos negligenciados podem resultar em destruição tecidual extensa e ulceração crônica (Figura 6).³⁴

Figura 6 - Ulceração extensa no membro acidentado

Caso negligenciado de envenenamento por *B. arietans* apresentando ulceração extensa. O paciente foi ao hospital oito semanas após o acidente.³⁴

No sentido de avaliar a trombocitopenia observada nas vítimas, um estudo *in vitro* recente demonstrou que o número de plaquetas diminui significativamente após a exposição ao veneno de *B. arietans*, possivelmente devido à direta atividade citotóxica do veneno sobre as plaquetas, promovendo hiperativação e degradação plaquetária. Deste modo, mesmo com a adição de trombina em modelo *in vitro*, as amostras de sangue de indivíduos saudáveis tratadas com o veneno foram incapazes de gerar redes de fibrina. Da mesma forma, o veneno age sobre os eritrócitos, levando à diminuição do tamanho e a alterações da superfície celular culminando em eriptose.⁴⁰ Esta ação direta sobre os eritrócitos, em conjunto com a hemorragia descrita nos estudos de caso, podem contribuir com a anemia aguda e hipotensão relatadas nos acidentes.³⁸

A hipotensão, outro importante sintoma apresentado pelas vítimas, pode ser favorecida pela hemorragia, a qual pode ser decorrente de distúrbios no endotélio vascular devido a degradação de componentes da membrana basal por metaloproteases do veneno (SVMP; do inglês: *snake venom metalloprotease*),^{41, 42} ou por coagulopatias mediadas por proteases do veneno, incluindo as SVMPs e as serino proteases (SVSP; do inglês: *snake venom serine protease*).^{20, 43, 44} Entretanto, Kodama e cols. (2015)⁴⁵ mostraram que o veneno também possui ação direta sobre a pressão sanguínea. Neste estudo, os autores identificaram grandes quantidades de peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs; do inglês: *bradykinin-potentiating peptides*) no veneno, os quais foram capazes de induzir hipotensão em ratos.

Neste sentido, outro trabalho também apontou a presença de toxinas com potencial hipotensor, as quais são capazes de degradar a angiotensina II em peptídeos vasodilatadores (angiotensina 1-7).⁴⁶

Em modelos experimentais, mais especificamente em ratos, o veneno foi capaz de induzir colapso circulatório decorrente de aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento de plasma, bem como hipotensão arterial, culminando em choque hipovolêmico e morte.⁴⁷ O veneno também provoca stress oxidativo, o qual foi correlacionado com alterações hepáticas e renais.⁴⁸ Em modelos murinos foi demonstrado que o veneno tem a capacidade de induzir hemorragia,^{49, 50} necrose,⁵¹ e apresenta ação mitotóxica.⁵² Estudo mais recente que se valeu de abordagens *in vitro* e *ex vivo* corrobora a ação mitotóxica observada por Ponte e colaboradores (2010),⁵² além de demonstrar uma ação citotóxica, bem como fraca atividade pró-coagulante e neurotóxica.⁵³ Em macacos, foi mostrado que o veneno aumenta o tempo médio de coagulação sanguínea e promove fibrinogenólise e fibrinólise. As plaquetas são extremamente susceptíveis ao veneno e a agregação plaquetária, que ocorre na presença de baixas doses de veneno, é irreversível.⁵⁴

1.3.2 Tratamento

É bem descrito que existem variações dos efeitos decorrentes de acidentes com serpentes da mesma espécie, as quais estão relacionadas com a distribuição geográfica, clima, idade, sexo e tipo de dieta,⁵⁵ e para *B. arietans* não é diferente. Sintomas observados em pacientes acidentados na África Ocidental (Norte da Nigéria) apresentam hemorragias evidentes e petéquias atribuídas à trombocitopenia, sem ocorrência de coagulopatias. Este trabalho também sugere a ação direta do veneno no miocárdio e/ou no sistema nervoso simpático, de modo que um paciente apresentou colapso circulatório na ausência de hemorragia significativa.³⁴ Em contrapartida, na África Oriental e do Sul,^{21*} bem como em um acidente envolvendo um espécime mantido em cativeiro em um pequeno zoológico localizado na América do Norte, distúrbios no processo de coagulação sanguínea atribuídos à coagulopatias foram descritos. Tal discrepância pode ser decorrente de variações sazonais¹², bem como diferenças intrínsecas encontradas nos venenos de espécimes de *B. arietans*, as quais parecem não ser dependentes apenas da localização geográfica³³, o que dificulta o desenvolvimento de terapias mais efetivas.

* SEZI, C. L.; ALPIDOVSKY, V. K.; REEVE, M. I. apud WHO, 2010²¹. Defibrination syndrome after snake bite. *East Afr. Med. J.*, v. 49, 8, p. 589-96, 1972.

Portanto, o tratamento é sempre sintomático; de modo que o antiveneno específico deve ser administrado o mais rápido possível assim que sinais graves de envenenamento sistêmicos ou locais estejam evidentes. Entre as terapias de suporte estão o uso de vasopressores, transfusão de eritrócitos, plasma ou plaquetas, ventilação, bem como o uso de fármacos como a lidocaína para tratamento da dor e arritmia cardíaca. Na ocorrência de síndromes compartimentais a fasciotomia é recomendada. Em casos de reações alérgicas devido ao uso do antiveneno podem ser administrados anti-histamínicos e, em casos mais severos, corticoides como a prednisolona. Curiosamente, terapias envolvendo a utilização de sanguessugas também foram relatadas.^{21, 38} Contudo, em regiões como a África, onde não há investimento suficiente nem para o uso dos antivenenos, a terapia complementar pode ser uma heresia.

É válido salientar que na ausência de terapia com antiveneno em acidentes que apresentam sinais clínicos graves, o envenenamento normalmente culmina em amputações^{38, 56} e/ou mortes³⁴. Apesar não ter sido possível comprovar a causa da morte através da necrópsia, de acordo com Warrell e cols. (1975),³⁴ a morte pode ser decorrente de colapso circulatório, devido à hemorragia ou ação direta dos componentes do veneno ao miocárdio e/ou no sistema nervoso simpático, bem como em decorrência de insuficiência renal. Embora amputações e mortes também tenham sido relatadas após terapia com antiveneno,^{34, 38} nestes casos, devem ser considerados: 1) a quantidade e qualidade do antiveneno administrado; 2) a via correta de administração; e, sem dúvida, 3) o tempo entre o aparecimento dos sinais clínicos e a administração do tratamento. De modo que a recomendação da OMS para o envenenamento por *B. arietans* é a administração endovenosa de 50-100 mL, cerca de 5-10 vials, do antiveneno específico tão logo os sinais de envenenamento apareçam.²¹ Por fim, é interessante ressaltar que os danos locais como inflamação, edema, necrose e síndrome compartimental não são bem neutralizados pelo uso de antivenenos,^{34, 38, 57, 58} possivelmente devido à rápida ação de algumas toxinas, justificando estudos sobre os componentes e o mecanismo de ação deste veneno, a fim de se compreender os processos biológicos envolvidos nestes danos e estabelecer terapias complementares mais eficientes.

CAPÍTULO 1 - Contribuição da resposta inflamatória para a patologia do envenenamento por serpentes

1.1 INTRODUÇÃO

O envenenamento por muitos viperídeos é caracterizado por dano tecidual local, desencadeando sintomas como edema, dor, equimose e necrose, bem como por efeitos sistêmicos, tais como hemorragia, falha renal aguda, coagulopatias e choque cardiovascular.^{59, 60} É bem descrito que o mecanismo pelo qual os venenos de serpentes induzem o dano tecidual local envolve uma potente resposta inflamatória, com a participação de neutrófilos e monócitos na circulação, bem como macrófagos teciduais.^{61, 62} Entretanto, já foi demonstrado que a inflamação induzida pelo envenenamento por serpentes também pode contribuir para o estabelecimento de lesões sistêmicas, como danos ao miocárdio,³⁷ o qual contribui para o desenvolvimento de arritmias cardíacas. Neste contexto, um estudo demonstrou que a lesão cardíaca presente em ratos envenenados por *Vipera aspis* (família Viperidae, subfamília Viperinae), tem a participação do TNF- α , o qual foi capaz de induzir aumento da permeabilidade da membrana dos cardiomiócitos, levando ao dano no miocárdio.⁶³ Assim, é coerente admitir que o processo inflamatório exerce importante influência tanto nos efeitos locais quanto sistêmicos decorrentes do envenenamento. Neste sentido, os próximos tópicos irão abordar aspectos gerais do processo inflamatório, incluindo aspectos importantes sobre a natureza e ação dos mediadores lipídicos. Por fim, serão expostas mais interações entre o processo inflamatório e o envenenamento por serpentes da família Viperidae.

1.1.1 Inflamação

O processo inflamatório é um mecanismo de defesa inato do organismo contra agressões, na presença ou não de um agente infeccioso. É caracterizado por um conjunto de alterações bioquímicas, vasculares e celulares que culminam na ativação de moléculas plasmáticas e recrutamento e ativação de leucócitos para o sítio inflamatório, com o intuito de eliminar o efeito lesivo e restaurar a homeostasia. Durante a inflamação, células apresentadoras de antígeno (APCs) são ativadas e se tornam capazes de direcionar a resposta imune adaptativa. Em adição, a inflamação é essencial para a restauração do tecido agredido, de modo que não há cicatrização na ausência de um processo inflamatório. Contudo, a

ativação exacerbada pode levar ao dano tecidual, contribuir para o agravamento de diversas patologias e, em casos mais graves, culminar na perda de função do tecido afetado.⁶⁴

Os períodos iniciais da resposta inflamatória aguda envolvem uma série de alterações na microvasculatura, culminando no influxo coordenado de componentes sanguíneos (leucócitos e plasma) para o sítio da injúria tecidual. As alterações no calibre e no fluxo vascular se iniciam nas arteríolas logo após o dano, de modo que ocorre uma transiente vasoconstrição seguida de vasodilatação. As arteríolas são formadas por uma camada de células endoteliais revestidas por camadas de músculo liso e, por esta razão, podem relaxar ou contrair em resposta a mediadores inflamatórios. Desta forma, exercem um importante papel na regulação do fluxo sanguíneo através da microcirculação, sendo responsável pelo maior aporte de sangue para o tecido inflamado, causando rubor e calor. Paralelamente, nas vênulas pós capilares, constituídas por uma camada de células endoteliais não revestidas por músculo liso, ocorre o aumento da permeabilidade vascular, levando ao escape de fluido para o tecido extravascular e iniciando a formação do edema acompanhado de dor. Todos estes eventos são orquestrados por mediadores inflamatórios, incluindo peptídeos derivados do sistema complemento, bradicinina, aminas vasoativas, TNF- α e mediadores lipídicos, os quais são produzidos por células teciduais residentes, como as células endoteliais, mastócitos, macrófagos e células dendríticas, após a injúria tecidual.⁶⁵⁻⁶⁷

Inicialmente neutrófilos e mais tardiamente macrófagos, e em algumas situações os linfócitos T, são recrutados para o tecido onde ocorreu a injúria via agentes quimiotáticos produzidos localmente, incluindo mediadores lipídicos como o LTB₄⁶⁸ e o PAF,⁶⁹ bem como por quimiocinas, como a IL-8 responsável pelo recrutamento de neutrófilos^{70, 71} e MCP-1 envolvida no influxo de macrófagos.^{72, 73} A migração para o tecido envolve a interação entre moléculas de adesão presentes tanto nos leucócitos, como a L-selectina (CD62L) que é expressa constitutivamente, quanto no endotélio, como a E (CD62E) e P (CD62P)-selectinas expressas no endotélio ativado por estímulos inflamatórios, incluindo TNF α , IL-1, IFN γ , histamina e espécies reativas de oxigênio, proporcionando a adesão fraca e rolagem destes leucócitos nas vênulas pós-capilares. As selectinas reconhecem estruturas de carboidratos, como o ácido siálico, fucose, galactose e N-acetilgalactosamina, as quais estão presentes em glicoproteínas e glicolipídeos da membrana celular. Posteriormente, a firme adesão dos leucócitos às células endoteliais da microvasculatura ocorre via moléculas de adesão denominadas integrinas, incluindo a LFA-1 (CD11aCD18), Mac-1 (CD11bCD18), VLA-4 (CD49aCD29) e $\alpha 4\beta 7$ (CD49dCD29), expressas constitutivamente nos leucócitos e cuja afinidade é aumentada por quimiocinas. Por sua vez, os ligantes para estas integrinas, como o

ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106) e MadCAM-1, são superexpressos pelas células endoteliais ativadas, embora também possam ser expressos por outros tipos celulares como linfócitos, células dendríticas, macrófagos e fibroblastos. Esta firme adesão via integrinas e ligantes para integrinas leva a sinalizações intracelulares que induzem a reorganização do citoesqueleto e espreadimento da membrana, finalmente promovendo o extravasamento dos leucócitos para o tecido extravascular, fenômeno conhecido como diapedese. As diferentes classes de moléculas de adesão coordenam a cinética de extravasamento de determinados grupos de leucócitos, ao passo que sua expressão é regulada pelos mediadores inflamatórios produzidos durante a resposta.^{66, 74-76}

No tecido, os leucócitos são ativados, seja por contato direto com patógenos ou pela ação de citocinas e outros mediadores liberados por células residentes. Essa ativação leva a fagocitose de agentes invasores, bem como células apoptóticas, necróticas e debris celulares, a qual é mediada por um número restrito de receptores de membrana responsáveis pelo reconhecimento e internalização dos mesmos, como o receptor de manose, que reconhece carboidratos; receptores de moléculas do sistema complemento, específicos para os fragmentos C3b e iC3b; e receptores Fcγ, responsáveis pelo reconhecimento de partículas opsonizadas por anticorpos IgG. A fagocitose induz o aumento da produção de moléculas com ação microbicida, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, com o intuito de eliminar o agente causador do estímulo e reestabelecer a homeostase.^{77, 78} Na tentativa de eliminar o agente invasor, os neutrófilos liberam o conteúdo tóxico de seus grânulos, os quais contêm espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase.⁷¹ Estes potentes agentes efetores não discriminam entre moléculas próprias e estranhas, de modo que danos colaterais ao tecido adjacente são inevitáveis.

Uma das formas de ativação destes leucócitos ocorre via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs; do inglês: *pattern-recognition receptors*), os quais reconhecem e se ligam em padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs; do inglês: *pathogen-associated molecular patterns*), padrões moleculares associados a danos (DAMPs; do inglês: *damage-associated molecular patterns*),⁷⁹⁻⁸¹ e mais recentemente mostrado, padrões moleculares associados a venenos (VAMPs; do inglês: *venom-associated molecular patterns*).⁸² O termo VAMP foi cunhado por pesquisadores brasileiros, os quais mostraram que camundongos deficientes de TLR (Receptor do tipo Toll; do inglês: *Toll-like receptor*)-2 e TLR-4, dois importantes PRRs, bem como da molécula adaptadora CD14, produzem menos mediadores inflamatórios em resposta ao veneno de *Tityus serrulatus*, incluindo a diminuição de IL-6 e TNF-α.⁸²

No contexto inflamatório, os TLRs podem ativar os leucócitos ao iniciar uma cascata de sinalização que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B, responsável pela expressão de diversos genes inflamatórios, incluindo o TNF- α , a pró IL-1 β e a IL-6, bem como outras proteínas envolvidas com a atividade microbicida, como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS; do inglês: *inducible nitric-oxide synthase*).^{81, 83, 84} A pró IL-1 β é um zimógeno cuja ativação depende da via dos inflamassomas, complexos multiproteicos formados a partir da ativação celular pelo reconhecimento de padrões via PRRs citosólicos da família NLR (Receptores do tipo NOD; do inglês: *Nod-like receptors*). Uma importante subfamília de NLRs, denominada NALP, está envolvida na indução da resposta inflamatória via citocinas da família de IL-1, incluindo a IL-1 β , IL-8 e a IL-33. O reconhecimento via NALP promove a formação de inflamassomas responsáveis pela ativação de caspases inflamatórias, caspases-1, 4 e 5 em humanos e caspases-1, 11 e 12 em camundongos, as quais são capazes de converter a pró-IL-1 β em IL-1 β madura.^{85, 86} A IL-1 β é altamente inflamatória e pode atuar sinergisticamente com outras citocinas. Em conjunto, a IL-1 β e o TNF- α ativam o endotélio e induzem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Já com a IL-6, ativam hepatócitos e induzem a produção de proteínas de fase aguda: colectinas, ficolinas e pentraxinas. Essas proteínas ativam o sistema complemento e funcionam como opsoninas, facilitando a fagocitose por macrófagos e neutrófilos.⁸¹

A resolução da inflamação e o reparo tecidual dependem da eliminação do agente invasor, levando a diminuição dos sinais pró-inflamatórios e produção de mediadores anti-inflamatórios, bem como fatores de crescimento, os quais são produzidos por macrófagos residentes e recém-recrutados. Neste sentido, a apoptose dos neutrófilos no tecido e consequente fagocitose por macrófagos é fundamental para a fase de resolução da inflamação.⁷¹ Outro importante mediador produzido nesta fase de resolução são as lipoxinas (LX), eicosanoides com ação anti-inflamatória capazes de inibir o recrutamento de neutrófilos e estimular a migração de monócitos que serão responsáveis pela remoção das células mortas e início da remodelação tecidual. Paralelamente, o exsudato inflamatório é drenado do compartimento intersticial pelo sistema linfático e a homeostase é reestabelecida.⁸⁷ No entanto, se o estímulo inflamatório inicial não for devidamente neutralizado, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é então substituído por macrófagos, ou no caso de infecção, também linfócitos T. Se a combinação de efeitos decorrentes destas células for insuficiente, a inflamação se torna crônica, envolvendo a formação de granulomas formados a partir do influxo de fagócitos mononucleares, linfócitos e fibroblastos, bem como a formação de tecidos linfoides terciários.⁶⁴

Portanto, temos que a vasodilatação e o aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares, eventos iniciais da inflamação,⁸⁸ o recrutamento de leucócitos para o foco da lesão,^{68, 69} bem como a fase de resolução,⁸⁷ envolvem os mediadores lipídicos, como os prostanoídes, leucotrienos e o fator ativador de plaquetas, os quais podem agir sinergisticamente com outros mediadores para acentuar a resposta. Como exemplo, é possível citar as prostaglandinas (PGs) que, juntamente com a bradicinina e a histamina, têm a capacidade de acentuar a permeabilidade vascular e o edema;⁸⁹ ou o LTB₄, que assim como a IL-8, é responsável pelo recrutamento de neutrófilos.^{71, 90, 91} Ainda, a sequência temporal de eventos envolvidos na resposta inflamatória aguda pode ser regulada pelo perfil destes mediadores lipídicos, uma vez que este perfil muda gradativamente no decorrer da resposta, ao passo que na fase de resolução da inflamação os mediadores lipídicos encontrados são distintos daqueles envolvidos nos períodos iniciais.⁹² Neste contexto, estudos mostraram a modulação da resposta de monócitos e macrófagos por eicosanóides,^{93, 94} enfatizando o importante papel destes mediadores em várias etapas do processo inflamatório.

1.1.2 Mediadores lipídicos

Os mediadores lipídicos são autacóides produzidos a partir da clivagem de fosfolipídeos constituintes da membrana celular pela ação de fosfolipase A₂ (PLA₂; do inglês: *Phospholipase A₂*), dando origem a produtos oxigenados, genericamente denominados eicosanóides, e ao fator ativador de plaquetas (PAF; do inglês: *platelet-activating factor*). Esse processo ocorre mediante a estimulação de receptores de membrana e consequente ativação celular, promovendo o aumento do cálcio citosólico e ativação de PLA₂, que são enzimas capazes de hidrolisar fosfolipídeos de membrana. Uma vez ativadas, as PLA₂ hidrolisam os fosfolipídeos de membrana dando origem ao ácido araquidônico (AA) ou ácido eicosatetraenóico, bem como outros ácidos graxos poli-insaturados relacionados. Estes ácidos graxos livres podem ser metabolizados por diferentes complexos enzimáticos, dando origem aos eicosanóides. Já o lisofosfolipídeo remanescente poderá ser acetilado e convertido em moléculas de PAF bioativas.^{95, 96}

1.1.2.1 Eicosanóides

Os eicosanóides são lipídeos bioativos derivados do ácido araquidônico (AA) e outros ácidos graxos poli-insaturados, os quais atuam tanto na regulação da homeostase quanto em

processos inflamatórios. Por estarem envolvidos em inúmeros processos biológicos, a inibição da atividade dos eicosanoides clássicos, ou seja, leucotrienos e prostaglandinas, é uma estratégia amplamente utilizada para aliviar sintomas relacionados à inflamação, tais como dor, inchaço, febre, bem como sobre condições asmáticas.^{95, 97}

A produção destes mediadores lipídicos é finamente regulada e envolve a ativação de PLA₂, as quais são responsáveis pela hidrólise dos fosfolipídeos de membrana. Para tal, mediante a ativação celular com concomitante influxo de cálcio, a PLA₂ é ativada e translocada para a membrana perinuclear, bem como para a membrana do retículo endoplasmático e do aparato de Golgi, de forma dependente da concentração e duração do estímulo com cálcio.⁹⁸ Até o momento já foram descritos vários membros da família das PLA₂,⁹⁹ contudo, as PLA₂ citosólicas do tipo IV parecem ser as principais envolvidas na geração de eicosanoides.^{100, 101} Uma vez translocada, a PLA₂ promove a hidrólise dos fosfolipídeos constituintes de membrana, dando origem ao AA, o qual pode ser metabolizado em eicosanoides pelas ciclo-oxigenases (COX)-1 e 2, responsáveis pela geração de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TXs), coletivamente conhecidos como prostanoídes; pelas lipoxigenases (LOX)-5, 8, 12 e 15, dando origem aos leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), ácidos hidroperoxi-(HPETE) e hidroxi-eicosatetraenoicos (HETEs), e hepoxilinas (HX); pelo citocromo P450 epoxihidrolase (CYP), originando os ácidos epoxieicosatrienoicos (EET); bem como por mecanismos não enzimáticos.⁹⁵

1.1.2.1.1 Prostanoides

O ácido araquidônico pode ser metabolizado por enzimas denominadas “prostaglandina-endoperóxido H sintases” (PGHSs), amplamente conhecidas como ciclo-oxigenases (COX), dando origem à prostaglandina endoperóxido H₂ (PGH₂), a qual é convertida em prostanoídes bioativos (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos) a partir da ação de enzimas intermediárias.^{102, 103}

A PGH₂, precursora de todos os prostanoídes, é gerada a partir da bis-dioxigenação e subsequente redução do ácido araquidônico pelas enzimas COX-1/2. Uma vez sintetizada, a PGH₂ é metabolizada em diferentes prostanoídes bioativos de forma dependente de enzimas intermediárias seletivamente expressas em determinados tipos celulares. Neste sentido, é possível citar a enzima tromboxano sintase, responsável pela geração do TXA₂, que é encontrada em plaquetas e macrófagos; as prostaciclina sintases, as quais dão origem as prostaciclina (PGI₂), encontradas em células endoteliais; a PGF sintase, envolvida na geração

de $\text{PGF}_{2\alpha}$, e encontrada no útero, bem como a PGD sintase, importante para a produção de PGD_2 , que pode ser encontrada no cérebro e em mastócitos;⁹⁷ já a PGE_2 , bastante envolvida em processos inflamatórios agudos, é gerada à partir do metabolismo da PGH_2 por PGE sintases microssomais (mPGES) presentes em diversos tipos celulares.¹⁰⁴ Portanto, os prostanoídes podem ser produzidos por diversos tipos celulares e são capazes de desempenhar diferentes funções biológicas, incluindo a manutenção da homeostase vascular e renal, relaxamento e contração da musculatura lisa, citoproteção gastrointestinal, ovulação, implantação, desenvolvimento embrionário e indução do trabalho de parto, indução do sono e, sobretudo, sobre processos inflamatórios e na hiperalgesia.^{95, 105}

A PGE_2 é a prostaglandina mais abundante no organismo e desempenha um papel importante tanto na manutenção da homeostase gastrointestinal, renal e cardiovascular, quanto na resposta imune,^{106, 107} sendo a principal PG responsável pela formação do edema, hiperalgesia e produção de IL-6 *in vivo*.¹⁰⁸ De maneira geral, a PGE_2 induz febre, hiperalgesia, vasodilatação e potencializa o extravasamento vascular.^{89, 108, 109} Em contrapartida, efeitos antagônicos já foram descritos em alguns modelos, como a supressão de citocinas inflamatórias, como o $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 e IL-6,¹¹⁰⁻¹¹³ e a inibição da fagocitose em macrófagos.¹¹⁴ Tais divergências podem estar relacionadas com a quantidade de PGE_2 utilizada no estímulo,¹¹⁰ bem como pelo tipo de sinalização induzida por cada receptor. Até o momento, foram descritos quatro receptores para PGE_2 , denominados EP_1 - EP_4 , que não apenas se ligam seletivamente à PGE_2 , mas desencadeiam diferentes vias de sinalização, incluindo a geração de AMP cíclica (cAMP) via EP_2 e EP_4 , a inibição da geração de cAMP via EP_3 , bem como a ativação da hidrólise do fosfatidilinositol via EP_1 .¹¹⁵ Mais recentemente, os receptores EP_2 e EP_4 foram associados a sinais inibitórios, mais precisamente promovendo a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas por PGE_2 .^{112, 113}

O TXA_2 , o qual é rapidamente metabolizado em TXB_2 , atua como um potente vasoconstritor¹¹⁶ e agregador de plaquetas.¹¹⁷ Além disso, está envolvido na ativação de células T¹¹⁸ e no processo inflamatório, induzindo aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos e expressão de moléculas de adesão da família das imunoglobulinas, como ICAM-1 e VCAM-1.^{119, 120}

A PGD_2 está associada a efeitos fisiológicos no sistema nervoso central, tais como indução do sono¹²¹ e modulação da temperatura corporal.¹²² Também está envolvida na maturação de mastócitos,¹²³ vasodilatação,¹²⁴ recrutamento de eosinófilos¹²⁵ e resposta alérgica.¹²⁶ A PGI_2 inibe a agregação plaquetária, induz hiperalgesia, vasodilatação, aumento de IL-10 e diminuição de $\text{TNF-}\alpha$, sendo considerada um anti-inflamatório endógeno;⁹⁵ por

sua vez, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ promove a contração da musculatura lisa vascular, uterina e respiratória, bem como tem a capacidade de diminuir a pressão intraocular.^{127, 128}

Os prostanoídes recém-produzidos são liberados para fora da célula por meio de transportadores especializados pertencentes à família de polipeptídeos transportadores de ânions, bem como por outros transportadores ainda não caracterizados,¹²⁹ e desempenham suas funções via receptores acoplados à proteína G (GPCRs; do inglês: *G protein-coupled receptors*), expressos tanto na membrana plasmática como na membrana nuclear. Tais receptores foram classificados como TP, IP, EP, FP e DP, específicos para TX, PGI, PGE, PGF e PGD, respectivamente. Como mencionado anteriormente, os receptores para PGE_2 são ainda subdivididos em quatro grupos, designados EP_1 - EP_4 .¹⁰⁶ Para a PGD_2 também são descritos dois receptores distintos, o DP_1 e DP_2 . O DP_2 , diferente dos demais receptores citados, faz parte de um subgrupo de receptores quimiotáticos e está envolvido no recrutamento de linfócitos Th2 e eosinófilos via PGD_2 .¹²⁶ Deste modo, a diversidade dos efeitos desencadeados pelos prostanoídes pode ser em parte atribuída aos seus receptores diversos, os quais ativam diferentes vias de sinalização.¹¹⁵ Devido à sua natureza efêmera, cuja meia-vida varia de segundos a poucos minutos, normalmente a ação dos prostanoídes é autócrina e parácrina. Entretanto, como já foram descritos receptores ancorados à membrana nuclear,¹³⁰ é possível admitir também que estes prostanoídes atuem de forma intrácrina.

Algumas PGs podem ainda exercer suas funções via receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR; do inglês: *peroxisome proliferators-activating receptors*), membro da superfamília de fatores de transcrição dependentes de ligantes, os quais estão envolvidos com o metabolismo de lipídios e também podem induzir efeitos anti-inflamatórios.¹³¹ Como exemplo, é possível citar a sinalização via $\text{PPAR}\gamma$ induzida por um derivado da PGD_2 , a qual inibe os fatores de transcrição NF- κ B, AP-1 e STAT, culminando na diminuição de iNOS e citocinas.¹³²

Contudo, é importante ressaltar que dentre as diversas enzimas envolvidas na geração dos prostanoídes, as COX-1/2 são as mais importantes e amplamente estudadas, pois são o alvo dos anti-inflamatórios não-esteroidais, como a aspirina e o ibuprofeno, amplamente utilizados para o tratamento da dor, febre e inflamação.¹³³ As COX-1 e COX-2 compartilham mais de 60 % de homologia em suas sequências de aminoácidos e possuem cinéticas parecidas. Além disso, a PGH_2 produzida pela ação de ambas isoformas pode ser igualmente convertida nos mesmos prostanoídes bioativos. Todavia, essas enzimas apresentam suas peculiaridades, incluindo a expressão gênica finamente regulada e seletiva, bem como diferenças importantes na região de contato com o substrato, neste último caso, contribuindo

para a geração dos anti-inflamatórios isoforma-específicos.^{134, 135} A expressão de COX-1 é normalmente constitutiva e expressa na maioria dos tecidos, o que fez com que esta isoforma fosse considerada importante para a manutenção da homeostase. Em contraste, a COX-2 normalmente não é detectada em muitos tecidos, mas pode ser induzida por mitógenos, citocinas e certos estímulos inflamatórios. Desta forma, as isoformas foram classificadas como constitutiva (COX-1) e induzida (COX-2).¹⁰²

Entretanto, estudos vêm mostrando que os efeitos decorrentes da ação destas isoformas nos processos biológicos podem ser mais complexos do que se pensava.¹³⁶ No sistema nervoso central, por exemplo, foi observado que o papel das COXs pode ser invertido. Em resposta ao LPS, camundongos deficientes de COX-1 apresentaram uma redução da resposta inflamatória,¹³⁷ ao passo que a inflamação foi acentuada em animais deficientes de COX-2.¹³⁸ No entanto, a exacerbação da resposta inflamatória nos animais deficientes de COX-2 não foi atribuída ao aumento compensatório da expressão de COX-1, uma vez que não houve diferença na expressão desta isoforma. Na realidade, houve aumento da produção de citocinas, quimiocinas e da ativação dos macrófagos residentes, indicando que a COX-2 pode estar envolvida na produção de moléculas anti-inflamatórias.¹³⁸ Gilroy e colaboradores (1999)¹³⁹ mostraram que os prostanoídes derivados de COX-2 no início da inflamação são diferentes dos encontrados na fase mais tardia. Nas duas primeiras horas há uma predominância de PGE₂, ao passo que em 48 h foi observada a predominância de PGD₂ e PGJ₂, as quais foram correlacionadas com a resolução do processo inflamatório. Neste contexto, já foi demonstrado um papel importante de COX-2 na resolução da inflamação e cicatrização de úlceras gástricas.¹⁴⁰

O aumento da expressão de COX-1 em resposta a alguns estímulos já foi reportado em macrófagos,¹⁴¹ bem como em fibroblastos e células endoteliais.¹⁴² Além disso, a contribuição de COX-1 para o processo inflamatório induzido por carragenina também foi demonstrada em ratos e camundongos,¹⁴³ enfatizando o potencial pró-inflamatório de COX-1 não apenas no sistema nervoso.

Por outro lado, além dos efeitos inflamatórios decorrentes da ação de COX-2, estudos com camundongos deficientes ou tratados com inibidores seletivos também evidenciaram importantes funções fisiológicas desta isoforma. A deleção gênica de COX-2 ocasionou problemas renais,¹⁴⁴ além de infertilidade devido a falhas de ovulação e implantação do embrião no endométrio.¹⁴⁵ Efeitos cardiotoxicos também foram associados ao uso prolongado de inibidores seletivos para COX-2.¹⁴⁶ Em conjunto, estes resultados indicam que

a COX-2 não está apenas envolvida com processos inflamatórios e patológicos, mas também contribui para a homeostase dos sistemas renal, reprodutor e cardiovascular.

Em adição aos conhecimentos obtidos ao longo dos anos sobre a ação das isoformas de COX, estudos apontam controvérsias com relação a citoproteção gastrointestinal normalmente conferida à COX-1. Foi avaliado que camundongos deficientes de COX-1 não apresentam mais ulceração gástrica, bem como o tratamento com inibidores seletivos de COX-1 não foram capazes de induzir tais lesões. No entanto, a ulceração foi observada com a combinação de inibidores seletivos de COX-1 e COX-2, indicando que a redução geral dos prostanoídes é mais importante do que a inibição seletiva de determinada isoforma de COX.^{137, 138, 147, 148}

Portanto, os estudos apontam a complexidade da ação destas enzimas nos processos biológicos. De modo que indicam que a COX-1 não está apenas envolvida em processos homeostáticos, mas pode contribuir para a amplificação da resposta inflamatória. Ao passo que a COX-2, além de atuar em processos inflamatórios, também desempenha um papel importante para a manutenção da homeostase de diversos tecidos.

Mais recentemente foi descoberta a COX-3, uma variante de COX-1, onde a sequência do íntron 1 foi mantida no RNA mensageiro (mRNA). Este íntron contém uma região que pode ser transcrita, a qual codifica uma proteína de 30-34 aminoácidos que é inserida na porção hidrofóbica N-terminal do peptídeo sinal da enzima, responsável pelo direcionamento de COX-1 para o lúmen do retículo endoplasmático e envelope nuclear. Como a atividade de COX-3 pode ser inibida por fármacos analgésicos e antipiréticos, como a fenacetina e a dipirona, os autores sugerem a participação desta isoforma em processos de dor e febre. Em humanos a expressão mais abundante de COX-3 foi encontrada no córtex cerebral e no coração; já em cães é principalmente expressa no córtex cerebral.¹⁴⁹

1.1.2.1.2 Leucotrienos

Ao contrário das prostaglandinas, as quais são sintetizadas por uma ampla variedade de células, os leucotrienos são majoritariamente produzidos por células inflamatórias como os leucócitos PMNs, macrófagos e mastócitos.^{97, 150} São potentes mediadores inflamatórios e seus efeitos na patogênese da asma são bem caracterizados,¹⁵¹ no entanto, também estão envolvidos em diversos processos inflamatórios, e participam do mecanismo de defesa da imunidade inata contra patógenos pulmonares.¹⁵²

Os leucotrienos (LTs) são produzidos predominantemente via metabolismo do AA pela enzima 5-lipoxigenase (5-LO), que pode ser encontrada tanto no núcleo quanto no citosol, dependendo do tipo celular na qual é expressa.¹⁵⁰ Ao passo que a célula é ativada, seja pelo reconhecimento de imunocomplexos, componentes da parede de bactérias, entre outros estímulos, a 5-LO presente no núcleo, ou que foi translocada à partir do citosol de forma semelhante à PLA₂,¹⁵³ interage com a PLA₂ com o auxílio de uma outra proteína conhecida como “proteína ativadora de 5-LO” (FLAP; do inglês: *5-LO activating protein*), a qual é capaz de tornar o AA um substrato viável para a ação da 5-LO. Desta reação, o primeiro metabólito convertido do AA é o epóxido LTA₄, o qual pode passar por três processos distintos: hidrólise, conjugação com glutathione ou sofrer metabolismo extracelular.¹⁵⁴ O processo de hidrólise é mediado pela enzima LTA₄ hidrolase (LTA₄H), dando origem ao LTB₄, importante para o recrutamento e ativação de neutrófilos, incluindo a adesão às células endoteliais.^{150, 155, 156} Além disso, o LTB₄ pode induzir aumento da permeabilidade vascular de maneira dependente de neutrófilos, desta forma, também contribuindo para o edema.¹⁵⁷ Por outro lado, se o epóxido LTA₄ for metabolizado pela enzima LTC₄ sintase (LTC₄S), o LTA₄ é conjugado com glutathione reduzida, formando o LTC₄.¹⁵⁸ O LTC₄ é então transportado para fora da célula, onde sua porção peptídica pode ser metabolizada para formar o LTD₄ e o LTE₄. Juntos, o LTC₄, LTD₄ e o LTE₄ são conhecidos como cistenil leucotrienos, ou como antigamente eram chamados: “substâncias de reação lenta de anafilaxia”, devido sua capacidade lenta e contínua de promover a contração do músculo liso e induzir aumento da permeabilidade vascular nas reações de hipersensibilidade imediata, como na asma e em outros processos alérgicos.^{155, 159} Além disso, os cistenil LTs induzem a produção de muco¹⁶⁰ e, mais especificamente o LTD₄, contribui para os processos alérgicos via recrutamento de eosinófilos.^{161, 162}

Assim como as PGs, os LTs são reconhecidos por receptores acoplados à proteína G, dos quais quatro são bem caracterizados até o momento: B-LT₁ e B-LT₂, responsáveis pelo reconhecimento de LTB₄, e CysLT₁ e CysLT₂, receptores específicos para os cistenil LTs. O B-LT₁ é o receptor de alta afinidade para o LTB₄ e medeia a quimiotaxia de neutrófilos, ao passo que a afinidade do B-LT₂ é bem inferior e suas funções ainda não são bem estabelecidas, embora seja expresso em uma ampla variedade de tecidos, o que sugere sua provável relevância. O LTB₄ também pode atuar dentro da própria célula, interagindo com receptores PPAR-γ. Esta interação é um mecanismo de controle da resposta inflamatória, uma vez que ela promove a degradação do LTB₄.^{90, 163} Por sua vez, o LTD₄ pode ativar células da musculatura lisa endoteliais ou das vias aéreas via receptor 1 de cistenil-leucotrienos

(CysLT₁), causando broncoconstrição e edema.^{155, 164} O CysLT₁ é expresso nas células da musculatura lisa das vias aéreas,¹⁶⁴ bem como nas células endoteliais das vênulas pós-capilares.¹⁶⁵ Tanto o LTD₄ como o LTC₄ também podem se ligar ao receptor CysLT₂, expresso em vários tecidos.¹⁶⁶ Inibidores de 5-LO, como o zileuton (Zyflo), bem como antagonistas do receptor CysLT₁, incluindo o zafirlukast (Accolate) e o montelukast (Singulair), são utilizados na clínica para o controle da asma.¹⁵¹

1.1.2.2 Fator ativador de plaquetas

O fator ativador de plaquetas (PAF; do inglês “*platelet-activating factor*” ou 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina) é um lisofosfolípídeo acetilado com uma grande variedade de funções biológicas, das quais as mais bem caracterizadas são sobre o processo inflamatório e sistema vascular.^{96, 167} Sabe-se que muitos mediadores lipídicos são derivados de fosfolípídeos constituintes de membrana,¹⁶⁸ porém, o PAF foi o primeiro descrito como um fosfolípídeo intacto capaz de atuar como um autacoide.⁹⁶

A biossíntese do PAF pode ocorrer tanto pela via do remodelamento, ativada principalmente durante processos inflamatórios, quanto pela via *de novo*, principal fonte de PAF sob condições fisiológicas. A via do remodelamento, como o próprio nome sugere, tem a função de gerar o PAF através de modificações específicas em fosfolípídeos de membrana contendo resíduos de colina. Uma vez que estes fosfolípídeos são hidrolisados pelas PLA₂ ativadas, o ácido araquidônico é liberado e metabolizado em eicosanoides. Paralelamente e em concentrações equimolares, o lisofosfolípídeo remanescente (Liso-PAF) é então acetilado por uma liso-PAF acetiltransferase e convertido em PAF bioativo. Em contrapartida, a via *de novo* de biossíntese do PAF é realizada pela adição de uma molécula de colina associada a um fosfato (fosfocolina) diretamente sobre uma molécula análoga ao diacilglicerol, o 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol (AAG), o qual é um metabólito intermediário do PAF.¹⁶⁹ Interessante pontuar que, apesar de ser considerado um metabólito intermediário, o AAG pode exercer algumas ações semelhantes ao PAF, como estimular a proliferação de células da musculatura lisa,¹⁷⁰ promover a diferenciação celular,¹⁷¹ bem como induzir agregação plaquetária¹⁷² e hipotensão.¹⁷³

Apesar do importante papel do PAF produzido pelas células endoteliais e plaquetas, sua síntese não ocorre apenas em células sanguíneas, mas em vários outros tecidos como pulmão fetal,¹⁷⁴ rins¹⁷⁵ e cérebro.¹⁷⁶ Em concordância com a ampla gama de células capazes de sintetizar o PAF, suas funções biológicas são bastante diversas, incluindo a ativação

plaquetária,¹⁷⁷ constrição da musculatura lisa das vias aéreas,¹⁷⁸ hipotensão¹⁷⁷ e aumento da permeabilidade vascular.¹⁷⁹ Em conjunto, tais sintomas estão relacionados com o quadro de anafilaxia sistêmica, onde a importante participação do PAF foi evidenciada pelo uso de animais deficientes do PAFR.¹⁸⁰

Na resposta inflamatória o PAF é capaz de mediar interações celulares, incluindo as interações entre células endoteliais e leucócitos, que culminam na adesão e posterior diapedese dos leucócitos para o tecido. As células endoteliais ativadas por estímulos inflamatórios sintetizam PAF, o qual é capaz de ativar leucócitos polimorfonucleares (PMNs), peças chave para a resposta inflamatória aguda. Esta ativação envolve a polarização celular, aumento da motilidade, liberação dos grânulos, aumento da afinidade de integrinas (ex. $\beta 2$), bem como a redistribuição das moléculas de superfície destes leucócitos.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ O PAF também pode atuar sobre outros leucócitos envolvidos no processo inflamatório, como nos monócitos/macrófagos. Neste contexto, um trabalho demonstrou que a sinalização via PAF induz a translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo e induz a expressão de diversos genes inflamatórios.¹⁸⁵ Em adição, o PAF é expresso por plaquetas ativadas, as quais podem, assim como as células endoteliais, interagir com os leucócitos na circulação¹⁸⁶ e contribuir com a amplificação da resposta inflamatória.

Inicialmente acreditava-se que o PAF era um mediador solúvel capaz de ativar leucócitos e plaquetas em suspensão. Entretanto, posteriormente foi demonstrado que este mediador é sintetizado por células endoteliais ativadas de forma bastante regulada e local; ainda, que o PAF gerado era capaz de ativar leucócitos PMNs. Esta foi a primeira evidência de um mecanismo de ativação de leucócitos PMNs *in situ*, pois até então acreditava-se que esses leucócitos eram ativados apenas em resposta à estímulos quimiotáticos difundidos na corrente sanguínea.¹⁸¹⁻¹⁸³ Atualmente sabe-se que a maior parte do PAF produzido não é secretada, mas sim fica ancorada à membrana da célula que o sintetizou, a fim de ser reconhecido por seu receptor específico expresso na membrana das células alvo. Portanto, normalmente a ação do PAF é justácrina, isto é, uma sinalização dependente de contato.^{184, 186} Neste tipo de sinalização, a célula produtora do PAF interage com seu receptor (PAFR) expresso na superfície da célula alvo, de modo que o contato é mantido com o auxílio de moléculas de adesão, como a P-selectina. Este contato garante a ação do PAF apenas sobre as células alvo, atuando como um controle espacial da inflamação. Além de mediar interações entre células, a sinalização do PAF também pode ser autócrina ou até mesmo intrácrina. Entretanto, em alguns casos, o PAF também pode ter ação parácrina, bem como atingir a circulação e exercer ação endócrina.¹⁶⁷

O controle da concentração e atividade do PAF produzido é realizado tanto pelo controle da sua síntese, bem como pela ação de PAF-acetilhidrolases (PAF-AHs), enzimas capazes de remover o grupo acetil do PAF transformando novamente em uma molécula de liso-PAF inativa. Como um mecanismo de controle, na circulação a PAF-AH limita a meia vida do PAF a poucos minutos.¹⁸⁷

1.1.3 Venenos de viperídeos e inflamação

A partir do momento em que o veneno é injetado, duas situações ocorrem simultaneamente: o desenvolvimento dos efeitos tóxicos induzidos pelas toxinas do veneno e, não menos importante, a estimulação da resposta imune do hospedeiro a fim de neutralizar e remover as proteínas do veneno. Quando os danos locais e sistêmicos gerados por estas toxinas excedem a capacidade da vítima de assimilar e responder a agressão, se inicia o que chamamos de envenenamento. Os venenos, especialmente de serpentes, induzem a ativação da resposta imune inata, caracterizada por processos inflamatórios,^{59, 60} bem como adaptativa, incluindo a geração de anticorpos específicos, importante para a produção dos soros antivenenos.¹⁸⁸⁻¹⁹¹

A inflamação é a principal característica dos envenenamentos por serpentes da família Viperidae. A ativação do processo inflamatório e sua cascata de eventos desempenham um papel importante na patogênese do envenenamento, no quadro clínico e no desfecho do acidente. Neste sentido, podemos citar os envenenamentos por *Bothrops asper*,^{192, 193} *B. atrox*^{194, 195} e *B. jararaca*,^{196, 197} os quais, entre outras alterações características como os distúrbios hemostáticos e cardiovasculares, induzem uma proeminente resposta inflamatória, a qual já foi associada não apenas com os danos locais, mas também com os distúrbios sistêmicos provocados por venenos viperídicos.^{37, 63}

Entre os sintomas inflamatórios, o edema local é bastante relevante, pois pode levar a isquemia e compressão neuronal, culminando na perda de tecido, incapacidades e até na amputação do membro afetado.^{58, 198, 199} O extravasamento de plasma nas vênulas pós-capilares é responsável pelo início da formação do edema. Neste sentido, foi mostrado que o extravasamento de plasma nas vênulas pós-capilares do músculo cremáster de animais tratados com o veneno de *Bothrops asper*, é detectável já após dois minutos da inoculação do veneno.²⁰⁰ A formação do edema, neste outro estudo avaliado na pata de animais experimentais, também tem início rápido, porém, se mantém por mais de 24 h e vem acompanhada por infiltrado de leucócitos.²⁰¹ No entanto, o edema não é apenas resultado do

acúmulo de conteúdo plasmático extravasado. Em 2008, Mora e cols.²⁰² demonstraram que o edema pode ser acentuado pela contração dos vasos linfáticos eferentes provocada pelo veneno, dificultando a remoção do conteúdo intersticial acumulado.

Além do edema, também é característico o acúmulo de células na região afetada após estímulos com o veneno de *Bothrops asper*. No modelo de inflamação induzida no músculo gastrocnêmio de camundongos, em 6 h foi observado um leve infiltrado celular, que se acentuou a partir das 24 h e se manteve até as 72 h. O infiltrado foi localizado dentro de uma área contendo células musculares necróticas, bem como no espaço intersticial adjacente. O tipo celular predominante nos períodos compreendidos entre 6 h e 24 h foi de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), ao passo que entre 48 h e 72 h os leucócitos PMNs foram substituídos por leucócitos mononucleares (MNs).¹⁹² No modelo de inflamação induzida na pata de camundongos, foi observado fenômeno semelhante.²⁰³ O pico de IL-6 ocorreu no período compreendido entre 3 h e 6 h após o estímulo com o veneno, o qual se estabilizou após 12 h. Não foram encontrados TNF- α e IL- α em nenhum dos períodos avaliados. Entre 6 h e 24 h o veneno induziu o influxo principalmente de leucócitos PMNs, com o aparecimento de células MNs nos períodos mais tardios. Na tentativa de compreender a participação de toxinas hemorrágicas presentes no veneno na indução do edema e produção de mediadores inflamatórios, os animais foram inoculados com o veneno cujas toxinas hemorrágicas haviam sido neutralizadas. A partir deste ensaio, foi possível concluir que a atividade hemorrágica das toxinas do veneno não está envolvida na indução do edema, influxo de leucócitos e produção de IL-6.

A migração de leucócitos para o tecido envolve a interação entre moléculas de adesão expressas tanto nos leucócitos, quanto nas células endoteliais. A expressão diferencial destas moléculas é estimulada por mediadores inflamatórios e coordena a cinética de migração dos diferentes tipos de leucócitos.⁷⁴⁻⁷⁶ Neste sentido, foi mostrado que o veneno de *Bothrops asper* induz a expressão de L-selectina, LFA-1, ICAM-1, PECAM-1 e CD18 em neutrófilos e em células endoteliais,¹⁹³ indicando a ação direta do veneno sobre estas células, bem como a ação dos diferentes mediadores inflamatórios produzidos em resposta ao veneno.

Uma vez no tecido, estes leucócitos são ativados, seja pela ação direta do veneno ou via mediadores produzidos localmente em resposta ao estímulo. Assim, foi demonstrado que os venenos de *Bothrops asper* e *B. jararaca*, induzem o influxo e ativação de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos. O influxo de leucócitos se iniciou após 3 h da e se estabilizou às 48 h. O tipo celular predominante nas primeiras horas era de PMNs, seguido do aumento de leucócitos MNs observado entre 48 h e 72 h. Os dois venenos foram capazes de

induzir o aumento da fagocitose, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e produção de IFN- γ , tanto nos leucócitos PMNs quanto nos leucócitos MNs. Em macrófagos, houve também o aumento da produção de óxido nítrico (NO). Em conjunto, os autores concluíram que os resultados obtidos indicam a participação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no dano local provocado por estes venenos.¹⁹⁷

O envenenamento pela espécie *Bothrops atrox*, responsável pela maioria dos acidentes na região norte do Brasil, também apresenta um processo inflamatório associado. É caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, influxo de leucócitos e produção de citocinas, quimiocinas e eicosanoides. Curiosamente, nos períodos mais iniciais houve aumento de leucócitos MNs, seguido do aumento de PMNs apenas após esse período. Entre os mediadores, o veneno induziu a produção de PGD₂, PGE₂, TXA₂, LTB₄, das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12p70, além da quimiocina CCL-2, em humanos também conhecida como MCP-1 e responsável pelo influxo de monócitos para o tecido.¹⁹⁵ Neste sentido, este grupo também demonstrou o importante papel da sinalização via TLR2 e MyD88 na indução da resposta inflamatória induzida por este veneno em modelo de peritonite. A proteína MyD88 está envolvida com o influxo de leucócitos MNs e PMNs para o tecido, bem como na produção de mediadores inflamatórios induzidos pelo veneno. Houve diminuição dos níveis de PGE₂, LTB₄, TNF- α , IL-1 β , IL-12p70 e CCL-2, ao passo que a produção de TXA₂ e IL-10 não foram alteradas. Os animais geneticamente deficientes de MyD88 não expressam COX-2, indicando que a produção de PGE₂, mas não de TXA₂, é dependente da atividade de COX-2.²⁰⁴ Na ausência de TLR2 os resultados foram um pouco distintos.²⁰⁵ Houve aumento de IL-6 e CCL-2 nos animais deficientes de TLR2, indicando que a produção de IL-6 e CCL-2 são reguladas negativamente pela ativação do TLR2; paralelamente, houve acúmulo de PMNs na cavidade peritoneal dos animais deficientes, possivelmente sendo a fonte de IL-6. Apesar do aumento de CCL-2, houve diminuição do influxo de MNs. Os autores sugerem que o recrutamento de MNs via TLR2 é independente de CCL-2 e que a diminuição do influxo de MNs está associada à diminuição da produção de mediadores inflamatórios importantes, incluindo a IL-1 β , uma vez que esta citocina é uma molécula chave da imunidade inata e está associada com os eventos inflamatórios induzidos pelo veneno de *B. atrox*.^{193, 204} Ainda, este estudo mostrou que nos animais geneticamente deficientes de TLR2 o recrutamento de leucócitos PMNs induzidos pelo veneno é independente de LTB₄. Por outro lado, não houve diferença na expressão de COX-2, PGE₂, TXA₂ e IL-10.²⁰⁵ A sinalização via TLR2 e MyD88 também contribui para a resposta inflamatória de macrófagos

estimulados com a miotoxina-III, uma fosfolipase A₂ purificada do veneno de *Bothrops asper*.²⁰⁶

Contudo, os venenos de serpentes da família Viperidae também podem desempenhar funções anti-inflamatórias, como é o caso do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, ou mais especificamente, da crotoxina (CTX), principal toxina do veneno. A CTX foi capaz de modular a colite induzida por TNBS em camundongos, diminuindo a perda de peso, a intensidade da doença, o dano tecidual e a atividade de mieloperoxidases (MPO). Paralelamente, os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 também foram reduzidos. Ao avaliar a modulação a nível celular, foi visto que a CTX diminui o acúmulo de células linfóides inatas do grupo 3, linfócitos TH17 e da citocina IL-17, ao passo que não altera a frequência de células TCD4⁺. No entanto, foi observado um aumento na frequência de linfócitos T reguladores, acompanhado pelo aumento de TGF- β , PGE₂ e LXA₄.²⁰⁷ Em concordância com estes resultados, Sampaio e cols. (2006),²⁰⁸ utilizando inibidores específicos para 5-LO e COX-1/2, concluíram que o efeito anti-inflamatório tanto do veneno quanto da CTX, estão relacionados com produtos dependentes da via da 5-LO, como por exemplo, a LXA₄, mas não o LTB₄.

Como visto até aqui, muitos estudos mostram os efeitos de diversos venenos de serpentes da família Viperidae sobre o processo inflamatório, especialmente em membros da subfamília Crotalinae que inclui os gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. No entanto, ainda que em menor número, existem trabalhos evidenciando o potencial pró-inflamatório de venenos de serpentes da subfamília Viperinae, a qual inclui o gênero *Bitis*. Recentemente um estudo mostrou a atividade pró-inflamatória do veneno de *Montivipera bornmuelleri* no modelo de peritonite em camundongos.²⁰⁹ Após inoculação do veneno na cavidade peritoneal dos animais, seguida da quantificação dos mediadores produzidos no homogenato do baço após 6 h e 24 h, foi mostrado que o veneno induz a produção de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17, IL-4 e IL-10. Além disso, células monocíticas da linhagem U937 estimuladas com o veneno de *Vipera ammodytes ammodytes* aumentam a expressão de diversos genes pró-inflamatórios, incluindo os genes para IL-1 β e IL-8.²¹⁰ No modelo de inflamação induzida no músculo cremáster de camundongos, o veneno de *Vipera berus*, outro membro da subfamília Viperinae, induziu edema, hemorragia e mionecrose.²¹¹

Com base nestes estudos, podemos admitir que mesmo venenos de serpentes da mesma família, como é o caso dos viperídeos aqui mencionados, induzem padrões inflamatórios distintos, os quais podem exercer tanto efeitos pró, quanto anti-inflamatórios. Como nos exemplos aqui citados, bem como em muitos outros trabalhos disponíveis na

literatura,²¹²⁻²¹⁴ foram demonstrados vários padrões de resposta inflamatória, indicando que, apesar dos venenos de viperídeos serem compostos por toxinas pertencentes a um número restrito de famílias, incluindo as metaloproteases, serino proteases e fosfolipases A₂,^{215, 216} cada veneno tem seu próprio perfil de resposta inflamatória associada. Essa diferença se deve a frequência de expressão de cada classe de toxinas, bem como pela variabilidade das propriedades tóxicas dentro da mesma classe devido à inserção de motivos funcionais introduzidos em toxinas estruturalmente relacionadas.^{215, 216} De fato, compreender o padrão de mediadores e tipos celulares envolvidos na resposta inflamatória nos envenenamentos é o primeiro passo para se elucidar o mecanismo inflamatório induzido por cada veneno. Em seguida, o caminho é investigar a participação de determinados mediadores inflamatórios ou populações celulares nos fenômenos induzidos pelo veneno, como por exemplo, no edema²¹⁷ e na mionecrose,²¹⁸ a fim de se obter estratégias de intervenção nestes importantes efeitos não neutralizados pelos antivenenos.

Neste sentido, o papel dos mediadores lipídicos foi avaliado no edema provocado pelos venenos de *Bothrops asper* e *B. jararaca*. Utilizando inibidores capazes de inibir diferentes etapas da síntese de eicosanoides, foi possível mostrar que no edema formado pela injeção do veneno de *B. asper* é em grande parte mediado por prostanoídes, mais especificamente pelos prostanoídes derivados do metabolismo de COX-2. Embora em menor intensidade, os eicosanoides independentes de COX-1/2, além de outros mediadores, também estejam envolvidos com a formação do edema. Já as intervenções do edema induzido pelo veneno de *B. jararaca* utilizando os mesmos inibidores mostrou que o veneno provoca o edema majoritariamente via prostanoídes, os quais são derivados da atividade tanto de COX-2, quanto de COX-1.²¹⁷ Em adição, lesões musculares provocadas por venenos botrópicos podem ser atenuadas pelo uso de dexametasona, um inibidor de PLA₂. Neste estudo foi visto que a dexametasona, bem como o extrato de *Eclipta prostrata*, reduzem o dano muscular e o edema provocado pelos venenos de *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu*, acompanhado pela redução de leucócitos e atividade de mieloperoxidase no tecido.²¹⁸ A dexametasona, a indometacina e o celecoxib, respectivamente, inibidores de PLA₂, COX-1/2 e COX-2, também foram capazes de reduzir o edema e o influxo de neutrófilos induzidos pelo veneno de *B. jararacussu*.²¹² Diferentes anti-inflamatórios, incluindo a dexametasona e o diclofenaco, também foram capazes de reduzir o edema provocado pelo veneno de *Cerastes gasperettii*.²¹⁹ Em conjunto, estes resultados indicam que a inflamação, mais especificamente, os eicoisanoídes, são, ao menos em parte, responsáveis pelo dano tecidual provocado por estes venenos.

A inflamação associada ao envenenamento por viperídeos está envolvida não apenas com os efeitos locais, mas pode contribuir para a patogênese sistêmica, de modo que foi associada com danos ao miocárdio e consequente arritmia cardíaca^{37, 63}. Outro estudo mostrou que a inflamação, juntamente com os distúrbios na cascata de coagulação induzidos por venenos de diferentes viperídeos, contribuem para a letalidade de animais experimentais. Os autores trabalharam em cima da hipótese de que a P-selectina solúvel, a qual é aumentada em doenças trombóticas e está envolvida na hipercoagulação disseminada nestas desordens, poderia atuar de maneira benéfica em envenenamentos por viperídeos, uma vez que nestes envenenamentos ocorrem distúrbios da coagulação e hemorragias. Inicialmente foi confirmado que, de fato, a concentração de P-selectina solúvel é aumentada durante o envenenamento, como uma forma endógena de controlar os distúrbios provocados pelo veneno de duas formas: controlando o influxo de leucócitos para o tecido inflamado, reduzindo os níveis de TNF- α e IL-1 β e normalizando a hemostasia. Considerando tal efeito benéfico da P-selectina solúvel, os autores se valeram do tratamento dos camundongos com P-selectina solúvel recombinante, o qual inibiu 100 % a morte dos animais desafiados com doses letais destes venenos.²²⁰ Wanderley e cols. (2014)²¹² demonstraram que o fucoidan, um inibidor de P e L-selectinas, foi capaz de reduzir o edema e o infiltrado de neutrófilos induzidos pelo veneno de *B. jararacussu*. No entanto, considerando o efeito protetor da P-selectina solúvel nos distúrbios sistêmicos provocados por venenos de viperídeos, o uso do fucoidan para o tratamento destes envenenamentos deve ser amplamente investigado.

Como podemos notar, apesar dos extensos estudos com relação ao processo inflamatório associado aos envenenamentos por viperídeos, até o momento, não existem trabalhos que avaliam o processo inflamatório associado ao envenenamento pela serpente *Bitis arietans*, uma das principais serpentes de interesse médico do continente africano. Estudos de caso demonstraram que o envenenamento por *B. arietans* provoca distúrbios cardiovasculares, hemostáticos, bem como inflamatórios, caracterizado por sintomas como edema, dor, febre e neutrofilia.^{34, 35, 38, 39} Para nosso conhecimento, apenas um único estudo prospectivo em cachorros envenenados naturalmente por *B. arietans* mostrou a presença de inflamação sistêmica devido ao aumento da proteína C-reativa no plasma.³⁷ Como descrito até aqui, a inflamação, bastante relacionada aos distúrbios decorrentes do envenenamento por viperídeos, é um processo complexo que envolve uma rede de interações entre componentes celulares, plasmáticos e mediadores produzidos em resposta a um determinado estímulo, no qual os mediadores lipídicos exercem um importante papel, atuando em diversas etapas do processo inflamatório. Deste modo, o primeiro capítulo deste trabalho teve como objetivo

estudar o processo inflamatório agudo induzido pelo veneno de *B. arietans* em modelo *in vivo* e avaliar a contribuição dos mediadores lipídicos para estes eventos.

1.2 OBJETIVO

Estudar o processo inflamatório agudo induzido pelo veneno de *B. arietans* e avaliar a contribuição dos mediadores lipídicos para estes eventos.

1.2.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar eventos agudos induzidos pelo veneno no modelo de peritonite, considerando os seguintes parâmetros:
 - Aumento da permeabilidade vascular;
 - Aumento de leucócitos;
 - Aumento da expressão gênica de proteínas envolvidas com a resposta inflamatória;
 - Produção de eicosanoides;
 - Produção de citocinas e quimiocinas; e
 - Hemorragia.
- ✓ A partir de intervenções farmacológicas e utilização de animais deficientes da enzima 5-lipoxigenase ou do receptor do PAF, avaliar a contribuição dos mediadores lipídicos para o aumento de leucócitos, produção de citocinas e quimiocinas e hemorragia na cavidade peritoneal.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Veneno

O veneno de *Bitis arietans* (BA33 - Venom Supplies, SA, Austrália), cedido pelo Dr. José Roberto da Seção de Soros Hiperimunes do Instituto Butantan, foi obtido de animais adultos de ambos os sexos, medindo aproximadamente 60 cm cada e provenientes do sul do continente africano. Antes da obtenção do veneno, foi constatado que as serpentes estavam aptas e saudáveis a partir de inspeção visual e revisão dos registros em banco de dados de cada animal, contendo informações como aspecto da pele, tipo de alimentação, dados reprodutivos e médicos. O veneno liofilizado foi armazenado em freezer -20 °C. Para os ensaios *in vivo*, amostras de veneno foram diluídas em salina apirogênica (NaCl 0,15 M) e filtradas em filtros esterilizantes, com poros de 0,22 µm, e armazenadas em freezer -80 °C. O conteúdo proteico foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA) ²²¹.

1.3.1.1 Dosagem protéica pelo método BCA

A concentração protéica das amostras de veneno foi determinada pelo método do ácido bicinconínico, utilizando o kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, IL, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Para interpolação de dados foi utilizada curva padrão com diferentes concentrações (0 - 2000 µg/mL) de albumina de soro bovino (BSA, Sigma Aldrich, MO, EUA) diluída em PBS (8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; pH 7,4). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (ELX 800, Biotek Instruments, VT, EUA) no comprimento de onda de λ 540 nm. Os valores de absorbância da curva padrão foram plotados e uma curva correspondente à absorbância *versus* concentração protéica foi construída. Os valores de absorbância das amostras foram interpolados aos valores da curva padrão e a concentração protéica de cada amostra foi obtida.

1.3.1.2 Análise da presença de endotoxina

Antes dos experimentos, amostras de veneno (20 µg/mL) foram diluídas em salina apirogênica, filtradas e encaminhadas à Seção de Controle Microbiológico do Instituto Butantan (Serviço de Controle de Qualidade, Divisão Bioindustrial) para análise da presença

de endotoxina (ANEXO A). A análise foi realizada pelo método semi-quantitativo LAL (*Limulus* amebocyte lisate) utilizando o kit *PYROGENT™ Gel clot LAL Assays* (Lonza, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração estimada de endotoxina presente nas amostras foi calculada de acordo com um padrão de endotoxina de *Escherichia coli* na concentração de 0,125 UE/mL. A concentração de endotoxina encontrada nas amostras de veneno variou de 0,125 a 1,25 UE/mL, desta forma, mesmo considerando o limite máximo estimado, se encontra dentro do limite aceitável de endotoxina por micrograma de veneno ($< 0,1$ UE/ μ g).²²²

1.3.2 Animais

Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, de 20-22 g, de quatro linhagens distintas. Os camundongos das linhagens C57BL/6, 129 SvE e 129 SvE deficientes da enzima 5-lipoxigenase (5LO^{-/-}) foram provenientes do Centro de Bioterismo da rede USP de Biotérios. Já os camundongos da linhagem C57BL/6 deficientes do receptor do PAF (PAFR^{-/-}) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Takao Shimizu, do Departamento de Bioquímica da Universidade de Tokyo. As linhagens PAFR^{-/-} e 5LO^{-/-} possuem o mesmo “fundo genético” dos animais C57BL/6 e 129 SvE, respectivamente, portanto, foram comparados com seus respectivos controles no decorrer do estudo. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do departamento de Imunologia em condições padronizadas, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (nº 4669091117) e normas estabelecidas pelo CONCEA.

1.3.3 Inoculação de veneno e obtenção de sangue e do exsudato peritoneal

Para a indução da resposta inflamatória local, os animais foram inoculados com a dose miotóxica não-letal do veneno de *B. arietans*, a qual foi previamente estabelecida pelo nosso grupo⁵². Esta dose (0,2 DL-50) foi recalculada de acordo com a DL-50 estabelecida mais recentemente pelo nosso grupo,¹⁸⁹ obtida com o mesmo lote de veneno utilizado para os experimentos deste estudo. A mesma dose de veneno foi previamente utilizada para a indução de inflamação em modelo murino utilizando o veneno de *Bothrops jararaca*.¹⁹⁶ Assim, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p.) com uma solução de veneno diluído em salina apirogênica na concentração de 50 μ g/mL, a qual foi administrada em um volume

de 200 µL/ 20 g (0,5 mg/kg). Os animais dos grupos controle receberam administração i.p. de volume equivalente de solução salina apirogênica.

Decorridas 1/2 h, 4 h ou 8 h da inoculação de veneno, períodos selecionados de acordo com a literatura para avaliar o processo inflamatório agudo,^{195, 196, 223} os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano e, em seguida, eutanasiados sob atmosfera excessiva de CO₂. O sangue foi coletado por punção cardíaca e despensado em tubos contendo solução anticoagulante (Citrato trissódico 2H₂O; 129 mmol) na proporção de 1 parte de anticoagulante para 9 partes de sangue (1:10; v/v). Após homogeneização, o sangue foi centrifugado a 5000 × g durante 10 minutos a 4 °C para obtenção do plasma, o qual foi armazenado em freezer – 80 °C para posteriores dosagens. Para a coleta do exsudato peritoneal foi injetado pela via i.p. 3 mL/cavidade de PBS autoclavado e gelado, a qual foi massageada por aproximadamente um minuto. Devido a dificuldade de se coletar o volume total injetado, como forma de padronização, foram coletados 2 mL/cavidade. O conteúdo coletado foi centrifugado individualmente a 500 × g por 5 minutos a 4 °C para deposição das células. O sobrenadante livre de células foi imediatamente aliquoteado e armazenado a -80 °C para posteriores dosagens. As células precipitadas foram diluídas em 200 µL de PBS gelado e utilizadas para contagem total e diferencial de leucócitos, dosagem de hemoglobina, bem como para a análise da expressão gênica e proteica de COX-1 e COX-2 (COX-1/2).

1.3.3.1 Análises no exsudato peritoneal

Após a coleta do exsudato peritoneal, conforme descrito em 1.3.3, o pellet de células e o exsudato peritoneal livre de células foram utilizados para as análises a seguir.

1.3.3.1.1 Contagem total e diferencial de leucócitos

Cada precipitado celular obtido após a centrifugação dos exsudatos peritoneais foi homogeneizado em 200 µL de PBS gelado. Uma alíquota foi diluída em solução de Turk (1:20; v/v), para contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer visualizada em microscopia de luz. Para a contagem diferencial, foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro contendo 5 x 10⁴ células/cada, preparados em citocentrífuga (Citospin 4, Thermo Scientific, MA, EUA) a temperatura ambiente (400 rpm por 5 minutos) e coradas pelo corante Instant Prov (New Prov, Paraná, Brasil). Foram contadas no mínimo 100 células em diferentes campos, utilizando microscopia de luz e aumento de 1000 x. O valor inicial

obtido em porcentagem de leucócitos mononucleares e leucócitos polimorfonucleares foi ajustado para número bruto de células em 1 mL de lavado.

1.3.3.1.2 Dosagem de hemoglobina

Para avaliar a hemorragia na cavidade peritoneal induzida pelo veneno, a concentração de hemoglobina presente nas hemácias do exsudato peritoneal foi estimada. Para tal, a solução de células obtidas após a centrifugação do exsudato peritoneal (pellet diluído em 200 μ L) foi diluída em água deionizada (1:60) e mantidas durante dez minutos à temperatura ambiente, para completa hemólise dos eritrócitos e liberação da hemoglobina. Para interpolação de dados foi utilizada curva padrão com diferentes concentrações de hemoglobina bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluída em PBS (0 g/dL, 0,0039 g/dL, 0,0078 g/dL, 0,0156 g/dL, 0,0312 g/dL, 0,05 g/dL, 0,1 g/dL, 0,2 g/dL, 0,3 g/dL e 0,4 g/dL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (ELX 800, Biotek Instruments, VT, EUA) no comprimento de onda de λ 415 nm. Os valores de absorbância da curva padrão foram plotados e uma curva correspondente à absorbância *versus* concentração foi construída. Os valores de absorbância das amostras foram interpolados aos valores da curva padrão e a concentração de hemoglobina de cada amostra foi obtida.

1.3.3.1.3 Extração de RNA e PCR quantitativo

Para a amplificação das amostras de RNA, os precipitados celulares foram submetidos a tratamentos com tampão para lise de eritrócitos (ACK lysing buffer, Gibco, Invitrogen Corp., CA, EUA), a fim de evitar possíveis interferências. Para tal, o precipitado celular, oriundo do lavado peritoneal coletado individualmente, foi homogeneizado em 200 μ L de PBS gelado. Uma alíquota de 40 μ L foi reservada para dosagem de hemoglobina e contagem do número total e diferencial de leucócitos. Aos 160 μ L restantes, foram adicionados 400 μ L de tampão de lise e as amostras foram incubadas durante três minutos no gelo. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS/tubo, os quais foram homogeneizados e submetidos à centrifugação (4 °C, 4 min, 250 $\times$ g). O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, ao precipitado celular foram adicionados 250 μ L/cada de Trizol e as amostras foram armazenadas a – 80 °C. O RNA total foi extraído com o auxílio de colunas “Direct-zolTM RNA MiniPrep” (Zymo Research, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, a concentração de RNA foi determinada em espectrofotômetro e a mesma quantidade de

amostra foi ajustada para a síntese do DNA complementar (cDNA). O cDNA foi sintetizado utilizando o kit “*Verso cDNA Synthesis*” (Thermo Scientific, MA, EUA) e a reação em cadeia da polimerase (PCR), quantitativa e em tempo real (PCRq), foi realizada com *primers* específicos para: Il-6 (F: 5’ – TCC TTA GCC ACT CCT TCT GT – 3’; R: 5’ – AGC CAG AGT CCT TCA GAG A – 3’), Cox-1 (F: 5’ – TTC AAC ACA CTC TAT CAC TGG C – 3’; R: 5’ – AGA AGC GTT TGC GGT ACT CAT – 3’) e Cox-2 (F: 5’ – CTC CCT GAA GCC GTA CAC AT – 3’; R: 5’ – ATG GTG CTC CAA GCT CTA CC – 3’), todos da *Exxtend Biotecnologia* (SP, Brasil); e Il-1 β (F: 5’ CTC TTG TTG ATG TGC TGC TG – 3’; R: 5’ – GAC CTG TTC TTT GAA GTT GAC G – 3’), Alo $\times$ 5 (F: 5’ – CCA GTC GTA CTT TGA ATC CGT – 3’; R: 5’ CCA TCT GCC TGC TAT ATA AGA ACC), e Hprt, utilizado como controle, (F: 5’ – AGC AGG TCA GCA AAG AAC T – 3’; R: 5’ – CCT CAT GGA CTG ATT ATG GAC A – 3’) da *Integrated DNA Technologies* (IDT, IA, EUA). A reação foi realizada utilizando o reagente “*SYBR Green Fast*” (Applied Biosystems, Life Technologies, CA, EUA) no sistema “*Step One Plus*” (Thermo Scientific, MA, EUA). A expressão relativa dos genes de interesse foi normalizada pela expressão do gene de referência (Hprt). O cálculo foi realizado pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, conforme descrito por Livak e colaboradores (2001).²²⁴

1.3.3.1.4 Western Blotting para análise da expressão proteica de COX-1/2

Nas análises por *Western Blotting*, os precipitados celulares foram submetidos a tratamentos com tampão para lise de eritrócitos (ACK lysing buffer, Gibco, Invitrogen Corp., CA, EUA), a fim de evitar possíveis interferências (ver metodologia no item 1.3.3.1.3). Após descartar o sobrenadante cuidadosamente, ao precipitado celular foram adicionados 40 μ L de tampão de amostra redutor, contendo β -mercaptoetanol,²²⁵ a cada 1×10^6 células. As amostras foram então aquecidas durante dez minutos a 100 °C e posteriormente armazenadas a -20 °C, até sua utilização. As proteínas (40 μ L/poço) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS, sob voltagem constante de 100 V. Como controle positivo da expressão de COX-2, células Raw 264.7 foram tratadas por 24 h com LPS (100 ng/mL) e 20 μ g/poço do lisado celular, previamente reduzido e desnaturado, foram submetidos à eletroforese.²²⁶ Em seguida, as bandas proteicas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare, IL, EUA), em sistema semi-seco (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, CA, EUA) durante 35 min a 15 V. Os sítios não-específicos foram bloqueados com leite desnatado a 5 % em TBST (150 mM NaCl; 20 mM Tris; 0,5 % Tween 20; pH 7,4) por 1 hora a temperatura ambiente.

Após lavagens com TBST, as membranas foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos para COX-1 e COX-2, ambos na diluição de 1:500 (Cayman Chemical, MI, EUA), a 4 °C *overnight*. Para controle, as membranas também foram incubadas com anticorpo monoclonal contra β -actina na diluição de 1:2000 (Cell Signaling, MA, EUA) durante o mesmo período. Posteriormente, as membranas foram lavadas e incubadas, durante 1 hora a temperatura ambiente, com anticorpos secundários anti-IgG murinas ou de coelho conjugados com peroxidase. Por fim, as bandas imunorreativas foram reveladas utilizando substrato quimioluminescente ECL (Thermo Scientific, MA, EUA). A intensidade das bandas foi determinada por densitometria utilizando o programa de análise “AlphaDigiDoc 1000 v3.2 Beta” (Alpha Innotech Corp., CA, EUA) e normalizadas pelas bandas de β -actina.

1.3.3.1.5 Dosagem de mediadores lipídicos

Os níveis de LTB₄, LTC₄, PGE₂ e TXB₂ (metabólito estável do TXA₂) foram quantificados nos fluídos peritoneais livres de células por ensaio imunoenzimático competitivo de acordo com instruções do fabricante (EIA, Cayman Chemical, MI, EUA). As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro de placas com densidade ótica entre λ 405/420 nm (VersaMaxTM, Molecular devices, CA, EUA). As concentrações de eicosanoides foram calculadas a partir da interpolação com a curva padrão do kit. O limite inferior de detecção foi de > 13 pg/mL (LTB₄ e TXB₂), > 10 pg/mL (LTC₄) e > 15 pg/mL (PGE₂).

1.3.3.1.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas

O perfil de citocinas e quimiocinas induzidos pelo veneno foi avaliado no exsudato peritoneal livre de células. Para quantificação das citocinas inflamatórias e quimiocinas: TNF- α , IL-6, MCP-1, IFN- γ , IL-10 e IL-12p70 foi utilizado o kit “CBA Mouse Inflammatory Cytokines” (BD Bioscience, CA, EUA), de acordo com especificações do fabricante. A aquisição de dados foi realizada em citômetro de fluxo (FACS Canto II, Becton Dickinson, CA, EUA) e a análise realizada pelo software FACS Diva, versão 6.1.3. O limite inferior de detecção foi de: > 7,3 pg/mL (TNF); > 5 pg/mL (IL-6); > 52,7 pg/mL (MCP-1); > 2,5 pg/mL (IFN- γ); > 17,5 pg/mL (IL-10); e > 10,7 pg/mL (IL-12p70). Para a quantificação da citocina IL-1 β foi utilizado o kit de ELISA “Mouse IL-1 β ELISA Set” (BD Biosciences, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (ELX 800, Biotek Instruments, VT, EUA) no comprimento de onda de λ 450 nm e as

absorbâncias das amostras experimentais foram interpoladas com a curva padrão. O limite inferior da curva padrão do kit foi de >15 pg/mL.

1.3.3.2 Dosagem de IL-6 e MCP-1 no plasma

A quantificação de IL-6 e MCP-1 foram realizadas no plasma, coletado conforme descrito em 1.3.3, por ensaio imunoenzimático utilizando o kit “*BD OptEIA™ Set Mouse*” (BD Bioscience, CA, EUA), de acordo com recomendações do fabricante. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro de placas com densidade óptica de λ 450 nm e os valores obtidos interpolados na curva padrão para a obtenção da concentração dos mediadores. A faixa de detecção dos kits foi entre 10-1000 pg/mL.

1.3.4 Avaliação do aumento da permeabilidade vascular

O aumento da permeabilidade vascular induzida pelo veneno foi avaliado pelo método de difusão do corante azul de Evans na cavidade peritoneal.^{179, 195} Para tal, os animais foram inoculados pela via endovenosa pelo plexo retro-orbital, após sedação com isoflurano, com 20 mg/kg de azul de Evans diluído em 100 μ L de salina apirogênica. Logo em seguida, os animais foram inoculados com veneno pela via i.p. (0,5 mg/kg), conforme descrito no item 1.3.3. Após dez minutos e 1/2 h, os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano e, em seguida, eutanasiados em câmara de CO₂. Neste momento, foi realizada a coleta do lavado peritoneal, conforme já descrito. De maneira breve, foram injetados 3 mL de PBS autoclavado e gelado/cavidade, que após leve homogeneização, foram coletados (2 mL/cada) e centrifugados a 500 $\times$ g por 5 minutos a 4 °C para remoção das células e debris. A quantificação do corante extravasado foi realizada no sobrenadante do lavado peritoneal dos animais experimentais e controles mediante à interpolação das D.O.s lidas a λ 625 nm com as D.O.s de uma curva do corante, variando de 0,3 - 50 μ g/mL.

1.3.5 Intervenções farmacológicas

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos C57BL/6 foram tratados pela via subcutânea, na região dorsal, com diferentes fármacos, seguindo doses utilizadas em estudos prévios com venenos: indometacina (10 mg/kg)²¹², SC-560 (5 mg/kg),²²⁷ MK-886 (5 mg/kg)²²⁸ ou WEB-2086 (5 mg/kg),²²⁹ respectivamente, inibidores de COX-1/2, de

COX-1, da proteína ativadora de 5-LO (FLAP; do inglês: *5-lipoxygenase-activating protein*) e antagonista do receptor do PAF. Grupos controle foram tratados apenas com os veículos dos inibidores emulsionados em salina apirogênica. Em seguida, os animais foram inoculados com o veneno pela via i.p. (0,5 mg/kg) e decorridas 1/2 h ou 4 h do estímulo foi realizado o lavado peritoneal (ver item 1.3.3) para a contagem total e diferencial do número de leucócitos e dosagem de citocinas e quimiocinas nos fluídos peritoneais livres de células. Nos mesmos períodos de estímulo, a quantificação de hemoglobina foi realizada nas hemácias presentes do precipitado celular. A ação dos inibidores diretamente sobre os eicosanoides avaliados neste estudo foi avaliada após 1/2 h de estímulo com veneno e, em alguns casos específicos, após 4 h.

1.3.5.1 Preparo dos inibidores utilizados nos tratamentos

Os inibidores utilizados neste estudo foram provenientes da empresa Cayman Chemical, EUA. Conforme recomendações do fabricante, todos foram reconstituídos em DMSO e as alíquotas armazenadas a -80 °C. Para os experimentos, os inibidores foram diluídos em salina apirogênica até atingir a concentração final utilizada para os tratamentos. O volume injetado foi sempre ajustado pelo peso de cada animal (100 µL/20g), mantendo a concentração/kg mencionada anteriormente.

1.3.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (SD) e analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism, versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, CA, EUA). O teste *t* de Student foi utilizado para comparações entre dois grupos. As comparações entre mais de dois grupos em relação a uma variável foram realizadas pelo teste One Way ANOVA e as comparações múltiplas realizadas pelo pós-teste de Tukey HSD. Para comparação de duas ou mais variáveis, entre mais de dois grupos, foi utilizado o teste Two Way ANOVA, seguido por pós-teste de Tukey HSD. Para todos os testes os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados demonstrados nos gráficos são representativos de dois ou mais experimentos reprodutíveis (4-6 animais/grupo).

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Perfil inflamatório induzido pelo veneno de *B. arietans*

Para avaliar eventos associados à inflamação aguda induzida pelo veneno de *B. arietans*, camundongos 129 SvE foram inoculados com a dose miotóxica não letal (0,5 mg/mL) do veneno ⁵² pela via intraperitoneal, calculada de acordo com a DL-50 do veneno estabelecida por Guidolin e cols. (2016). ¹⁸⁹ Após 1/2 h, 4 h e/ou 8 h de estímulo, o lavado peritoneal e o sangue foram coletados para avaliação dos parâmetros inflamatórios avaliados neste estudo.

1.4.1.1 *Análise da permeabilidade vascular, aumento de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios na cavidade peritoneal*

A inflamação aguda em resposta a agressões envolve alterações na microvasculatura, as quais culminam no influxo coordenado de componentes plasmáticos para o tecido e ativação de células imunes neste microambiente. Logo após a agressão, as arteríolas sofrem vasoconstrição transiente seguida de vasodilatação. Tais eventos são acompanhados pelo aumento da permeabilidade vascular, principalmente nas vênulas pós-capilares, o que de fato leva ao escape de fluídos plasmáticos para o tecido extravascular, contribuindo para a formação do edema, um dos sinais cardinais da inflamação. Neste contexto, a primeira etapa do trabalho foi avaliar se o veneno de *B. arietans* é capaz de promover o aumento da permeabilidade vascular.

Para tal, o aumento da permeabilidade vascular foi avaliado pelo método de extravasamento do corante azul de Evans na cavidade peritoneal após dez minutos e 1/2 h da inoculação do veneno. Como mostra a figura 7, o veneno foi capaz de induzir aumento da permeabilidade vascular nos dois períodos avaliados.

Figura 7 – Aumento da permeabilidade vascular em camundongos 129 SvE

Após sedação, camundongos da linhagem 129 SvE foram inoculados pela via endovenosa com solução de azul de Evans (20 mg/kg). Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 10 minutos e 1/2 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem do corante azul de Evans extravasado na cavidade. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de Student. Dados da comparação entre os dois períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo veneno em 10 min. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de três experimentos reproduzíveis.

Após alterações na microcirculatura, inúmeros mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos, são produzidos na circulação e localmente pelas células endoteliais e leucócitos residentes, como mastócitos, macrófagos e células dendríticas. Esses mediadores coordenam os eventos inflamatórios em resposta à lesão. Paralelamente, leucócitos circulantes, inicialmente neutrófilos e mais tardiamente monócitos, migram para o local da lesão sob a influência dos agentes quimiotáticos produzidos. Assim, o próximo passo foi avaliar o aumento de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais experimentais após a inoculação veneno.

Na figura 8 é possível observar que o veneno induziu aumento de leucócitos na cavidade peritoneal a partir de 4 h, o qual se manteve após 8 h. Destes leucócitos, os polimorfonucleares (PMNs), em sua maioria neutrófilos, foram os mais abundantes.

Para elucidar quais os potenciais mediadores envolvidos nesta resposta, inicialmente foi avaliada a expressão gênica de citocinas inflamatórias e de enzimas envolvidas com o metabolismo de eicosanoides. Assim, foi possível observar que o veneno promove o aumento da expressão dos genes de IL-6, IL-1 β , COX-1, COX-2 e 5-LO. O aumento da expressão dos genes de IL-6, IL-1 β , COX-1 e COX-2 ocorreu após 4 h e se manteve após 8 h de estímulo com o veneno. Em 8 h, houve aumento da expressão do gene de IL-1 β quando comparado com o período de 4 h. Já o aumento da expressão do gene de 5-LO ocorreu apenas após 8 h (Figura 9).

Figura 8 – Contagem de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE

Camundongos da linhagem 129 SvE foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 1/2 h, 4 h e 8 h os lavados peritoneais foram coletados para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre os dois períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (α): estatisticamente diferente do grupo veneno em 1/2 h. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Figura 9 – O veneno de *B. arietans* promove aumento da expressão gênica de IL-6, IL-1 β , COX-1, COX-2 e 5-LO em camundongos 129 SvE

Camundongos da linhagem 129 SvE foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Decorridas 4 h ou 8 h, os lavados peritoneais foram coletados. Após a lise de eritrócitos, as células foram tratadas com trizol para extração do RNA total. O PCRq foi realizado para a determinação da expressão gênica de **a)** IL-6, **b)** IL-1 β , **c)** COX-1, **d)** COX-2 e **e)** 5-LO. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre os dois períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo veneno em 4 h. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Em 1/2 h já foi possível observar aumento na produção de LTB_4 , LTC_4 , PGE_2 e TXB_2 (metabólito estável do TXA_2) na cavidade peritoneal (Figura 10).

Figura 10 – Produção de eicosanoides na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE

Camundongos da linhagem 129 SvE foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 1/2 h os lavados peritoneais foram coletados para análise da produção de: **a)** LTB_4 , **b)** LTC_4 , **c)** PGE_2 e **d)** TXB_2 , por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados analisados estatisticamente por teste t de *Student*. (*): estatisticamente diferente do controle. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Nos exsudatos peritoneais também foi avaliada a produção de quimionas e citocinas inflamatórias em resposta ao veneno. Em 1/2 h não houve produção significativa de nenhum dos mediadores avaliados: IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70, IL-1 β e MCP-1. Ao passo que em 4 h o veneno induziu a produção de IL-6 e MCP-1. Após 8 h de estímulo houve redução tanto de IL-6 quanto de MCP-1 (Figura 11).

Para avaliar a capacidade do veneno em promover inflamação sistêmica, a concentração de IL-6 e MCP-1 foi avaliada no plasma dos animais experimentais. Como mostra a figura 12, os dois mediadores inflamatórios foram encontrados no plasma, indicando a presença de um processo inflamatório sistêmico.

Figura 11 – Produção de citocinas e quimiocinas na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE

Camundongos da linhagem 129 SvE foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 1/2 h, 4 h e 8 h os lavados peritoneais foram coletados para dosagem de citocinas e quimiocinas por CBA. **a)** dosagem de IL-6; **b)** dosagem de MCP-1 e **c)** relação de todas as citocinas e quimiocinas avaliadas. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (α): estatisticamente diferente do grupo veneno em 1/2 h. (β): estatisticamente diferente do grupo veneno em 4 h. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Figura 12 – Detecção de IL-6 e MCP-1 no plasma de camundongos 129 SvE

Camundongos da linhagem 129 SvE foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 1/2 h, 4 h e 8 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (α): estatisticamente diferente do grupo veneno em 1/2 h. (*) $p < 0,05$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Como relatado em estudos de caso, um dos eventos principais do envenenamento por *Bitis arietans* é a hemorragia.^{34,38} Neste sentido, foi avaliado se a dose miotóxica de veneno é capaz de promover hemorragia na cavidade peritoneal dos animais experimentais. Como é possível verificar na figura 13, o veneno induziu hemorragia local a partir de 4 h, a qual se acentuou em 8 h. É importante ressaltar que não houve hemorragia em 10 minutos e 1/2 h, o que valida o resultado referente ao aumento da permeabilidade vascular nestes períodos.

Figura 13 - Hemorragia na cavidade peritoneal de camundongos 129 SvE

Camundongos da linhagem 129 SvE foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 10 minutos, 1/2 h, 4 h ou 8 h de estímulo, o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre os dois períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (α): estatisticamente diferente do grupo veneno em 1/2 h. (β): estatisticamente diferente do grupo veneno em 4 h. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

No decorrer da tese, alguns experimentos foram realizados com animais da linhagem C57BL/6. Por este motivo, a resposta ao veneno também foi caracterizada nesta linhagem. Para os ensaios seguintes, exceto para a análise da produção de eicosanoides, avaliada em 1/2 h, foi padronizado o período de 4 h de estímulo com o veneno para avaliar o aumento de leucócitos e hemorragia na cavidade peritoneal. Neste período, as concentrações local e sistêmica de IL-6 e MCP-1, as quais atingiram seu pico em 4 h, também foram avaliadas.

É importante ressaltar que os camundongos C57BL/6 apresentaram hemorragia já nos períodos iniciais (dados não mostrados), impossibilitando a verificação do aumento da permeabilidade vascular no modelo de peritonite nestes animais. Assim, o primeiro passo foi verificar o aumento de leucócitos na cavidade peritoneal. Como mostra a figura 14, assim como nos animais da linhagem 129 SvE, o veneno de *B. arietans* é capaz de induzir o

aumento de leucócitos, sobretudo, leucócitos PMNs, na cavidade peritoneal de animais da linhagem C57BL/6.

Figura 14 – Contagem de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Analisados estatisticamente por teste t de *Student*. (*): estatisticamente diferente do controle. (**) $p < 0,01$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Paralelamente, houve aumento da expressão dos genes de IL-6, IL-1 β , COX-1 e COX-2 (Figura 15).

Figura 15 - O veneno de *B. arietans* estimula o aumento da expressão gênica de IL-6, IL-1 β , COX-1 e COX-2 em camundongos C57BL/6

Camundongos da linhagem C57BL-6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Decorridas 4 h os lavados peritoneais foram coletados. Após a lise de eritrócitos, as células foram tratadas com trizol para extração do RNA total. O PCRq foi realizado para a determinação da expressão gênica de **a)** IL-6, **b)** IL-1 β , **c)** COX-1 e **d)** COX-2. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Analisados estatisticamente por teste t de *Student*. (*): estatisticamente diferente do controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Como o período selecionado para estes ensaios foi de 4 h, a produção de eicosanoides foi avaliada também neste período. Contudo, após 1/2 h a produção destes mediadores é mais pronunciada e, por este motivo, apenas o período de 1/2 h foi selecionado para a dosagem de eicosanoides nos ensaios subsequentes. Em 1/2 h já foi possível observar aumento na produção de LTB₄, LTC₄ e PGE₂, o qual se manteve após 4 h. A produção significativa de TXB₂ (metabólito estável do TXA₂) foi detectada apenas em 1/2 h. Não houve diferença significativa na produção de LTB₄ e PGE₂ entre os dois períodos avaliados. Por outro lado, os níveis de LTC₄ e TXB₂ diminuíram significativamente em 4 h (Figura 16).

Figura 16 – Produção de eicosanoides na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 1/2 h ou 4 h de estímulo, os lavados peritoneais foram coletados para análise da produção de: **a)** LTB₄, **b)** LTC₄, **c)** PGE₂ e **d)** TXB₂, por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo veneno em 4 h. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Nos exsudatos peritoneais também foi avaliada a produção de quimionas e citocinas inflamatórias após 4 h da inoculação do veneno. Como previamente observado na linhagem 129 SvE, o veneno induziu a produção de IL-6 e MCP-1 na cavidade peritoneal dos animais da linhagem C57BL/6, mas não de IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70 e IL-1 β (Figura 17).

Nestes animais, a presença de inflamação sistêmica, caracterizada pela detecção de IL-6 e MCP-1 no plasma, foi confirmada (Figura 18).

Figura 17 – Produção de citocinas e quimiocinas na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 horas de estímulo, os lavados peritoneais foram coletados para dosagem de citocinas e quimiocinas por CBA. **a)** dosagem de IL-6; **b)** dosagem de MCP-1 e **c)** relação de todas as quimiocinas e citocinas avaliadas. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por teste t de *Student*. (*) $p < 0,05$. (*): estatisticamente diferente do controle. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Figura 18 – Concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1 em camundongos C57BL/6

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por teste t de *Student*. (*): estatisticamente diferente do controle. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Em 4 h, houve hemorragia na cavidade local provocada pelo veneno (Figura 19).

Figura 19 - Hemorragia na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por teste t de *Student*. (*): estatisticamente diferente do controle. (***) $p < 0,001$. Dados representativos de três experimentos reproduzíveis.

Portanto, temos até aqui que o veneno de *B. arietans* promove a geração de LTB_4 , LTC_4 , PGE_2 e TXB_2 , os quais podem contribuir para o processo inflamatório envolvido no envenenamento, incluindo o aumento do número de leucócitos na cavidade peritoneal e a produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1. Característico deste tipo de envenenamento, os animais também apresentaram hemorragia local na cavidade peritoneal, a qual foi precedida por trombocitopenia e acompanhada pela diminuição do número de eritrócitos no sangue (Apêndice C). Considerando a presença de hemorragia local, é coerente admitir que o número de células na cavidade peritoneal estimulada pelo veneno é a somatória do influxo de leucócitos que migraram em função do processo inflamatório e dos leucócitos que extravasaram em função do processo hemorrágico. Por esta razão, o termo “aumento do número de leucócitos” foi utilizado ao longo do trabalho em substituição ao termo “influxo de leucócitos”, no qual a migração de leucócitos para o tecido ocorre exclusivamente por diapedese.

1.4.2 Contribuição dos mediadores lipídicos no envenenamento

Uma vez que o veneno de *B. arietans* induziu a produção de mediadores lipídicos, o próximo passo do estudo foi avaliar a contribuição destes mediadores para os eventos agudos induzidos pelo veneno. Para tal, nos valem de intervenções farmacológicas e uso de camundongos geneticamente deficientes de componentes envolvidos com o metabolismo ou reconhecimento destes mediadores. No modelo de peritonite induzida pela inoculação da dose miotóxica não letal do veneno (0,5 mg/kg), foi avaliada a contribuição dos leucotrienos, de ligantes do receptor do PAF (PAFR) e de prostanoídes para o aumento de leucócitos e

produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1 no período de 4 h. Paralelamente, o efeito destes mediadores sobre a hemorragia local provocada pelo veneno foi avaliado.

1.4.2.1 Contribuição dos leucotrienos no envenenamento

Para compreender a contribuição dos leucotrienos para os eventos agudos induzidos pelo veneno, inicialmente os animais foram tratados pela via subcutânea, uma hora antes da inoculação do veneno, com o inibidor da enzima ativadora de 5-lipoxigenase (FLAP; do inglês: *5-lipoxygenase activating protein*), o MK-886 (5 mg/kg). O MK-886 é capaz de inibir a produção de LTs devido sua capacidade de se ligar e inativar a FLAP, que uma vez inativada, perde sua capacidade de se ligar ao ácido araquidônico (AA) e o tornar um substrato viável para a metabolização de LTs via 5-LO.

Inicialmente, foi avaliado o efeito do MK-886 sobre a produção dos eicosanoides induzidos pelo veneno. Como esperado, o MK-886 reduziu a produção do LTB₄ e LTC₄. Paralelamente, o tratamento interferiu com a produção de TXB₂ (Figura 20).

Figura 20 – Produção de eicosanoides após tratamento com MK-886

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com MK-886 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina aprotínica (controle). Após 1/2 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de eicosanoides por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

O tratamento com MK-886 foi capaz de reduzir o número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal (Figura 21).

Figura 21 – O tratamento com MK-886 diminui o número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com MK-886 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Além disso, o tratamento com MK-886 foi capaz de reduzir marcadamente a produção local de IL-6 e MCP-1 (Figura 22).

Figura 22 – O tratamento com MK-886 reduziu a produção local de IL-6 e MCP-1

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com MK-886 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de IL-6 e MCP-1 por CBA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

A concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1 também foi reduzida após os tratamentos com o MK-886 (Figura 23).

Figura 23 – O tratamento com MK-886 reduziu a concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com MK-886 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Em adição, houve aumento da hemorragia local após o tratamento com MK-886, sugerindo que os eicosanoides inibidos por este fármaco, incluindo o LTB₄ e o LTC₄, podem exercer um efeito protetor no contexto de hemorragia local induzida pelo veneno (Figura 24).

Figura 24 – O tratamento com MK-886 aumentou a hemorragia local

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com MK-886 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

A contribuição dos leucotrienos no envenenamento também foi avaliada mediante a utilização de camundongos geneticamente deficientes da enzima 5-lipoxigenase (5LO^{-/-}). Na linhagem 129 SvE, a qual possui o mesmo fundo genético dos animais 5LO^{-/-}, foi possível avaliar o aumento da permeabilidade vascular, visto que esta linhagem não apresentou hemorragia local nos períodos iniciais. Como mostra a figura 25, a permeabilidade vascular foi mais acentuada nos animais deficientes da enzima 5-LO.

Figura 25 – Os animais 5-LO^{-/-} têm permeabilidade vascular elevada

Após sedação, camundongos da linhagem 129 SvE e 5LO^{-/-} foram inoculados pela via endovenosa com solução de azul de Evans (20 mg/kg). Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 10 e 30 minutos o lavado peritoneal foi coletado para dosagem do corante azul de Evans extravasado na cavidade. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de Student. Dados das comparações entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Ao contrário do esperado, isto é, diferente dos resultados obtidos após o tratamento com MK-886, não houve diferença no número de leucócitos totais, tampouco de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal dos animais deficientes de 5-LO (Figura 26).

Figura 26 – Nos animais deficientes da enzima 5-LO não houve diminuição do número de leucócitos na cavidade peritoneal

Camundongos 129 SvE e 5LO^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média ± SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de quatro experimentos reprodutíveis.

Além disso, os animais deficientes de 5-LO produziram níveis semelhantes de IL-6 e MCP-1 na cavidade peritoneal (Figura 27).

Figura 27 – Não há diferença significativa na produção local de IL-6 e MCP-1 nos animais deficientes de 5-LO

Camundongos 129 SvE e 5LO^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de IL-6 e MCP-1 por CBA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de quatro experimentos reprodutíveis.

Ao passo que a concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1 é mais elevada nos animais deficientes de 5LO (Figura 28).

Figura 28 – Os animais 5LO^{-/-} têm mais IL-6 e MCP-1 sistêmica

Camundongos 129 SvE e 5LO^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Dados representativos de quatro experimentos reprodutíveis.

Para tentar compreender a discrepância entre os animais tratados com o MK-886 e os animais 5LO^{-/-}, foi avaliado se, de fato, esses animais não expressam 5-LO. Como mostra a figura 29, não há expressão da enzima 5-LO nos animais deficientes em nenhum dos períodos avaliados, validando o modelo experimental. Em adição, foi avaliada produção de LTs nos animais 5LO^{-/-} (Figura 30). Os animais geneticamente deficientes da enzima 5-LO produzem menos LTB₄ e LTC₄ do que a linhagem controle. Ao passo que não houve diferença significativa na produção de PGE₂ e TXB₂. No entanto, é possível notar que após o estímulo com o veneno os animais 5LO^{-/-} tem aumento significativo da produção de LTB₄ e LTC₄, indicando a participação de outras lipoxigenases no envenenamento.

Figura 29 – Expressão gênica da enzima 5LO

Camundongos das linhagens 129 SvE e 5LO^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Decorridas 4 h e 8 h os lavados peritoneais foram coletados. Após a lise de eritrócitos, as células foram tratadas com trizol para extração do RNA total. O PCRq foi realizado para a determinação da expressão gênica da enzima 5-lipoxigenase (5LO) em **a)** 4 h e **b)** 8 h. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle. (*) $p < 0,05$. Dados representativos de quatro experimentos reprodutíveis.

Figura 30 – Produção de eicosanoides nos animais deficientes de 5-LO

Camundongos 129 SvE e 5LO^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 1/2 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de eicosanoides por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Por fim, neste caso corroborando o resultado obtido após o tratamento com MK-886, a hemorragia na cavidade peritoneal foi mais elevada nos animais deficientes de 5-LO (Figura 31).

Figura 31 – A hemorragia na cavidade peritoneal induzida pelo veneno é maior em animais deficientes da enzima 5-LO

Camundongos 129 SvE e 5LO^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de quatro experimentos reprodutíveis.

1.4.2.2 Contribuição do PAFR e seus ligantes no envenenamento

Embora não tenha sido realizada a quantificação da produção de PAF, até porque a maioria do PAF sintetizado se mantém ancorado à célula responsável por sua síntese, seu papel na inflamação induzida pelo veneno foi avaliado. Inicialmente, o papel do PAFR foi avaliado a partir do tratamento com WEB-2086, antagonista do PAFR (5 mg/kg, 1 h antes da inoculação do veneno; via subcutânea).

O tratamento com WEB-2086 reduziu a produção de LTC₄ e TXB₂, ao passo que não interferiu com a produção de LTB₄ e PGE₂ (Figura 32).

O tratamento com o antagonista do receptor do PAFR não interferiu de maneira significativa no número de leucócitos na cavidade peritoneal (Figura 33). Por outro lado, o tratamento com WEB-2086 foi capaz de diminuir a produção local (Figura 34) e sistêmica (Figura 35) de IL-6.

Figura 32 – Produção de eicosanoides após tratamento com WEB-2086

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com WEB-2086 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 1/2 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de eicosanoides por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Figura 33 – O tratamento com WEB-2086 não alterou o número de leucócitos na cavidade peritoneal

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com WEB-2086 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Figura 34 – O tratamento com WEB-2086 diminui a produção local de IL-6

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com WEB-2086 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de IL-6 e MCP-1 por CBA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Figura 35 – O tratamento com WEB-2086 diminui a concentração sistêmica de IL-6

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com WEB-2086 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Por fim, foi visto que o tratamento com WEB-2086 não interfere com a hemorragia local provocada pelo veneno (Figura 36).

Figura 36 – O tratamento com WEB-2086 não alterou a hemorragia local

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com WEB-2086 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

A contribuição do PAFR no envenenamento também foi avaliada pelo uso de animais geneticamente deficientes deste receptor (PAFR^{-/-}). Como mostra a figura 37, animais PAFR^{-/-} tem menos acúmulo de leucócitos totais e PMNs na cavidade peritoneal. Ao passo que não houve alteração no número de leucócitos MNs.

Além disso, houve redução local de IL-6 e MCP-1 nos animais deficientes de PAFR (Figura 38). Por outro lado, houve redução sistêmica apenas de IL-6 nos animais PAFR^{-/-} (Figura 39).

Figura 37 – A quantidade de leucócitos encontrados na cavidade peritoneal após o estímulo com o veneno é parcialmente dependente de ligantes de PAFR

Camundongos C57BL/6 e PAFR^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Figura 38 – A produção local de IL-6 e MCP-1 é parcialmente dependente de ligantes do PAFR

Camundongos C57BL/6 e PAFR^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de IL-6 e MCP-1 por CBA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Figura 39 – A concentração sistêmica de IL-6 é parcialmente dependente de ligantes do PAFR

Camundongos C57BL/6 e PAFR^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Ainda, é possível observar que na ausência do PAFR há menos hemorragia provocada pelo veneno (Figura 40).

Figura 40 – A hemorragia na cavidade peritoneal é atenuada em animais PAFR^{-/-}

Camundongos C57BL/6 e PAFR^{-/-} foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 horas de estímulo, o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados de cada grupo veneno comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre as linhagens analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): diferença estatística entre as linhagens. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reproduzíveis.

1.4.2.3 Contribuição dos prostanoides no envenenamento

O papel dos prostanoides no envenenamento foi avaliado a partir de intervenções farmacológicas. Para tal, inicialmente os camundongos foram tratados 1 h antes da inoculação do veneno com indometacina (10 mg/kg). A indometacina atua na inibição de COX-1/2 e, consequentemente com a geração de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs).

O tratamento com indometacina inibiu a produção de TXB₂, ao passo que não interferiu com a geração de PGE₂. Em adição, após o tratamento com indometacina houve aumento de LTB₄ e redução de LTC₄ (Figura 41). Como mostra a figura 42, a produção de PGE₂ também não foi afetada em 4 h após o tratamento prévio com indometacina. Portanto, admitimos que os efeitos decorrentes do tratamento com indometacina neste estudo se devem à inibição da produção de TXB₂, mas não de PGE₂.

Figura 41 – Produção de eicosanoides após tratamento com indometacina

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com indometacina (10 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 1/2 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de eicosanoides por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Figura 42 – Produção de PGE₂ em 4 h após tratamento com indometacina

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com indometacina (10 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de PGE₂ por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

O tratamento com indometacina foi capaz de reduzir o número de leucócitos totais e PMNs na cavidade peritoneal, ao passo que não interferiu com o número de leucócitos MNs (Figura 43).

Figura 43 – O tratamento com indometacina reduz o número de leucócitos na cavidade peritoneal

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com indometacina (10 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

O tratamento com indometacina foi capaz de reduzir a produção local (Figura 44) e a concentração sistêmica (Figura 45) de IL-6, ao passo que não interferiu com a produção de MCP-1.

Figura 44 – O tratamento com indometacina reduz a produção local de IL-6

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com indometacina (10 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de IL-6 e MCP-1 por CBA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Figura 45 – O tratamento com indometacina reduz a concentração sistêmica de IL-6

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com indometacina (10 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

O tratamento com indometacina foi capaz de acentuar a hemorragia local provocada pelo veneno (Figura 46).

Figura 46 – O tratamento com indometacina acentua a hemorragia local

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com indometacina (10 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

1.4.2.3.1 Contribuição de COX-1 no envenenamento

A geração de mediadores lipídicos é um mecanismo complexo que envolve a interação de diversas sintases intermediárias. Como exemplo, temos a TXA sintase e a PGD sintase, as quais se encontram co-localizadas com COX-1 na membrana do retículo endoplasmático, e, desta forma, estão principalmente envolvidas com a geração de TXA₂ e PGD₂ durante as fases mais iniciais da resposta inflamatória.²³⁰ Além disso, é importante ressaltar que a indometacina, apesar de ser considerado um inibidor não seletivo de COX, é mais específica para COX-1.²³¹ Em conjunto com os dados experimentais obtidos, os dados da literatura indicam que o efeito anti-inflamatório induzido pela indometacina neste estudo foi decorrente da inibição de COX-1, com consequente inibição da produção de TXB₂.

Neste sentido, para confirmar a importância de COX-1 nos eventos agudos induzidos pelo veneno, o próximo passo foi avaliar o papel de COX-1 no aumento do número de leucócitos, produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1, bem como sobre a hemorragia na cavidade peritoneal em 4 h. Para tal, os ensaios seguintes foram conduzidos mediante o tratamento prévio dos animais (1 h antes do veneno) com o inibidor específico de COX-1, o SC-560 (5 mg/kg).

Como visto anteriormente, o veneno foi capaz de promover o aumento da expressão gênica de COX-1 (Figura 15). No entanto, a expressão proteica de COX-1 não foi alterada,

indicando que sua possível participação envenenamento pode ter sido decorrente do aumento da atividade enzimática. Além disso, não houve expressão proteica de COX-2 em 4 h (Figura 47), indicando que a COX-2 foi expressa apenas em períodos compreendidos entre 1/2 h e 4 h, ou que os prostanoídes produzidos são, de fato, dependentes apenas da atividade de COX-1.

Figura 47 – Expressão proteica de COX-1/2 nas células peritoneais

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h os lavados peritoneais foram coletados e as células tratadas com tampão de lise de eritrócitos para posterior análise da expressão proteica de COX-1 e 2 por *Western Blotting*. Na membrana, cada poço representa um animal (3 animais representativos de cada grupo). Células Raw 264.7 tratadas por 24 h com LPS foram utilizadas como controle positivo da expressão de COX-2. No gráfico, cada ponto representa a média $\pm$ SD (3 animais), analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

O tratamento com SC-560 foi capaz de reduzir o número de leucócitos totais e PMNs, ao passo que não interferiu com o número de leucócitos MNs (Figura 48).

Figura 48 – Houve redução do número de leucócitos na cavidade peritoneal após o tratamento com SC-560

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com SC-560 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para contagem total e diferencial de leucócitos. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Em contrapartida, diferente do tratamento com indometacina, o SC-560 não foi capaz de reduzir a produção local (Figura 49), nem sistêmica de IL-6 (Figura 50). O tratamento não interferiu com a produção de MCP-1.

Figura 49 – O tratamento com SC-560 não alterou a produção local de IL-6 e MCP-1

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com SC-560 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de IL-6 e MCP-1 por CBA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle. (**) $p < 0,01$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

Figura 50 – O tratamento com SC-560 não alterou a concentração sistêmica de IL-6 e MCP-1

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com indometacina (10 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 4 h o sangue foi coletado por punção cardíaca e o plasma obtido para a dosagem de IL-6 e MCP-1 por ELISA. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo tratado com inibidor. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

Finalmente, foi visto que o tratamento com SC-560 não interfere na hemorragia local provocada pelo veneno (Figura 51).

Figura 51 – A hemorragia na cavidade peritoneal induzida pelo veneno não aumentou após o tratamento com SC-560

Uma hora antes do estímulo com o veneno, camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratados com SC-560 (5 mg/kg) pela via subcutânea. Em seguida, os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirrogênica (controle). Após 4 h o lavado peritoneal foi coletado para dosagem de hemoglobina. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais), analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

1.5 DISCUSSÃO

A inflamação é caracterizada por uma série de eventos complexos, incluindo a vasodilatação arteriolar seguida pelo aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade das vênulas pós-capilares, levando ao extravasamento do conteúdo plasmático e a migração de leucócitos para o tecido extravascular.⁶⁴⁻⁶⁷ No modelo de peritonite, este estudo mostrou que a dose miotóxica do veneno da serpente *B. arietans* (0,5 mg/kg) induz um processo inflamatório agudo, caracterizado pelo aumento da permeabilidade vascular, produção de mediadores inflamatórios e aumento de leucócitos na cavidade peritoneal, mais especificamente de leucócitos PMNs. Estes dados estão de acordo com estudos prévios que demonstram a capacidade pró-inflamatória de venenos de serpentes da subfamília Viperinae, como é o caso de estudos com o veneno de *Montivipera bornmuelleri* em modelo de peritonite,²⁰⁹ de *Vipera berus* no músculo cremáster, onde também foi detectada hemorragia,²¹¹ bem como pelo veneno de *Vipera ammodytes ammodytes* em células monocíticas da linhagem U937.²¹⁰ Além da inflamação, paralelamente, os animais apresentaram hemorragia local, corroborando relatos de estudos de caso.^{34, 38}

Principalmente em 1/2 h o veneno de *B. arietans* induziu a produção de LTB₄, LTC₄, PGE₂ e TXB₂, assim como já observado no exsudato peritoneal de camundongos inoculados com o veneno de *Bothrops atrox*.¹⁹⁵ Estes mediadores podem contribuir para diversas etapas do processo inflamatório, incluindo os eventos iniciais na microcirculação, como a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, os quais contribuem para a formação do edema.^{65, 66} Além disso, os mediadores lipídicos, especialmente os prostanoídeos, estão envolvidos com a produção de IL-6¹⁰⁸ e com o recrutamento de neutrófilos.²³² O TXA₂ está envolvido com o aumento da expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1, na superfície de células endoteliais ativadas pelo PAF, o que contribui para a diapede dos leucócitos PMNs e MNs.¹¹⁹ O LTB₄ também pode contribuir para o envenenamento via recrutamento e ativação de neutrófilos, ação que pode ser potencializada pelo LTD₄.^{156, 233, 234}

Dentre as citocinas e quimiocinas avaliadas, o veneno induziu a produção de IL-6 e MCP-1, indicando a ativação do fator de transcrição NF-κB pelo veneno ou pela inflamação. A IL-6 é um mediador solúvel com efeitos pleiotrópicos na inflamação, resposta imune e hematopoiese. Logo após sua síntese local nos períodos iniciais do processo inflamatório, a IL-6 atinge a corrente sanguínea até chegar no fígado, onde induz a síntese de proteínas de fase aguda, incluindo a proteína C reativa (PCR), proteína amiloide A sérica e o fibrinogênio,²³⁵ as quais são capazes de amplificar a resposta inflamatória de diversas formas,

incluindo a ativação do sistema complemento e atuando como opsoninas.⁸¹ Além disso, a IL-6 pode reduzir a produção de albumina,²³⁵ o que leva a diminuição da pressão osmótica sanguínea e consequente propagação do plasma no tecido extravascular, causando edema. Na medula óssea, a IL-6 promove a maturação de megacariócitos e, consequentemente, a liberação de plaquetas.²³⁶ Além disso, regula a transição do recrutamento de neutrófilos para macrófagos durante a inflamação.⁷⁶ Por outro lado, as quimiocinas desempenham um papel fundamental no recrutamento seletivo de monócitos, neutrófilos e linfócitos, induzindo quimiotaxia através da ativação de receptores acoplados a proteína G e consequente aumento da afinidade de integrinas.²³⁷ A MCP-1, também conhecida como CCL-2, é a quimiocina chave na regulação da migração e infiltração de monócitos durante a resposta inflamatória e pode ser produzida por muitos tipos celulares, incluindo as células endoteliais e monócitos.⁷³ A produção de MCP-1 indica o posterior influxo de monócitos para o tecido, o qual ocorre após o pico de leucócitos PMNs.^{192, 196} Em conjunto, a IL-6 e a MCP-1 contribuem para a amplificação do processo inflamatório induzido pelo veneno de *B. arietans*, assim como participam da inflamação induzida por outros venenos de serpentes, como o de *Naja annulifera*²²⁹ e *Bothrops atrox*.¹⁹⁵ Entretanto, diferente de alguns venenos botrópicos, não foram detectadas citocinas como o TNF- α ^{193, 195} e IL-1 β ²²³ no exsudato peritoneal e no plasma dos animais experimentais. Contudo, foi observado o aumento da expressão gênica de IL-1 β , sugerindo que esta citocina pode ter sido produzida em quantidades inferiores à capacidade de detecção do kit. Ao passo que a expressão gênica de TNF- α não foi avaliada.

A resposta inflamatória aguda também é caracterizada pela migração de leucócitos, inicialmente PMNs, os quais são mais tardiamente substituídos por leucócitos MNs.⁶⁴ Neste estudo, vimos que durante a inflamação aguda induzida pelo veneno (4 h - 8 h) houve aumento do número de leucócitos PMNs, mas não MNs, na cavidade peritoneal dos animais experimentais. Os leucócitos PMNs são o tipo celular predominante nos estágios iniciais do processo inflamatório provocado por diversos venenos botrópicos,^{192, 196, 203} e exercem funções cruciais para a amplificação da resposta inflamatória, incluindo a produção de mediadores como a IL-8, IL-6 e PGE₂.²³⁸ A ativação destes leucócitos culmina na liberação do conteúdo tóxico de seus grânulos, os quais contêm espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase.⁷¹ Estes potentes agentes efetores não discriminam entre moléculas próprias e estranhas, de modo que danos colaterais ao tecido adjacente são inevitáveis. Em contrapartida, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos resulta na produção de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos, como o TGF- β e a IL-10, as quais são essenciais para o reparo tecidual.²³⁹

Diversos estudos mostraram que a inflamação induzida por venenos é parcialmente dependente de mediadores lipídicos,^{212, 229, 234} o que nos levou a avaliar a contribuição destes mediadores para os eventos agudos provocados pelo veneno de *B. arietans*. Neste sentido, o primeiro passo foi avaliar a contribuição destes mediadores para o aumento da permeabilidade vascular. Nos animais da linhagem 129 SvE foi visto que o veneno de *B. arietans* induz aumento da permeabilidade vascular já em dez minutos, a qual se intensifica em 1/2 h. Nos dois períodos, os animais deficientes da enzima 5-lipoxigenase (5-LO^{-/-}) apresentaram permeabilidade vascular mais elevada. É bem estabelecido que os leucotrienos, incluindo o LTB₄ e o LTC₄ induzem aumento da permeabilidade vascular.^{157, 159} Portanto, para nosso conhecimento, a suposta contribuição dos leucotrienos para o controle negativo da permeabilidade vascular ainda não havia sido demonstrada, de modo que são necessários outros estudos para compreender o mecanismo e relevância deste fenômeno. Por outro lado, o efeito dos mediadores lipídicos sobre o aumento da permeabilidade vascular não pôde ser avaliado nos animais C57BL/6, linhagem utilizada com os ensaios com os inibidores e como controle da linhagem PAFR^{-/-}, visto que esta linhagem apresentou hemorragia evidente já nos períodos iniciais. Contudo, a rápida produção de mediadores lipídicos que contribuem para a vasodilatação, como a PGE₂,²⁴⁰ bem como para o aumento da permeabilidade vascular, de maneira indireta, como a PGE₂, capaz de potencializar o extravasamento vascular induzido pela bradicinina,²⁴⁰ ou direta, como o TXA₂,¹²⁰ o PAF¹⁷⁹ e os cistenil leucotrienos, incluindo o LTC₄,¹⁵⁹ indicam a participação desses mediadores na modulação destes eventos. Porém, estes efeitos devem ser avaliados mais cuidadosamente utilizando doses não hemorrágicas ou outro modelo experimental onde a hemorragia não interfira. Contudo, os resultados aqui obtidos com a dose miotóxica do veneno são bastante relevantes, uma vez que replica o que ocorre no envenenamento, onde a inflamação é acompanhada por hemorragia,^{33, 34, 37}.

Para avaliar a contribuição dos leucotrienos (LTs) para o aumento do número de leucócitos na cavidade peritoneal e produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1, foram utilizados animais geneticamente deficientes da enzima 5-lipoxigenase (5LO^{-/-}) ou animais tratados com MK-886, inibidor da enzima ativadora de 5-LO (FLAP). Como esperado, o tratamento com MK-886 foi capaz de diminuir a produção de LTB₄ e LTC₄. Paralelamente, diminui a produção de TXB₂, mas não interferiu com a produção de PGE₂. O tratamento com o MK-886 causou diminuição do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal e redução local e sistêmica de IL-6 e MCP-1, sugerindo que os LTs, incluindo o LTB₄ e o LTC₄, são importantes para estes eventos agudos induzidos pelo veneno. Por outro lado, ao contrário do esperado, não houve redução destes parâmetros inflamatórios nos animais 5LO^{-/-},

apesar destes animais também terem níveis significativamente menores de LTB₄ e LTC₄, quando comparados com os animais da linhagem 129 SvE, utilizados como controle.

Modelos animais potencialmente apresentam o risco de mecanismos compensatórios devido à modificação genética do gene alvo, o que torna os resultados difíceis de interpretar. No entanto, animais das linhagens 129 SvE e 5LO^{-/-} já foram utilizados para avaliar a inflamação induzida pelo veneno do escorpião *Tityus serrulatus*,²³⁴ onde foi mostrado que os animais deficientes da enzima 5-LO apresentaram inflamação atenuada. Contudo, é importante considerar o fato de que o envenenamento por *B. arietans* é hemorrágico, de modo que no modelo de peritonite induzida pelo veneno de *B. arietans* a inflamação foi acompanhada por hemorragia, o que nos leva a admitir que, além dos leucócitos PMNs, outros componentes plasmáticos, incluindo as plaquetas, atingiram a cavidade peritoneal. As plaquetas expressam majoritariamente COX-1²⁴¹ e 12-LO²⁴² e podem contribuir para o processo inflamatório induzido pelo veneno a partir da geração de prostanoídes e leucotrienos dependentes destas vias. A presença de 12-LO nas plaquetas explica a produção significativa de leucotrienos nos animais 5LO^{-/-} e o fato do tratamento com o MK-886 não ter reduzido a níveis basais a produção destes leucotrienos. No entanto, a presença de plaquetas e, consequentemente de 12-LO, por si só não explica a divergência entre os resultados obtidos com os animais tratados com MK-886 e geneticamente deficientes, uma vez que ambos apresentam inibição da atividade de 5-LO e a possível contribuição das plaquetas que extravasaram na cavidade devido à hemorragia. Após buscas na literatura, foi visto que, embora o MK-886 tenha sido originalmente descrito com um inibidor seletivo de FLAP, estudos têm mostrado que sua ação anti-inflamatória é mais complexa. Uma destas funções é a capacidade de inibir a atividade de COX-1 e suprimir a agregação plaquetária.²⁴³ De fato, no nosso estudo foi observado que o tratamento com MK-886 reduz a produção de TXB₂, um dos principais metabólitos dependentes da ação de COX-1.²³⁰ Por outro lado, não houve redução de TXB₂ nos animais 5LO^{-/-}, o que pode explicar a ausência de redução do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal destes camundongos. Considerando estes aspectos, os dados sugerem a participação de COX-1 e TXB₂ no envenenamento. Corroborando esta hipótese, um estudo recente mostrou a importante contribuição de TXB₂ derivado de plaquetas via metabolismo por COX-1 sobre a ativação e recrutamento de neutrófilos em modelo de inflamação pulmonar.²⁴⁴ Neste sentido, foi mostrado que o TXB₂ induz aumento da permeabilidade vascular por meio do aumento da produção de IL-8,¹²⁰ principal quimiocina envolvida com a migração de neutrófilos.⁷⁰ Além disso, o veneno induz hiperativação e agregação plaquetária,⁴⁰ as quais podem ter sido atenuadas pelo MK-886.

Outra função do MK-886 é a capacidade de inibir PPAR- α , membro da superfamília de fatores de transcrição dependentes de ligantes.²⁴⁵ No contexto inflamatório, a ativação de PPAR- α foi associada ao aumento da expressão gênica e proteica do componente C3, molécula central da ativação do sistema complemento.²⁴⁶ Este aumento se deve ao fato do gene de C3 ser um alvo direto do elemento responsivo da molécula PPAR- α . Neste trabalho, utilizando RNAs de interferência, agonistas e antagonistas de PPAR- α , os autores mostraram que o aumento da expressão gênica e proteica de C3 é dependente de PPAR- α , o qual foi inibido pelo tratamento com MK-886.²⁴⁷ Assim, no nosso estudo é possível sugerir que o MK-886 foi capaz de inibir PPAR- α e, possivelmente, o aumento da produção de C3. Neste sentido, os resultados indicam que o sistema complemento pode estar envolvido com o processo inflamatório agudo induzido pelo veneno de *B. arietans*, incluindo a geração de IL-6.²⁴⁸ A participação do sistema complemento no processo inflamatório induzido por venenos não é uma surpresa.²⁴⁹⁻²⁵¹

Estes resultados apontam a complexidade do processo inflamatório induzido pelo veneno de *B. arietans* e nos permite inferir que apenas a redução da geração de leucotrienos, observada tanto nos animais tratados com MK-886, como nos animais deficientes de 5-LO, não foi suficiente para inibir o aumento de leucócitos na cavidade peritoneal e a produção de IL-6 e MCP-1 induzidas pelo veneno. Neste sentido, podemos dizer que o aumento de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal induzido pelo veneno de *B. arietans* é um fenômeno independente de LTB₄. Este mesmo efeito já foi demonstrado com o veneno de *Bothrops atrox*. Neste estudo foi mostrado que camundongos deficientes de TLR2 tratados com o veneno não produzem LTB₄, no entanto, não apresentaram redução do influxo de PMNs na cavidade peritoneal.²⁵²

O papel do PAF foi avaliado a partir da inibição farmacológica do seu receptor (PAFR) com o WEB-2086 ou pelo uso de animais geneticamente deficientes deste receptor (PAFR^{-/-}). O tratamento com WEB-2086 reduziu a produção de LTC₄ e TXB₂, ao passo que não interferiu com a produção de LTB₄ e PGE₂. Paralelamente, inibiu significativamente a produção de IL-6, mas não alterou a produção de MCP-1 nem o número de leucócitos PMNs na cavidade. Por outro lado, os camundongos PAFR^{-/-} apresentaram redução de todos os parâmetros inflamatórios avaliados. A inibição farmacológica, incluindo a dose, via de inoculação e tempo de tratamento utilizado para os experimentos com o WEB-2086 foi baseada em um estudo prévio com o veneno da serpente africana *Naja annulifera*, onde o tratamento foi capaz de inibir o edema provocado pelo veneno. No entanto, esta inibição foi eficiente apenas durante os primeiros trinta minutos.²²⁹ Desta forma, é possível que o

tratamento com o WEB-2086 tenha sido eficiente apenas nos períodos iniciais e por esta razão, houve redução de TXB_2 em 1/2 h, mas não houve redução significativa do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal em 4 h. Contudo, os resultados obtidos com os animais deficientes indicam um papel importante de ligantes de PAFR, incluindo o PAF e seu metabólito intermediário AAG, para o processo inflamatório agudo induzido pelo veneno.

Após o tratamento com WEB-2086 houve aproximadamente 60 % de inibição da produção de TXB_2 . Esta redução é esperada, visto que o PAF é um potente ativador de plaquetas e indutor da produção de TXB_2 nestas células.²⁵³ A agregação plaquetária induzida pelo PAF é inibida pelo tratamento com WEB-2086 ($\text{IC}_{50} = 0,65 \mu\text{m}$) e pela indometacina ($\text{IC}_{50} = 0,2 \mu\text{m}$). Além disso, em uma concentração bem mais baixa ($\text{IC}_{50} = 0,05 \mu\text{m}$), foi visto que o tratamento com o antagonista do receptor de TXB_2 (SQ29548) foi capaz de inibir a ativação e agregação plaquetária,²⁵⁴ indicando a importante contribuição deste metabólito na resposta induzida pelo PAF. Portanto, com os resultados obtidos em conjunto com a ampla literatura consultada, é possível sugerir que os eventos agudos induzidos pelo veneno de *B. arietans* são dependentes de agonistas do PAFR, os quais, dentre outras coisas, induzem a produção de TXB_2 via COX-1.

Finalmente, para avaliar a contribuição dos prostanoídes para os eventos agudos induzidos pelo veneno, os animais foram tratados com indometacina e SC-560, respectivamente inibidores de COX-1/2 e COX-1. O tratamento com indometacina aumentou significativamente a produção de LTB_4 , reduziu a produção de LTC_4 , promoveu a inibição completa de TXB_2 , mas não interferiu com a produção de PGE_2 . O aumento da produção de LTB_4 após o tratamento com indometacina indica que produtos metabolizados por COX, como o TXB_2 , mas não a PGE_2 , a qual não foi inibida pela indometacina nas condições experimentais utilizadas neste estudo, regulam negativamente a produção de LTB_4 . Ao estudar o envenenamento pelo escorpião *Tityus serrulatus*, Zoccal e cols. (2016) mostraram que a produção de LTB_4 é negativamente regulada pela PGE_2 e vice-versa e que este balanço determina o desfecho do envenenamento.²²⁸ Em neutrófilos de sangue periférico humano, a PGE_2 altera a biossíntese de LTB_4 para a LXA_4 , a qual é capaz de reduzir o infiltrado de neutrófilos.⁹² Em conjunto, estes estudos revelam a contribuição de PGE_2 para o controle da geração de LTB_4 . No entanto, para nosso conhecimento a regulação negativa da produção de LTB_4 pelo TXB_2 ainda não havia sido demonstrada. Em adição, apesar do aumento de LTB_4 , o tratamento com indometacina foi capaz de diminuir o número de PMNs e a concentração local e sistêmica de IL-6, indicando novamente que o LTB_4 não é importante para estes eventos agudos induzidos pelo veneno. A redução de neutrófilos após o tratamento com

indometacina já mostrada em modelo de inflamação local induzida pelo veneno de *Bothrops jararacussu*.²¹² Apesar de reduzir a concentração de IL-6, o tratamento com indometacina não alterou a produção de MCP-1. Neste sentido, a inibição da expressão gênica de IL-6 após o tratamento com indometacina já foi reportada anteriormente, ao passo que a expressão gênica de TNF- α não foi alterada,¹⁰⁸ indicando que a IL-6 é um importante mediador inflamatório seletivamente inibido pela indometacina.

Como mencionado, o tratamento com indometacina não foi capaz de reduzir a produção de PGE₂. A concentração de indometacina utilizada foi baseada em um estudo prévio com o veneno de *Bothrops jararacussu*, onde o tratamento foi capaz de reduzir o edema e a neutrofilia provocado pelo veneno de *Bothrops jararacussu*.²¹² No entanto, os autores não avaliaram a inibição de PGE₂. De acordo com a literatura, a TXA sintase e a PGD sintase estão co-localizadas com a COX-1 na membrana do retículo endoplasmático, desta forma, estão principalmente envolvidas com a produção de TXA₂ e PGD₂ durante as fases mais iniciais da resposta inflamatória induzida em macrófagos peritoneais de rato.²³⁰ Por outro lado, a PGE sintase microssomal 1 e a PGI sintase se encontram mais próximas a COX-2 na membrana perinuclear, estando mais envolvidas com a produção de PGE₂ e PGI₂ durante as fases mais tardias da resposta inflamatória induzida por LPS.^{230, 255} Considerando estas informações, em conjunto com o fato de que a indometacina é mais específica para COX-1,²⁵⁶ é possível sugerir que a indometacina, na concentração, via de inoculação e período de tratamento utilizados, não foi capaz de inibir COX-2 e a consequente produção de PGE₂. Por outro lado, foi capaz de inibir COX-1 e, consequentemente, a produção de TXB₂, culminando na diminuição do número de leucócitos PMNs e produção de IL-6. Corroborando este raciocínio, a geração de PGE₂ não foi inibida após o tratamento com o inibidor seletivo de COX-1 (dados não mostrados). Além disso, um trabalho mostrou que houve inibição da produção de PGE₂ no exsudato da pata de ratos tratados com carragenina após o tratamento com uma dose três vezes maior de indometacina do que a utilizada no presente estudo.¹⁰⁸

Foi mostrado que a redução de leucócitos PMNs, IL-6 e MCP-1 decorrente do tratamento com MK-886 parece ser dependente de ações complementares, como a inibição de COX-1²⁴³ e consequente redução de TXB₂, como vimos neste estudo, sugerindo a importância de COX-1 no envenenamento. Portanto, o papel de COX-1 foi avaliado após o tratamento com SC-560. O inibidor seletivo de COX-1 (SC-560) foi capaz de reduzir o número de leucócitos PMNs, no entanto, ao contrário do tratamento com indometacina, não alterou a produção de IL-6. Além de ser responsável pela inibição de COX, a indometacina também é um agonista do receptor PPAR- γ , o qual é capaz de inibir a produção de citocinas

inflamatórias em monócitos humanos.¹³¹ Desta forma, concluímos que a indometacina inibiu a atividade de COX-1, produção de TXB₂ e, conseqüentemente, diminuiu o influxo de PMNs na cavidade peritoneal dos animais experimentais. Por outro lado, a diminuição de IL-6 após o tratamento com indometacina pode ter sido decorrente da sinalização via PPAR- γ , mas não da inibição de COX-1, visto que a inibição seletiva de COX-1 utilizando o SC-560 não foi capaz de inibir a produção desta citocina.

Estudos prévios mostraram que neutrófilos expressam COX-2.^{257, 258} No entanto, nas células presentes na cavidade peritoneal, constituídas majoritariamente de leucócitos PMNs, em sua maioria neutrófilos, não foi detectada a expressão de COX-2 em 4 h. Contudo, a ausência de inibição da produção PGE₂ a partir do tratamento com inibidores de COX-1, sugere a participação de COX-2 no envenenamento. É possível que esta isoforma tenha sido expressa no período compreendido entre 1/2 h e 4 h, como demonstrado em um estudo com duas PLA₂ de *Bothrops asper*, capazes de induzir o aumento da expressão proteica de COX-2 a partir de 1 h com redução em 3 h.²⁵⁹ Portanto, a expressão de COX-2 induzida pelo veneno nas células peritoneais deve ser investigada em outros períodos e a ação de prostanóides dependentes de COX-2, especialmente a PGE₂, deve ser avaliada.

Em suma, os resultados obtidos com os inibidores da síntese de leucotrienos e prostanoídes apontam que estes fármacos podem atuar de maneira positiva no controle dos eventos inflamatórios induzidos pelo veneno de *B. arietans*. Entretanto, os mecanismos de ação destes e outros fármacos similares são complexos. Como exemplo, podemos citar o mecanismo anti-inflamatório mediado pelo ácido acetilsalicílico (AAS), amplamente utilizado como analgésico e antitérmico. O AAS não inibe apenas a atividade de COX-2 e a produção de prostanoídes, mas também é capaz de acetilar a COX-2 e induzir a produção de uma lipoxina anti-inflamatória, a LXA₄.^{95, 260} Além disso, também é complexa a interação entre as sintases intermediárias responsáveis pela geração destes mediadores,⁹⁵ o que pode ser o motivo pela redução de LTC₄ após os tratamentos com indometacina e WEB-2086.

Além da inflamação, o veneno de *B. arietans* provocou hemorragia local, a qual foi modulada pelo uso de inibidores/antagonistas e em animais geneticamente deficientes de receptores ou enzimas responsáveis pelo metabolismo de mediadores lipídicos. A hemorragia é um efeito intrínseco do envenenamento por *B. arietans*,^{34, 35, 38} a qual é acompanhada por intensa trombocitopenia.^{34, 38} Contudo, é interessante pontuar que a trombocitopenia por si só não é um indício de hemorragia, visto que existem indivíduos trombocitopênicos que não apresentam sangramentos.²⁶¹ Na tentativa de compreender este fenômeno, evidências experimentais mostraram que a hemorragia e a inflamação estão interligadas. George e cols.

(2008) constataram que animais plaquetopênicos desenvolvem hemorragias apenas quando apresentam um processo inflamatório associado.²⁶² Desta forma, a inflamação pode ser importante para a modulação de distúrbios hemostáticos, sendo de extrema relevância para os acidentes ofídicos de cunho hemorrágico.

No presente estudo foi mostrado que a hemorragia local foi menor em camundongos geneticamente deficientes do receptor do PAF. O veneno de *B. arietans* induz intensa trombocitopenia *in vivo*.^{34, 38} *In vitro* foi mostrado que o veneno possui ação direta sobre as plaquetas, promovendo hiperativação e degradação plaquetária.⁴⁰ Por sua vez, as plaquetas estão envolvidas com a ativação e migração de leucócitos via TXB₂ e COX-1, portanto, acentuam a inflamação,²⁴⁴ fato que pode contribuir para a hemorragia.²⁶² Sabendo que o PAF é um potente ativador de plaquetas e indutor da produção de TXB₂, é possível dizer que a hiperativação e degradação plaquetária provocada pela ação direta do veneno, a qual contribui para a hemorragia, é acentuada pela ativação do PAF. Desta forma, se torna coerente o dado de redução da hemorragia local nos animais geneticamente deficientes do receptor do PAF.

Por outro lado, após o tratamento com MK-886, bem como nos animais 5LO^{-/-}, houve aumento da hemorragia local, indicando que os leucotrienos, incluindo o LTB₄ e o LTC₄, de alguma forma controlam a hemorragia provocada pelo veneno. Após o tratamento com indometacina foi observado o mesmo efeito, ao passo que a inibição seletiva de COX-1 com o SC-560 não alterou a hemorragia local. Estudos prévios mostraram que a hemorragia local provocada por venenos botrópicos não é dependente de mediadores lipídicos, visto que o tratamento com dexametasona, um inibidor de PLA₂, não foi capaz de reestabelecer os níveis de fibrinogênio e plaquetas, tampouco a hemorragia local, provocados pelo veneno de *Bothrops atrox*.²⁶³ Após o tratamento com dexametasona e indometacina, Gonçalves e cols. (2000)²⁶⁴ também mostraram que a hemorragia local provocada pelo veneno de *B. jararaca* é independente de mediadores lipídicos. No entanto, não foram encontrados dados da literatura que corroborem o aumento da hemorragia após o tratamento com MK-886, indometacina ou em animais 5LO^{-/-}, de modo que este fenômeno necessita de mais evidências experimentais para melhor compreensão. Contudo, resultados de ensaios preliminares de sobrevida mostraram que o aumento da hemorragia local provocada pelo veneno não é importante para a letalidade, uma vez que animais 5LO^{-/-} foram mais resistentes a doses letais do veneno (1 e 2 DL-50). O pré-tratamento com inibidores seletivos de COX-1 (SC-560) e COX-2 (nimesulide), ambos utilizados na concentração de 5 mg/kg e administrados 1 h antes do veneno, não aumenta a sobrevida dos animais. Ainda, os animais deficientes de PAFR são tão susceptíveis a doses letais do veneno como os animais não deficientes (dados não mostrados).

1.6 CONCLUSÃO

O veneno de *Bitis arietans* é capaz de induzir inflamação *in vivo*, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal, acompanhados pela produção dos eicosanoides LTB₄, LTC₄, TXB₂ e PGE₂, bem como pela produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1. Os dados indicam que a inibição de leucotrienos não é suficiente para promover a redução do número de leucócitos PMNs, IL-6 e MCP-1 induzidos pelo veneno. Em contrapartida, a COX-1 e, possivelmente, seu principal metabólito TXB₂, são importantes para o aumento de leucócitos PMNs. Em animais deficientes do PAFR houve redução local e sistêmica de IL-6 e MCP-1 e do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal, bem como da hemorragia, indicando que os ligantes do PAFR estão envolvidos com os eventos agudos induzidos pelo veneno. Os tratamentos com MK-886 e indometacina, e, em menor intensidade com o WEB-2086, foram capazes de reduzir o processo inflamatório promovido pelo veneno. Por outro lado, a inibição farmacológica com MK-886 e indometacina pode acentuar a hemorragia. Em suma, conclui-se que o veneno de *B. arietans* induz um processo inflamatório agudo, o qual é parcialmente dependente de mediadores lipídicos. Ainda, que os fármacos utilizados para a inibição destes mediadores podem contribuir de maneira positiva e, sobretudo, complexa no controle das reações agudas provocadas pelo veneno.

CAPÍTULO 2 - Purificação e caracterização de toxinas do veneno e avaliação dos efeitos pró-inflamatórios sobre macrófagos humanos

Além do papel dos mediadores inflamatórios endógenos, as enzimas presentes no veneno, especialmente de viperídeos, incluindo as metaloproteases^{62, 265} e as serino proteases,^{198, 266} contribuem para a inflamação. Portanto, o estudo de toxinas isoladas é uma importante ferramenta para compreender o complexo mecanismo inflamatório envolvido no envenenamento pela serpente *B. arietans*.

Neste contexto, o capítulo 2 irá abordar aspectos referentes à composição deste veneno, com ênfase nos principais aspectos das metaloproteases e serinoproteases, as quais representam juntas aproximadamente 60 % do veneno. Em adição, será abordado o papel destas toxinas sobre o processo inflamatório, importante efeito decorrente do envenenamento.

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Composição do veneno

O veneno de serpentes é composto por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas e uma pequena quantidade de aminoácidos livres e lipídeos. O sódio é o principal cátion encontrado; zinco e cálcio estão associados a muitas metaloproteases; já os carboidratos são principalmente encontrados nas glicoproteínas. Contudo, dentre todos estes componentes, as proteínas representam aproximadamente 90-95% do total e podem ser agrupadas de acordo com a atividade que exercem. São classificadas como proteínas com atividade enzimática (serino proteases, metaloproteases, L-amino oxidases e fosfolipases A₂) e proteínas sem atividade enzimática (desintegrinas, lectinas do tipo C, peptídeos natriuréticos, proteínas secretórias ricas em cisteínas (CRISP), fatores de crescimento neural, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz).^{267†}

O transcriptoma e o proteoma do veneno de *Bitis arietans* mostram que este veneno, bem como os demais do gênero *Bitis* spp.²¹⁵ é composto principalmente por proteínas pertencentes a um número restrito de famílias: metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas, lectinas do tipo C, inibidores do tipo Kunitz e cistatinas (Figura 52).²⁶⁸⁻²⁷⁰ Em

† RUSSELL, F. E. apud MARKLAND, 1998. Venoms. In: **Snake Venom Poisoning**, p. 139-234. Lippincott, Philadelphia, 1980 and TU, A.T. apud MARKLAND, 1998. Snake venoms: General background and composition. In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**, pp. 1±19. John Wiley and Sons, New York, 1988a.

adição, Kodama e cols. (2015),⁴⁵ encontraram uma grande quantidade de peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) no veneno de *B. arietans*, os quais também são encontrados em outros venenos do gênero *Bitis*.

Figura 52 – Componentes do veneno da serpente *Bitis arietans*

Análises do transcriptoma e do proteoma do veneno da serpente *B. arietans* revelam que o veneno é composto por um número restrito de classes de proteínas, destas, as metaloproteases (SVMPs) e as serino proteases (SVSPs) são as mais abundantes. CTL, lectina do tipo C; PLA₂, fosfolipase A₂; cystatin, cistatina: inibidor de cisteíno proteases; Kunitz, inibidor de serino proteases do tipo Kunitz; e DISI, desintegrina.

Corroborando estes dados, ensaios de atividade biológica do veneno confirmam a presença tanto de metaloproteases, quanto de serinoproteases, a partir da inibição seletiva das atividades proteolíticas e gelatinolíticas, respectivamente, com EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético; do inglês: *ethylene diamine tetracetic acid*) e PHE (1,10 Fenantrolina; do inglês: *1,10-phenanthroline*) ou com PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil; do inglês: *phenylmethylsulfonyl fluoride*). A clivagem do fibrinogênio humano foi parcialmente atribuída às serino proteases, contudo, as maiores responsáveis por esta clivagem parecem ser as proteínas da classe das metaloproteases. O veneno também apresentou enzimas com atividades hialuronidásicas e fosfolipásicas, proteínas glicosiladas, além de toxinas com potencial hipotensor, capazes de degradar a angiotensina II em peptídeos vasodilatadores (angiotensina 1-7).⁴⁶

Variações na composição dos venenos são bem descritas entre os táxons, contudo, diferenças entre indivíduos da mesma espécie são observadas. Estas podem estar associadas a fatores como ontogenia, hábitos alimentares, gênero do animal, bem como sua distribuição

geográfica. Neste contexto, um estudo avaliou diferenças na composição proteica, atividade proteolítica e reatividade do antiveneno EchiTAB-Plus-ICP, desenvolvido na Costa Rica, frente a venenos de espécimes de *B. arietans* de diferentes regiões da África, bem como oriundos da Arábia Saudita.³³ De fato, com relação ao perfil eletroforético do veneno e a presença de metaloproteases, foram observadas divergências mais consideráveis entre espécimes de regiões geográficas diferentes, de modo que venenos de exemplares nativos do continente africano se mostraram mais semelhantes, embora as diferenças na atividade proteolítica não tenham sido relacionadas à distribuição geográfica. No entanto, variações na composição proteica do veneno entre espécimes da Nigéria foram observadas. Em gel de SDS-PAGE sob condições redutoras, as proteínas de alto peso molecular parecem ser mais conservadas, de modo que variações significativas foram observadas em proteínas com massa molecular inferior a 25 kDa. De maneira importante, através do uso de anticorpos específicos, o autor enfatiza diferenças na presença de metaloproteases nestes espécimes, e que estas diferenças não apresentam correlação com o sexo do animal. Ainda, foram observadas diferenças individuais com relação à degradação do fibrinogênio e da gelatina, os quais podem ser relacionados aos sintomas distintos apresentados nos envenenamentos. O reconhecimento das proteínas do veneno pelo antiveneno EchiTAB-Plus-ICP foi muito amplo, no entanto, proteínas de baixo peso presentes em alguns espécimes não foram reconhecidas. Corroborando estes resultados, estudos com uma espécie de serpente asiática, a *Agkistrodon rhodostoma* (família Viperidae), mostraram que tais variações também podem ocorrer entre serpentes da mesma espécie criadas em cativeiro, indicando que este é um fenômeno geneticamente herdado, e não apenas induzido pelo ambiente.²⁷¹ Entretanto, estas discrepâncias não estão necessariamente associadas à atividade do veneno, visto que proteínas homólogas podem desempenhar papéis semelhantes. Para tal, ensaios comparativos de atividade biológica devem ser realizados.

2.1.1.1 Metaloproteases

O veneno da maioria dos viperídeos é composto por pelo menos 30% de metaloproteases, o que sugere seu importante papel na patologia do envenenamento, desencadeando hemorragia, coagulação intravascular, edema, inflamação e necrose.^{272, 273}

As metaloproteases de veneno de serpente ou SVMPs (do inglês: *snake venom metalloproteases*) são endopeptidases dependentes de zinco (Zn^{2+}), filogeneticamente relacionadas às proteínas com domínios desintegrinas e metaloproteases de mamíferos

(ADAMs; do inglês: *a desintegrin and metalloprotease*), pertencentes à família M12, subfamília M12b, das metaloproteases dependentes de zinco dentro do clã MA (classificação MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>)²⁷⁴. Possuem domínio de ligação ao substrato conservado (HEXXHXXGXXH) e peso molecular entre 20-100kDa, dependendo de sua composição.²⁷⁵⁻²⁷⁷

São agrupadas em três subclasses (PI-PIII), de acordo com a composição de seus domínios. As SVMPs da classe PI são as mais simples e contêm apenas o domínio catalítico de metaloprotease (M); as de classe PII contêm um domínio M seguido por um domínio desintegrina (D) e as SVMPs da classe PIII, além dos domínios M e D, possuem um domínio rico em cisteínas (C). Ainda, as SVMPs da classe PIII são divididas em subclasses de acordo com as modificações pós-traducionais, como homodimerizações (P-IIIc), ou proteólises entre os domínios M e D (P-IIId). Formalmente conhecida como P-IV, um heterotrímero da classe das SVMPs que contém um domínio adicional semelhante à lectina do tipo C, foi atualmente incluída no grupo III como a subclasse P-IIId, já que até o momento não foi encontrado nenhum transcrito referente à P-IV.^{273, 278}

A maioria das SVMPs, hemorrágicas ou não, são fibrinogenolíticas e, assim como as serino proteases, estão envolvidas com distúrbios na cascata de coagulação.²⁷⁹ As SVMPs clivam principalmente a cadeia α do fibrinogênio e mais fracamente a cadeia β , como a atroxase de *Crotalus atrox*²⁸⁰ e a lebetase de *Vipera lebetina*,²⁸¹ ambas SVMPs da classe P-I. Até o momento, a única metaloprotease isolada capaz de clivar a cadeia γ do fibrinogênio é a atrolisina F (64 kDa), de *C. atrox*.²⁸² Assim como as serino proteases, as metaloproteases com atividades fibrinogenolíticas podem ser ferramentas empregadas para a diminuição do nível de fibrinogênio, bem como para a solubilização de coágulos na corrente sanguínea.^{43, 277}

As SVMPs são os fatores primários envolvidos na hemorragia local e sistêmica.²⁸³⁻²⁸⁵ Atuam essencialmente na degradação de componentes da membrana basal subjacente às células endoteliais capilares, causando a ruptura da parede do vaso e permitindo o extravasamento de sangue para o estroma. Este dano vascular contribui para a geração de áreas isquêmicas, as quais contribuem para o aparecimento de áreas necrosadas. Neste contexto, a hemorragia causada pelas SVMPs está entre os sintomas mais importantes dos envenenamentos causados por viperídeos.²⁷³ Todavia, existem SVMPs que não possuem atividade hemorrágica evidente, mas que podem atuar de formas distintas como perturbando a hemostasia por mecanismos pró e anti-coagulantes, inibindo a agregação plaquetária ou até induzindo a apoptose e promovendo inflamação.^{267, 286}

Há evidências de que as SVMPs da classe P-III são mais hemorrágicas do que as da classe P-I.^{283, 285, 286} Embora tenha sido demonstrado em experimentos *in vitro* que ambas

possam clivar componentes da matrix extracelular, esta divergência indica que a atividade catalítica não é o único mecanismo envolvido no dano vascular. Estudos em modelo *in vivo*⁴¹ ou em culturas 2D e 3D contendo componentes da matrix extracelular,⁴² indicam que os domínios não catalíticos das SVMPs da classe P-III são responsáveis pela ligação aos componentes da membrana basal das vênulas e vasos capilares, resultando na hidrólise do colágeno do tipo IV e consequente enfraquecimento e ruptura da parede dos vasos. Em contrapartida, as SVMPs da classe P-I parecem exercer papel importante na resposta inflamatória, como demonstrado pelo aumento da permeabilidade vascular e migração de células inflamatórias pela Bj-PI2, isolada do veneno de *Bothrops jararaca*,²⁸⁷ e pelo aumento de IL-6 e IL-1 β em camundongos tratados com BaP1, isolada do veneno de *Bothrops asper*.²⁸⁸

É bem descrito que a hemorragia é o principal sintoma atribuído às SVMPs. Contudo, estudos apontam a importante participação de diferentes SVMPs no desenvolvimento de mionecrose local,^{289, 290} dano tecidual^{290, 291} e reações inflamatórias.^{288, 292, 293} Embora a terapia antiveneno seja eficiente para conter os sintomas sistêmicos do envenenamento, sozinha ela não é capaz de neutralizar toxinas que causam rápido dano tecidual. Por isso, vêm crescendo os esforços para compreender o mecanismo de ação de toxinas isoladas de veneno, sobretudo sobre a contribuição destas toxinas na resposta inflamatória associada aos envenenamentos.

2.1.1.2 Serinoproteases

Mais de um terço das enzimas proteolíticas conhecidas são serino proteases, as quais podem ser encontradas em plantas, microorganismos e animais. Suas funções são variadas e podem estar envolvidas com a digestão, ativação do sistema complemento, diferenciação celular e hemostasia.⁴³

As serino proteases de veneno de serpentes ou SVSPs (do inglês: *snake venom serine proteases*), são classificadas no clã PA, família S1 das quimotripsinas, e apresentam uma tríade catalítica (His 43, Asp 88 e Ser 184) altamente conservada (classificação MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>).²⁷⁴ Geralmente, apresentam cadeia única e possuem peso molecular em torno de 26-33 kDa, dependendo do grau de glicosilação, que pode variar de 0-30% e cuja função ainda não foi estabelecida.²⁹⁴ Já foi demonstrado que a N-desglicosilação da elegaxobin II, isolada do veneno de *Trimeresurus elegans*, afeta a interação da enzima com macromoléculas como o fibrinogênio e o cininogênio, mas que não influencia na interação com um substrato sintético, sugerindo a participação da região glicosilada no

reconhecimento do substrato.²⁹⁵ Contudo, em outras SVSPs os glicanos parecem estar mais envolvidos com a estabilidade estrutural da proteína do que diretamente com a função catalítica.²⁹⁶

Tipicamente, as SVSPs exibem aproximadamente 51-98% de similaridade entre elas, 26-33% com a trombina humana e 34-40% de similaridade com a calicreína plasmática humana. Apesar da elevada similaridade na composição de aminoácidos, ao contrário da tripsina, as SVSPs não são inibidas por inibidores endógenos, como as serpinas, e apresentam alta especificidade por seus substratos.²⁷⁷ De fato, a conformação de algumas SVSPs possuem diferenças consideráveis e tais variações talvez possam explicar as distintas especificidades e atividades que estas enzimas apresentam.²⁹⁷⁻²⁹⁹

No geral, as SVSPs, afetam a cascata de coagulação através da ativação de componentes envolvidos nos processos de coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária, cujos mecanismos se assemelham às enzimas endógenas dos mamíferos. Algumas SVSPs agem de maneira similar à trombina e, por isso, são conhecidas como enzimas semelhantes à trombina (*Thrombin-like enzymes* – TLEs) e estão presentes em muitos venenos. Alguns exemplos de TLEs isoladas de venenos são: a batroxobin^{300, 301} e a TL-BJ,³⁰² as quais clivam a molécula de fibrinogênio e podem levar ao desenvolvimento de distúrbios hemostáticos. De maneira interessante, enquanto algumas SVSPs têm a capacidade de degradar o fibrinogênio levando à formação de coágulos de fibrina, como a elegaxobin,³⁰³ outras, como a halystase, clivam a molécula de fibrinogênio em sítios diferentes da trombina e não promovem a formação de coágulos.³⁰⁴ Além disso, uma serino protease isolada do veneno da serpente *Bitis rhinoceros*, a rhinocerase, possui a capacidade de degradar coágulos de fibrina gerados pela trombina, sugerindo uma atividade anticoagulante.³⁰⁵

Outro grupo de SVSPs são as enzimas com atividades semelhantes à calicreína, as quais podem exercer efeito hipotensor, promovendo a liberação de bradicinina a partir da clivagem do cininogênio plasmático de alta massa molecular.²⁷⁷ São exemplos destas enzimas a crotalase,^{306, 307} elagaxobin II^{295, 303} e a KN-BJ.³⁰⁸ A atividade da bradicinina é bem descrita na musculatura vascular, induzindo aumento da permeabilidade e vasodilatação.

³⁰⁹ Em adição, as cininas exercem importante papel no contexto inflamatório via receptor B₁, o qual é expresso mediante estímulos de citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 β . Foi demonstrado que tanto a bradicinina, quanto a calidina, são capazes de promover o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório e que esta ação é acompanhada do aumento de expressão do receptor B₁.³¹⁰ Evidências indicam que após ativação celular via receptor B₁ há um aumento da produção de quimiocinas, as quais são responsáveis pela

migração leucocitária.³¹¹ Deste modo, enzimas capazes de promover a liberação de bradicinina podem ser consideradas moléculas importantes no contexto de hipotensão e inflamação apresentada pelas vítimas de envenenamento por *B. arietans*.

2.1.1.3 Ação de toxinas isoladas de veneno sobre células do sistema imune

Para compreender o complexo mecanismo inflamatório associado aos envenenamentos, diversas toxinas foram purificadas, caracterizadas e seus efeitos inflamatórios avaliados. Neste sentido, estudos mostram que os macrófagos são células cruciais para a amplificação do processo inflamatório induzido por toxinas de veneno, especialmente SVMPs e SVSPs, uma vez que na ausência destas células a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, para o sítio inflamatório é comprometida.^{62, 265}

A jararhagina, uma metaloprotease hemorrágica de 52 kDa da classe PIII isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, é capaz de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias em modelo *in vitro* utilizando macrófagos peritoneais murinos. Após inibição com EDTA, foi visto que esta ação é independente da atividade catalítica.²⁶⁵ Entretanto, em modelo *in vivo* e utilizando 1,10-fenantrolina, a atividade proteolítica parece ter grande participação no recrutamento de leucócitos,⁶² bem como na clivagem do precursor do TNF- α .²⁹² Corroborando estes resultados, Laing e cols. (2003),²⁹³ demonstraram em camundongos *knock-out* de receptores de TNF e da citocina IL-6, que a jararhagina, de fato, induz a produção de citocinas inflamatórias, no entanto, que estas citocinas (TNF e IL-6) estão envolvidas na dermonecrose, mas não têm participação no edema e hemorragia.

A fagocitose, um dos principais mecanismos da imunidade inata, é mediada principalmente por macrófagos e neutrófilos, genericamente chamados de fagócitos. Este processo consiste no reconhecimento, captura e destruição de patógenos, partículas insolúveis, células próprias danificadas ou mortas e debris celulares.⁷⁷ No envenenamento, os macrófagos parecem ter papel primordial na inflamação e consequente dano tecidual, visto que na ausência de macrófagos, a jararhagina foi incapaz de estimular o recrutamento de leucócitos.⁶² Ainda, foi demonstrado que a HF-3 nativa, uma SVMP de classe III também isolada do veneno de *B. jararaca*, bem como seu fragmento DC-HF3 recombinante, promovem o aumento da fagocitose em macrófagos peritoneais murinos via receptor $\alpha_M\beta_2$.³¹²

Além da participação das SVMPs no processo inflamatório, o papel de SVSPs foi demonstrado. Neste estudo, a partir da inibição das serino proteases presentes no veneno de *Bothrops alternatus* e *B. moojeni* utilizando PMSF, foi possível observar a participação de

serino proteases na indução do edema e dor causados pelo veneno em modelo *in vivo*. Ainda, foi enfatizado o papel dos eicosanoides, do óxido nítrico e da bradicinina na indução destes efeitos inflamatórios.³¹³

As SVSPs também podem contribuir com a inflamação através da ativação de componentes envolvidos com a remodelação da matriz extracelular. A matriz extracelular é uma complexa rede de interações entre proteínas e proteoglicanos responsável pela sustentação tecidual. Contudo, sua participação nos processos biológicos vai além, uma vez que a interação entre células e a matriz extracelular pode regular diretamente o comportamento celular via sinalizações mediadas por receptores, incluindo a modulação da resposta celular a fatores de crescimento. A remodelação da matriz extracelular é principalmente mediada por metaloproteases de matriz endógenas (MMPs; do inglês: *matrix metalloproteinases*), membros da família de enzimas dependentes de zinco. As MMPs estão envolvidas na angiogênese, reparo tecidual, migração celular, liberação de mediadores parácrinos, bem como para a geração e degradação de diversas moléculas bioativas, desta forma, estão envolvidas com diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo doenças inflamatórias.³¹⁴ Neste sentido, foi demonstrado que SVSPs do veneno de *Bothrops asper* são capazes de ativar metaloproteases de matriz endógenas, indicando a participação de SVSPs na resposta inflamatória e no dano tecidual, uma vez que a hiperativação de MMPs estão envolvidas com a degradação descontrolada de componentes de matriz e consequente dano tecidual.²⁶⁶ Além disso, uma SVSP isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é capaz de induzir edema na pata de animais experimentais, acompanhado pelo aumento da expressão de COX-2 e da produção de PGE₂.¹⁹⁸

Como mostrado no primeiro capítulo desta tese, o veneno de *B. arietans* é capaz de induzir uma resposta inflamatória *in vivo*, a qual é dependente de mediadores lipídicos, IL-6 e MCP-1. No entanto, até o momento não se sabe quais os possíveis componentes do veneno envolvidos nesta resposta inflamatória. Cerca de 60 % do veneno de *B. arietans* é composto por SVMs e SVSPs, enzimas responsáveis por efeitos inflamatórios desencadeados por venenos de outras serpentes da família Viperidae. Assim, com base nas evidências do potencial pró-inflamatório de SVMs e SVSPs de venenos viperídicos, em conjunto com a importante participação de macrófagos nos eventos inflamatórios induzidos por venenos, este capítulo da tese teve como objetivo a purificação, caracterização e análise dos efeitos pró-inflamatórios de uma SVM e uma SVSP isoladas do veneno de *B. arietans* sobre macrófagos humanos em cultura.

2.2 OBJETIVO

2.2.1 Objetivo geral

Purificação de uma serino protease e uma metaloprotease do veneno da serpente africana *Bitis arietans* e caracterização de suas atividades sobre substratos biológicos e propriedades pró-inflamatórias em macrófagos humanos.

2.2.2 Objetivos específicos

2.2.2.1 Obtenção das toxinas purificadas:

- ✓ Fracionamento do veneno por cromatografia de exclusão molecular;
- ✓ Determinação da atividade proteolítica das frações sobre substratos FRET;
- ✓ Identificação da classe enzimática das frações providas de atividade proteolítica;
- ✓ Purificação das frações contendo atividade de serino protease e metaloprotease;
- ✓ Identificação das proteases purificadas por espectrometria de massas;
- ✓ Atividade das proteases isoladas sobre substratos biológicos relacionados ao envenenamento;
- ✓ Neutralização das toxinas purificadas por antiveneno experimental anti-*Bitis arietans* produzido no Instituto Butantan;

2.2.2.2 Propriedades das toxinas purificadas sobre o processo inflamatório:

- ✓ Citotoxicidade celular sobre macrófagos humanos;
- ✓ Ação das toxinas purificadas sobre as funções biológicas de macrófagos:
 - Produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias;
 - Produção de PGE₂ e LTB₄.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Veneno

O veneno de *Bitis arietans* (BA27 - Venom Supplies, SA, Austrália) foi obtido de animais adultos de ambos os sexos, medindo aproximadamente 60 cm cada, provenientes do sul do continente africano. Antes da obtenção do veneno, foi constatado que as serpentes estavam aptas e saudáveis a partir de inspeção visual e revisão dos registros em banco de dados de cada animal, contendo informações como aspecto da pele, tipo de alimentação, dados reprodutivos e médicos. O veneno liofilizado foi armazenado em freezer -20 °C. Para a utilização *in vitro*, amostras do veneno foram diluídas em PBS estéril e as alíquotas armazenadas à -20 °C. O conteúdo proteico foi determinado pelo método do ácido bicinconínico (BCA)²²¹.

2.3.2 Análise da presença de endotoxina no veneno e toxinas purificadas

Antes dos experimentos, amostras de veneno (20 µg/mL) ou de toxinas purificadas (2 µg/mL) foram diluídas em salina apirogênica, filtradas e encaminhadas à Seção de Controle Microbiológico do Instituto Butantan (Serviço de Controle de Qualidade, Divisão Bioindustrial) para análise da presença de endotoxina (ANEXOS A, B e C). A análise foi realizada pelo método LAL (*Limulus* ameocyte lisate) utilizando o kit PYROGENT TM Gel clot LAL Assays (Lonza, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de endotoxina presente nas amostras foi calculada de acordo com uma curva padrão de endotoxina de *Escherichia coli* com concentrações de 0,125 EU/mL. As concentrações de endotoxina estimadas nas amostras foi >0,125 e <1,25/mL. Desta forma, conclui-se que o veneno contém de 0,006-0,06 UE/µg, ao passo que as toxinas purificadas contêm de 0,06-0,625 UE/µg.

2.3.3 Antiveneno

O antiveneno anti-*Bitis arietans* (α-Ba), produzidos e validados por Guidolin e cols. (2016),¹⁸⁹ foram gentilmente cedidos pela “Divisão Bioindustrial - Seção de Antisoros, Instituto Butantan”. De maneira breve, para obtenção do plasma hiperimune, cavalos (n=12) foram imunizados pela via subcutânea (3,5 mg/animal) com o veneno de *B. arietans* (Venom

Supplies, Tanunda, Austrália), em quatro pontos distintos da região dorsal do animal, com intervalo de 15 dias entre a primeira imunização e o reforço. Para a primeira imunização, o veneno foi emulsionado em adjuvante Marcol Montanide 80 (MMT80) completo e na seguinte apenas em PBS estéril (6 mL de solução final/animal). Quinze dias após cada imunização, amostras de sangue (8 mL/animal) foram coletadas pela veia jugular e armazenadas em tubos contendo solução anticoagulante (heparina). O plasma foi obtido após centrifugação ($405 \times g$ por 15 minutos a 4°C) e armazenado a -20°C até sua utilização. Posteriormente, o plasma da segunda imunização foi purificado pelo método do ácido caprílico. Os anticorpos purificados foram dosados ($37,1 \text{ mg/mL}$) e validados. Exibiram altos títulos por ELISA ($5.18 \times 10^6 \text{ U-E/mL}$) ³¹⁵ e o índice arbitrário de afinidade foi estimado utilizando diferentes concentrações de KSCN como agente caotrópico, ^{316, 317} onde na concentração máxima de KSCN testada (5 M), 30% dos anticorpos permaneceram ligados. A capacidade neutralizante deste antiveneno foi avaliada “*in vivo*”. Dos antivenenos produzidos neste trabalho, o antiveneno anti-*Bitis arietans* (α -Ba) obteve maior índice de atividade específica, com $77 \mu\text{g}$ de veneno neutralizado por 1 mg do antiveneno correspondente. Estes anticorpos foram utilizados para os ensaios de neutralização das toxinas purificadas *in vitro*. Como controle negativo, foi utilizado um *pool* contendo fragmentos F(ab')₂ purificados do antissoro contra toxina botulínica (Lote: 0908161; $48,9 \text{ mg/mL}$), ou IgG de cavalos não imunizados, ambos gentilmente cedidos pela “Seção de Soros do Instituto Butantan”.

2.3.4 Fracionamento do veneno

2.3.4.1 Isolamento de toxinas do veneno por cromatografia de exclusão molecular

O veneno foi fracionado por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 HR (10/30 GL, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) e a absorbância das frações foi monitorada a 280 nm utilizando o monitor UPC-900 (Amersham Pharmacia Biotech AB). Brevemente, em sala climatizada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), vinte miligramas do veneno foram dissolvidos em 5 mL em solução eluente de acetato de amônio ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$, 50 mM) e $500 \mu\text{L}$ foram aplicados, por vez, em coluna previamente estabilizada com a mesma solução. As proteínas foram eluídas sob um fluxo contínuo de $0,4 \text{ mL/min}$ e coletadas manualmente ao término de cada pico. Em seguida, as proteínas foram liofilizadas em *Speed Vac*, ressuspensas em PBS estéril ($\text{pH } 7,4$) e armazenadas a -20°C até a utilização. O conteúdo

proteico foi estimado pelo método de BCA e o perfil eletroforético dos picos visualizado por SDS-PAGE²²⁵ corado por prata.³¹⁸

2.3.4.1.1 Dosagem protéica pelo método de BCA

A concentração protéica das amostras de veneno e frações purificadas, bem como dos anticorpos ou porções F(ab')₂ dos soros hiperimunes utilizados, foi determinada pelo método do ácido bicinonínico,²²¹ utilizando o kit comercial Pierce BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, IL, EUA), de acordo com especificações do fabricante (para mais detalhes sobre o método, ver item 1.3.1.1, capítulo 1).

2.3.4.1.2 Perfil eletroforético do veneno e das frações obtidas

Amostras de veneno (15 µg) ou das frações obtidas da primeira etapa de gel filtração (4 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida²²⁵ na presença de SDS sob condições redutoras ou não redutoras. Para melhor separação das bandas, foram utilizados géis com gradiente de 8-16% de acrilamida (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Sweden). Para tal, as amostras foram diluídas em tampão redutor, contendo β-mercaptoetanol, ou não redutor, na proporção de 1:1, ou na quantidade desejada de antígeno acrescida de tampão até atingir o volume máximo comportado pelo poço do gel. Em seguida, foram aquecidas a 96 °C por 6 minutos e aplicadas no gel em poços individuais e submetidas a uma corrente constante de 100 V. As bandas dos géis foram reveladas por impregnação pelo nitrato de prata, de acordo metodologia adaptada de Morrissey, 1981.³¹⁸ Os géis foram fotografados utilizando o equipamento Gel Logic 100, Imaging System (KODAK, Rochester, NY, EUA).

2.3.5 Atividade enzimática das frações obtidas por cromatografia

2.3.5.1 Atividade proteolítica sobre substratos FRET

Os ensaios de atividade proteolítica das frações (0,2-5 µg/poço) foram realizados em tampão PBS (pH 7,4; volume final de 100 µL/poço) em placas de 96 poços de fundo branco (Perkin Elmer, MA, EUA) utilizando 10 µM/poço dos seguintes substratos FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer ou substratos de supressão intramolecular de fluorescência): Abz-FRSSR-EDDnp ou Abz-RPPGFSPFR-EDDnp, ambos gentilmente

cedidos pelo Dr. Luiz Juliano Neto do departamento de Biofísica da UNIFESP. A reação de hidrólise dos substratos foi realizada a 37 °C e continuamente monitorada (λ_{EM} 420 nm e λ_{EX} 320 nm) durante dez minutos em espectrofotômetro de fluorescência (Victor 3™ Perkin-Elmer, MA, EUA ou FLUOstar® Omega, BMG Labtech, HE, Germany, conforme indicado na figura), como descrito por Kuniyoshi e cols (2012).³¹⁹ A atividade proteolítica específica foi expressa como unidade arbitrária de fluorescência liberada do substrato clivado, por minuto, por µg de toxina ou veneno (UF/min/µg).

2.3.5.2 Inibição da atividade proteolítica com inibidores seletivos

Para os ensaios de inibição da atividade proteolítica, as frações do veneno foram pré-incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, 2 mM/poço) ou 1,10 fenantrolina (PHE, 2 mM/poço) ou apenas em PBS. A inibição com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 100 mM/poço) foi realizada sem período de pré-incubação. Quando necessário, foram realizadas amostras controles na presença do mesmo volume de etanol, utilizado na preparação das soluções estoque de PMSF e PHE. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

2.3.6 Purificação das toxinas de interesse

As frações obtidas da primeira etapa de gel filtração foram submetidas a ensaios de atividade proteolítica e etapas de inibição com inibidores seletivos. A partir destes resultados, as frações com menor complexidade no gel de SDS-PAGE e providas de atividade desejada foram selecionadas. A fração 3 (F3) e a fração 5 (F5) foram selecionadas para obtenção da serino protease (SVSP) e da metaloprotease (SVMP) purificadas, respectivamente. Para tal, estas frações foram submetidas a uma segunda etapa de cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 (10/300 GL, GE Healthcare, Bio-science AB, Uppsala, Sweden), seguindo a metodologia descrita anteriormente (item 2.3.4.1). As subfrações obtidas foram liofilizadas em *Speed Vac*, ressuspendidas em PBS estéril e armazenadas a – 20 °C. O conteúdo protéico foi estimado pelo método de BCA e o perfil eletroforético visualizado por SDS-PAGE corado por prata.

2.3.7 Validação das toxinas purificadas

2.3.7.1 Atividade proteolítica sobre substratos FRET

De acordo com os resultados anteriores, para validação das subfrações obtidas de F3, para a obtenção da SVSP, foi utilizado o substrato FRET Abz-FRSSR-EDDnp e para validação das subfrações de F5, para a obtenção da SVMP, o substrato Abz-RPPGFSPFR-EDDnp. A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita no item 2.3.5.1. Os ensaios foram realizados em quadruplicata.

2.3.7.2 Inibição da atividade proteolítica com inibidores seletivos

A inibição da atividade proteolítica das toxinas purificadas sobre substratos FRET foi realizada utilizando EDTA, PMSF e PHE, de acordo com metodologia citada anteriormente (item 2.3.5.2).

2.3.7.3 Análise do perfil eletroforético

O perfil eletroforético das toxinas purificadas foi avaliado por SDS-PAGE, conforme descrito em (2.3.4.1.2), com algumas variações. Amostras das toxinas purificadas (4 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE sob condições redutoras ou não redutoras. Os géis foram montados em placas de vidro, com gel de empacotamento e gel de corrida, contendo 5% e 10% de acrilamida, respectivamente utilizando o sistema Mighty Small (Hoefer Pharmacia Biotech, CA, EUA). As bandas dos géis foram reveladas por impregnação pelo nitrato de prata, fotografadas (Gel Logic 100 - Imaging System (KODAK, Rochester, NY, EUA) e a densitometria das bandas mensuradas pelo software Kodak MI.

2.3.7.4 Inibição da atividade proteolítica com antiveneno

A habilidade do antiveneno experimental anti-*Bitis arietans* (α -Ba) em neutralizar as toxinas purificadas foi estimada. Amostras das toxinas purificadas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, na presença ou não do antiveneno (50-1000 µg). A atividade proteolítica residual foi mensurada como descrito no item 2.3.5.1 utilizando o substrato FRET selecionado para cada toxina. A concentração máxima de antiveneno foi determinada de

acordo com a concentração capaz de neutralizar 100% da atividade proteolítica das enzimas. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. A especificidade da neutralização com o antiveneno α -Ba foi avaliada. Baseado na concentração de antiveneno específico capaz de neutralizar 100 % a atividade proteolítica da enzima, foi utilizada a mesma quantidade de fragmentos $F(ab')_2$ anti-toxina botulínica ou IgG de cavalos não imunizados, como controle. A atividade proteolítica residual foi analisada após a incubação das toxinas com os anticorpos controle por 30 minutos a temperatura ambiente e mensurada como descrito anteriormente.

2.3.7.5 Identificação das toxinas purificadas por espectrometria de massas

As proteínas purificadas, obtidas da segunda etapa cromatográfica, foram submetidas à digestão em gel com tripsina (Sigma-Aldrich, MO, EUA), de acordo com a metodologia descrita por Shevchenko e cols.³²⁰. As soluções obtidas da extração foram dessalinizadas por “Zip-Tip” (C18), liofilizadas, ressuspensas em ácido fórmico 0,1% e enviadas para análise em espectrômetro de massas (MS/MS) no Laboratório de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan (LETA). De maneira resumida, as análises foram realizadas por cromatografia líquida em HPLC Easy-nLC II nano acoplado ao LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com ionização do tipo *nano electrospray*. Os peptídeos foram separados em coluna C-18 (Jupiter®, Phenomenex, Torrance, CA, EUA) empacotada “in-house” com beads de 5 μ m. Os peptídeos foram eluídos em gradiente linear de 5-95% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico, por quinze minutos em um fluxo de 200 nL/min. As sequências obtidas foram submetidas a uma busca no banco de dados “Serpentes” (Taxid: 8570) utilizando o programa PEAKS Studio (Versão 8, Bionformatics Solution, Waterloo, Canadá), cuja taxa de falsas descobertas (FDR) foi ajustada para $\leq 5\%$. As sequências obtidas foram alinhadas com sequências disponíveis no banco de dados da Uniprot KB com o auxílio do programa “online” Clustal Omega.

2.3.7.6 Atividade proteolítica das toxinas purificadas sobre substratos biologicamente ativos

2.3.7.6.1 Clivagem do fibrinogênio humano

Para avaliar a atividade fibrinogenolítica, trinta microgramas de fibrinogênio humano (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foram incubados com diferentes concentrações das duas toxinas purificadas (0,5 μ g, 1 μ g, 2 μ g ou 5 μ g) durante 1 hora a 37 °C em banho-maria sob constante

agitação. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de tampão redutor para SDS-PAGE (1:1) e aquecida por 6 minutos a 96 °C. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% e o gel corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,2%). A atividade fibrinogenolítica foi determinada pela clivagem das cadeias α , β e/ou γ do fibrinogênio. Como controle de uma possível auto degradação, o fibrinogênio foi incubado, pelo mesmo período, apenas em tampão. A intensidade relativa das bandas foi determinada por densitometria (KODAK MI).

2.3.7.6.2 Clivagem do peptídeo sintético homólogo ao cininogênio pela SVSP purificada

Para determinar a liberação de cininas, 90 μ M de peptídeo sintético homólogo a uma porção do cininogênio humano de alta massa molecular (KNBK - PLGMISLMKRPPGFSPFRSSR), foi incubado com 0,2 μ g da SVSP (serino protease isolada do veneno; F3-1) diluída em tampão tris-NaCl (50 mM Tris; 50 mM NaCl; pH 7,4) por 3 horas a 37 °C. Os fragmentos da hidrólise foram obtidos por *Zip-Tip* e liofilizados. Em seguida, o material foi ressuspendido em ácido fórmico 0,1% e analisado por espectrometria de massas, conforme metodologia descrita no item 2.3.7.5. Os dados brutos obtidos foram submetidos a uma busca contra a sequência peptídica do KNBK utilizando o programa PEAKS Studio (Versão 8, Bionformatics Solution, Waterloo, Canada), cujo FDR foi ajustado para $\leq 0,1\%$.

2.3.7.6.3 Clivagem da fibronectina humana pela SVMP purificada

Para avaliar a ação da SVMP (metalo protease purificada; F5-4), vinte microgramas de fibronectina humana (Sigma Aldrich) foram incubadas com diferentes concentrações de F5-4 (0,1 μ g; 0,2 μ g e 0,5 μ g) durante 1 hora a 37° C em banho-maria e sob constante agitação. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de tampão redutor para SDS-PAGE (1:1) e aquecida por 6 minutos a 96° C. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% e o gel corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250* (0,2%). Como controle de uma possível auto degradação, a fibronectina foi incubada, pelo mesmo período, apenas em tampão.

2.3.8 Ação da SVSP e da SVMP purificadas sobre macrófagos humanos

2.3.8.1 Cultura de pré-monócitos humanos da linhagem THP-1

Pré-monócitos humanos da linhagem THP-1 (BCRJ: 0234 - Banco de Células do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foram cultivados em garrafas de 75 cm³ (Corning Inc. – NY, EUA) contendo meio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corp., CA, EUA) acrescido de 23 mM de NaHCO₃, 13 mM de C₆H₁₂O₆, 10 mM de Hepes, 2 mM de L-glutamina e 1 mM de piruvato de sódio. Na semana do uso, o meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) (meio RPMI completo; RPMI⁺). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, na concentração de 2-8x10⁵ células/mL. O número total de células e a viabilidade celular foram periodicamente controlados pela contagem em câmara de Neubauer após coloração com azul de Trypan 0,4% em PBS estéril (1:1; v/v).

2.3.8.2 Diferenciação das células THP-1 com PMA

Os monócitos humanos foram diferenciados em macrófagos utilizando Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA; do inglês: *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), de acordo com metodologia descrita por Daigneault e cols. (2010).³²¹ De maneira resumida, as células viáveis foram transferidas para placas de 24 poços (2x10⁵/poço) contendo 1 mL de meio RPMI⁺ acrescido de PMA, na concentração final de 100 ng/mL, e incubadas por 72 horas em estufa de CO₂ a 37 °C. No quarto dia, o meio contendo PMA foi substituído por RPMI⁺ sem PMA (2 mL/poço) e as células foram mantidas em repouso por 4 dias. Ao término do período de descanso, a aderência dos macrófagos foi visualizada em microscópio de contraste de fase (Leica DM2500, Wetzlar, Alemanha) e fotografada.

2.3.8.2.1 Expressão de CD11b nos macrófagos diferenciados

Para avaliar a expressão de CD11b nos macrófagos diferenciados com PMA, os monócitos foram cultivados e diferenciados em garrafas de 75 cm², seguindo o mesmo protocolo descrito para a diferenciação em placas. Os macrófagos foram desaderidos cuidadosamente com auxílio de espalhador de células do tipo rodo (*scraper*) e todo o conteúdo foi centrifugado (260 × g, 10 min, 10 °C). Após contagem com azul de trypan, o *pellet*

foi ressuspendido em tampão de FACS (PBS/BSA 1% acrescido de 0,01% de azida sódica), em volume suficiente para que se tenha 1×10^6 células viáveis a cada 50 μL , e as células foram transferidas para microplacas com fundo em U (50 μL /poço). Sobre as solução de células, foi adicionado o anticorpo monoclonal anti-CD11b marcado com PE (IgG1 κ PE, Clone VIM 12, BD, Becton Dickinson, CA, EUA) ou o isotipo controle (IgG1 κ PE, BD), diluídos 1:5 em tampão de FACS. Após incubação por 30 minutos a 4 °C e ao abrigo da luz, as células foram lavadas três vezes ($305 \times g$, 5 min, 4 °C) e ressuspendidas em 300 μL de tampão de FACS contendo 1% de paraformaldeído. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (FACS Aria III, Becton Dickinson, CA, EUA). Para comparação, todo o processo foi feito em paralelo com os monócitos não submetidos ao processo de diferenciação.

2.3.8.3 Tratamento dos macrófagos com a SVSP e a SVMP purificadas e com o veneno de *B. arietans*

Após o período de descanso, na ausência de PMA, os macrófagos diferenciados em placas de 24 poços (2×10^5 céls/poço), foram submetidos a diferentes tratamentos com o veneno e com as toxinas purificadas. Para tal, o meio de cultura foi removido e às células foram adicionados 500 μL /poço, em duplicata, de meio RPMI incompleto (RPMI) contendo 0,5 μg ou 1 μg de serino protease ou metaloprotease purificadas. Em paralelo, os macrófagos foram tratados com o mesmo volume de meio incompleto contendo 0,5 μg , 1 μg , 10 μg ou 15 μg de veneno. As placas foram mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO_2 durante 24 h, 48 h e 72 h. Os tempos de tratamento foram baseados em um estudo com o veneno de *Bothrops lanceolatus*.³²² Ao término de cada período de incubação, o sobrenadante foi aspirado, centrifugado ($405 \times g$, 4 °C, 5 minutos) para remoção dos debris celulares, aliquotado e armazenado a -80 °C para as posteriores dosagens. É importante frisar que, para evitar a inativação das toxinas do veneno pelo SFB, todos os tratamentos foram feitos em meio RPMI incompleto (RPMI), isto é, acrescido de antibióticos, mas, na ausência de SFB.

2.3.8.4 Viabilidade pelo método de LDH

A viabilidade celular foi avaliada à partir da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) utilizando o kit “CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay” (Promega, MD, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A LDH é uma enzima citosólica estável, a qual é liberada no meio apenas após a lise celular. Portanto, o nível de LDH foi quantificado nos sobrenadantes dos macrófagos submetidos aos diferentes tratamentos com as

toxinas purificadas e com o veneno. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (FLUOstar® Omega, BMG Labtech, HE, Germany,) no comprimento de onda de λ 490 nm. Para o cálculo de citotoxicidade, a porcentagem de morte foi calculada utilizando as D.O.s obtidas das amostras experimentais, juntamente com as D.O.s dos seguintes controles: 1) controle de liberação máxima de LDH (sobrenadante de macrófagos tratados durante 45 minutos com o tampão de lise do kit) e 2) controle de background (apenas meio de cultura utilizado nos tratamentos), conforme segue a expressão:

$$\% \text{ citotoxicidade} = 100 \times \frac{\text{Liberação de LDH experimental} - \text{background}}{\text{Liberação máxima de LDH} - \text{background}}$$

Por fim, o resultado final foi calculado em porcentagem de viabilidade celular, considerando o resultado obtido nos sobrenadantes das células tratadas apenas com meio (RPMI) como 100 % de viabilidade.

2.3.8.5 Quantificação de citocinas e quimiocinas

O perfil de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos estimulados com diferentes concentrações das toxinas purificadas ou do veneno foi avaliado no sobrenadante das culturas, coletados conforme descrito em 2.3.8.3. Para quantificação das citocinas inflamatórias: IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF foi utilizado o kit “CBA Human Inflammatory Cytokine” (BD Bioscience, CA, EUA), e para a quantificação das quimiocinas: CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10, foi utilizado o kit “CBA Human Chemokine” (BD Bioscience, CA, EUA), de acordo com especificações do fabricante. A aquisição de dados foi realizada em citômetro de fluxo (FACS Aria III, Becton Dickinson, CA, EUA) e a análise de dados utilizando o software FACS Diva, versão 6.1.3. O limite inferior de detecção do kit foi de: > 3,6 pg/mL (IL-8); > 7,2 pg/mL (IL-1 β); >2,5 pg/mL (IL-6); > 3,3 pg/mL (IL-10); > 3,7 pg/mL (TNF); > 1,9 pg/mL; > 0,2 pg/mL (CXCL8/IL-8); > 1,0 pg/mL (CCL5/RANTES); > 2,5 pg/mL (CXCL9/MIG); > 2,7 pg/mL (CCL2/MCP-1); e > 2,8 pg/mL (CXCL10/IP-10).

2.3.8.6 Quantificação de mediadores lipídicos

Os níveis de LTB₄ e PGE₂ foram quantificados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos por ensaio imunoenzimático competitivo de acordo com instruções do fabricante (EIA, Cayman Chemical, EUA). As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro com densidade ótica entre 405/420 nm (VersaMax™, Molecular devices, CA, EUA). As concentrações de eicosanoides foram calculadas a partir da interpolação com a curva padrão do kit. O limite inferior de detecção foi de > 13 pg/mL (LTB₄) e > 15 pg/mL (PGE₂).

2.3.9 Análise estatística

Os dados foram calculados como média $\pm$ desvio padrão (SD) (expressos nos gráficos como média $\pm$ erro padrão (SEM)) e analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism, versão 6.0 para Windows, da GraphPad Software (Califórnia, EUA). As comparações entre mais de dois grupos em relação a uma variável foram realizadas pelo teste One-Way ANOVA e para as comparações de duas ou mais variáveis entre mais de dois grupos, foi utilizado o teste Two-Way ANOVA, ambos seguidos pelo pós-teste de Tukey HSD. Para todos os testes os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos por, no mínimo, duas vezes em dias independentes.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Análise eletroforética e fracionamento do veneno de *Bitis arietans* e caracterização de componentes com atividade enzimática

2.4.1.1 Análise do perfil eletroforético do veneno

A análise do perfil eletroforético do veneno de *B. arietans* revelou a presença de proteínas com peso molecular variando de 180 a 6 kDa. A presença de bandas de baixo peso no gel reduzido sugere a presença de complexos protéicos ou dímeros na amostra não reduzida (Figura 53).

Figura 53 – Perfil eletroforético do veneno de *Bitis arietans*

Quinze microgramas de veneno foram submetidos à eletroforese em gel de gradiente (8-16%), sob condições não-redutoras (N/R) e redutoras (R). As bandas foram reveladas por impregnação com nitrato de prata.

2.4.1.2 Fracionamento do veneno

O veneno foi fracionado por cromatografia de exclusão molecular, onde as proteínas foram separadas por tamanho e complexidade. O perfil cromatográfico desta primeira etapa

de separação revela a presença de nove picos majoritários, denominados F1-F9. (Figura 54A). O perfil eletroforético das frações obtidas foi avaliado por SDS-PAGE corado com prata (Figura 54B). Baseado neste resultado e, considerando que o objetivo do trabalho é a purificação de proteínas com peso molecular superior a 15 kDa, mais precisamente, uma SVSP e uma SVMP, as frações 1 a 6 foram selecionadas para as etapas de inibição.

Figura 54 - Perfil cromatográfico do veneno de *Bitis arietans*

A) Vinte miligramas do veneno liofilizado foram submetidos a uma etapa de cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 HR, equilibrada e eluída com acetato de amônio (50 mM) em ambiente climatizado (22 ± 2 °C). As amostras foram coletadas em um fluxo de 0,4 mL/min. e o conteúdo proteico foi monitorado sob absorbância de 280 nm no leitor UPC-900; **B)** O perfil eletroforético foi avaliado em gel com gradiente de 8-16% de acrilamida e as bandas reveladas pela impregnação por nitrato de prata.

2.4.1.3 Rendimento e atividade proteolítica das frações do veneno de *Bitis arietans*

A estimativa de rendimento das frações oriundas da cromatografia foi realizada pela dosagem de proteínas pelo método de BCA, conforme segue na tabela II. Em seguida, a atividade proteolítica foi avaliada pela clivagem de dois substratos FRET: Abz-FRSSR-EDDnp e Abz-RPPGFSPFR-EDDnp, em uma cinética de dez minutos. A tabela II mostra que todas as frações obtidas, bem como o veneno, possuem atividade proteolítica sobre os substratos testados. Entretanto, é possível notar que algumas frações exibiram seletividade, de modo que foram capazes de clivar apenas um dos substratos FRET.

Tabela II - Rendimento e atividade proteolítica das frações do veneno sobre substratos FRET

Fração	Rendimento (μg)	Atividade específica (UF/min/ μg)	
		Abz-FRSSR-EDDnp	Abz-RPPGFSPFR-EDDnp
1	1.090	$61,56 \pm 0,86$	N.D.
2	1.109	$1.271,0 \pm 9,0$	$526 \pm 45,65$
3	3.053	$27,85 \pm 0,94$	$31,03 \pm 2,18$
4	1.440	N.D.	$85,60 \pm 4,07$
5	1.795	N.D.	$918 \pm 50,8$
6	376	$66,62 \pm 0,93$	N.D.
Veneno	-	$259,1 \pm 14,86$	$431,5 \pm 29,98$

A atividade proteolítica das frações de interesse (F1-F6, com peso molecular superior a 15 kDa) obtidas por cromatografia de exclusão molecular, foram avaliadas pela clivagem de substratos FRETs. Em placas brancas de 96 poços, as frações (0,2 - 2 μg /poço) foram incubadas com 10 μM de substrato FRET (Abz-FRSSR-EDDnp ou Abz-RPPGFSPFR-EDDnp) em PBS (volume final de 100 μL). A atividade proteolítica foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{\text{EX}}=320$ e $\lambda_{\text{EM}}=420$ nm, leitor: FLUOstar® Omega) durante 10 minutos. Resultados representados como média $\pm$ SD das duplicatas. Dados representativos de dois ensaios independentes. UF: Unidade de fluorescência arbitrária; N.D.: Não detectável.

2.4.1.4 Inibição seletiva da atividade proteolítica das frações do veneno de *Bitis arietans*

Após repetições dos testes de atividade enzimática, foi observado que as frações 1 e 6 não eram estáveis, isto é, as proteínas presentes nestas frações perderam a atividade proteolítica após o primeiro ciclo de descongelamento. Sabendo que as proteínas de interesse devem apresentar um grau de estabilidade elevado para resistir às etapas de cromatografias, foram selecionadas as frações 2 a 5 para a etapa de inibição subsequente.

Corroborando estudos anteriores,^{46, 268, 269} a inibição seletiva de SVSPs (PMSF) e SVMPs (EDTA e 1,10 – fenantrolina), revelou a presença destas duas classes enzimáticas no veneno (Figura 55A e B). A presença majoritária de SVSPs foi encontrada nas frações 2 e 3 (Figura 55C e D). Já os picos 4 e 5 apresentaram principalmente atividade de SVMPs (Figura 55E e F).

A partir destes resultados, em conjunto com a análise da complexidade das frações por SDS-PAGE, as frações 3 e 5 foram selecionadas para a purificação de uma SVSP e uma SVMP, respectivamente.

Figura 55 - Inibição seletiva da atividade proteolítica das frações do veneno

Frações do veneno de *Bitis arietans* (0,2 - 5 µg/poço), foram incubadas com EDTA (100 mM/poço), PMSF (2 mM/poço) e 1,10- PHE (2 mM/poço). Após trinta minutos de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado 10 µM de substrato FRET (Abz-FRSSR-EDDnp (substrato 1) ou Abz-RPPGFSPFR-EDDnp (substrato 2)), em um volume final de 100 µL e a atividade proteolítica foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{EX}=320$ e $\lambda_{EM}=420$ nm, leitor Victor 3TM) durante 10 minutos. Foi selecionado o substrato preferencialmente clivado por cada fração e o cálculo de porcentagem de inibição foi realizado considerando a atividade específica de cada amostra incubada apenas em PBS como 100% de atividade. **A)** Veneno + substrato 1 (S1); **B)** Veneno + S2; **C)** Fração 2 (F2) + S1; **D)** F3 + S1; **E)** F4 + S2; e **F)** F5 + S2. Resultado representativo de dois ensaios independentes expressos como média da porcentagem de inibição $\pm$ SEM e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***).

2.4.2 Purificação e identificação de uma serino protease do veneno de *Bitis arietans*³²³

2.4.2.1 Segunda etapa de cromatografia da fração 3: obtenção da SVSP purificada

A partir dos testes de atividade e inibição da atividade enzimática das frações obtidas da primeira etapa cromatográfica do veneno, realizada por cromatografia de exclusão molecular, bem como pela análise da fração com atividade de SVSP (F2 e F3) que apresentou menor complexidade por SDS-PAGE, a fração 3 foi selecionada para a purificação de uma serino protease. O fracionamento da fração 3 originou cinco subfrações majoritárias (F3-1 a F3-5), como mostra a figura 56.

Figura 56 - Perfil cromatográfico da fração três isolada do veneno de *Bitis arietans*

A) O terceiro pico cromatográfico (F3), obtido da primeira etapa de purificação, foi submetido a um segundo ciclo de cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75, equilibrada e eluída com acetato de amônio (50 mM) em ambiente climatizado (22 ± 2 °C). As amostras foram coletadas em um fluxo de 0,4 mL/min. e o conteúdo proteico foi monitorado sob absorvância de 280 nm em leitor UPC-900; B) Zoom da fração 3-1 (F3-1), pico contendo maior atividade proteolítica, conforme segue na tabela III.

2.4.2.1.1 Rendimento e atividade proteolítica das subfrações de F3

O rendimento relativo, baseado na dosagem proteica das subfrações obtidas de F3, revelou que a F3-2 é a mais concentrada, seguida de F3-3, F3-4, F3-1 e F3-5. No entanto, destas, apenas a F3-1 apresentou atividade proteolítica e, por este motivo, foi selecionada para as etapas seguintes (Tabela III).

Tabela III - Atividade proteolítica e rendimento das subfrações de F3

Subfração	Rendimento (μg)	Atividade específica (UF/min/ μg)
F3-1	25,77	$665,6 \pm 4,5$
F3-2	581,65	N.D.
F3-3	134,18	N.D.
F3-4	40,94	N.D.
F3-5	1,61	N.D.

A atividade proteolítica das frações obtidas do fracionamento de F3 por cromatografia de exclusão molecular foi avaliada pela clivagem de substratos FRETs. Em placas brancas de 96 poços, as frações (0,1 - 2 μg /poço) foram incubadas com 10 μM de substrato FRET (Abz-FRSSR-EDDnp) em PBS (volume final de 100 μL). A atividade proteolítica foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{\text{EX}}=320$ e $\lambda_{\text{EM}}=420$ nm, leitor: FLUOstar® Omega) durante 10 minutos. Resultado representativo de dois ensaios independentes expressos como média $\pm$ SEM e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey (* $p<0,05$). UF: Unidade de fluorescência arbitrária; N.D.: Não detectável.

2.4.2.1.2 Inibição da atividade proteolítica de F3-1

A inibição da atividade proteolítica de F3-1 sobre o substrato FRET Abz-FRSSR-EDDnp, após incubação com EDTA, PMSF e PHE, revelou que apenas o PMSF, inibidor seletivo de serino proteases, foi capaz de inibir completamente a atividade enzimática desta fração (Figura 57). Este resultado indica que a fração F3-1 é composta majoritariamente por SVSPs.

Figura 57 – Inibição da atividade proteolítica de F3-1

A fração 3-1 (F3-1; 0,2 µg/poço), foi incubada com EDTA (100 mM/poço), PMSF (2 mM/poço) e 1,10- PHE (fenantrolina, 2 mM/poço) por trinta minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 µM de substrato FRET (Abz-FRSSR-EDDnp) em um volume final de 100 µL e a atividade proteolítica foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{EX}=320$ e $\lambda_{EM}=420$ nm, leitor Victor 3TM) durante 10 minutos. O cálculo de porcentagem de inibição foi realizado considerando a atividade específica de F3-1 incubada apenas em PBS como 100% de atividade. Resultado representativo de dois ensaios independentes expressos como média da porcentagem de inibição $\pm$ SEM e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,001$ (***).

2.4.2.1.3 Perfil eletroforético de F3-1

A análise eletroforética de F3-1, sob condições não-redutoras, revelou a presença de uma banda única de 33 kDa, indicando o elevado grau de pureza desta fração (Figura 58).

Figura 58 - Perfil eletroforético da fração F3-1, a SVSP purificada do veneno de *B. arietans*

A fração 3-1 (4µg/poço), correspondente à SVSP isolada da fração 3, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, sob condições não redutoras. A banda foi revelada por impregnação com nitrato de prata.

2.4.2.2 Identificação da serino protease (SVSP) por espectrometria de massas

A banda de 33 kDa foi extraída do gel de poliacrilamida e submetida à identificação por espectrometria de massas. Os fragmentos de hidrólise foram sequenciados, os dados obtidos analisados pelo programa Peaks e as sequências pareadas com SVSPs disponíveis no banco de dados da Uniprot KB. Os fragmentos DIMLIR e TLCAGVLEGGK apresentaram identidade com diferentes SVSPs: a rhinocerase, isolada do veneno de uma serpente do mesmo gênero de *B. arietans*, a *B. rhinoceros*; a kallikrein-CohPH-2, do veneno de *Crotalus oreganus helleri*, encontrada na América do Norte, bem como a elagaxobin-1 e a stejnefibrase-1, ambas purificadas do veneno de serpentes asiáticas do gênero *Trimeresurus* sp. Este resultado indica a importância desta SVSP isolada do veneno de *B. arietans*, visto que ela se manteve conservada em serpentes de diferentes continentes no decorrer no processo evolutivo. Além das duas sequências peptídicas conservadas, o sequenciamento também revelou um peptídeo exclusivo da SVSP de *B. arietans*: HPCAQPHLP AFYTK (Figura 59).

Figura 59 - Identificação da SVSP por espectrometria de massas

	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
Rhinocerase	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Kallikrein-CohPH-2	MVLIRVLNLLILQLSYAQKSELVIGGDECNTTEHRLVALY EYWSRSLFCGGTLINEE					
Elegaxobin-1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Stejnefibrase-1	MELIRVLNLLILQLSYAQKSELIIGGDECNIDEHRLVALY--KSGRFRCCGGTLINEE					
	61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120
Rhinocerase	WVS--	-----	-----	-----	-----	-----
Kallikrein-CohPH-2	WVLTAKHCNRKHFLLIYGVHDSVQFDKEQRRFPKEKYFFNCSSNFTKWDK					
Elegaxobin-1	WVLTAAHCNGKNMEIYLVGHSSKVPNKDVQRRVPKEKFFCDSSKTYTKWNK					
Stejnefibrase-1	WVLTAAHCDRRNMEIKLGMHSSKNVPNEDEQRRVPKEKFFCDSSKNYQTQWNK					
	121-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
Rhinocerase	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Kallikrein-CohPH-2	PVRNSEHIAPLSLPSSPPIVGSVCRVMGWGTTTSPNETLPDVPHCANINLLDYEVCRAN					
Elegaxobin-1	PVRKSAHIAPLSLPSSPPSVGSVCRVMGWGTTTSPQETYPDVPHCAKINLLDYSECRAAY					
Stejnefibrase-1	PVNNSTHIAPLSLPSSPPIVGSVCRIMGWGTTTSPNETYPDVPHCANINLFNYTVCHGAH					
	181-190	191-200	201-210	211-220	221-230	231-240
Rhinocerase	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Kallikrein-CohPH-2	PQSALPATSR	TLCAGVLEGGK	DTCL	-----	-----	-----
Elegaxobin-1	P--GLPPKSRT	TLCAGVLEGGK	DTCCGDS	GGPLICNGQFQGIVSWG	DP	CAQPHLP
Stejnefibrase-1	A--GLPATSR	TLCAGVLEGGK	DTCKGDS	GGPLICNGQFQGIVSWG	HP	CAQPREPGVYTK
	241-250	251-260	261-266			
Rhinocerase	VFDYIPWIK	-----	-----			
Kallikrein-CohPH-2	VFDHLDWIKSIIAGNTTVNCPRENFE					
Elegaxobin-1	VFDHLDWIKGIIAGNTDATCPL---					
Stejnefibrase-1	VFDHLDWIKNIAGSTTATCPL---					

A sequência peptídica dos três fragmentos oriundos da hidrólise da serino protease purificada (SVSP, F3-1), analisadas por espectrometria de massas, foram alinhadas com quatro sequências de serino proteases disponíveis no banco de dados da Uniprot KB: rhinocerase (P86497), kallikrein-CohPH-2 (JAA98009), elegaxobin-1 (P84788) e stejnefibrase-1 (Q8AY80). As sequências peptídicas identificadas pelo sequenciamento *de novo* estão realçadas em cinza. A tríade catalítica está em caixa aberta. Os fragmentos sublinhados se referem aos resíduos com 100% de similaridade.

2.4.2.3 Neutralização da atividade proteolítica da SVSP purificada com antiveneno

Tendo identificado a SVSP de 33 kDa por espectrometria de massas, foi avaliada a capacidade de neutralização desta enzima pelo antiveneno experimental anti-*Bitis arietans*. Após trinta minutos de incubação a temperatura ambiente com doses crescentes do antiveneno, 50-1000 µg/poço, a atividade proteolítica da SVSP foi inibida de maneira dose dependente (Figura 60A). Como mostra a figura 60B, 100 µg de antiveneno neutralizou aproximadamente 50 % da atividade. Já a neutralização completa foi obtida a partir de 500 µg, e o mesmo foi observado com o dobro de antiveneno. A neutralização utilizando 100 µg do antiveneno significa uma proporção de 1 parte de SVSP para 500 partes de antiveneno, bem como 500 µg se refere a uma proporção de 1:2.500, isto é, proporção eficiente para neutralização total da SVSP nesta condição experimental. Para comprovar a especificidade da inibição, foi utilizado como controle o soro contendo fragmentos F(ab')₂ anti-toxina botulínica, na maior dose do antiveneno específico capaz de inibir 100% da atividade. De fato, a neutralização foi específica, visto que não houve nenhuma neutralização com o anticorpo controle.

Figura 60 - Neutralização da atividade proteolítica da SVSP com antiveneno experimental

A) A serino protease (F3-1; 0,2 µg/poço), foi incubada com diferentes concentrações do antiveneno experimental anti-*Bitis arietans*, PBS ou com o soro anti-botulínico (controle), durante trinta minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 µM de substrato FRET (Abz-FRSSR-EDDnp) em um volume final de 100 µL e a atividade proteolítica remanescente foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{EX}=320$ e $\lambda_{EM}=420$ nm, leitor FLUOstar® Omega) durante 10 minutos. Resultado expresso como atividade específica (UF/min/µg) ± SD e analisados por One-Way ANOVA. **B)** O cálculo de porcentagem de neutralização foi realizado considerando a atividade específica de F3-1 incubada apenas em PBS como 100% de atividade. Resultado expresso como média da porcentagem de neutralização ± SEM analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (#) Diferença significativa entre as concentrações de antiveneno e (*) Diferença significativa das amostras em relação aos controles. $p<0,0001$ (****). Dados representativos de dois ensaios independentes. n.s. = não significativo.

2.4.2.4 Atividade da SVSP purificada sobre substratos fisiológicos

Para a validação da SVSP foram selecionados dois substratos fisiológicos envolvidos no envenenamento: o fibrinogênio humano e o peptídeo sintético homólogo ao cininogênio.

2.4.2.4.1 Atividade da SVSP sobre o fibrinogênio humano: distúrbios hemostáticos

Amostras de fibrinogênio humano foram incubadas por 1 h a 37 °C com concentrações crescentes da SVSP (0,5-5 µg) e separadas em SDS-PAGE sob condições redutoras. A SVSP foi capaz de clivar a cadeia α do fibrinogênio de maneira significativa já na menor dose testada. Esta ação foi dose dependente, de modo que a cadeia α foi totalmente hidrolisada quando incubada com 5 µg da toxina (Figura 61A e B). A clivagem da cadeia β foi expressivamente menor, contudo, por densitometria das bandas é possível notar a clivagem desta cadeia a partir de 1 µg de SVSP, de forma mais aparente quando o fibrinogênio foi tratado com a maior dose de toxina (Figura 61A e C). Já a cadeia γ foi hidrolisada apenas com 5 µg de SVSP (Figura 61A e D).

Figura 61 - Clivagem do fibrinogênio humano pela SVSP

A) Trinta microgramas de fibrinogênio humano foram incubados com a SVSP (F3-1; 0,5-5 µg/poço) durante 1 hora a 37 °C. Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão redutor e separadas por SDS-PAGE (10%). O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue. Intensidade relativa das bandas estimada por densitometria: **B)** Cadeia α , **C)** Cadeia β e **D)** Cadeia γ .

2.4.2.4.2 Atividade da SVSP sobre o peptídeo homólogo ao cininogênio: liberação de cininas vasoativas

Para avaliar a capacidade da SVSP em clivar o cininogênio e promover a liberação de cininas vasoativas, 0,2 µg de SVSP foram incubados com 90 µM de peptídeo homólogo ao cininogênio (KNBK), durante 3 horas a 37 °C. A análise dos fragmentos de hidrólise do KNBK, identificados por espectrometria de massas, revelou que a SVSP purificada foi capaz de promover a liberação de duas cininas vasoativas: a bradicinina e a Met-Lys-Bradicinina (Figura 62). A partir desta atividade, a SVSP purificada foi denominada Kn-Ba, isto é, cininogenase de *Bitis arietans*, do inglês “*Kininogenase from Bitis arietans*”.

Figura 62 - Clivagem do peptídeo homólogo ao cininogênio pela Kn-Ba, a SVSP purificada do veneno de *Bitis arietans*

A serino protease (SVSP; 0,2 µg) foi incubada com 90 µM de peptídeo homólogo ao cininogênio, KNBK (PLGMISLMKRPPGFSPFRSSR), em tampão Tris-NaCl (pH 7,4) durante três horas a 37 °C. Os fragmentos da hidrólise do peptídeo sintético foram obtidos por Zip-Tip, analisados por espectrometria de massas e as sequências peptídicas obtidas alinhadas com a sequência do KNBK íntegro.

2.4.3 Purificação e identificação de uma metaloprotease do veneno de *Bitis arietans*

2.4.3.1 Segunda etapa de cromatografia da fração 5: obtenção da SVMP purificada

Seguindo o mesmo padrão para seleção da fração contendo atividade de serino protease (ver item 2.4.2.1), a fração 5 foi selecionada para a purificação de uma metaloprotease. Após a segunda etapa de cromatografia de exclusão molecular, o fracionamento de F5 originou sete subfrações majoritárias (F5-1 a F5-7) (Figura 63).

Figura 63 - Perfil cromatográfico da fração cinco isolada do veneno de *Bitis arietans*

A) O quinto pico cromatográfico (F5), obtido da primeira etapa de purificação, foi submetido a um segundo ciclo de cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75, equilibrada e eluída com acetato de amônio (50 mM) em ambiente climatizado (22 ± 2 °C). As amostras foram coletadas em um fluxo de 0,4 mL/min. e o conteúdo proteico foi monitorado sob absorbância de 280 nm em leitor UPC-900; **B)** A fração 5-4 (F5-4) foi evidenciada por conter a atividade proteolítica mais elevada, conforme segue na tabela IV.

2.4.3.1.1 Rendimento e atividade proteolítica das subfrações de F5

Baseado no rendimento relativo, a partir da dosagem de proteínas por BCA, notou-se que a subfração F5-5 é a mais concentrada, embora F5-4 também tenha apresentado uma concentração razoável de proteínas. Contudo, semelhante às subfrações de F3, a fração mais concentrada não foi a que apresentou a maior atividade proteolítica. Neste caso, F5-4 foi a fração mais proteolítica e, por esta razão, foi selecionada para as etapas seguintes (Tabela IV).

2.4.3.1.2 Inibição da atividade proteolítica de F5-4

A inibição da atividade proteolítica de F5-4 foi avaliada sobre o substrato FRET Abz-RPPGFSPFR-EDDnp, após incubação com EDTA, PMSF e PHE. A figura 64 revela que esta fração foi inibida apenas pelo uso de inibidores seletivos de SVMPs, deste modo, indicando que F5-4 é composta majoritariamente por metaloproteases.

Tabela IV - Atividade proteolítica e rendimento das subfrações de F5

Subfração	Rendimento (μg)	Atividade específica (UF/min/ μg)
F5-1	2,1	N.D.
F5-2	8,6	N.D.
F5-3	16,4	$77,66 \pm 2,26$
F5-4	96,6	$562,40 \pm 25,34$
F5-5	131,6	$118,80 \pm 4,22$
F5-6	25,0	N.D.
F5-7	7,8	N.D.

A atividade proteolítica das frações obtidas do fracionamento de F5 por cromatografia de exclusão molecular foi avaliada pela clivagem de substratos FRETs. Em placas brancas de 96 poços, as frações (0,5 - 2 μg /poço) foram incubadas com 10 μM de substrato FRET (Abz-RPPGFSPFR-EDDnp) em PBS (volume final de 100 μL). A atividade proteolítica foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{\text{EX}}=320$ e $\lambda_{\text{EM}}=420$ nm, leitor: FLUOstar® Omega) durante 10 minutos. Resultado representativo de dois ensaios independentes expressos como média $\pm$ SD e analisados por One-Way Anova seguido pelo pós-teste de Tukey (* $p<0,05$). UF: Unidade de fluorescência arbitrária; N.D.: Não detectável.

Figura 64 - Inibição da atividade proteolítica de F5-4

A fração 5-4 (F5-4; 0,5 μg /poço), foi incubada com EDTA (100 mM/poço), PMSF (2 mM/poço) e 1,10- PHE (2 mM/poço) por trinta minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 μM de substrato FRET (Abz-RPPGFSPFR-EDDnp) em um volume final de 100 μL e a atividade proteolítica foi medida por espectrofluorimetria ($\lambda_{\text{EX}}=320$ e $\lambda_{\text{EM}}=420$ nm, leitor Victor 3TM) durante 10 minutos. O cálculo de porcentagem de inibição foi realizado considerando a atividade específica de F5-4 incubada apenas em PBS como 100% de atividade. Resultado representativo de dois ensaios independentes expressos como média da porcentagem de inibição $\pm$ SEM e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. $p<0,001$ (***)

2.4.3.1.3 Perfil eletroforético de F5-4

O perfil eletroforético da fração 5-4 sob condições não-redutoras revelou a presença de duas bandas: uma majoritária de 24 kDa e uma banda menos concentrada de aproximadamente 38 kDa (Figura 65). À medida que a amostra foi submetida à redução com β -mercaptoetanol, foi observada uma banda única de 23,5 kDa, indicando a provável

dimerização desta protease no gel não-reduzido. Este resultado aponta o elevado grau de pureza de F5-4.

Figura 65 - Perfil eletroforético de F5-4, a SVMP purificada do veneno de *B. arietans*

A fração 5-4 (4µg/poço), correspondente à metaloprotease isolada da fração 5, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, sob condições redutoras (R) e não redutoras (N/R). A banda foi revelada por impregnação com nitrato de prata.

2.4.3.2 Identificação da metaloprotease (SVMP) por espectrometria de massas

A banda de 23,5 kDa foi extraída do gel de poliacrilamida e submetida a hidrólise e posterior identificação por espectrometria de massas. Os fragmentos obtidos foram sequenciados, analisados pelo programa Peaks e as sequências pareadas com SVMPs disponíveis no banco de dados da Uniprot KB. Os dois peptídeos identificados, SCIMASTISK e GDNPDDRCTGQSADCPR, apresentaram identidade total apenas com a insularinase, uma SVMP da classe PI isolada do veneno de *Bothrops insulares*, uma serpente da América do Sul. No entanto, apresentaram elevada identidade com outras duas metaloproteases da classe PI, isoladas do veneno da serpente da América Central, *Bothrops asper* (Figura 66).

Figura 66 - Identificação da SVMP por espectrometria de massas

Insularinase SVMPBa BaP1	1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
	MIQVLLVTICLAAFPYQSSII	LES	GNVNDYEVVYARKVTELP	KGAVQQKYEDAMQYEFK		
	MIEVLLVTICLAVSPYQSSII	LES	GNVNDYEVVYPRKVTELP	KGAVQPKYEDAMQYEFK		
Insularinase SVMPBa BaP1	61-70	71-80	81-90	91-100	101-110	111-120
	VNGEPVVLHLEKNKGLFSEDY	SETHYSPDGRQII	ITYPPFEDHCYYHGRIENDAD	STASIS		
	VNGEPVVLHLEKNKGLFSEDY	SETHYSPDGRKII	ITYPSFEDHCYYHGRIENDAD	STASIS		
Insularinase SVMPBa BaP1	121-130	131-140	141-150	151-160	161-170	171-180
	ACNGLKGHFQKQGETYLI	EPLKLPDSEAHAVYKYENVEKE	DEAPKMGVETN	WESYEPI		
	ACNGLKGHFQKQGETYLI	EPLKLPDSEAHAVYKYENVEKE	DEAPKMGVETN	WESYEPI		
Insularinase SVMPBa BaP1	181-190	191-200	201-210	211-220	221-230	231-240
	EKASQSNLTPEQQKFS	PRYIELAVVADHGMFTKYN	SNLNTIRTRVHEM	VNTLNGFFRSVN		
	EKASQSNLTPEQQKFS	PRYIELAVVADHGMFTKYN	SNLNTIRTRVHEM	VNTLNGFFRSVN		
Insularinase SVMPBa BaP1	241-250	251-260	261-270	271-280	281-290	291-300
	VDASLANLEVWSKKDLIK	VEKDSSKTLTSFG	EWRRDLPRI	SHDHAQLLT	TIVFDQQT	
	VDASLANLEVWSKKDLIK	VEKDSSKTLTSFG	EWRRDLPRI	SHDHAQLLT	TIVFDNYVI	
Insularinase SVMPBa BaP1	301-310	311-320	321-330	331-340	341-350	351-360
	GLAYTAGMCDPRQSV	AVVMDHSSKNLR	VAVTMAHELGH	NLGMDD-DTCT	CGAKSCIMAS	
	GITEFGKMDPKLS	VGVRDHSEINLQ	VAVAMAH	ELGHNLGMYHD	GNQCHCDA	ASCIMAD
Insularinase SVMPBa BaP1	361-370	371-380	381-390	391-400	401-410	411-420
	TISKGLSFEFSKCS	QNYQTYLTDHNP	QCILNKPLTT	VSGNELLEAGE	EEDCDGAPEN	PCC
	TLREVL	SYEFSDCSQNY	ETYLTKHNP	QCILNEPLLI	VSGNELLEAGE	EEDCDGAPEN
Insularinase SVMPBa BaP1	421-430	431-440	441-450	451-460	461-470	471-477
	DAATCKLRPRAQCA	EGLCCDQCRFK	GAGKICRRAR	GDNPDDRCT	TGQSADCP	NRNRFHA
	DAATCKLRPGAQCA	EGLCCDQCRFK	GAGKICRRAR	GDNPDDRCT	TGQSADCP	NRNRFHA

A sequência peptídica dos dois fragmentos de hidrólise da metaloprotease purificada (SVMP, F5-4), analisadas por espectrometria de massas, foram alinhadas com três sequências de metaloproteases disponíveis no banco de dados da Uniprot KB: insularinase (Q5XUW8), SVMPBa (Q072L5) e BaP1 (P83512). As sequências peptídicas identificadas pelo sequenciamento *de novo* estão realçadas em cinza. As regiões do sítio ativo e resíduos de ligação ao Zn^{2+} foram evidenciadas pela caixa aberta. Os fragmentos sublinhados se referem aos resíduos com 100% de identidade.

2.4.3.3 Neutralização da atividade proteolítica da SVMP purificada com antiveneno

Após a identificação da SVMP de 23,5 por espectrometria de massas, a neutralização com o antiveneno experimental anti-*B. arietans* foi avaliada. Após trinta minutos de incubação a temperatura ambiente com doses crescentes do antiveneno, 50-1000 µg/poço, a atividade proteolítica da SVMP foi inibida de maneira dose dependente (Figura 67A). A neutralização de aproximadamente 50% foi obtida quando utilizado 250 µg de antiveneno,

seguida de 70% e 100% de neutralização com 500 µg e 1000 µg de antiveneno, respectivamente. Em outras palavras, 50% da atividade proteolítica foi neutralizada com uma proporção de 1:500 (1 parte de SVMP para 500 partes de antiveneno), seguida de 70% de neutralização com uma proporção de 1:1000. A neutralização completa foi obtida com a proporção de 1:2000 (Figura 67B). A especificidade da neutralização foi comprovada após o ensaio de inibição com anticorpos IgG de cavalo não imunizados (1000 µg/mL; proporção de 1:2000), os quais não foram capazes de inibir a atividade proteolítica da SVMP (Figura 67B). Como curiosidade, é interessante ressaltar que o soro controle “F(ab')₂ anti-toxina botulínica”, utilizado como controle da inibição da atividade proteolítica da SVSP, não pôde ser utilizado como controle da inibição da SVMP, visto que esse controle foi capaz de inibir cerca de 35 % da atividade proteolítica da SVMP. Após buscas na literatura, foi constatado que a toxina botulínica, utilizada como imunógeno para a produção deste soro controle, é uma metaloprotease^{324, 325}, indicando a provável razão por este reconhecimento cruzado.

Figura 67 - Neutralização da atividade proteolítica da SVMP com antiveneno experimental

A metaloprotease (F5-4; 0,5 µg/poço), foi incubada com diferentes concentrações do antiveneno experimental anti-*Bitis arietans*, PBS ou com soro controle: soro anti-botulínico (**A**) e IgG pré-imune (**C**), durante trinta minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 µM de substrato FRET (Abz-RPPGFSPFR-EDDnp) em um volume final de 100 µL e a atividade proteolítica remanescente foi medida por espectrofluorimetria (λ_{EX} =320 e λ_{EM} =420 nm, leitor FLUOstar® Omega) durante 10 minutos. Resultado expresso como atividade específica (UF/min/µg) ± SD. **B** e **D**) O cálculo de porcentagem de neutralização foi realizado considerando a atividade específica de F5-4 incubada apenas em PBS como 100% de atividade. Resultado expresso como média da porcentagem de neutralização ± SEM e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (#) Diferença significativa entre as concentrações de antiveneno e (*) Diferença significativa das amostras em relação aos respectivos controles. $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***); $p < 0,0001$ (****). Dados representativos de dois ensaios independentes. n.s. = não significativo.

2.4.3.4 Atividade da SVMP purificada sobre substratos fisiológicos

Para a validação da SVMP foram selecionados dois substratos fisiológicos envolvidos no envenenamento: o fibrinogênio e a fibronectina humanos.

2.4.3.4.1 Atividade da SVMP sobre o fibrinogênio humano: distúrbios hemostáticos

Após incubação do fibrinogênio humano com concentrações crescentes da SVMP (0,5-2 μg), a hidrólise do substrato foi avaliada em gel de poliacrilamida sob condições redutoras. Como mostra a figura 68, ao contrário da SVSP que clivou principalmente a cadeia α , já na menor dose testada, a SVMP foi capaz de clivar totalmente as cadeias α e β do fibrinogênio humano. Entretanto, não houve atividade sobre a cadeia γ .

Figura 68 - Clivagem do fibrinogênio humano pela SVMP

Trinta microgramas de fibrinogênio humano foram incubados com a SVMP (F5-4; 0,5-2 μg /poço) durante 1 hora a 37 °C. Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão redutor e separadas por SDS-PAGE (10%). O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue*.

2.4.3.4.2 Atividade da SVMP sobre a fibronectina humana: ação sobre componentes de matrix extracelular

Após a incubação da SVMP com a fibronectina humana, a hidrólise dependente da concentração da SVMP foi evidenciada por SDS-PAGE sob condições redutoras. A banda principal da fibronectina, com aproximadamente 220 kDa, foi totalmente degradada após o período de incubação, isto já na menor dose testada (0,1 µg). Fragmentos proteicos de 220-50 kDa, provenientes da hidrólise deste substrato, são observados (Figura 69).

Figura 69 - Clivagem da fibronectina humana pela SVMP

Vinte microgramas de fibronectina humana foram incubados com a metaloprotease (F5-4; 0,1-0,5 µg/poço) durante 1 hora a 37 °C. As amostras foram tratadas com tampão redutor e separadas por SDS-PAGE (10%). O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue*.

2.4.4 Resumo das etapas de purificação e rendimento das toxinas

Baseado nos resultados obtidos até aqui, é possível concluir que foram purificadas e caracterizadas duas importantes toxinas do veneno de *B. arietans*: uma SVSP e uma SVMP.

O resumo do processo de purificação para obtenção das toxinas, bem como o rendimento relativo, são mostrados na tabela V.

Tabela V – Resumo do processo de purificação e rendimento das proteínas de interesse

Amostra	Etapas de purificação	Proteína final (µg)	Atividade específica	Rendimento final (%)
Veneno ¹	-	20.000	259,1 ± 14,8	100
Fração 3	1ª Gel filtração (Superose 12 HR)	3.053	27,8 ± 0,9	15,3
Serino protease (SVSP; Kn-Ba)	2ª Gel filtração (Superdex 75)	26	665,6 ± 4,5	0,1
Veneno ²	-	20.000	431,5 ± 29,9	100
Fração 5	1ª Gel filtração (Superose 12 HR)	1.795	918 ± 50,8	9,0
Metaloprotease (SVMP; F5-4)	2ª Gel filtração (Superdex 75)	97	562,4 ± 25,3	0,5

Atividade específica (UF/min/µg) sobre substratos FRET. Atividade proteolítica sobre o substrato Abz-FRSSR-EDDnp (veneno¹, fração 3 e Kn-Ba) e Abz-RPPGFSPFR-EDDnp (veneno², fração 5 e F5-4).

2.4.5 Efeitos das toxinas purificadas sobre macrófagos humanos

2.4.5.1 Cultivo das células THP-1 e processo de diferenciação dos macrófagos

Os pré-monócitos não aderentes da linhagem THP-1 (Figura 70A) foram cultivados em meio RPMI⁺ na concentração de $2-8 \times 10^5$ células/mL. Nestas condições, as células em suspensão cresceram em grumos e apresentaram alta taxa de proliferação, de modo que o número de células era duplicado dentro de 2-3 dias. Em seguida, os monócitos foram diferenciados em macrófagos utilizando 100 ng/mL de PMA. Diferentemente dos monócitos, após o período de diferenciação, os macrófagos se tornaram aderentes, espalhados e relativamente maiores que as células não diferenciadas (Figura 70B).

Figura 70 - Diferenciação de pré-monócitos THP-1 em macrófagos

A) Pré-monócitos humanos da linhagem THP-1 foram cultivados em garrafas de 75 cm³ contendo meio RPMI⁺. As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, na concentração de 2-8x10⁵ células/mL. **B)** Macrófagos foram diferenciados de pré-monócitos THP-1 com 100 ng/mL de PMA durante 3 dias, seguido de um período de descanso de 4 dias na ausência de PMA. Aumento de 200x.

2.4.5.1.1 Expressão de CD11b nos macrófagos

Para confirmar a diferenciação dos macrófagos foi avaliada a expressão da molécula de CD11b, a qual em conjunto com CD18, formam o receptor de C3b inativo (iC3b), conhecido como CR3. De fato, os macrófagos expressam quantidade elevada de CD11b, um importante marcador deste tipo celular. Em contrapartida, praticamente nenhuma expressão foi observada nos monócitos (Figura 71).

Figura 71 - Expressão de CD11b em macrófagos diferenciados

Macrófagos aderentes diferenciados com PMA e monócitos em suspensão foram analisados quanto a expressão de CD11b por citometria de fluxo. Resultado expresso como média das duplicatas $\pm$ SEM e analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferença significativa com relação aos respectivos controles ($p < 0,0001$). Dados representativos de dois ensaios independentes.

2.4.5.2 Citotoxicidade sobre macrófagos humanos

Os macrófagos humanos foram tratados com duas concentrações de SVSP e SVMP (0,5 µg e 1 µg), bem como com diferentes concentrações de veneno (0,5-15 µg), durante 24 h, 48 h e 72 h. Para avaliar o efeito citotóxico dos tratamentos, a viabilidade celular foi monitorada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH). Em todas as condições avaliadas, as toxinas purificadas e o veneno não afetaram significativamente a viabilidade celular (> 90 % de células viáveis).

2.4.5.3 Produção de citocinas inflamatórias

Para avaliar o papel das toxinas purificadas no processo inflamatório, macrófagos humanos, diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram incubados com 0,5 e 1 µg/poço de SVSP ou SVMP durante 24 h, 48 h e 72 h. Em paralelo, as células também foram tratadas com 0,5-15 µg/poço de veneno. Ao término de cada período de incubação, a concentração das citocinas produzidas foi avaliada no sobrenadante das culturas.

Nas doses testadas, o veneno foi capaz de induzir a produção de TNF e IL-1 β (Figura 72), de forma dependente da concentração. Por sua vez, ainda que em baixa concentração, a produção de TNF foi detectada após 24 h de tratamento com as duas maiores doses de veneno. Após 48 h esta citocina não foi mais detectada. Por outro lado, a produção de IL-1 β foi mais elevada e sua produção se manteve ao longo dos três períodos avaliados. O ápice da produção desta citocina foi detectado também em 24 h.

Figura 72 - Produção de citocinas em macrófagos humanos tratados com o veneno de *B. arietans*

a) TNF

b) IL-1 β

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com diferentes concentrações do veneno de *B. arietans*. Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de citocinas inflamatórias foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas das concentrações de veneno e seus respectivos controles; (#) Diferenças entre as concentrações de veneno. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

O tratamento das células com a SVSP induziu níveis elevados de TNF, IL-6 e IL-1 β , e essa produção ocorreu de maneira dependente da concentração (Figura 73). O TNF e a IL-6 foram produzidos principalmente em 24 h, no entanto, a produção se manteve até as 72 h de incubação. Já a IL-1 β foi produzida principalmente em 48 h e 72 h.

Já a SVMP induziu a produção de TNF, IL-10 e IL-1 β (Figura 74). Assim como o veneno, a produção de TNF foi baixa e detectada principalmente em 24 h. a SVMP também promoveu a produção de IL-10 em 24 h, uma importante citocina anti-inflamatória. Semelhante ao estímulo com a SVSP, a IL-1 β teve seu pico em 48 h e 72 h.

Utilizando as maiores doses dos estímulos (SVSP e SVMP, 1 μ g e veneno 15 μ g) para estabelecer uma comparação, a produção de níveis elevados de TNF e IL-6 após estímulo com

a SVSP é evidente. Já a única capaz de induzir a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, foi a SVMP. Por fim, a IL-1 β , cuja produção é dependente do fator de transcrição NF- κ B e sua liberação dependente da ativação de inflamassomas, teve seu ápice em 24 h em resposta ao veneno. Em 48 h as duas toxinas purificadas induziram aumento desta citocina, ao passo que em 72 h não houve diferença significativa entre o veneno e a SVSP (Figura 75).

Figura 73 - Produção de citocinas em macrófagos humanos tratados com a SVSP purificada do veneno de *B. arietans*

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com duas concentrações da SVSP purificada. Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de citocinas inflamatórias foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas das concentrações de SVSP e seus respectivos controles; (#) Diferenças entre as concentrações de SVSP. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Figura 74 - Produção de citocinas em macrófagos humanos tratados com a SVMP purificada do veneno de *B. arietans*

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com duas concentrações da SVMP purificada. Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de citocinas inflamatórias foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas das concentrações de SVMP e seus respectivos controles; (#) Diferenças entre as concentrações de SVMP. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Figura 75 - Comparação das citocinas produzidas em resposta às maiores doses de veneno, SVSP e SVMP purificadas

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com as concentrações mais altas de veneno (15 μ g), SVSP (1 μ g) e SVMP (1 μ g). Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de citocinas inflamatórias foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas dos estímulos em relação ao controle; (#) Diferenças entre os estímulos. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

2.4.5.4 Produção de quimiocinas

Para a dosagem de quimiocinas foram selecionadas as duas doses de toxinas purificadas e as duas maiores doses de veneno para os tratamentos.

Como mostra a figura 76, o veneno foi capaz de induzir a produção de RANTES e IL-8. De forma dependente da concentração, o aumento de RANTES ocorreu principalmente em 24 h e se manteve até as 48 h. Por outro lado, a produção de IL-8 se intensificou nos períodos mais tardios.

Além de RANTES e IL-8, a SVSP foi capaz de induzir a produção de IP-10 e MCP-1. A IP-10 foi induzida a partir de 24 h após o estímulo com 1 µg, a qual teve redução significativa após 48 h e se elevou em 72 h. O estímulo com 0,5 µg foi capaz de induzir a produção desta citocina apenas em 72 h. Já a produção de MCP-1 foi detectada nas duas doses de estímulo, embora tenha sido também dependente da concentração. Em 48 h sua produção foi superior a 24 h e se manteve até as 72 h. A produção de RANTES e IL-8 mantiveram o mesmo padrão observado para a MCP-1 (Figura 77).

Por sua vez, a SVMP promoveu a produção de MCP-1, RANTES e IL-8. Todas produzidas de forma dependente da concentração de estímulo, a MCP-1 e a IL-8 aumentaram no decorrer de todos os períodos de incubação. Já a produção de RANTES foi detectada apenas a partir de 48 h e não houve aumento em 72 h (Figura 78).

Figura 76 - Produção de quimiocinas em macrófagos humanos tratados com o veneno de *B. arietans*

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com duas concentrações de veneno de *B. arietans*. Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de quimiocinas foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas das concentrações de veneno e seus respectivos controles; (#) Diferenças entre as concentrações de veneno. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Figura 77 - Produção de quimiocinas em macrófagos humanos tratados com a SVSP purificada do veneno de *B. arietans*

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com duas concentrações da SVSP purificada. Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de quimiocinas foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas das concentrações de SVSP e seus respectivos controles; (#) Diferenças entre as concentrações de SVSP. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Figura 78 - Produção de quimiocinas em macrófagos humanos tratados com a SVMP purificada do veneno de *B. arietans*

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com duas concentrações da SVMP purificada. Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de quimiocinas foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Dados da comparação entre os períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas das concentrações de SVMP e seus respectivos controles; (#) Diferenças entre as concentrações de SVMP. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

Comparando as maiores doses de todos os tratamentos, foi possível concluir que a SVSP induziu os maiores níveis das quatro quimiocinas produzidas (Figura 79), indicando seu importante papel no processo inflamatório induzido pelo veneno.

Figura 79 - Comparação das quimiocinas produzidas em resposta às maiores doses de veneno, SVSP e SVMP purificadas

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com as concentrações mais altas de veneno (15 μ g), SVSP (1 μ g) e SVMP (1 μ g). Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção de quimiocinas foi avaliada por CBA após 24 h, 48 h e 72 h dos tratamentos. Todos os gráficos mostram a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados de cada período comparados com seu respectivo controle analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas dos estímulos em relação ao controle; (#) Diferenças entre os estímulos. Os símbolos indicam diferenças entre os tempos de estímulos: (α): diferença de 48 ou 72 horas comparados a 24 horas e (β): diferença de 72 para 48 horas. $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

2.4.5.5 Produção de PGE_2 e LTB_4

Por fim, a produção de PGE_2 e LTB_4 foi avaliada nos sobrenadante das culturas de macrófagos tratados durante 1/2 h com o veneno (15 μ g), SVSP e SVMP (1 μ g). Como mostra a figura 80, apenas o veneno foi capaz de induzir a produção significativa de PGE_2 neste período.

Figura 80 – Produção de PGE_2 em macrófagos humanos tratados com as maiores doses de veneno, SVSP e SVMP purificadas

Macrófagos humanos (2×10^5 /poço), diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1, foram tratados com as concentrações mais altas de veneno (15 μ g), SVSP (1 μ g) e SVMP (1 μ g). Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. A produção PGE_2 foi avaliada por ELISA após 1/2 h de tratamento. O gráfico mostra a média das duplicatas $\pm$ SEM. Dados analisados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*) Diferenças significativas dos estímulos em relação ao controle; (#) Diferenças entre os estímulos. $p < 0,01$ (**).

O veneno, bem como a SVMP e SVSP, não induziram a produção de LTB_4 em 1/2 h de estímulo.

2.5 DISCUSSÃO

As taxas de morbidade e mortalidade globais causadas por envenenamentos por serpentes são alarmantes, principalmente em países em desenvolvimento localizados na África, Ásia e América do Sul.⁷ No caso do continente africano, a serpente *Bitis arietans*, popularmente conhecida como “Puff adder”, é a principal espécie de interesse médico e responsável pelo maior número de acidentes. Endêmica da África Subsaariana e com populações esparsas encontradas no Marrocos e Arábia Saudita, esta serpente tem um potente veneno que pode desencadear efeitos locais e sistêmicos, dentre eles: dor, febre, leucocitose, dano tecidual e distúrbios hemostáticos e cardiovasculares, os quais podem levar a morte na ausência de tratamento.^{34, 38} Entretanto, apesar do elevado índice de acidentes envolvendo esta espécie e seus comprovados efeitos deletérios,^{7, 10} o mecanismo pelo qual os componentes tóxicos deste veneno causam danos permanece pouco estudado. Em vista disso, esforços que visam compreender o mecanismo de ação das toxinas purificadas são estratégias promissoras para auxiliar no tratamento destes acidentes.

Até o momento, de acordo com a literatura, foram isoladas e caracterizadas algumas toxinas do veneno de *B. arietans*, como: metaloproteases hemorrágicas^{326, 327} e não hemorrágicas;³²⁸ serino proteases fibrinogenolíticas, liberadora de cininas e com ação sobre a insulina,³²⁹ bem como uma SVSP capaz de promover a liberação de calidina;³³⁰ fosfolipases A₂ como a bitanarina com elevada atividade fosfolipásica e capaz de bloquear canais iônicos³³¹ e a bitiscetina que induz agregação plaquetária;^{332, 333} a Ba25, com estrutura primária similar às lectina do tipo C de venenos, com atividade pró-coagulante³³⁴ e a PAL (Puff adder lectin), uma lectina que induz a liberação de Ca⁺⁺ no retículo sarcoplasmático, o que leva a consequente contração muscular;³³⁵ e a bitistatina (P17497), conhecida anteriormente como arietina, um peptídeo capaz de inibir a agregação plaquetária.³³⁶ Recentemente, uma família de peptídeos inibidores da ECA, os BPPs (*Bradykinin-Potentiating Peptides*), foram descritos neste veneno, os quais foram capazes de induzir hipotensão *in vivo*.⁴⁵ Em adição, foram encontradas altas concentrações de adenosina, as quais podem causar vasodilatação local e também contribuir para a hipotensão.³³⁷ No entanto, até o momento, o potencial pró-inflamatório do veneno e de suas toxinas purificadas não foi avaliado.

Frente ao exposto, no presente trabalho foram isoladas e caracterizadas duas representantes das principais classes de toxinas do veneno de *B. arietans*: uma SVSP de 33 kDa, filbrinogenolítica e liberadora de cininas, e uma SVMP de 23,5 kDa, com atividade

sobre o fibrinogênio e fibronectina, cujos efeitos pró-inflamatórios foram analisados em macrófagos humanos.

A massa molecular tanto da SVSP quanto da SVMF isoladas são muito próximas as encontradas no transcriptoma e proteoma deste veneno.^{268, 269} O proteoma foi investigado a partir da separação das proteínas do veneno por cromatografia de fase reversa, seguida do sequenciamento da região N-terminal destas proteínas e determinação da massa por espectrometria de massas. Entre as proteínas encontradas, foram identificadas metaloproteases da classe P-I, com peso molecular estimado em 23,310 kDa, e serino proteases de 28-42 kDa.

Como outras SVSPs,^{301, 305, 338} a Kn-Ba apresentou peso molecular de 33 kDa e a atividade proteolítica foi totalmente inibida pelo PMSF. Os peptídeos oriundos de sua hidrólise foram sequenciados e alinhados com sequências de SVSPs dos venenos de *Bitis rhinoceros*, *Trimeresurus* sp. e *Crotalus oreganus helleri* e apresentaram 100 % de identidade com estas sequências de aminoácidos. Contudo, apesar dos membros das SVSPs apresentarem homologia na sequência primária, efeitos biológicos distintos são descritos.^{303, 305} O tipo e o teor de glicosilação²⁹⁴⁻²⁹⁶ pode ser um dos responsáveis por tais diferenças. Neste contexto, podemos frisar várias SVSPs com atividade semelhante à trombina,^{294, 339} as quais podem clivar o fibrinogênio e promover a formação de coágulos^{303, 340} ou SVSPs capazes de clivar o fibrinogênio em regiões distintas das clivadas pela trombina, e, desta forma, tornar esta molécula incoagulável.^{305, 341} A Kn-Ba foi capaz de clivar as cadeias α e β do fibrinogênio humano, e, embora sua atividade pró/anti-coagulante não tenha sido investigada até o momento, a capacidade de hidrolisar a molécula de fibrinogênio indica seu possível papel nos distúrbios hemostáticos apresentados no envenenamento.

Apesar dos dados limitados, já foi descrito que o envenenamento pela serpente *B. arietans* pode resultar em hipotensão.^{34, 38} Alguns estudos sugerem que esta hipotensão seja causada pela hemorragia espontânea,³⁴² no entanto, são relatadas mortes de pacientes com colapso circulatório na ausência de hemorragia significativa,³⁴ indicando a ação direta de componentes do veneno sobre a hipotensão. No presente trabalho foi demonstrado que a Kn-Ba foi capaz de clivar o peptídeo sintético homólogo ao cininogênio, promovendo a liberação de bradicinina e Met-Lys-bradicinina, cininas vasoativas e inflamatórias, que podem estar relacionadas com a hipotensão e inflamação apresentada pelas vítimas. Desde que Rocha e Silva e cols. (1949)³⁴³ descreveram a bradicinina, várias enzimas de veneno capazes de promover a liberação de cininas foram descritas.^{295, 305, 306, 308, 344} Entretanto, as cininas usualmente liberadas pela ação de SVSPs são a bradicinina (BK) e a calidina (Lys-BK); de acordo com nosso conhecimento, esta é a primeira vez que foi reportada a liberação de Met-

Lys-bradicinina pela ação de uma SVSP. Apesar de menos comum, já foi demonstrado que a Met-Lys-bradicinina tem afinidade pelos receptores de cininas B1 e B2 e que seus efeitos biológicos são equivalentes às da bradicinina, aumentando a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e a IL-1 β ³⁴⁵. Exercendo importante papel na inflamação, a expressão do receptor de cininas B1 é aumentada por citocinas inflamatórias como a IL-1 β , ^{310, 311} desta forma, estabelecendo uma alça de amplificação da resposta inflamatória. Neste contexto, a Kn-Ba pode estar influenciando no quadro de hipotensão e inflamação não apenas pela capacidade de promover a liberação de cininas vasoativas, mas também, por induzir a produção de citocinas inflamatórias em macrófagos, como será visto mais a frente. Em adição, como já demonstrado em trabalhos anteriores do nosso grupo, o veneno de *B. arietans* possui componentes capazes de degradar ⁴⁶ e inibir a ECA, ⁴⁵ indicando uma ação sinérgica da Kn-Ba com estes compostos na promoção do quadro de hipotensão.

Por fim, considerando que o tratamento recomendado para os acidentes ofídicos é a terapia com antiveneno, o qual vem sendo melhorado ao longo dos anos ^{28, 346, 347} é importante frisar que a atividade proteolítica da Kn-Ba, uma potente SVSP deste veneno, foi completamente neutralizada pelo antiveneno experimental produzido pelo nosso grupo. ¹⁸⁹ Este antiveneno apresentou elevado reconhecimento cruzado com proteínas presentes nos venenos de *B. nasicornis* e *B. rhinoceros*, além de promover proteção *in vivo*. Baseado no elevado grau de homologia entre as sequências das SVSPs em conjunto com nossos resultados, é possível sugerir que este antiveneno experimental seja capaz de bloquear a atividade das SVSPs presentes em outros venenos, ou pelo menos, nos venenos do gênero *Bitis* sp.

Por sua vez, a SVMF purificada do veneno apresentou peso molecular de 23,5 kDa, semelhante à outras SVMFs da classe P-I, como a insularinase A ³⁴⁸ e a BaP1, ²⁸³ e teve sua atividade proteolítica completamente inibida pelo EDTA e 1,10-fenantrolina. Os peptídeos oriundos de sua hidrólise foram sequenciados e alinhados com SVMFs dos venenos de *Bothrops insularis* (insularinase A) e *B. asper* (BaP1) e apresentaram 100 % e 89,2 % de identidade, respectivamente, com estas sequências de aminoácidos. Como as SVSPs, as SVMFs são fibrinogenolíticas, ^{267, 280, 281} e clivam preferencialmente a cadeia α e mais fracamente a cadeia β do fibrinogênio, desta forma, podendo contribuir para os distúrbios de coagulação apresentados pelas vítimas. Em contraste ao observado com a Kn-Ba, já na menor dose testada, a SVMF foi capaz de clivar completamente as cadeias α e β do fibrinogênio, sem nenhuma atividade sobre a cadeia γ , o que de certa forma já era esperado, visto que a

única SVMP descrita com capacidade de degradar a cadeia γ é a atrolisina F.²⁸² Entretanto, a capacidade pró-coagulante desta enzima deve ser investigada.

A habilidade das SVMPs em induzir hemorragia é associada à sua capacidade de hidrolisar proteínas da matrix extracelular, como colágeno tipo IV, fibronectina, trombospondina e laminina.²⁷² É descrito que as SVMPs da classe P-III são mais hemorrágicas do que as da classe P-I;^{283, 285, 286} tal diferença pode ser explicada pela presença dos domínios desintegrina e cisteína presentes apenas nas SVMPs da classe P-III, os quais são capazes de promover a adesão destas toxinas nos componentes de matrix extracelular, facilitando sua ação proteolítica.^{41, 42} No entanto, existem variações neste aspecto dentro da classe P-I, que agrupam SVMPs hemorrágicas, bem como SVMPs fracamente ou não hemorrágicas. Como exemplos destas SVMPs da classe P-I temos a BaP1, a insularinase A e as DaH e DaMD. A BaP1 é fibrinogenolítica, fracamente hemorrágica e não exerce atividade pró-coagulante. Por outro lado, é capaz de degradar componentes da matrix extracelular e promover morte celular conhecida como “*anoikis*”, um tipo de apoptose causada pela falta de ancoramento celular.^{283, 291} A insularinase-A possui atividade pró-coagulante, devido à sua capacidade de ativar a pró-trombina, porém não é hemorrágica nem capaz de promover “descolamento” e apoptose de células endoteliais.³⁴⁸ Já a DaH e a DaMD, duas SVMPs da classe P-I isoladas do veneno da serpente asiática *Agkistrodon acutus*, são altamente hemorrágicas.³⁴⁹ De acordo com Tsai e cols. (2000),³⁴⁹ as SVMPs de baixo peso podem ser classificadas em três grupos: hemorraginas ácidas (HA), hemorraginas básicas (HB), providas de atividade hemorrágica moderada, e fibrogenases não-hemorrágicas (F). O subtipo HA é caracterizado pelo valor de pI entre 4-5, alta atividade hemorrágica e baixa atividade fibrinogenolítica; o subtipo HB é caracterizado pelo valor de pI entre 7-10 e atividade hemorrágica moderada ou fraca. Ambos são capazes de inibir a agregação plaquetária.³⁵⁰ Já os membros do subtipo F apresentam elevada atividade enzimática e fraca atividade hemorrágica. No entanto, membros do grupo F podem induzir edema e dano tecidual.²⁹⁰ Baseado nesta classificação, bem como em similaridades na sequência de aminoácidos que compõem o sítio catalítico de diferentes SVMPs, o autor conclui que a região responsável pela atividade hemorrágica não é apenas o sítio catalítico, visto que este é semelhante entre SVMPs de classes diferentes; também, pelo fato de que diferentes SVMPs hidrolisam igualmente substratos comuns como insulina B, fibrinogênio e componentes de matrix extracelular, e que esta atividade proteolítica não está diretamente associada à atividade hemorrágica.³⁴⁹ Baseado nestas informações, temos que a SVMP purificada neste trabalho foi capaz de hidrolisar completamente a fibronectina humana, contudo, seu potencial

hemorrágico deve ser avaliado. Por fim, assim como a SVSP, a atividade proteolítica da SVMP foi completamente inibida pelo anticorpo experimental anti-*B. arietans*.

Tendo em mãos as toxinas purificadas e parcialmente caracterizadas, os efeitos sobre macrófagos humanos foram avaliados. Para tal, macrófagos foram diferenciados de pré-monócitos da linhagem THP-1 utilizando PMA (100 ng/mL) por 72 h, seguido de um período de descanso de 4 dias em meio sem PMA.³²¹ De acordo com Daigneault e cols. (2010),³²¹ este é o protocolo onde as características dos macrófagos diferenciados de pré-monócitos THP-1 mais se aproximam dos macrófagos diferenciados de monócitos de sangue periférico humano, justificando a escolha deste protocolo para o trabalho. Após o tratamento, as células tornaram-se aderentes e o espriamento pôde ser claramente observado. Além destes aspectos, foi avaliada a expressão da molécula de CD11b, um marcador bastante utilizado para validar a diferenciação de macrófagos.³⁵¹ A molécula de CD11b complexada à molécula de CD18, formam o receptor CR3, expresso em macrófagos e outros leucócitos, o qual se liga ao iC3b fixados à superfície de patógenos e auxilia na fagocitose.⁷⁷ Como esperado, houve um aumento bastante significativo da expressão de CD11b nos macrófagos quando comparados com os monócitos não tratados, desta forma, confirmando o processo de diferenciação e tornando as células aptas aos tratamentos.

Trabalhando com a LFH-II, uma SVMP da classe P-I purificada do veneno de *Lachesis muta muta*, Rucavado e cols. (1999)²⁹⁰ demonstraram que o tratamento de células endoteliais murinas com 2,5-20 µg/poço de LFH-II só foi capaz de promover uma leve desadesão celular, mas não a liberação de LDH, mesmo na maior dose testada. Em outras palavras, foi mostrado que o tratamento com 20 µg de LFH-II não induziu morte celular. Considerando o rendimento atual das proteases purificadas, os macrófagos foram tratados com 0,5 µg e 1 µg das toxinas purificadas durante 24 h, 48 h e 72 h, períodos em que os ensaios de citotoxicidade e dosagem de citocinas inflamatórias e quimiocinas foram realizados. Como esperado, nenhuma das doses teve efeito citotóxico, no entanto, ambas foram capazes de induzir a produção de mediadores inflamatórios. A SVSP induziu a produção das citocinas TNF, IL-6 e IL-1β e as quimiocinas IP-10, MCP-1, RANTES e IL-8. Já a SVMP foi capaz de induzir a produção de IL-10 em 24 h, bem como de TNF e IL-1β e das quimiocinas MCP-1, RANTES e IL-8. Com exceção da IL-10, todos os mediadores produzidos após estímulo com a SVMP foram detectados em níveis mais baixos do que os induzidos pela SVSP. Já nas células tratadas com o veneno, foram detectados baixos níveis de TNF e níveis elevados de IL-1β, além das quimiocinas RANTES e IL-8. Além disso, o estímulo com veneno foi o único capaz de induzir a produção de PGE₂. Este resultado indicou

que a SVSP é um componente importante do veneno para estimular a síntese de citocinas e quimiocinas inflamatórias. Contudo, a elevada concentração de IL-1 β nas células tratadas com veneno indica a presença de outros componentes que, assim como a SVSP, estão promovendo a ativação de inflamassomas, com consequente ativação da caspase-1 e liberação de IL-1 β madura no sobrenadante das culturas. Além disso, a produção de PGE₂ apenas após o tratamento com o veneno indicou que a SVSP e a SVMP não estão envolvidas com a produção deste prostanoide em 30 minutos.

O TNF- α é um potente mediador inflamatório produzido, principalmente, por monócitos e macrófagos ativados. Dentre suas funções está o recrutamento de leucócitos, diferenciação de macrófagos, desgranulação de neutrófilos e indução da geração de leucotrienos, os quais estão envolvidos com o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e contribuem com a migração leucocitária. Estas ações culminam na produção de praticamente todos os mediadores inflamatórios, incluindo IL-1, IL-6, IL-8 e outros mediadores lipídicos. Em adição, é gerada uma alça de amplificação, onde todos estes componentes induzem a síntese de produção e liberação do TNF- α por macrófagos, que por sua vez, também é ativado por esta citocina.^{352, 353} Neste sentido, os nossos dados corroboram o importante papel do TNF- α na inflamação e indicam sua participação na indução de citocinas encontradas no sobrenadante dos macrófagos, incluindo a IL-6 e a IL-1 β . Interessante pontuar que nas amostras de SVSP e de SVMP, mas não de veneno (ver item 2.3.2), foram detectadas quantidades de LPS superiores à recomendada (< 0,1 EU/ μ g de peçonha).²²² Contudo, sabendo que o LPS é um potente indutor da produção de TNF- α ,³⁵⁴ é possível inferir que a concentração de LPS encontrada nas toxinas purificadas não é suficiente para modular ou se sobrepôr à capacidade das toxinas em produzir TNF- α , uma vez que, utilizando a mesma concentração de toxina purificada (1 μ g; 24 h), foi detectado 30 vezes mais TNF- α no sobrenadante dos macrófagos tratados com a SVSP.

Apesar de muitos estudos apontarem as SVMPs como potentes moléculas pró-inflamatórias,^{288, 292, 293} no presente trabalho foi demonstrado que a SVMP isolada do veneno de *B. arietans* induziu quantidades significativamente menores de citocinas inflamatórias, quando comparada com a SVSP isolada do mesmo veneno. Tal resultado pode ser explicado pela rápida hidrólise das citocinas por ação de metaloproteases, como mostrado por Clissa e cols. (2001).²⁶⁵ Este trabalho demonstrou que os transcritos correspondentes a IL-6, TNF- α e IL-1 β estavam aumentados após o tratamento com a jararhagina, uma SVMP P-III isolada do veneno de *Bothrops jararaca*. No entanto, o aumento no nível de proteínas só pôde ser detectado quando a jararhagina foi pré-incubada com o quelante EDTA. Este resultado

indicou que, de fato, as citocinas estavam sendo produzidas em resposta à SVMP, porém eram clivadas antes que pudessem ser dosadas. Ainda, indicou que o estímulo para a produção destes mediadores, pelo menos nesta condição experimental, é independente da atividade catalítica. Corroborando estes resultados, outro trabalho demonstrou que a jararhagina é capaz de clivar o precursor do TNF, promovendo sua ativação, o que colabora para o quadro inflamatório.²⁹² Contudo, sabendo que a jararhagina é uma metaloprotease da classe P-III, portanto, mais complexa que a SMVP de 23,5 kDa isolada neste trabalho, a capacidade desta em clivar e promover a degradação das citocinas deve ser investigada. Em adição, estudos prévios também encontraram IL-10 após a administração de SVMPs isoladas de venenos botrópicos.^{355, 356}

Menaldo e cols. (2013)³⁵⁷ avaliaram o potencial pró-inflamatório de duas serino proteases isoladas do veneno de *Bothrops pirajai*: a BpirSP27 e a BpirSP41. Utilizando ratos Wistar e camundongos BALB/c inoculados com 10-50 µg das toxinas purificadas, parâmetros como edema, dor e recrutamento de leucócitos foram avaliados. Neste modelo, os autores concluíram que as serino proteases isoladas do veneno de *B. pirajai* não exerciam um papel importante no processo inflamatório. Em contrapartida, a participação de SVSPs presentes nos venenos de *Bothrops alternatus* e *B. moojeni* em processos inflamatórios, mais especificamente na indução de edema e dor, já foi comprovada.³¹³ Outras SVSPs presentes no veneno de *Bothrops asper* contribuem para o processo inflamatório por ativarem MMPs endógenas.²⁶⁶ Em adição, uma SVSP isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é capaz de induzir edema na pata de animais experimentais, acompanhado pelo aumento da expressão de COX-2 e da produção de PGE₂.¹⁹⁸ Corroborando estes trabalhos, no presente estudo, a SVSP isolada do veneno de *B. arietans* foi capaz de ativar os macrófagos humanos, induzindo a produção de potentes mediadores inflamatórios, como: TNF, IL-6, IL-1β e IL-8, bem como das quimiocinas IP-10, MCP-1 e RANTES, indicando sua importante participação no processo inflamatório induzido pelo veneno de *B. arietans*.

2.6 CONCLUSÃO

Foram purificadas e parcialmente caracterizadas duas representantes das principais classes de proteínas que constituem o veneno de *B. arietans*: uma SVSP de 33 kDa, fibrinogenolítica e capaz de promover a liberação de cininas vasoativas, e uma SVMP de 23,5 kDa, capaz de hidrolisar o fibrinogênio e fibronectina humanos, as quais podem estar relacionadas com os distúrbios hemostáticos, cardiovasculares e com danos teciduais apresentados no envenenamento. Sobre a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, a SVSP exerceu papel principal, visto que foi capaz de induzir níveis elevados de TNF, IL-6 e IL-1 β , bem como das quimiocinas IP-10, MCP-1, RANTES e IL-8. Por outro lado, a SVMP foi a única capaz de induzir a produção de IL-10, uma importante citocina anti-inflamatória. Houve produção de PGE₂ apenas após o estímulo com o veneno, indicando que a SVSP e a SVMP não estão envolvidas com a produção deste prostanoide neste período. Além disso, a elevada produção de IL-1 β após o estímulo com veneno indica que existem outros componentes do veneno envolvidos com a produção desta importante citocina. Em suma, conclui-se que a SVSP, e, em menor intensidade a SVMP, são importantes componentes do veneno responsáveis pela indução de diversos mediadores inflamatórios. Por sua vez, os macrófagos estão envolvidos com a produção destes mediadores e, em conjunto com as ações diretas das toxinas do veneno, podem contribuir para a amplificação do processo inflamatório envolvido no envenenamento.

CONCLUSÃO GERAL

A) O veneno de *B. arietans* induz inflamação *in vivo*, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e do número de leucócitos PMNs na cavidade peritoneal, acompanhados pela produção dos eicosanoides LTB₄, LTC₄, TXB₂ e PGE₂, bem como pela produção local e sistêmica de IL-6 e MCP-1. Devido à hemorragia, é possível que componentes plasmáticos, como as PLTs, tenham extravasado para a cavidade. Paralelamente, foram purificadas e caracterizadas uma SVSP, fibrinogenolítica e cininogenolítica, bem como a SVMP, fibrinogenolítica e capaz de hidrolisar a fibronectina, as quais podem estar envolvidas com a hemorragia e distúrbios cardiovasculares e com o dano tecidual provocado pelo veneno. Ambas foram capazes de induzir a ativação de macrófagos humanos em cultura e promover a produção de diversos mediadores inflamatórios. **B)** Após intervenções farmacológicas e uso de camundongos geneticamente deficientes, foi possível concluir que os eventos inflamatórios induzidos pelo veneno são parcialmente dependentes de mediadores lipídicos. Fb: fibrinogênio; Fn: fibronectina; Cn: cininogênio; PLT: plaquetas; PMNs: polimorfonucleares; MNs: mononucleares; SVSP: serino protease; SVMP: metaloprotease. Imagens: *Servier Medical Art*.

REFERÊNCIAS[‡]

- 1 BRAZIL, I. V. **Memória Histórica do Instituto de Butantan**. São Paulo: Elvino Pocai, 1941. p. 1-169.
- 2 MOTT, M. L. et al. A defesa contra o ofidismo de Vital Brazil e a sua contribuição à Saúde Pública brasileira. **Cadernos de História da Ciência**, v. 7, n. 1, p. 89-110, 2011.
- 3 DE FRANCO, M.; KALIL, J. The Butantan Institute: history and future perspectives. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 7, p. 1-6, 2014.
- 4 História do Cientista Vital Brazil. Disponível em: <http://www.vitalbrazil.rj.gov.br/cientista.html>. Acesso em: 03 mar. 2016.
- 5 STOCK, R. P. et al. Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 2, p. 173-177, 2007.
- 6 SWAROOP, S.; GRAB, B. Snakebite mortality in the world. **Bull. World Health Organ.**, v. 10, n. 1, p. 35-76, 1954.
- 7 KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.**, v. 5, n. 11, p. 1591-1604, 2008.
- 8 TAMBOURGI, D. V. Envenenamentos por serpentes: Doença Negligenciada Afetando Países em Desenvolvimento. In: 62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2010. Natal.
- 9 WARRELL, D. A. Snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.
- 10 CHIPPAUX, J. P. Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 586-599, 2011.
- 11 HABIB, A. G. et al. Snakebite is under appreciated: Appraisal of burden from West Africa. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 9, p. 1-8, 2015.
- 12 BLAYLOCK, R. Epidemiology of snakebite in Eshowe, KwaZulu-Natal, South Africa. **Toxicon**, v. 43, n. 2, p. 159-166, 2004.
- 13 GUTIERREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med.**, v. 3, n. 6, p. 727-731, 2006.
- 14 MORAN, N. F. et al. High incidence of early anaphylactoid reaction to SAIMR polyvalent snake antivenom. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 1, p. 69-70, 1998.
- 15 DE SILVA, H. A.; RYAN, N. M.; DE SILVA, H. J. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 81, n. 3, p. 446-452, 2016.
- 16 WILKINSON, D. Retrospective analysis of snakebite at a rural hospital in Zululand. **S. Afr. Med. J.**, v. 84, n. 12, p. 844-847, 1994.
- 17 WARRELL, D. A. Unscrupulous marketing of snake bite antivenoms in Africa and Papua New Guinea: choosing the right product 'what's in a name?'. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 5, p. 397-399, 2008.

[‡] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- 18 CHIPPAUX, J.-P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 23, n. 1, p. 1-2, 2017.
- 19 BROECKHOVEN, C.; DU PLESSIS, A. Has snake fang evolution lost its bite? New insights from a structural mechanics viewpoint. **Biol. Lett.**, v. 13, n. 8, p. 1-5, 2017.
- 20 BERLING, I.; ISBISTER, G. K. Hematologic effects and complications of snake envenoming. **Transfus. Med. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 82-89, 2015.
- 21 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Prevention and Clinical Management of Snakebite in Africa**. Brazzaville, 2010. p. 1-145.
- 22 FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J. Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200-209, 2009.
- 23 YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATO, T.; MEBS, D. Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. II. Enzymatic properties with special reference to substrate specificity. **Biochim. Biophys. Acta. Protein Struct. Mol. Enzymol.**, v. 1247, n. 1, p. 17-23, 1995.
- 24 DE OLIVEIRA PARDAL, P. P. et al. Hemorrhagic stroke in children caused by *Bothrops marajoensis* envenoming: a case report. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 2015.
- 25 BELLASRI, S.; JANA, H. Lung hemorrhage and brain stroke following fatal viper (*Cerastes cerastes*) bite. **Pan. Afr. Med. J.**, v. 26, n. 1, p. 1-2, 2017.
- 26 RANAWAKA, U. K.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. Neurotoxicity in snakebite--the limits of our knowledge. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 10, p. 1-18, 2013.
- 27 BERNHEIM, A. et al. Three cases of severe neurotoxicity after cobra bite (*Naja kaouthia*). **Swiss Med. Wkly.**, v. 131, n. 1, p. 227-228, 2001.
- 28 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins**. Geneva, 2016. p. 1-146.
- 29 SHUPE, S. **Generic and Species Descriptions**. New York: Skyhorse Publishing, 2013. p. 1-165.
- 30 SERRANO, S. M. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501-510, 2005.
- 31 LENK, P. et al. Phylogeny and taxonomic subdivision of *Bitis* (Reptilia: Viperidae) based on molecular evidence. **Kaupia**, v. 8, n. 1, p. 31-38, 1999.
- 32 LENK, P. et al. Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia: Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 19, n. 1, p. 94-104, 2001.
- 33 CURRIER, R. B. et al. Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (*Bitis arietans*): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMs). **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 864-873, 2010.
- 34 WARRELL, D. A.; ORMEROD, L. D.; DAVIDSON, N. M. Bites by puff-adder (*Bitis arietans*) in Nigeria, and value of antivenom. **Br. Med. J.**, v. 4, n. 5998, p. 697-700, 1975.
- 35 BEY, T. A. et al. Exotic snakebite: envenomation by an African puff adder (*Bitis arietans*). **The J. Emerg. Med.**, v. 15, n. 6, p. 827-831, 1997.

- 36 Puff adder - *Bitis arietans*. Disponível em: <https://www.itsnature.org/ground/reptiles-land/puff-adder/>. Acesso em: 17 abr. 2016.
- 37 LANGHORN, R. et al. Myocardial injury in dogs with snake envenomation and its relation to systemic inflammation. **J. Vet. Emerg. Crit. Care**, v. 24, n. 2, p. 174-181, 2014.
- 38 LAVONAS, E. J. et al. Severe puff adder (*Bitis arietans*) envenomation with coagulopathy. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 40, n. 7, p. 911-918, 2002.
- 39 THEAKSTON, R.; WYATT, G. Venom antibody levels in a patient bitten by a young puff adder (*Bitis arietans*) during a world record attempt. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 79, n. 3, p. 305-307, 1985.
- 40 STRYDOM, M. A. et al. The effect of physiological levels of South African puff adder (*Bitis arietans*) snake venom on blood cells: an in vitro model. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2016.
- 41 BALDO, C. et al. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 6, p. 1-10, 2010.
- 42 BALDO, C. et al. Jararhagin disruption of endothelial cell anchorage is enhanced in collagen enriched matrices. **Toxicon**, v. 108, n. 1, p. 240-248, 2015.
- 43 BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9, p. 851-859, 2000.
- 44 KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 34, n. 4-5, p. 200-204, 2005.
- 45 KODAMA, R. T. et al. New proline-rich oligopeptides from the venom of African adders: Insights into the hypotensive effect of the venoms. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1850, n. 6, p. 1180-1187, 2015.
- 46 PAIXÃO-CAVALCANTE, D. et al. African adders: partial characterization of snake venoms from three *Bitis* species of medical importance and their neutralization by experimental equine antivenoms. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 1-18, 2015.
- 47 SCHAEFFER, R.; CHILTON, S.; CARLSON, R. Puff adder venom shock: a model of increased vascular permeability. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 233, n. 2, p. 312-317, 1985.
- 48 AL-ASMARI, A. K. et al. The effect of ascorbic acid on *Bitis arietans* venom induced toxicity in rats. **J. A. Arab. Univ. Basic Appl. Sci.**, v. 24, n. 1, p. 89-94, 2016.
- 49 AUNG, H. T. et al. Rosmarinic acid in *Argusia argentea* inhibits snake venom-induced hemorrhage. **J. Nat. Med.**, v. 64, n. 4, p. 482-486, 2010.
- 50 DE SOUZA, T. L.; MAGNOLI, F. C.; DA SILVA, W. D. Characterization of a hemorrhage-inducing component present in *Bitis arietans* venom. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 14, n. 12, p. 999-1008, 2015.
- 51 BLAYLOCK, R. S. Immediate active movement following *Bitis arietans* or *Naja mossambica* venom injection diminishes or prevents necrosis in mice. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1675-1677, 2002.
- 52 PONTE, C. G. et al. Inhibition of the myotoxic activities of three African *Bitis* venoms (*B. rhinoceros*, *B. arietans* and *B. nasicornis*) by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 536-540, 2010.

- 53 FERNANDEZ, S. et al. In vitro toxic effects of puff adder (*Bitis arietans*) venom, and their neutralization by antivenom. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1586-1597, 2014.
- 54 BRINK, S.; STEYTLER, J. G. Effects of puff-adder venom on coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation in the baboon. **S. Afr. Med. J.**, v. 48, n. 28, p. 1205-1213, 1974.
- 55 CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- 56 WEST, C. T.; WEST, S. C.; DEMETRIADES, A. K. Amputation for a puff adder (*Bitis arietans*) envenomation in a child-1954. **South Sudan Med. J.**, v. 40, n. 7, p. 911-918, 2014.
- 57 RAINER, P. P. et al. Case report: Hyperbaric oxygen in the treatment of puff adder (*Bitis arietans*) bite. **Undersea and Hyperbaric Med. Soc.**, v. 37, n. 6, p. 395-398, 2010.
- 58 PICOLO, G. et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 10, p. 1221-1228, 2002.
- 59 TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 67-76, 2009.
- 60 TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100 n. 1, p. 181-184, 2005.
- 61 VORONOV, E.; APTE, R.; SOFER, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 5, n. 1, p. 5-33, 1999.
- 62 COSTA, E. et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, n. 1, p. 13-17, 2002.
- 63 SZOLD, O. et al. Tumor necrosis factor as a mediator of cardiac toxicity following snake envenomation. **Crit. Care Med.**, v. 31, n. 5, p. 1449-1453, 2003.
- 64 MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.
- 65 GARCIA LEME, J. et al. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. **Br. J. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 88-96, 1973.
- 66 GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, n. 5, p. 662-675, 1994.
- 67 JANCAR, S., Imunidade inata e inflamação. In: **Imunologia** Rio Janeiro: Thieme Revinter, 2008, p. 17-39.
- 68 DAHLEN, S. E. et al. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, n. 6, p. 3887-3891, 1981.
- 69 DILLON, P. K. et al. Effect of platelet-activating factor on leukocyte adhesion to microvascular endothelium. Time course and dose-response relationships. **Inflammation**, v. 12, n. 6, p. 563-573, 1988.
- 70 HENKELS, K. M. et al. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). **FEBS Lett.**, v. 585, n. 1, p. 159-166, 2011.

- 71 NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 173-182, 2006.
- 72 AREFIEVA, T. I. et al. MCP-1-stimulated chemotaxis of monocytic and endothelial cells is dependent on activation of different signaling cascades. **Cytokine**, v. 31, n. 6, p. 439-446, 2005.
- 73 DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.
- 74 CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v. 84, n. 7, p. 2068-2101, 1994.
- 75 HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 9, p. 1379-1386, 2000.
- 76 KAPLANSKI, G. et al. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.**, v. 24, n. 1, p. 25-29, 2003.
- 77 ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 593-623, 1999.
- 78 BROUCKAERT, G. et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. **Mol. Biol. Cell.**, v. 15, n. 3, p. 1089-1100, 2004.
- 79 LENTSCHAT, A. et al. Mastoparan, a G protein agonist peptide, differentially modulates TLR4- and TLR2-mediated signaling in human endothelial cells and murine macrophages. **J. Immunol.**, v. 174, n. 7, p. 4252-4261, 2005.
- 80 LIU, X. et al. Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. **Nat. Immunol.**, v. 12, n. 5, p. 416-424, 2011.
- 81 MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819-826, 2007.
- 82 ZOCCAL, K. F. 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. 1-12, 2014.
- 83 LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 1, n. 6, p. 1-10, 2009.
- 84 ARIAS-SALVATIERRA, D. et al. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF-κB pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by lipopolysaccharide. **Cell. Signal.**, v. 23, n. 2, p. 425-435, 2011.
- 85 MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 561-574, 2004.
- 86 MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v. 442, n. 7098, p. 39-44, 2006.
- 87 SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1191-1197, 2005.
- 88 PEARSON, J. D. **Vascular adhesion molecules and inflammation**. Suíça: Birkhäuser Verlag, 1999. p. 1-267.

- 89 MILLS, P. C. et al. Vascular leakage induced by histamine, bradykinin, serotonin and prostaglandin E₂ in greyhounds. **Aust. Vet. J.**, v. 70, n. 1, p. 21-24, 1993.
- 90 YOKOMIZO, T. et al. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 620-624, 1997.
- 91 KISHIKAWA, K. et al. ONO-4057, a novel, orally active leukotriene B₄ antagonist: effects on LTB₄-induced neutrophil functions. **Prostaglandins**, v. 44, n. 4, p. 261-275, 1992.
- 92 LEVY, B. D. et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 612-619, 2001.
- 93 TAKAHASHI, H. K. et al. Prostaglandin E₂ inhibits IL-18-induced ICAM-1 and B7. 2 expression through EP2/EP4 receptors in human peripheral blood mononuclear cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 9, p. 4446-4454, 2002.
- 94 SURAM, S. et al. Cytosolic phospholipase A₂α and eicosanoids regulate expression of genes in macrophages involved in host defense and inflammation. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-17, 2013.
- 95 DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 15, n. 8, p. 511-523, 2015.
- 96 PRESCOTT, S. M. et al. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, n. 1, p. 419-445, 2000.
- 97 FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.
- 98 EVANS, J. H. et al. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A₂ translocation to internal membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 32, p. 30150-30160, 2001.
- 99 SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, n. 1, p. 1-19, 2000.
- 100 UOZUMI, N.; SHIMIZU, T. Roles for cytosolic phospholipase A₂ alpha as revealed by gene-targeted mice. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 68-69, n. 1, p. 59-69, 2002.
- 101 LESLIE, C. C. Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. **J. Lipid. Res.**, v. 56, n. 8, p. 1386-1402, 2015.
- 102 SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, n. 1, p. 145-182, 2000.
- 103 ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **J. Lipid. Res.**, v. 50, n. 1, p. 29-34, 2009.
- 104 JAKOBSSON, P. J. et al. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 13, p. 7220-7225, 1999.
- 105 LIM, H. et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 197-208, 1997.
- 106 NARUMIYA, S. Physiology and pathophysiology of prostanoid receptors. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.**, v. 83, n. 1, p. 296-319, 2007.
- 107 KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1851, n. 4, p. 414-421, 2015.

- 108 PORTANOVA, J. P. et al. Selective neutralization of prostaglandin E₂ blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 3, p. 883-891, 1996.
- 109 IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A. A. Prostaglandin E₂ as a mediator of fever: synthesis and catabolism. **Front. Biosci.**, v. 9, n. 1-3, p. 1977-1983, 2004.
- 110 RENZ, H. et al. Release of tumor necrosis factor- α from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E₂ and cyclic nucleotides. **J. Immunol.**, v. 141, n. 7, p. 2388-2393, 1988.
- 111 KNUDSEN, P. J.; DINARELLO, C. A.; STROM, T. B. Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin 1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. **J. Immunol.**, v. 137, n. 10, p. 3189-3194, 1986.
- 112 TAKAYAMA, K. et al. Prostaglandin E₂ suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 46, p. 44147-44154, 2002.
- 113 NOGUCHI, K. et al. Prostaglandin E₂ (PGE₂) downregulates interleukin (IL)-1 α -induced IL-6 production via EP2/EP4 subtypes of PGE₂ receptors in human periodontal ligament cells. **Oral Dis.**, v. 11, n. 3, p. 157-162, 2005.
- 114 DAVIDSON, J. et al. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. **Immunology**, v. 94, n. 2, p. 228-234, 1998.
- 115 BREYER, M. D.; JACOBSON, H. R.; BREYER, R. M. Functional and molecular aspects of renal prostaglandin receptors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 7, n. 1, p. 8-17, 1996.
- 116 AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z. S.; VANHOUTTE, P. M. Thromboxane A₂ receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. **Hypertension**, v. 15, n. 6, p. 699-703, 1990.
- 117 PAUL, B. Z.; JIN, J.; KUNAPULI, S. P. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 41, p. 29108-29114, 1999.
- 118 KABASHIMA, K. et al. Thromboxane A₂ modulates interaction of dendritic cells and T cells and regulates acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 7, p. 694-701, 2003.
- 119 ISHIZUKA, T. et al. Thromboxane A₂ receptor blockade suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, n. 3, p. 367-377, 1996.
- 120 KIM, S.-R. et al. Thromboxane A₂ increases endothelial permeability through upregulation of interleukin-8. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 397, n. 3, p. 413-419, 2010.
- 121 MIZOGUCHI, A. et al. Dominant localization of prostaglandin D receptors on arachnoid trabecular cells in mouse basal forebrain and their involvement in the regulation of non-rapid eye movement sleep. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 98, n. 20, p. 11674-11679, 2001.
- 122 FÖRSTERMANN, U.; HELDT, R.; HERTTING, G. Studies on the mechanism of central cardiovascular and temperature responses to prostaglandin D₂. **Prostaglandins Leukot. Med.**, v. 18, n. 3, p. 301-308, 1985.
- 123 TAKETOMI, Y. et al. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A₂-prostaglandin D₂-DP1 receptor paracrine axis. **Nat. Immunol.**, v. 14, n. 6, p. 554-566, 2013.

- 124 CHENG, K. et al. Antagonism of the prostaglandin D₂ receptor 1 suppresses nicotinic acid-induced vasodilation in mice and humans. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, n. 17, p. 6682-6687, 2006.
- 125 SCHRATL, P. et al. The role of the prostaglandin D₂ receptor, DP, in eosinophil trafficking. **J. Immunol.**, v. 179, n. 7, p. 4792-4799, 2007.
- 126 SPIK, I. et al. Activation of the prostaglandin D₂ receptor DP2/CRTH2 increases allergic inflammation in mouse. **J. Immunol.**, v. 174, n. 6, p. 3703-3708, 2005.
- 127 BASU, S. Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F₂ α from physiology to new principles in inflammation. **Med. Res. Rev.**, v. 27, n. 4, p. 435-468, 2007.
- 128 WOODWARD, D. et al. Prostaglandin F₂ α effects on intraocular pressure negatively correlate with FP-receptor stimulation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 30, n. 1, p. 1838-1842, 1989.
- 129 SCHUSTER, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, n. 1, p. 221-242, 1998.
- 130 BHATTACHARYA, M. et al. Nuclear localization of prostaglandin E₂ receptors. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 95, n. 26, p. 15792-15797, 1998.
- 131 JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82-86, 1998.
- 132 RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79-82, 1998.
- 133 VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biol.**, v. 231, n. 25, p. 232-235, 1971.
- 134 MARNETT, L. J. et al. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 22903-22906, 1999.
- 135 FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 6, p. 433-442, 2001.
- 136 ZIDAR, N. et al. Cyclooxygenase in normal human tissues—is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? **J. Cell. Mol. Med.**, v. 13, n. 9, p. 3753-3763, 2009.
- 137 CHOI, S.-H.; LANGENBACH, R.; BOSETTI, F. Genetic deletion or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-1 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response and brain injury. **FASEB J.**, v. 22, n. 5, p. 1491-1501, 2008.
- 138 AID, S.; LANGENBACH, R.; BOSETTI, F. Neuroinflammatory response to lipopolysaccharide is exacerbated in mice genetically deficient in cyclooxygenase-2. **J. Neuroinflammation**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2008.
- 139 GILROY, D. W. et al. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nat. Med.**, v. 5, n. 6, p. 698-701, 1999.
- 140 MIZUNO, H. et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. **Gastroenterology**, v. 112, n. 2, p. 387-397, 1997.
- 141 SMITH, C. J. et al. Differentiation of monocytoid THP-1 cells with phorbol ester induces expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (COX-1). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 192, n. 2, p. 787-793, 1993.

- 142 JACKSON, B. A. et al. Effects of transforming growth factor β and interleukin-1 β on expression of cyclooxygenase 1 and 2 and phospholipase A₂ mRNA in lung fibroblasts and endothelial cells in culture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 197, n. 3, p. 1465-1474, 1993.
- 143 WALLACE, J. L. et al. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. **Gastroenterology**, v. 115, n. 1, p. 101-109, 1998.
- 144 MORHAM, S. G. et al. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**, v. 83, n. 3, p. 473-482, 1995.
- 145 LIM, H. et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 197-208, 1997.
- 146 GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 1, p. 4-15, 2006.
- 147 LANGENBACH, R. et al. Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, n. 8, p. 1237-1246, 1999.
- 148 WALLACE, J. L. et al. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. **Gastroenterology**, v. 119, n. 3, p. 706-714, 2000.
- 149 CHANDRASEKHARAN, N. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.
- 150 PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. **FEBS Lett.**, v. 487, n. 3, p. 323-326, 2001.
- 151 DRAZEN, J. M.; ISRAEL, E.; O'BYRNE, P. M. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, n. 3, p. 197-206, 1999.
- 152 PETERS-GOLDEN, M.; COFFEY, M. Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 132, n. 4, p. 251-257, 1998.
- 153 CHEN, X.-S.; FUNK, C. D. The N-terminal "β-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 1, p. 811-818, 2001.
- 154 GRONERT, K. et al., Transcellular regulation of eicosanoid biosynthesis. In: **Eicosanoid Protocols**: Springer, 1999, p. 119-144.
- 155 SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, n. 4597, p. 568-575, 1983.
- 156 SPADA, C. et al. Synergistic effects of LTB₄ and LTD₄ on leukocyte emigration into the guinea pig conjunctiva. **Am. J. Pathol.**, v. 130, n. 2, p. 354-368, 1988.
- 157 BJÖRK, J.; HEDQVIST, P.; ARFORS, K.-E. Increase in vascular permeability induced by leukotriene B₄ and the role of polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation**, v. 6, n. 2, p. 189-200, 1982.
- 158 PENROSE, J. F.; AUSTEN, K. F. The biochemical, molecular, and genomic aspects of leukotriene C₄ synthase. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v. 111, n. 6, p. 537-546, 1999.
- 159 YONG, T.; MAYHAN, W. G. Effect of prostaglandin E₁ on leukotriene C₄-induced increases in vascular permeability of hamster cheek pouch. **Inflammation**, v. 16, n. 2, p. 159-167, 1992.

- 160 MACFARLANE, A. J. et al. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 161, n. 5, p. 1553-1558, 2000.
- 161 SPADA, C. et al. Comparison of leukotriene B₄ and D₄ effects on human eosinophil and neutrophil motility in vitro. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, n. 2, p. 183-191, 1994.
- 162 MULDER, A. et al. Effect of inhaled leukotriene D₄ on airway eosinophilia and airway hyperresponsiveness in asthmatic subjects. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 159, n. 5, p. 1562-1567, 1999.
- 163 YOKOMIZO, T. et al. A second leukotriene B₄ receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 3, p. 421-432, 2000.
- 164 LYNCH, K. R. et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT 1 receptor. **Nature**, v. 399, n. 6738, p. 789-793, 1999.
- 165 GRONERT, K. et al. Selectivity of recombinant human leukotriene D₄, leukotriene B₄, and lipoxin A₄ receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA₄ and regulation of vascular and inflammatory responses. **Am. J. Pathol.**, v. 158, n. 1, p. 3-9, 2001.
- 166 HEISE, C. E. et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 39, p. 30531-30536, 2000.
- 167 LORANT, D. E. et al., Platelet-activating factor: a signaling molecule for leukocyte adhesion. In: **Vascular Adhesion Molecules and Inflammation**. J.D. Pearson, Editor Suíça: Birkhäuser Verlag, 1999, p. 81-107.
- 168 PRESCOTT, S. M. A thematic series on phospholipases. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 24, p. 15043-15043, 1997.
- 169 SNYDER, F. Metabolic processing of PAF. **Clin. Rev. Allergy**, v. 12, n. 4, p. 309-327, 1995.
- 170 STOLL, L. L. et al. 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol: a platelet-activating factor metabolite with biological activity in vascular smooth muscle cells. **Cell Regul.**, v. 1, n. 1, p. 13-25, 1989.
- 171 MCNAMARA, M. J. C. et al. 1-O-Hexadecyl-2-acetyl-sn-glycerol stimulates differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells to macrophage-like cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 122, n. 1, p. 824-830, 1984.
- 172 SATOUCHI, K. et al. Metabolism of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol by washed rabbit platelets: formation of platelet activating factor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 234, n. 1, p. 318-321, 1984.
- 173 BLANK, M. L.; CRESS, E. A.; SNYDER, F. A new class of antihypertensive neutral lipid: 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycerols, a precursor of platelet activating factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 118, n. 1, p. 344-350, 1984.
- 174 HOFFMAN, D. R.; TRUONG, C. T.; JOHNSTON, J. M. Metabolism and function of platelet-activating factor in fetal rabbit lung development. **Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.**, v. 879, n. 1, p. 88-96, 1986.
- 175 BLANK, M. L. et al. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 90, n. 4, p. 1194-1200, 1979.
- 176 KUNIEVSKY, B.; YAVIN, E. Production and metabolism of platelet-activating factor in the normal and ischemic fetal rat brain. **J. Neurochem.**, v. 63, n. 6, p. 2144-2151, 1994.

- 177 MONTRUCCHIO, G. et al. Role of platelet-activating factor in hypotension and platelet activation induced by infusion of thrombolytic agents in rabbits. **Circ. Res.**, v. 72, n. 3, p. 658-670, 1993.
- 178 CHUNG, K.; BARNES, P. Role for platelet-activating factor in asthma. **Lipids**, v. 26, n. 12, p. 1277-1279, 1991.
- 179 SIROIS, M. et al. PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L-655,240. **Prostaglandins**, v. 36, n. 5, p. 631-644, 1988.
- 180 ISHII, S. et al. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. **J. Exp. Med.**, v. 187, n. 11, p. 1779-1788, 1998.
- 181 CAMUSSI, G. et al. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. **J. Immunol.**, v. 131, n. 5, p. 2397-2403, 1983.
- 182 ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M. Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 76, n. 6, p. 2235-2246, 1985.
- 183 PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; MCINTYRE, T. M. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 81, n. 11, p. 3534-3538, 1984.
- 184 LORANT, D. E. et al. Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils. **J. Cell Biol.**, v. 115, n. 1, p. 223-234, 1991.
- 185 WEYRICH, A. S. et al. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- α secretion. Signal integration and NF- κ B translocation. **J. Clin. Invest.**, v. 95, n. 5, p. 2297-2303, 1995.
- 186 OSTROVSKY, L. et al. A juxtacrine mechanism for neutrophil adhesion on platelets involves platelet-activating factor and a selectin-dependent activation process. **Blood**, v. 91, n. 8, p. 3028-3036, 1998.
- 187 KUIJPERS, T. et al. The impact of platelet-activating factor (PAF)-like mediators on the functional activity of neutrophils: anti-inflammatory effects of human PAF-acetylhydrolase. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 123, n. 3, p. 412-420, 2001.
- 188 GUIDOLIN, F. et al. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**, v. 66, n. 1, p. 7-17, 2013.
- 189 GUIDOLIN, F. R. et al. Development of Equine IgG Antivenoms against Major Snake Groups in Mozambique. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 1, p. 1-17, 2016.
- 190 DA ROCHA, D. G. et al. Development of IgY antibodies against anti-snake toxins endowed with highly lethal neutralizing activity. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 106, n. 1, p. 404-412, 2017.
- 191 DIAS DA SILVA, W.; V TAMBOURGI, D. The humoral immune response induced by snake venom toxins. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 343-357, 2011.
- 192 GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev. Biol. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 209-214, 1986.

- 193 ZAMUNER, S. R. 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.
- 194 BARROS, S. et al. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators Inflamm.**, v. 7, n. 5, p. 339-346, 1998.
- 195 MOREIRA, V. et al. 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, 2012.
- 196 FARSKY, S. H. 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.
- 197 ZAMUNER, S. R. et al. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1505-1513, 2001.
- 198 COSTA, C. et al. Edema induced by a *Crotalus durissus terrificus* venom serine protease (Cdtsp 2) involves the PAR pathway and PKC and PLC activation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, n. 8, p. 1-17, 2018.
- 199 DHAR, D. Compartment syndrome following snake bite. **Oman Med. J.**, v. 100, n. 1, p. 1-6, 2015.
- 200 LOMONTE, B. et al. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. **Toxicon**, v. 32, n. 1, p. 41-55, 1994.
- 201 GUTIÉRREZ, J.; ARROYO, O.; BOLAÑOS, R. Myonecrosis, hemorrhage and edema induced by *Bothrops asper* venom in white mice. **Toxicon**, v. 18, n. 1, p. 603-610, 1980.
- 202 MORA, J. et al. Effects of *Bothrops asper* snake venom on lymphatic vessels: insights into a hidden aspect of envenomation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 10, p. 1-10, 2008.
- 203 LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. Å. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, n. 2, p. 93-105, 1993.
- 204 MOREIRA, V. et al. The crucial role of the MyD88 adaptor protein in the inflammatory response induced by *Bothrops atrox* venom. **Toxicon**, v. 67, n. 1, p. 37-46, 2013.
- 205 MOREIRA, V. et al. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by *Bothrops atrox* snake venom. **Toxicon**, v. 118, n. 1, p. 121-128, 2016.
- 206 LEIGUEZ, E. et al. Critical role of TLR2 and MyD88 for functional response of macrophages to a group IIA-secreted phospholipase A₂ from snake venom. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 1-11, 2014.
- 207 DE SOUZA ALMEIDA, C. et al. Crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* is able to down-modulate the acute intestinal inflammation in mice. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. 1-19, 2015.
- 208 SAMPAIO, S. et al. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 313-321, 2006.

- 209 YACOUB, T. et al. *Montivipera bornmuelleri* venom has immunomodulatory effects mainly up-regulating pro-inflammatory cytokines in the spleens of mice. **Toxicol. Rep.**, v. 5, n. 1, p. 318-323, 2018.
- 210 BODA, F. et al. Effect of *Vipera ammodytes ammodytes* snake venom on the human cytokine network. **Toxins**, v. 10, n. 7, p. 1-10, 2018.
- 211 CALDERÓN, L. et al. Biological and biochemical activities of *Vipera berus* (European viper) venom. **Toxicon**, v. 31, n. 6, p. 743-753, 1993.
- 212 WANDERLEY, C. et al. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoïd-and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, n. 1, p. 134-147, 2014.
- 213 DE TONI, L. G. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Int. Immunopharmacol.**, v. 28, n. 1, p. 199-207, 2015.
- 214 DELAFONTAINE, M. et al. Enzymatic and pro-inflammatory activities of *Bothrops lanceolatus* venom: Relevance for envenomation. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 1-19, 2017.
- 215 CALVETE, J. J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. **J. Proteome Res.**, v. 6, n. 7, p. 2732-2745, 2007.
- 216 SOUSA, L. F. et al. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 1-16, 2013.
- 217 OLIVO, R. D. A. et al. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon**, v. 49, n. 5, p. 670-677, 2007.
- 218 PATRÃO-NETO, F. C. et al. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, v. 69, n. 1, p. 55-64, 2013.
- 219 AL-ASMARI, A.; ABDO, N. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by *Cerastes gasperettii* (*cerastes*) venom. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 12, n. 3, p. 400-417, 2006.
- 220 SUN, D.-S.; HO, P.-H.; CHANG, H.-H. Soluble P-selectin rescues viper venom-induced mortality through anti-inflammatory properties and PSGL-1 pathway-mediated correction of hemostasis. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- 221 SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.
- 222 ZOCCAL, K. F. **A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* é reconhecida por receptores de reconhecimento padrão e induz ativação celular e inflamação.** 2014. 115 p. Doutorado - Departamento de Biociências Aplicadas à Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- 223 ESCOCARD, R. D. C. M. et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Immunobiology**, v. 211, n. 1, p. 37-46, 2006.
- 224 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

- 225 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- 226 HWANG, D. et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 6, p. 455-460, 1998.
- 227 GIANNOTTI, K. C. et al. A snake venom group IIA PLA₂ with immunomodulatory activity induces formation of lipid droplets containing 15-d-PGJ₂ in macrophages. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.
- 228 ZOCCAL, K. F. et al. Opposing roles of LTB₄ and PGE₂ in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nat. Commun.**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2016.
- 229 SILVA DE FRANÇA, F. et al. *Naja annulifera* Snake: New insights into the venom components and pathogenesis of envenomation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 1-27, 2019.
- 230 NARABA, H. et al. Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v. 160, n. 6, p. 2974-2982, 1998.
- 231 MEADE, E. A.; SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 9, p. 6610-6614, 1993.
- 232 TULL, S. P. et al. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. **PLoS Biol.**, v. 7, n. 8, p. 1-11, 2009.
- 233 MEDEIROS, A. I. et al. Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live *Histoplasma capsulatum* or by the β -glucan present in their cell wall. **Br. J. Pharmacol.**, v. 128, n. 7, p. 1529-1537, 1999.
- 234 ZOCCAL, K. F. et al. Ts6 and Ts2 from *Tityus serrulatus* venom induce inflammation by mechanisms dependent on lipid mediators and cytokine production. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2013.
- 235 CASTELL, J. V. et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. **FEBS Lett.**, v. 242, n. 2, p. 237-239, 1989.
- 236 ISHIBASHI, T. et al. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1241-1244, 1989.
- 237 HYDUK, S. J. et al. Phospholipase C, calcium, and calmodulin are critical for $\alpha 4\beta 1$ integrin affinity up-regulation and monocyte arrest triggered by chemoattractants. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 176-184, 2007.
- 238 DA SILVA SETUBAL, S. et al. Effect of *Bothrops bilineata* snake venom on neutrophil function. **Toxicon**, v. 76, n. 1, p. 143-149, 2013.
- 239 WANG, J. Neutrophils in tissue injury and repair. **Cell Tissue Res.**, v. 371, n. 3, p. 531-539, 2018.
- 240 WILLIAMS, T. Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular changes of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 65, n. 3, p. 517-524, 1979.
- 241 REITER, R.; RESCH, U.; SINZINGER, H. Do human platelets express COX-2? **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 64, n. 6, p. 299-305, 2001.

- 242 IKEI, K. N. et al. Investigations of human platelet-type 12-lipoxygenase: role of lipoxygenase products in platelet activation. **J. Lipid. Res.**, v. 53, n. 12, p. 2546-2559, 2012.
- 243 KOEBERLE, A. et al. MK-886, an inhibitor of the 5-lipoxygenase-activating protein, inhibits cyclooxygenase-1 activity and suppresses platelet aggregation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 608, n. 1, p. 84-90, 2009.
- 244 ROSSAINT, J. et al. Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response. **Nat. Commun.**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016.
- 245 KEHRER, J. P. et al. Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) α by MK886. **Biochem. J.**, v. 356, n. 3, p. 899-906, 2001.
- 246 DA SILVA, W. D.; LEPOW, I. H. Complement as a mediator of inflammation: II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. **J. Exp. Med.**, v. 125, n. 5, p. 921-946, 1967.
- 247 MOGILENKO, D. A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α positively regulates complement C3 expression but inhibits tumor necrosis factor α -mediated activation of C3 gene in mammalian hepatic-derived cells. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 3, p. 1726-1738, 2013.
- 248 TAKABAYASHI, T. et al. Both C3a and C3adesArg regulate interleukin-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 6, p. 1622-1628, 1998.
- 249 FARSKY, S. H. et al. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 9, n. 5, p. 213-221, 2000.
- 250 TANAKA, G. D. et al. *Micrurus* snake venoms activate human complement system and generate anaphylatoxins. **BMC Immunol.**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2012.
- 251 PIDDE-QUEIROZ, G. et al. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Mol. Immunol.**, v. 47, n. 16, p. 2537-2544, 2010.
- 252 MOREIRA, V. et al. The role of TLR2 in the acute inflammatory response induced by *Bothrops atrox* snake venom. **Toxicon**, v. 118, n., p. 121-128, 2016.
- 253 SHAH, B. H. et al. Molecular mechanisms involved in human platelet aggregation by synergistic interaction of platelet-activating factor and 5-hydroxytryptamine. **Exp. Mol. Med.**, v. 33, n. 4, p. 226-233, 2001.
- 254 RASHEED, H.; SAEED, S. A. Involvement of thromboxane A₂ and tyrosine kinase in the synergistic interaction of platelet activating factor and calcium ionophore A23187 in human platelet aggregation. **Exp. Mol. Med.**, v. 36, n. 3, p. 220-225, 2004.
- 255 BROCK, T. G.; MCNISH, R. W.; PETERS-GOLDEN, M. Arachidonic acid is preferentially metabolized by cyclooxygenase-2 to prostacyclin and prostaglandin E₂. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 17, p. 11660-11666, 1999.
- 256 BARNETT, J. et al. Purification, characterization and selective inhibition of human prostaglandin G/H synthase 1 and 2 expressed in the baculovirus system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1209, n. 1, p. 130-139, 1994.
- 257 HE, L.-K. et al. The expression of cyclooxygenase and the production of prostaglandin E₂ in neutrophils after burn injury and infection. **J. Burn Care Rehabil.**, v. 22, n. 1, p. 58-64, 2001.

- 258 KIM, J. S. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins: possible involvement of NF- κ B and MAP kinase signaling pathway. **Dig. Dis. Sci.**, v. 46, n. 10, p. 2277-2284, 2001.
- 259 MOREIRA, V. **Efeitos de toxinas com estrutura de fosfolipase A₂, isoladas do veneno de *Bothrops asper* e *Crotalus durissus terrificus*, e dos respectivos venenos, sobre a expressão de ciclooxygenases e produção de prostaglandinas**. 2007. 132 p. Doutorado - Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- 260 CLARIA, J.; SERHAN, C. N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 92, n. 21, p. 9475-9479, 1995.
- 261 ALEDORT, L. M. et al. Prospective screening of 205 patients with ITP, including diagnosis, serological markers, and the relationship between platelet counts, endogenous thrombopoietin, and circulating antithrombopoietin antibodies. **Am. J. Hematol.**, v. 76, n. 3, p. 205-213, 2004.
- 262 GOERGE, T. et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4958-4964, 2008.
- 263 BARRETO, G. N. L. S. et al. Experimental *Bothrops atrox* envenomation: Efficacy of antivenom therapy and the combination of *Bothrops* antivenom with dexamethasone. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 3, p. 1-18, 2017.
- 264 GONÇALVES, L. R. C.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. **Mediat. Inflamm.**, v. 9, n. 2, p. 101-107, 2000.
- 265 CLISSA, P. B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567-1573, 2001.
- 266 SARAVIA-OTTEN, P. et al. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. **Toxicon**, v. 44, n. 7, p. 749-764, 2004.
- 267 MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.
- 268 JUAREZ, P. et al. Molecular cloning of disintegrin-like transcript BA-5A from a *Bitis arietans* venom gland cDNA library: a putative intermediate in the evolution of the long-chain disintegrin bitistatin. **J. Mol. Evol.**, v. 63, n. 1, p. 142-152, 2006.
- 269 FASOLI, E. et al. Exploring the venom proteome of the African puff adder, *Bitis arietans*, using a combinatorial peptide ligand library approach at different pHs. **J. Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 932-942, 2010.
- 270 ARCHER, J. et al. VTBuilder: a tool for the assembly of multi isoform transcriptomes. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2014.
- 271 DALTRY, J. C. et al. Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 67-79, 1996.
- 272 BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. & Therapeut.**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.
- 273 GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 51-62, 2016.

- 274 RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, n. D1, p. D343-350, 2016.
- 275 STÖCKER, W. et al. The metzincins-Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. **Prot. Sci.**, v. 4, n. 5, p. 823-840, 1995.
- 276 TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1824, n. 1, p. 164-176, 2012.
- 277 MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, n. 1, p. 146-156, 2000.
- 278 FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.
- 279 LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **J. Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1791-1799, 2005.
- 280 TU, A. T. et al. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. **Toxicon**, v. 34, n. 11-12, p. 1295-1300, 1996.
- 281 SIIGUR, E.; SIIGUR, J. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1074, n. 2, p. 223-229, 1991.
- 282 NIKAI, T. et al. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 231, n. 2, p. 309-319, 1984.
- 283 GUTIÉRREZ, J. et al. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, n. 1, p. 19-29, 1995.
- 284 MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 379-385, 1988.
- 285 PAINE, M. et al. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 32, p. 22869-22876, 1992.
- 286 GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.
- 287 DA SILVA, I. R. F. et al. BJ-PI2, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1820, n. 11, p. 1809-1821, 2012.
- 288 RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediat. Inflamm.**, v. 11, n. 2, p. 121-128, 2002.
- 289 GUTIÉRREZ, J. M. A. et al. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.**, v. 62, n. 1, p. 28-41, 1995.

- 290 RUCAVADO, A. et al. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, n. 9, p. 1297-1312, 1999.
- 291 RUCAVADO, A. et al. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 63, n. 3, p. 186-199, 1995.
- 292 MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Processing of pro-tumor necrosis factor α by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 9, p. 2000-2005, 1996.
- 293 LAING, G. D. et al. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 12, p. 3458-3463, 2003.
- 294 CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 61, n. 1, p. 843-856, 2004.
- 295 OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin like enzyme, elegaxobin II, with lys-bradykinin releasing activity from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-Habu). **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 559-568, 2003.
- 296 KOMORI, Y.; NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. **J. Toxicol.: Toxin Rev.**, v. 17, n. 3, p. 261-277, 1998.
- 297 TOKUNAGA, F. et al. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from *Russell's viper* venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 33, p. 17471-17481, 1988.
- 298 KISIEL, W. et al. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 26, p. 12607-12613, 1987.
- 299 ZHANG, Y. et al. A novel plasminogen activator from snake venom. Purification, characterization, and molecular cloning. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 17, p. 10246-10255, 1995.
- 300 STOCKER, K.; BARLOW, G. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Methods Enzymol.**, v. 45, n., p. 214-223, 1976.
- 301 YOU, W. K. et al. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Lett.**, v. 571, n. 1, p. 67-73, 2004.
- 302 SERRANO, S. M. et al. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. **Thromb. Haemost.**, v. 83, n. 3, p. 438-444, 2000.
- 303 OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like enzyme, elegaxobin, from the venom of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon**, v. 38, n. 8, p. 1087-1100, 2000.
- 304 MATSUI, T. et al. Purification and amino acid sequence of halystase from snake venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*, a serine protease that cleaves specifically fibrinogen and kininogen. **The FEBS J.**, v. 252, n. 3, p. 569-575, 1998.
- 305 VAIYAPURI, S. et al. Purification and functional characterisation of rhinocerase, a novel serine protease from the venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. 1-10, 2010.

- 306 PIRKLE, H. et al. The primary structure of crotalase, a thrombin-like venom enzyme, exhibits closer homology to kallikrein than to other serine proteases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 99, n. 2, p. 715-721, 1981.
- 307 MARKLAND, F. S. et al. Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 79, n. 6, p. 1688-1692, 1982.
- 308 SERRANO, S. M. et al. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, n. 3, p. 845-853, 1998.
- 309 RHALEB, N. E.; YANG, X. P.; CARRETERO, O. A. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. **Comp. Physiol.**, v. 1, n. 2, p. 971-993, 2011.
- 310 EHRENFELD, P. et al. Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, n. 1, p. 117-124, 2006.
- 311 DUCHENE, J.; AHLUWALIA, A. The kinin B 1 receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 9, n. 2, p. 125-131, 2009.
- 312 SILVA, C. A. et al. Activation of α M β 2-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 322, n. 3, p. 950-956, 2004.
- 313 MAMEDE, C. C. N. et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, n. 1, p. 37-45, 2016.
- 314 STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, n. 1, p. 463-516, 2001.
- 315 DE ALMEIDA, C. M. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 293-301, 2008.
- 316 PULLEN, G.; FITZGERALD, M. G.; HOSKING, C. Antibody avidity determination by ELISA using thiocyanate elution. **J. Immunol. Methods**, v. 86, n. 1, p. 83-87, 1986.
- 317 ROMERO-STEINER, S. et al. Avidity determinations for *Haemophilus influenzae* type b anti-polyribosylribitol phosphate antibodies. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 12, n. 9, p. 1029-1035, 2005.
- 318 MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal. Biochem.**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.
- 319 KUNIYOSHI, A. K. et al. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 124-131, 2012.
- 320 SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, n., p. 850-858, 1996.
- 321 DAIGNEAULT, M. et al. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2010.
- 322 DELAFONTAINE, M. et al. Enzymatic and Pro-Inflammatory Activities of *Bothrops lanceolatus* Venom: Relevance for Envenomation. **Toxins**, v. 9, n. 8, p. 1-19, 2017.

- 323 MEGALE, Â. A. A. et al. Kn-Ba: a novel serine protease isolated from *Bitis arietans* snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 24, n. 1, p. 1-11, 2018.
- 324 LEBEDA, F. J. et al. The zinc-dependent protease activity of the botulinum neurotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 5, p. 978-997, 2010.
- 325 SUKONPAN, C. et al. Synthesis of substrates and inhibitors of botulinum neurotoxin type A metalloprotease. **Chem. Biol. Drug Design**, v. 63, n. 2, p. 181-193, 2004.
- 326 MEBS, D.; PANHOLZER, F. Isolation of a hemorrhagic principle from *Bitis arietans* (puff adder) snake venom. **Toxicon**, v. 20, n. 2, p. 509-512, 1982.
- 327 YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T.; MEBS, D. Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. II. Enzymatic properties with special reference to substrate specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1247, n. 1, p. 17-23, 1995.
- 328 NOK, A. J. A novel nonhemorrhagic protease from the African puff adder (*Bitis arietans*) venom. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 15, n. 4, p. 215-220, 2001.
- 329 SEKOGUCHI, S. et al. Kinin-releasing enzyme from the venom of *Bitis arietans* (puff adder). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 884, n. 3, p. 502-509, 1986.
- 330 NIKAI, T. et al. Kallidin-releasing enzyme from *Bitis arietans* (puff adder) venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 307, n. 2, p. 304-310, 1993.
- 331 VULFIUS, C. A. et al. An unusual phospholipase A₂ from puff adder *Bitis arietans* venom—a novel blocker of nicotinic acetylcholine receptors. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 787-793, 2011.
- 332 HAMAKO, J. et al. Purification and Characterization of Bitiscetin, a Novel von Willebrand Factor Modulator Protein from *Bitis arietans* Snake Venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 226, n. 1, p. 273-279, 1996.
- 333 OBERT, B. et al. Characterization of bitiscetin-2, a second form of bitiscetin from the venom of *Bitis arietans*: comparison of its binding site with the collagen-binding site on the von Willebrand factor A3-domain. **J. Thromb. Haemost.**, v. 4, n. 7, p. 1596-1601, 2006.
- 334 JENNINGS, B. R.; SPEARMAN, C. W. N.; SHEPHARD, E. G. A novel 25 kDa protein from the venom of *Bitis arietans* with similarity to C-type lectins causes fibrinogen-dependent platelet agglutination. **Toxicon**, v. 46, n. 6, p. 687-698, 2005.
- 335 OHKURA, M. et al. Properties of Ca⁺⁺ release induced by puff adder lectin, a novel lectin from the snake *Bitis arietans*, in sarcoplasmic reticulum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 277, n. 2, p. 1043-1048, 1996.
- 336 HUANG, T.-F. et al. Purification and characterization of an antiplatelet peptide, arietin, from *Bitis arietans* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1074, n. 1, p. 136-143, 1991.
- 337 GRAHAM, R. L. J. et al. Adenosine in the venoms from viperinae snakes of the genus *Bitis*: identification and quantitation using LC/MS and CE/MS. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 333, n. 1, p. 88-94, 2005.
- 338 PIRKLE, H. et al. Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties, and coagulant actions. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 19, p. 8830-8835, 1986.
- 339 PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. Scientific and Standardization Committee's Registry of Exogenous Hemostatic Factors. **Thromb. Haemost.**, v. 79, n. 3, p. 675-683, 1998.

- 340 ARONSON, D. L. Comparison of the actions of thrombin and the thrombin-like venom enzymes ancrod and batroxobin. **Thromb. Haemost.**, v. 36, n. 1, p. 9-13, 1976.
- 341 GAO, R. et al. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from Chinese green tree viper (*Trimeresurus stejnegeri*) venom. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 457-467, 1998.
- 342 CHAPMAN, D. The symptomatology, pathology and treatment of the bites of venomous snakes of Central and Southern Africa. **Venomous animals and their venoms**, v. 1, n. 1, p. 463-527, 1968.
- 343 ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am J Physiol**, v. 156, n. 2, p. 261-73, 1949.
- 344 SANT'ANA, C. D. et al. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 90, n. 3, p. 500-507, 2008.
- 345 BRAS, G. et al. Release of biologically active kinin peptides, Met-Lys-bradykinin and Leu-Met-Lys-bradykinin from human kininogens by two major secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*. **Peptides**, v. 48, n. 1, p. 114-123, 2013.
- 346 LAING, G. D. et al. A new Pan African polyspecific antivenom developed in response to the antivenom crisis in Africa. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 35-41, 2003.
- 347 GUIDOLIN, R. et al. Polyvalent horse F (Ab) 2 snake antivenom: Development of process to produce polyvalent horse F (Ab) 2 antibodies anti-african snake venom. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, n. 16, p. 2446-2455, 2010.
- 348 MODESTO, A. et al. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. **Biolog. Chem.**, v. 386, n. 6, p. 589-600, 2005.
- 349 TSAI, I. H. et al. Purification, cloning and sequence analyses for pro-metalloprotease-disintegrin variants from *Deinagkistrodon acutus* venom and subclassification of the small venom metalloproteases. **The FEBS J.**, v. 267, n. 5, p. 1359-1367, 2000.
- 350 OUYANG, C.; TENG, C.-M.; HUANG, T.-F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 945-966, 1992.
- 351 SCHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1, 25-dihydroxyvitamin D3. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996.
- 352 CROFT, M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, n. 4, p. 271-285, 2009.
- 353 PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 20, n. 2, p. 87-103, 2010.
- 354 HOAREAU, L. et al. Signaling pathways involved in LPS induced TNF α production in human adipocytes. **J. Inflamm.**, v. 7, n. 1, p. 1, 2010.
- 355 MENALDO, D. L. et al. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a PI metalloprotease and a phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* venom. **Mol. Immunol.**, v. 85, n., p. 238-247, 2017.

- 356 BERNARDES, C. P. et al. Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom. **Mol. Immunol.**, v. 68, n. 2, p. 456-464, 2015.
- 357 MENALDO, D. L. et al. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **Int. Immunopharmacol.**, v. 15, n. 4, p. 764-771, 2013.

APÊNDICE A

MEGALE, Â. A. A., et al. Kn-Ba: a novel serine protease isolated from *Bitis arietans* snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 24-38, 2018.

Megale et al. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*
(2018) 24:38
<https://doi.org/10.1186/s40409-018-0176-5>

Journal of Venomous Animals and
Toxins including Tropical Diseases

RESEARCH

Open Access

Kn-Ba: a novel serine protease isolated from *Bitis arietans* snake venom with fibrinogenolytic and kinin-releasing activities

Ângela Alice Amadeu Megale¹, Fábio Carlos Magnoli¹, Alexandre Kazuo Kuniyoshi¹, Leo Kei Iwai², Denise V. Tambourgi¹, Fernanda C. V. Portaro^{1*} and Wilmar Dias da Silva¹

Abstract

Background: *Bitis arietans* is a venomous snake found in sub-Saharan Africa and in parts of Morocco and Saudi Arabia. The envenomation is characterized by local and systemic reactions including pain, blistering, edema and tissue damage, besides hemostatic and cardiovascular disturbances, which can cause death or permanent disabilities in its victims. However, the action mechanisms that provoke these effects remain poorly understood, especially the activities of purified venom components. Therefore, in order to elucidate the molecular mechanisms that make the *Bitis arietans* venom so potent and harmful to human beings, this study reports the isolation and biochemical characterization of a snake venom serine protease (SVSP).

Methods: Solubilized venom was fractionated by molecular exclusion chromatography and the proteolytic activity was determined using fluorescent substrates. The peaks that showed serine protease activity were determined by blocking the proteolytic activity with site-directed inhibitors. In sequence, the fraction of interest was submitted to another cycle of molecular exclusion chromatography. The purified serine protease was identified by mass spectrometry and characterized biochemically and immunochemically.

Results: A serine protease of 33 kDa with fibrinogen-degrading and kinin-releasing activities was isolated, described, and designated herein as Kn-Ba. The experimental Butantan Institute antivenom produced against *Bitis arietans* venom inhibited the Kn-Ba activity.

Conclusions: The in vitro activities of Kn-Ba can be correlated with the capacity of the venom to provoke bleeding and clotting disorders as well as hypotension, which are common symptoms presented by envenomed victims. Obtaining satisfactory Kn-Ba inhibition through the experimental antivenom is important, given the WHO's recommendation of immunotherapy in cases of human accidents with venomous snakes.

Keywords: *Bitis arietans*, Venom, Antivenom, Serine protease, Fibrinogenolytic, Kinin-releasing activity

* Correspondence: fernanda.portaro@butantan.gov.br

¹Immunochimistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo 05503-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2018 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

APÊNDICE B

COUTO et al. Development of monoclonal antibody anti-african *Bitis arietans* snake toxin phospholipase A₂. **Journal of Toxins**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2017.

Avens Publishing Group
J Toxins
December 2017 Volume 4, Issue 1
© All rights are reserved by Silva, et al.

Development of Monoclonal Antibody Anti-African *Bitis arietans* Snake Toxin Phospholipase A₂

Keywords: Snake venoms; Toxins; Phospholipase A₂; Hemorrhage; Monoclonal antibodies; Immune therapy

Abstract

This work is part of long-term research to improve the quality of antivenom antibodies based on cumulative information gathered from established knowledge of the immune response cellular and molecular mechanisms as well as from molecular animal venom toxins. There are two main objectives: first, the introduction of punctual modifications to antitoxin antibody (Ab) production for immediate use; second, the use of Ab hyper variable regions to model scFvs that have high toxin neutralizing potency. The first objective has been successfully accomplished in recent years. Polyclonal Abs (pAbs) that has high antigen (Ag) potency recognition has been developed. For the second objective, the use of purified-characterized toxins as antigens to produce monoclonal Abs (mAbs) is ongoing. This manuscript contains data indicating that purified and enzymatically characterized PLA₂ from *Bitis arietans* venom induces IgA mAbs that recognize epitopes and neutralize toxic domains with desirable potency. The obtained mAb will serve as a hypervariable sequence source for single chain fragments variable (scFvs). The present study highlights the use of purified venom toxins as substitutes for complete venoms in immunization procedures.

Abbreviations

LD₅₀: Median Lethality Dose; Ab, Antibody; Ag, Antigen; D, Diversity Segments; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ED₅₀: Median Effective Dose ; F(Ab)₂: Ab Two Fragments; IgG: Immunoglobulin Gama; HAT: Hypoxanthine Amino Transferase; HGPTR: Hypoxanthine-Guanine Phorbosyltransferase; Ig: Immunoglobulin; J: Joining Segments; KSCN: Potassium Thiocyanate; Mab: Monoclonal Antibody; TK: Thymidine Kinase; Pabs: Polyclonal Antibodies; PLA₂: Phospholipase A₂; Scfvs: Single Chain Fragments Variable; SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; V: Variable Light Chain; VH: Variable Heavy Chain

Introduction

The currently used snake antivenoms are produced in horses immunized with whole venoms, partially isolated and their neutralizing potencies evaluated according to World Health Organization guidelines [1]. Resulting immunoglobulin's are IgG / F(ab)₂ mixtures of anti-toxins and anti-non toxins Abs. Although their neutralizing potency expressed in terms of ED₅₀, is evaluated, other important Abs qualities, such as affinity and specific activity, are not. High doses of intravenously injected antivenom are used to treat snake bites". Although are therapeutically effective, these antivenoms activate the complement system, resulting in anaphylatoxin formation solubilization of the venom component-antivenom immune aggregates and induction of adverse hypersensitivity reactions [2-10]. In addition, their cost of production is unaffordable for some developing countries [11]. Actual advances in antibody biotechnology

Open Access

Research Article

Alencar Couto MN¹, Amadeu Megale AA², Magnoli FC², Magalhães Junior MJ², da Silva de Souza G¹, Kanashiro MM¹ and da Silva WD^{2*}

¹Laboratório de Biologia do Reconhecer, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Brazil

²Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

*Address for Correspondence

Wilmir Dias da Silva, Laboratório de Imunoquímica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil, Tel: 55.11.26279618; E-mail: wilmir.silva@butantan.gov.br

Submission: 7 October, 2017

Accepted: 30 November, 2017

Published: 1 December, 2017

Copyright: © 2017 Alencar Couto MN, et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

largely used to produce therapeutic or immune diagnostic and images reagents were not yet incorporated into antivenom production. Therefore, incorporation of these advances in antivenom technology must be stimulated. To reach these objectives two decisions must be observed. First, introduction of punctual modifications into the immunization protocols aiming stimulating development of memory rather than naïve T and B cells. The longer life span of memory-immunologic T and B cells, compared to naïve cells, requires 10-50 less antigen to produce an effective immunological response that is characterized by the production of Abs with high affinity to specific epitopes [12-14].

The splenic naïve-B cells express cell surface antigen receptors, BCRs, in which the surrogate L-chain and definitive H-chain were constructed by somatic rearrangements in the absence of Ag contact. These rearrangements involve by chance associations of single regions from the multiple V-region, the five J-joining regions and the four D-regions, resulting in VJ surrogate L-chain and V(D) J definitive H-chain. Resulting BCRs upon contact with the specific Ag suffer punctual hyper mutations in both chains with substitution of the surrogate by definitive L-chain and increasing in both Ab specificity and affinity for the epitopes [15,16].

Second, substitute whole venom by purified relevant toxins as immunogens. Antitoxins Abs antitoxins predominate on unimportant Abs production. The therapeutically antivenom doses must be reduced.

Based on these known aspects of the immune response, we introduced strategic modifications into immunization protocols, such as reducing the venom dosage and increasing the number of immunizations as well as time between immunizations. Lower responding animals, identified by Ab titration using ELISA, were eliminated during immunization. Antivenom Abs with high specificity, affinity, and venom lethality-neutralizing potency against *Crotalus* spp. as well as snake African venoms were developed. These expected results stimulated further refinements in antivenom biotechnology. The elimination of antibodies against

APÊNDICE C

Alterações hematológicas em animais C57BL/6 tratados com o veneno

O analisador automático foi adquirido pelo departamento de Imunologia durante a etapa de finalização da tese. Por este motivo, não foram realizadas análises no sangue de todos os animais e condições experimentais, impossibilitando a inserção deste dado nos resultados. No entanto, como o veneno de *B. arietans* é hemorrágico, é interessante pontuar que a dose miotóxica do veneno utilizada neste estudo foi capaz de reproduzir fenômenos relatados em estudos de caso relacionados à hemorragia, como trombocitopenia e anemia.

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 1/2 h ou 4 h de estímulo, os animais foram anestesiados por inalação de isoflurano e, em seguida, eutanasiados sob atmosfera excessiva de CO₂. Em seguida, o sangue foi coletado por punção cardíaca e despensado em tubos contendo solução anticoagulante (Citrato trissódico 2H₂O; 129 mmol) na proporção de 1 parte de anticoagulante para 9 partes de sangue (1:10; v/v). Após homogeneização, amostras de sangue (25 µL/cada) foram analisadas em analisador hematológico automático BC-2800 Vet (Mindray, Shenzhen, China), conforme instruções do fabricante. O aparelho fornece os seguintes parâmetros: RBC = GV – glóbulos vermelhos ou eritrócitos; HCT = Ht – hematócrito; HGB = Hb – hemoglobina; MCV = VCM – volume corpuscular médio (tamanho das células); MCH = HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM = MCHC – concentração de hemoglobina corpuscular média (concentração de hemoglobina das hemácias); RDW-CV = ADVGVC – coeficiente de variação da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; RDW-SV = ADVGSD – desvio padrão da amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos; PLT – Plaquetas; MPV = VPM – volume plaquetar médio; WBC = GB – Leucócitos; LYMPH% = %LINF – porcentagem de linfócitos; MON% = %mon - porcentagem de monócitos; GRAN% = %gran – porcentagem de granulócitos; LYMPH% = #LINF – nº linfócitos; #MON = #mon – nº de monócitos; Gran# = nº gran. – granulócitos (neutrófilos); PDW = ADP – amplitude da distribuição de plaquetas; e PCT = Plaquetócrito.

Dentre os parâmetros avaliados, foram observadas alterações no número total e relativo de eritrócitos, plaquetas e leucócitos totais no sangue dos animais estimulados com o veneno. Em 4 h o veneno foi capaz de promover a diminuição de eritrócitos, indicando hemólise direta mediada pelo veneno, bem como hemorragia. Além disso, nos dois períodos

avaliados houve intensa trombocitopenia. Os leucócitos totais aumentaram significativamente em 1/2 h, corroborando o processo inflamatório observado na cavidade peritoneal. Apesar da tendência, em 4 h o aumento de leucócitos no sangue não foi significativo (Figura 81). Nenhuma destas alterações foram revertidas pelo tratamento prévio com o inibidor seletivo de COX-1 (SC-560; 5 mg/kg; 1 h antes do estímulo com o veneno) (dados não mostrados).

Figura 81 – Hemograma de animais C57BL/6 tratados com o veneno

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados pela via intraperitoneal com o veneno (0,5 mg/kg) ou apenas com salina apirogênica (controle). Após 1/2 h ou 4 horas de estímulo, o sangue foi coletado por punção cardíaca e a contagem de: **a)** eritrócitos; **b)** plaquetas e **c)** leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico automático. Cada ponto representa a média $\pm$ SD (4-5 animais). Dados do grupo veneno comparados com seus respectivos controles analisados estatisticamente por teste t de *Student*. Dados da comparação entre os dois períodos de estímulo analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. (*): estatisticamente diferente do controle; (#): estatisticamente diferente do grupo veneno em 1/2 h. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Dados representativos de dois experimentos reprodutíveis.

ANEXO A

Análise de LPS em amostras do veneno de *Bitis arietans*

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN

ib butantan

FORMULÁRIO DE REGISTRO

Nº. DO ANEXO: 0001_003	MÉTODO: IB/MG/CM-0019_003
ÁREA: Seção de Controle Microbiológico	
TÍTULO: TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO "GEL CLOT" - TESTE LIMITE	

IB/MG/CM-0019_003/0001_003/058/18

Data Entrada: 15/06/18 Data Teste: 15/06/18 Nº. Registro (NR): 18351/18
 Procedência: Laboratório de Farmacologia - Farmacologia
 Amostra: Veneno - B. arietans - Sem diluição Lote: #15.06.18
 LAL - Reconstituição: IB/MG/CM-0019_003/0006_002/089/18 Validade: 11/07/18
 Endotoxina - Reconstituição: IB/MG/CM-0019_003/0008_001/018/18 Validade: 18/06/18
 Água Apirogênica: 0000597790 Validade: 28/12/18
 Pipeta (100 µL) TAG: CM-PIP18-041-1000 Validade: #15.06.18 07/18
 Pipeta (10 µL) TAG: CM-PIP14-041-1000 Validade: #15.06.18 07/18
 Lote da ponteira (100 µL): 136753 Validade: 14/03/21
 Lote da ponteira (10 µL): 144643 Validade: 28/08/21
 Tubos despirogenizados: IB-m) 070/18 Validade: 08/07/18
 Banho Maria (TAG): CM-BM021-041-1228 Validade: #15.06.18 01/19

Diluição	Resultado (+) / (-)	Cálculo (diluição x sensibilidade)
Bure	LAL + PRODUTO → (+) (+)	1 x 0,125 = 0,125 UE/mL
1:10	LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+)	10 x 0,125 1,25 UE/mL
	LAL + PRODUTO → (+) (+)	
	LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+)	
	LAL + PRODUTO → (+) (+)	
	LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+)	
	LAL + PRODUTO → (+) (+)	
	LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+)	
Controle Negativo	LAL + ÁGUA APIROGÊNICA → (-) (-)	
Controle Positivo	LAL + ÁGUA APIROGÊNICA + ENDOTOXINA → (+) (+)	

Resultado
$0,125 < 1,25$ UE/mL #20.06.18
Especificação
#15.06.18 UE/mL
Conclusão
☐ Resultado dentro do critério de especificação - APROVADO. ☐ Resultado fora do critério de especificação - REPROVADO. ☒ Resultado informativo.

Observação: Pipeta 1000 µL TAG: CM-PIP34-41-2000 val.: 07.2018, Ponteira 1000 µL lot.: 140463 val.: 05.06.21 #15.06.21

Thais de Fátima Reginato Barbosa
Técnico de Controle de Qualidade
Seção de Controle Microbiológico
Analista (visto e data) 15.06.18

Priscila da Silva Carvalho
Analista de Controle de Qualidade
Seção de Controle Microbiológico
Conferente (visto e data) 19.06.18

Coordenador CQ (visto e data) 27.06.18

Patricia dos Santos Carneiro Gerente de Controle de Qualidade 08/01/2018

PROPRIEDADE DO INSTITUTO BUTANTAN

ANEXO B

Análise de LPS em amostras da fração F3-1, a SVSP isolada do veneno de *Bitis arietans*

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN

ib butantan

FORMULÁRIO DE REGISTRO

Nº. DO ANEXO: 0001_003	MÉTODO: IB/MG/CM-0019_003
ÁREA: Seção de Controle Microbiológico	
TÍTULO: TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO "GEL CLOT" - TESTE LIMITE	

IB/MG/CM-0019_003/0001_003/059/18

Data Entrada: 15 / 06 / 18 Data Teste: 15 / 06 / 18 Nº. Registro (NR): 18351 / 18
 Procedência: Laboratório de Farmacologia Simbioquímica
 Amostra: F3-1 B. arietans - Sum. diluição Lote: 15.06.18
 LAL - Reconstituição: IB/MG/CM-0019_003/0006_002/089/18 Validade: 11 / 07 / 18
 Endotoxina - Reconstituição: IB/MG/CM-0019_003/0008_001/018/18 Validade: 18 / 06 / 18
 Água Apirogênica: 0000597790 Validade: 28 / 12 / 18
 Pipeta (100 µL) TAG: CM-PIP18-041-1000 Validade: 15.06.18 07 / 18
 Pipeta (10 µL) TAG: CM-PIP14-041-1000 Validade: 15.06.18 07 / 18
 Lote da ponteira (100 µL): 136753 Validade: 14 / 03 / 21
 Lote da ponteira (10 µL): 144643 Validade: 28 / 08 / 21
 Tubos despirogenizados: IB-MD 070118 Validade: 08 / 07 / 18
 Banho Maria (TAG): CM-BM021-041-1228 Validade: 15.06.18 01 / 19

Diluição	Resultado (+) / (-)	Cálculo (diluição x sensibilidade)
Puro	LAL + PRODUTO → (+) (+) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+)	1 x 0,125 = 0,125 UE/mL
1:10	LAL + PRODUTO → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+)	10 x 0,125 = 1,25 UE/mL
	LAL + PRODUTO → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (-) (-)	
	LAL + PRODUTO → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (-) (-)	
	LAL + PRODUTO → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (-) (-)	
Controle Negativo	LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (-) (-)	
Controle Positivo	LAL + ÁGUA APIROGÊNICA + ENDOTOXINA → (+) (+)	

Resultado
0,125 a 1,25 UE/mL 20.06.18
Especificação
15.06.18 UE/mL
Conclusão
☐ Resultado dentro do critério de especificação - APROVADO. ☐ Resultado fora do critério de especificação - REPROVADO. ☒ Resultado informativo.

Observação: Pipeta 1000 µL TAG: CM-PIP34-41-2000 vál: 07/2018; ponteira 1000 µL Lati: 140463 vál: 05.06.21 15.06.18

Thais de Fátima Reginato Barbosa
Técnico de Controle de Qualidade
Seção de Controle Microbiológico

Analista (visto e data)

Priscila da Silva Carvalho
Análise de Controle de Qualidade
Seção de Controle Microbiológico

Conferente (visto e data)

Coordenador CQ (visto e data)

Patricia dos Santos Carneiro Gerente de Controle de Qualidade 08/01/2018

PROPRIEDADE DO INSTITUTO BUTANTAN

ANEXO C

Análise de LPS em amostras da fração F5-4, a SVMP isolada do veneno de *Bitis arietans*

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO BUTANTAN

ib butantan

FORMULÁRIO DE REGISTRO

Nº. DO ANEXO: 0001_003	MÉTODO: IB/MG/CM-0019_003
ÁREA: Seção de Controle Microbiológico	
TÍTULO: TESTE DE ENDOTOXINA BACTERIANA MÉTODO "GEL CLOT" - TESTE LIMITE	

IB/MG/CM-0019_003/0001_003/ 057/18

Data Entrada: 15 / 06 / 18 Data Teste: 15 / 06 / 18 Nº. Registro (NR): 18351/18
 Procedência: Laboratório de Imunogenética
 Amostra: F5-4 - B. arietans - Sem diluição Lote: 15.06.18
 LAL - Reconstituição: IB/MG/CM-0019_003/0006_002/ 089/18 Validade: 11 / 07 / 18
 Endotoxina - Reconstituição: IB/MG/CM-0019_003/0008_001/ 018/18 Validade: 18 / 06 / 18
 Água Apirogênica: 0000597790 Validade: 28 / 12 / 18
 Pipeta (100 µL) TAG: CM-PIP18-041-1000 Validade: 15.06.18 / 07 / 18
 Pipeta (10 µL) TAG: CM-PIP14-041-1000 Validade: 15.06.18 / 07 / 18
 Lote da ponteira (100 µL): 136753 Validade: 14 / 03 / 21
 Lote da ponteira (10 µL): 144643 Validade: 28 / 08 / 21
 Tubos despirogenizados: IB-MD 070/18 Validade: 08 / 07 / 18
 Banho Maria (TAG): CM-BM021-041-1228 Validade: 15.06.18 / 01 / 19

Diluição	Resultado (+) / (-)	Cálculo (diluição x sensibilidade)
Pure	LAL + PRODUTO → (+) (+) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+)	1 x 0,125 = 0,125 UE/mL
1:10	LAL + PRODUTO → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (+) (+) LAL + PRODUTO → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (-) (-) LAL + PRODUTO → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (-) (-) LAL + PRODUTO + ENDOTOXINA → (-) (-) LAL + ÁGUA APIROGÊNICA → (-) (-) LAL + ÁGUA APIROGÊNICA + ENDOTOXINA → (+) (+)	10 x 0,125 = 1,25 UE/mL 15.06.18

Resultado
0,125 < 1,25 UE/mL 15.06.18
Especificação
15.06.18 UE/mL
Conclusão
☐ Resultado dentro do critério de especificação - APROVADO. ☐ Resultado fora do critério de especificação - REPROVADO. ☒ Resultado informativo.

Observação: Pipeta de 1000 µL TAG: CM-PIP34-41-2000 mil.: 07.2318, ponteira 1000 µL Lote: 140463 mil.: 05.06.21 15.06.18

Thais de Fátima Reginato Barbosa
Técnico de Controle de Qualidade
Seção de Controle Microbiológico
Analista (visto e data)

Isidra da Silva Carvalho
Técnico de Controle de Qualidade
Seção de Controle Microbiológico
Conferente (visto e data)

19.06.18
20.06.18
27.06.18
Coordenador CQ (visto e data)

Patricia dos Santos Carneiro Gerente de Controle de Qualidade 08/01/2018

PROPRIEDADE DO INSTITUTO BUTANTAN