

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

FELIPE SILVA DE FRANÇA

IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS E EVENTOS INFLAMATÓRIOS
ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DO ENVENENAMENTO PELA
SERPENTE *Naja annulifera*:
CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

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

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

FELIPE SILVA DE FRANÇA

IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS E EVENTOS INFLAMATÓRIOS
ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DO ENVENENAMENTO PELA
SERPENTE *Naja annulifera*:
CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

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

Orientadora: Dra. Denise Vilarinho Tambourgi

Versão original.

São Paulo

2021

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)

Silva de França, Felipe

Identificação de toxinas e eventos inflamatórios envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*: Contribuição do sistema complemento / Felipe Silva de França; orientadora Denise Vilarinho Tambourgi. São Paulo, 2021.

240 p.

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

1. *Naja annulifera*. 2. Veneno. 3. Inflamação. 4. Sistema complemento. 5. Reações locais e sistêmicas. I. Vilarinho Tambourgi, Denise. III. Identificação de toxinas e eventos inflamatórios envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*: Contribuição do sistema complemento.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Felipe Silva de França

Título da Tese: Identificação de toxinas e eventos inflamatórios envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*: contribuição do Sistema Complemento

Orientador: Dra. Denise Vilarinho Tambourgi

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública 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

Para que um projeto desta magnitude aconteça, o auxílio de muitas pessoas é fundamental, portanto, nada mais justo do que agradecê-las!

Primeiramente, agradeço a mim por não desistir, em nenhum momento, dos meus objetivos, mesmo quando as incertezas e dificuldades eram presentes!

Agradeço a minha mãe pelo apoio incondicional, para que eu estudasse e realizasse o meu sonho de ser um Biocientista. Por me educar, ensinar valores de vida, enfim, por ser minha mãe!

Dra. Denise V. Tambourgi: se tem alguém que contribuiu para que meu sonho se tornasse realidade, esse alguém é você! Muito obrigado pela orientação, pelos ensinamentos, enfim, por tudo! Todas as nossas conversas, discussões, “brigas”, foram extremamente válidas para minha vida profissional e pessoal! Você faz parte do grupo seleto de pessoas que tem um espaço no meu coração!

Dra. Isadora Maria Villas-Boas, minhas terceira e quarta mãos!!! Sem a sua participação em meus experimentos, extremamente grandes e longos, nas “trocentas” repetições/confirmações, um terço desta tese não teria sido concluído! Meu sincero agradecimento pela ajuda, convivência, conselhos, amizade e discussões!

Prof. Dr. Bruno Cogliati, sua colaboração neste projeto foi inestimável! Obrigado pelas análises histopatológicas, extremamente acuradas de todas as amostras, pelos conselhos, ensinamentos, amizade e boas risadas em nossas reuniões!

Osmair Elder, nosso querido técnico “Osma”!!! A minha gratidão por toda a contribuição que você teve em vários momentos desta jornada, fosse dando uma palavra amiga quando as coisas não estavam muito legais, fosse quando precisasse de você para ajudar no equipamento que estava dando problema, aliquotar amostras em 500 tubos... Enfim, muitíssimo obrigado, meu amigo!

Alécio, Ana Cláudia, Ana Freire, Guilherme e Márcia a melhor equipe de técnicos e auxiliares que eu já conheci, muito obrigado por deixar tudo “no ponto” para os nossos experimentos acontecerem, a organização, esterilização, configuração de equipamentos, enfim, todo o trabalho de vocês foi essencial para a minha jornada no laboratório.

Elaine e “little Lia”, nossas secretárias!!! Obrigado pelo auxílio nos assuntos burocráticos do laboratório, e pela animação e descontração que deixavam a rotina mais feliz!

Sr. Severino Ramos, “Raminho”, agradeço imensamente a sua dedicação aos animais dos nossos experimentos! Seu trabalho foi de grande valia para mim! Obrigado por sempre os receber, organizá-los e alimentá-los!

Ana Tung, Aurélio Pedroso, Carla Cristina, Caroline Cassero, Cinthya Lais, Cinthya Okamoto, Daniel Manzoni, Daniela Tiemi, Danielle Paixão, Daiane Laíse, Gabriela Tanaka, Giselle Pidde, Giuliano Bonfá, Isadora Villas-Boas, Joel Megale, Ligia Luchini, Luís Sardinha, Mariana Torrente, Paola Fedatto, Paula Pohl, Priscila Hess, Rosana Shoji e Thyago Leonel, “Tamborigenses” atuais e do passado, estar com vocês fez toda a diferença! Vocês foram demais!!! Seja me passando conhecimentos, ensinando técnicas de bancada, participando dos meus mega experimentos, nas boas risadas, no choro, enfim, só tenho a agradecer por todos os momentos que estivemos juntos!

Agradeço a secretária Leila Hashimoto do Centro de Toxinas, Resposta Imune e Sinalização Celular (CeTICS)/CEPID-FAPESP/Instituto Butantan pela disposição em sempre auxiliar em todos os processos de compras de material para nossos experimentos e disponibilização de recursos para as mais variadas necessidades dos nossos projetos.

Se parte deste sonho aconteceu, devo agradecer ao Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Ingressar no programa de pós-graduação de vocês foi uma honra! Agradeço pela bolsa de estudos e por todos os conhecimentos transmitidos nas diferentes disciplinas, seminários e eventos promovidos pelo programa!

Às secretárias do Departamento de Imunologia, Maria Eni e Jotelma Leite, meus sinceros agradecimentos pelo auxílio dado, frente à todas as questões burocráticas relativas à pós-graduação.

Profa. Dra. Maristela Martins agradeço a oportunidade de fazer o estágio de docência no ensino superior (estágio PAE) com você! Seus ensinamentos foram de grande valia para mim!

Agradeço aos Drs. Ângela Silva Barbosa, Carla Cristina Squaiella-Baptistão, Catarina de Fátima Pereira Teixeira, Mônica Valdyrce dos Anjos Lopes Ferreira e Niels Olsen Saraiva Câmara pelo tempo disponibilizado para avaliar o meu projeto nos exames de qualificação do mestrado e doutorado. As discussões e sugestões dadas por vocês foram de grande valia!

Agradeço à Profa. Dra Ana Paula Lepique por sua disposição em me ajudar com os prazos na reta final da redação desta tese.

Agradeço e parablenizo a todos os professores das diversas disciplinas cursadas por mim, nos diferentes institutos e faculdades da Universidade de São Paulo. Vocês são a base de tudo, tenho muito orgulho de vocês!

Joel e Ângela, meu casal favorito!!! Agradeço a vocês por todos os momentos no laboratório, nossas discussões sobre experimentos e artigos; nossas risadas, angústias, enfim, por nossa amizade! Vocês fizeram uma grande diferença nesses anos!

Thyago Leonel, você chegou ao laboratório no meio da empreitada, e quem diria, de colegas de trabalho, viramos grandes amigos!!! Muito obrigado por todos os momentos, risadas, discussões, experimentos, rolês, ouvir minhas reclamações, enfim, vai ter que me aturar muito!!!

Agradeço ao Prof. Dr. Trent Woodruff da Escola de Ciências Biomédicas da Universidade de Queensland, Austrália, por gentilmente nos ceder os peptídeos PMX205 e P32, os quais foram imprescindíveis para determinar os mecanismos inflamatórios envolvidos na patologia do envenenamento pela *Naja annulifera*.

Agradeço aos Profs. Drs. John Lambris e Edimara da Silva Reis do Departamento de Patologia da Universidade da Pensilvânia por, gentilmente, nos ceder o peptídeo análogo da Compstatina, Cp40.

Agradeço ao Instituto Butantan por todas as oportunidades! Tenho orgulho de fazer parte do time científico desta instituição.

Agradeço à Universidade de São Paulo por tudo que me proveu! A qualidade de seu ensino e pesquisa é de deixar qualquer um impressionado! Tenho muito orgulho de ter sido aluno de vocês!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pelas bolsas concedidas no mestrado e no doutorado, as quais foram essenciais para que tudo isso acontecesse!

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, que através do CeTICS/CEPID-FAPESP/Instituto Butantan fomentou boa parte desta pesquisa e publicações de artigos científicos referentes a ela.

*Tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com
muito amor e com muita fé, que um dia você chega lá”*

Ayrton Senna

RESUMO

A serpente *Naja annulifera*, de importância médica humana e veterinária, é responsável por envenenamentos em países da África Subsaariana. Os acidentes causados por esta serpente são graves e muitas vezes fatais. No entanto, a composição e o modo de ação do seu veneno foram pouco explorados, o que contribuiu para a baixa eficácia das estratégias terapêuticas. Reações inflamatórias descontroladas são responsáveis por disfunções orgânicas em várias condições patológicas e considerando que por meio da inflamação, os venenos podem causar danos e até mesmo morte, o presente estudo teve como objetivo identificar toxinas e eventos inflamatórios envolvidos no envenenamento pela *N. annulifera*. Por meio de diferentes abordagens experimentais, foi mostrado que o veneno da *N. annulifera* apresenta composição proteica diversa, incluindo Cobra Venom Factor (CVF) e proteínas com resíduos de Manose e N-acetilglicosamina. Adicionalmente, foram identificadas hialuronidases, fosfolipases A2 (FLA2s), metaloproteases (SVMPs) e serinoproteases (SVSPs) capazes de degradar componentes da matriz extracelular, fosfolipídios de membrana e o fibrinogênio humano, bem como causar distúrbios hemostáticos. A inoculação subcutânea do veneno promoveu disfunções circulatórias, via degranulação de mastócitos, produção de LTB₄ e prostanoídes, bem como sinalização via PAFR, culminando em edema intenso. Em modelos de envenenamento experimental sistêmico moderado e severo, o veneno causou, com diferentes intensidades, leucocitose, aumento nas porcentagens de neutrófilos e monócitos, elevação nos níveis de IL-6, CCL2 e TNF- α . Além disso, os camundongos submetidos ao envenenamento experimental grave apresentaram lesão pulmonar hiperaguda (LPA). Empregando diferentes ensaios funcionais detectou-se que os eventos inflamatórios aqui descritos são mediados pelo sistema complemento, uma vez que o veneno causa ativação das vias alternativa, das lectinas e clássica do complemento humano, culminando na geração das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, bem como a formação de sTCC no soro. O veneno promoveu “tempestade” de mediadores inflamatórios no sangue humano caracterizada pela produção intensa de LTB₄, PGE₂, TXA₂, CCL2, CCL5 e CXCL8, dependentes da ativação do complemento por SVMPs, bem como da ativação do eixo C5a-C5aR1. Em camundongos, o veneno foi capaz de promover complementopatia intensa, principalmente nos animais submetidos ao envenenamento experimental grave. A ativação do eixo C5a-C5aR1, no tecido subcutâneo dos animais injetados com veneno, disparou a produção de LTB₄, PGE₂ e TXA₂, os quais foram responsáveis pelo edema. Adicionalmente, a geração de C5a induzida pelo veneno levou a produção da quimiocina CXCL1, juntamente com aumento nos níveis teciduais de MPO. Curiosamente, o aumento nos níveis sistêmicos de IL-6 e CCL2, bem como na porcentagem de neutrófilos induzidos pelo envenenamento experimental moderado demonstraram-se totalmente dependentes da ativação do C5aR1. A sinalização via C5aR1 nos animais submetidos ao envenenamento grave foi a responsável pela leucocitose, neutrofilia, monocitose e LPA. Os dados obtidos neste estudo demonstram que o veneno da *N. annulifera* é composto por componentes pró-inflamatórios e que o envenenamento é caracterizado por reações inflamatórias hiperagudas, mediadas pela ativação do complemento, mais especificamente do eixo C5a-C5aR1. Assim, o sistema complemento torna-se um possível alvo terapêutico para controlar reações inflamatórias deletérias, associadas ao envenenamento por esta serpente e de outros animais peçonhentos nos quais este eixo possa influenciar a patologia do envenenamento.

Palavras-chaves: *N. annulifera*; veneno; reações inflamatórias; complemento; C5aR1

ABSTRACT

The snake *Naja annulifera*, of human and veterinary medical importance, is responsible for envenomations in sub-Saharan African countries. The accidents caused by this snake are serious and often fatal. However, the composition and mode of action of its venom have been poorly explored, which contributes to the low effectiveness of therapeutic strategies. Uncontrolled inflammatory reactions are responsible for organic dysfunctions in various pathological conditions and considering that through inflammation, venoms can cause damage and even death, the present study aimed to identify toxins and inflammatory events involved in envenomation by *N. annulifera*. By different experimental approaches, it was shown that the venom of *N. annulifera* has a diverse protein composition, including Cobra Venom Factor (CVF) and proteins with residues of Mannose and N-acetylglucosamine. Additionally, hyaluronidases, phospholipases A2 (FLA2s), metalloproteases (SVMPs) and serinoproteases (SVSPs) capable of degrading components of the extracellular matrix, membrane phospholipids and human fibrinogen, as well as causing hemostatic disorders, have been identified. Subcutaneous inoculation of the venom promoted circulatory dysfunction, via mast cell degranulation, production of LTB₄ and prostanoids, as well as signaling via PAFR, culminating in intense edema. In models of moderate and severe systemic experimental envenomation, the venom caused, with different intensities, leukocytosis, an increase in the percentage of neutrophils and monocytes, an increase in the levels of IL-6, CCL2 and TNF- α . In addition, mice subjected to severe experimental envenomation presented hyperacute lung injury (ALI). Using different functional assays, it was found that the inflammatory events described here are mediated by the complement system, since the venom causes activation of the alternative, lectin and human complement classical pathways, culminating in the generation of anaphylatoxins C3a, C4a and C5a, as well as the formation of serum sTCC in the serum. The venom promoted a "storm" of inflammatory mediators in human blood characterized by the intense production of LTB₄, PGE₂, TXA₂, CCL2, CCL5 and CXCL8, dependent on complement activation by SVMPs, as well as activation of the C5a-C5aR1 axis. In mice, the venom was able to promote intense complementopathy, especially in animals subjected to severe experimental poisoning. The activation of the C5a-C5aR1 axis, in the subcutaneous tissue of animals injected with venom, triggered the production of LTB₄, PGE₂ and TXA₂, which were responsible for the edema. In addition, the venom-induced generation of C5a led to the production of the chemokine CXCL1, along with increased tissue levels of MPO. Interestingly, the increase in systemic levels of IL-6 and CCL2, as well as in the percentage of neutrophils induced by moderate experimental envenoming, was totally dependent on C5aR1 activation. Signaling via C5aR1 in animals submitted to severe envenoming was responsible for leukocytosis, neutrophilia, monocytosis and LPA. The data obtained in this study demonstrate that the *N. annulifera* venom is composed of pro-inflammatory components and that the envenomation is characterized by hyperacute inflammatory reactions, mediated by the activation of the complement, more specifically the C5a-C5aR1 axis. Thus, the complement system becomes a possible therapeutic target to control deleterious inflammatory reactions, associated with envenomation by this snake and other venomous animals in which this axis can influence the pathology of the poisoning.

Keywords: *N. annulifera*; venom; inflammatory reactions; complement; C5aR1

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Mapa delimitando, em amarelo, a área de ocorrência de <i>N. annulifera</i> na África Subsaariana	27
Figura 2 - Espécimes de <i>N. annulifera</i> na África Subsaariana apresentando diferentes padrões de coloração.....	28
Figura 3 - Perfil proteico do veneno da <i>N. annulifera</i>	56
Figura 4 - Detecção de atividades enzimático-tóxicas do veneno da <i>N. annulifera</i>	58
Figura 5 - Reações inflamatórias locais induzidas pelo veneno da <i>N. annulifera</i>	62
Figura 6 - Influência de diferentes mediadores inflamatórios no edema induzido pelo veneno de <i>N. annulifera</i>	65
Figura 7 - Reações inflamatórias sistêmicas no envenenamento experimental moderado por <i>N. annulifera</i>	67
Figura 8 - Reações inflamatórias sistêmicas no envenenamento experimental grave por <i>N. annulifera</i>	69
Figura 9 - Desenvolvimento de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) no envenenamento experimental grave	70
Figura 10 - Representação esquemática de componentes e eventos inflamatórios envolvidos no envenenamento pela serpente <i>N. annulifera</i>	83
Figura 11 - Ativação do Complemento humano pelo veneno de <i>N. annulifera</i> (VNa).....	138
Figura 12 - Ação direta do veneno da <i>N. annulifera</i> (VNa) sobre C3, C4 e C5	140
Figura 13 - O veneno de <i>N. annulifera</i> (VNa) causa ativação do Complemento em modelo <i>ex vivo</i> de sangue total humano	142
Figura 14 – O veneno de <i>N. annulifera</i> (VNa) provoca liberação de mediadores lipídicos em modelo <i>ex vivo</i> de sangue total humano	143
Figura 15 – O veneno de <i>N. annulifera</i> (VNa) promove aumento nos níveis plasmáticos de quimiocinas em modelo <i>ex vivo</i> de sangue total humano	144
Figura 16 – Influência de C3/C3b na inflamação induzida pelo veneno da serpente <i>N. annulifera</i> (VNa) em sangue humano	146
Figura 17 – Contribuição das SVMPs na inflamação induzida pelo veneno	

da <i>N. annulifera</i> (VNa) em sangue humano	148
Figura 18 – Contribuição do C3aR na inflamação induzida pelo veneno da <i>N. annulifera</i> (VNa) em sangue humano	149
Figura 19 – Influência do C5aR1 na inflamação induzida pelo veneno da serpente <i>N. annulifera</i> (VNa) em sangue humano	150
Figura 20 – Modulação da atividade do C5aR2 na inflamação induzida pelo veneno da <i>N. annulifera</i> (VNa) em sangue humano	151
Figura 21 – Ativação do Complemento <i>in vivo</i> induzida pelo veneno da serpente <i>N. annulifera</i> (VNa).....	153
Figura 22 - Participação do eixo C5a – C5aR1 nas reações locais	155
Figura 23 – O eixo C5a-C5aR1 elicit reações sistêmicas no envenenamento experimental moderado	157
Figura 24 – As alterações hematológicas no envenenamento experimental grave são induzidas via sinalização de C5a-C5aR1	158
Figura 25 – A LPA causada pelo envenenamento letal por <i>N. annulifera</i> (VNa) é dependente do eixo C5a-C5aR1	159
Figura 26 – O bloqueio do C5aR1 aumenta a produção de mediadores inflamatórios no envenenamento grave	160
Figura 27 –Representação esquemática da influência da ativação do sistema complemento na imunopatologia do envenenamento por <i>N. annulifera</i>	189

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	59
Tabela 2	63
Tabela 3	70

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	22
CAPÍTULO 1 – Caracterização dos componentes e das propriedades inflamatórias do veneno da serpente <i>Naja annulifera</i>	24
1.1 INTRODUÇÃO	24
1.1.1 Ofidismo e serpentes peçonhentas.....	24
1.1.1.1 Gênero <i>Naja</i>	25
1.1.2 <i>Naja annulifera</i>	27
1.1.2.1 Envenenamentos	28
1.1.3 Composição dos venenos de serpentes	30
1.1.4 Inflamação e envenenamentos	34
1.2 OBJETIVOS	44
1.2.1 Objetivos gerais	44
1.2.2 Objetivos específicos	44
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	45
1.3.1 Caracterização bioquímica do veneno da <i>N. annulifera</i>	45
1.3.1.1 Venenos	45
1.3.1.2 Dosagem proteica	45
1.3.1.3 Quantificação de endotoxina	45
1.3.1.4 Determinação do perfil eletroforético das proteínas do veneno	45
1.3.1.5 Análise do perfil de glicosilação das proteínas do veneno da <i>N. annulifera</i>	46
1.3.1.6 Western Blot para detecção do <i>Cobra Venom Factor</i> (CVF) no veneno da <i>N. annulifera</i>	46
1.3.2 Atividades Enzimático-Tóxicas	46
1.3.2.1 Atividade fosfolipásica	47
1.3.2.2 Atividade hialuronidásica	47
1.3.2.3 Atividade proteolítica	48
1.3.2.3.1 Atividade gelatinolítica	48
1.3.2.3.2 Atividade fibrinogenolítica.....	48
1.3.3 Declaração de ética humana	49
1.3.3.1 Ação do veneno de <i>N. annulifera</i> sobre o tempo de coagulação do plasma humano	49

1.3.3.2 Obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)	49
1.3.3.3 Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa).....	49
1.3.3.4 Tempo de Protrombina (TP).....	50
1.3.4 Ensaios "in vivo"	50
1.3.4.1 Animais.....	50
1.3.4.2 Atividade letal (Dose Letal 50%)	50
1.3.4.3 Resposta inflamatória local	50
1.3.4.3.1 Atividade edematogênica	50
1.3.4.3.2 Modulação farmacológica do edema.....	51
1.3.4.3.2.1 Preparo dos inibidores	51
1.3.4.3.2.2 Alvos e tratamentos	51
1.3.4.3.2.2.1 Mastócitos.....	51
1.3.4.3.2.2.2 Fosfolipase A ₂ citosólica (cFLA ₂)	51
1.3.4.3.2.2.3 Prostanóides.....	52
1.3.4.3.2.2.4 Leucotrienos	52
1.3.4.3.2.2.5 Fator ativador de plaquetas (PAF).....	52
1.3.4.4 Resposta inflamatória sistêmica	52
1.3.4.4.1 Determinação da dose subletal inflamatória.....	52
1.3.4.4.2 Alterações leucocitárias	53
1.3.4.4.3 Dosagem plasmática de mediadores inflamatórios	53
1.3.4.4.4 Análise histopatológica das patas e órgãos.....	54
1.3.5 Análise estatística.....	54
1.4 RESULTADOS	55
1.4.1 O veneno da <i>N. annulifera</i> é composto por diversas proteínas	55
1.4.2 As proteínas do veneno apresentam atividades enzimático-tóxicas.....	57
1.4.2.1 Distúrbios hemostáticos são elicitados pelo veneno da <i>N. annulifera</i>	59
1.4.3 O veneno da <i>N. annulifera</i> causa reações hiperagudas <i>in vivo</i>	60
1.4.3.1 Doses altas do veneno da serpente <i>N. annulifera</i> são letais	60
1.4.3.2 O veneno da <i>N. annulifera</i> causa inflamação local hiperaguda	61
1.4.3.2.1 O edema induzido pelo veneno da <i>N. annulifera</i> é influenciado por mastócitos e mediadores lipídicos.....	64
1.4.3.3 Reações inflamatórias sistêmicas são observadas em modelo murino de envenenamento moderado.....	66
1.4.3.4 Envenenamento experimental grave por <i>N. annulifera</i> provoca	

hiperinflamação sistêmica e pulmonar	67
1.5 DISCUSSÃO	71
1.6 CONCLUSÃO.....	84

CAPÍTULO 2 - Contribuição do sistema complemento na imunopatologia

do envenenamento por <i>N. annulifera</i>	85
2.1 INTRODUÇÃO	85
2.1.1 Sistema complemento	85
2.1.2 Rotas intrínsecas de ativação do Complemento	86
2.1.3 Rotas extrínsecas de ativação do Complemento.....	92
2.1.4 Anafilatoxinas e seus receptores.....	97
2.1.4.1 Receptores canônicos.....	98
2.1.4.1.1 C3aR	98
2.1.4.1.2 C5aR1	101
2.1.4.1.3 C5aR2	107
2.1.4.2 Receptores não canônicos	109
2.1.4.2.1 PAR1 e PAR4.....	109
2.1.5 Complemento e envenenamentos por serpentes	110
2.2 OBJETIVOS	118
2.2.1 Objetivos gerais	118
2.2.2 Objetivos específicos.....	118
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	120
2.3.1 Ação do veneno da <i>N. annulifera</i> sobre o Complemento humano	120
2.3.1.1 Obtenção do Soro Humano Normal (SHN) e tratamentos	120
2.3.1.2 Ensaio hemolítico	120
2.3.1.2.1 Via alternativa.....	120
2.3.1.2.2 Via clássica	121
2.3.1.3 ELISA.....	121
2.3.1.3.1 Via das lectinas	121
2.3.1.4 Análise da geração de anafilatoxinas e do complexo terminal do complemento solúvel (sTCC) no SHN.....	122
2.3.1.4.1 Anafilatoxinas.....	122
2.3.1.4.2 Análise da formação de sTCC no SHN	123
2.3.1.5 Ação do veneno sobre proteínas do Complemento humano.....	123

2.3.1.5.1 Análise da clivagem de componentes solúveis do complemento humano.....	123
2.3.1.6 Modelo <i>ex vivo</i> de inflamação em sangue total humano	124
2.3.1.6.1 Influência do Complemento nos eventos inflamatórios no modelo <i>ex vivo</i> de sangue total humano	125
2.3.1.6.1.1 Preparo dos inibidores	125
2.3.1.6.1.2 Alvos e tratamentos	125
2.3.1.6.1.2.1 Influência de C3/C3b.....	125
2.3.1.6.1.2.2 Contribuição do eixo C3a-C3aR.....	126
2.3.1.6.1.2.3 Influência do eixo C5a/C5adesArg-C5aR1	126
2.3.1.6.1.2.4 Modulação do eixo C5a/C5adesArg-C5aR2	126
2.3.1.6.1.2.5 Participação das SVMPs.....	126
2.3.1.6.1.3 Análise da geração de anafilatoxinas e sTCC nos modelos de sangue total e clivagem direta	127
2.3.1.6.1.4 Quantificação de mediadores lipídicos no sangue total.....	127
2.3.1.6.1.4.1 LTB ₄	127
2.3.1.6.1.4.2 PGE ₂	128
2.3.1.6.1.4.3 TXB ₂	128
2.3.1.6.1.5 Dosagem de interleucinas no sangue total.....	129
2.3.1.6.1.6 Quantificação de quimiocinas no sangue total	129
2.3.1.7 Ativação sistêmica do Complemento <i>in vivo</i>	129
2.3.1.7.1 Envenenamento sistêmico experimental	129
2.3.1.7.2 Determinação da atividade residual.....	130
2.3.1.7.2.1 Via alternativa.....	130
2.3.1.7.2.2 Via das lectinas.....	130
2.3.1.7.2.3 Via Clássica	131
2.3.1.7.3 Análise da geração sistêmica de C5a.....	131
2.3.1.8 Contribuição do eixo C5a-C5aR1 no envenenamento experimental.....	132
2.3.1.8.1 Efeito do bloqueio do C5aR1 nas reações locais.....	132
2.3.1.8.1.1 Impacto do bloqueio do C5aR1 no edema.....	132
2.3.1.8.1.2 Obtenção de tecidos e extração de mediadores	132
2.3.1.8.1.3 Contribuição do C5aR1 na produção de quimiocinas e mediadores lipídicos nas patas.....	133

2.3.1.8.1.4 Contribuição do C5aR1 para a migração de neutrófilos para o tecido subcutâneo	134
2.3.1.8.2 Efeito da inibição do C5aR1 nas reações sistêmicas.....	134
2.3.1.8.2.1 Alterações leucocitárias	134
2.3.1.8.2.2 Dosagem plasmática de Interleucinas e Quimiocinas	135
2.3.1.8.2.3 Contribuição do eixo C5a-C5aR1 para a lesão pulmonar aguda.....	135
2.3.1.8.2.4 Contribuição do eixo C5a-C5aR1 para a letalidade associada ao envenenamento	135
2.3.3 Análise estatística.....	136
2.4 RESULTADOS	137
2.4.1 O veneno de <i>N. annulifera</i> induz ativação do Complemento humano <i>in vitro</i>	137
2.4.2 SVMP e SVSP do veneno de <i>N. annulifera</i> promovem a clivagem de componentes solúveis do complemento humano	139
2.4.3 As toxinas do veneno de <i>N. annulifera</i> causam tempestade de mediadores inflamatórios no modelo <i>ex vivo</i> de sangue total humano.....	141
2.4.3.1 Contribuição de C3/C3b	145
2.4.3.2 Contribuição das SVMPs.....	147
2.4.3.3 Influência do C3aR.....	149
2.4.3.4 Participação do C5aR1	150
2.4.3.5 Modulação do C5aR2	151
2.4.4 O veneno de <i>N. annulifera</i> induz complementopatia sistêmica em modelos de envenenamento moderado e grave	152
2.4.5 A ativação do eixo C5a-C5aR1 influencia o desenvolvimento das reações locais.....	154
2.4.6 Reações inflamatórias sistêmicas no envenenamento moderado são dependentes da ativação do eixo C5a-C5aR1	156
2.4.7 A ativação do C5aR1 é responsável por alterações hematológicas e desenvolvimento de Lesão Pulmonar Aguda no envenenamento experimental grave	158
2.4.8 A interrupção da sinalização via C5aR1 não protege os animais da produção sistêmica de mediadores inflamatórios e da letalidade associada ao envenenamento grave	160
2.5 DISCUSSÃO	161
2.6 CONCLUSÃO.....	190

2.7 CONCLUSÕES GERAIS	191
REFERÊNCIAS	192
APÊNDICE A	230
APÊNDICE B	231
APÊNDICE C	232
ANEXO A	233
ANEXO B	234
ANEXO C	235
ANEXO D	236
ANEXO E	237
ANEXO F	238
ANEXO G	239
ANEXO H	240
ANEXO I	241

PREFÁCIO

O ofidismo na África Subsaariana é um grave problema de saúde pública caracterizado por elevados índices de morbidade e mortalidade. Embora de grande importância, pouca atenção é dada ao ofidismo pelas autoridades locais. A falta de recursos humanos e financeiros são agravantes no continente que contribuem para a escassez na geração de conhecimento sobre os venenos e produção de soro contra eles. Dentro deste contexto, o Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, através do projeto “*Venenos animais e sua importância para saúde pública no Brasil e África: Uma proposta de investigação e produção de conhecimento integrado*” tem se dedicado ao estudo de venenos de serpentes africanas de importância médica e produção de soros anti-veneno específicos.

Assim, levando-se em consideração que (i) a serpente *N. annulifera* provoca acidentes graves, (ii) que os componentes e o modo de ação do seu veneno foram pouco estudados, considera-se que são relevantes estudos que venham caracterizar esses aspectos e possam servir como base para a proposição de novas estratégias terapêuticas para este envenenamento.

Para melhor compreensão da temática do trabalho, a presente tese foi dividida em dois capítulos: o Capítulo I apresenta a caracterização dos componentes do veneno e do processo inflamatório local e sistêmico decorrente desse envenenamento; o Capítulo II descreve o impacto da ativação do sistema complemento nas reações locais e sistêmicas provocadas pelo veneno da *N. annulifera*.

Ao final da tese constam, em dois apêndices (**B** e **C**), as publicações de artigos referentes à caracterização dos componentes do veneno da *N. annulifera* e da fisiopatologia do envenenamento (**B**); a contribuição do sistema complemento nas reações locais e sistêmicas associadas ao envenenamento (**C**).

INTRODUÇÃO GERAL

A inflamação é uma resposta adaptativa dos tecidos diante de diferentes estímulos, tais como, lesões, distúrbios metabólicos e infecções. Se aguda e controlada, a resposta inflamatória remove o estímulo inicial, promovendo reparo e retorno do tecido a sua homeostase. No entanto, se descontrolada ou crônica, tal resposta adquire características patológicas (MEDZHITOV, 2008; 2010; OKIN & MEDZHITOV, 2012).

As doenças inflamatórias constituem um grupo complexo e heterogêneo de enfermidades que afetam mais de 10% da população mundial. Embora de importância significativa, os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de tais doenças não foram completamente elucidados, dificultando, desta forma, o estabelecimento de condutas terapêuticas ideais para essas patologias (CENTER OF RESEARCH IN INFLAMMATORY DISEASES, 2021). Essas doenças geralmente são caracterizadas por danos teciduais e disfunção de órgãos (KESHARI et al., 2017; OKIN & MEDZHITOV, 2012; VAN DE VEERDONK et al., 2017), sendo muitas vezes incapacitantes (EL-GALAWAY et al., 2010; OKIN & MEDZHITOV, 2012; SMOLEN et al., 2018; PFIZER, 2021) e responsáveis por óbitos, tal como observado em casos de choque séptico (KESHARI et al., 2017; van den VEERDONK et al., 2017) e envenenamentos por animais peçonhentos (BARROS DOS REIS, 2020; SARTIM et al., 2020; ZOCCAL et al., 2016; 2018; 2019; WHO, 2019).

Os envenenamentos por animais peçonhentos são um problema de saúde pública em várias regiões do mundo, sendo responsáveis por elevados índices de morbidade e mortalidade (CARDOSO et al., 2009; KASTURIRATNE et al., 2008; WHO, 2019). Estes acidentes, especialmente envolvendo serpentes peçonhentas, foram incluídos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na lista de doenças tropicais negligenciadas, as quais acometem, na maioria das vezes, populações pobres que vivem em áreas rurais. Tais acidentes apresentam características clínicas diversas e complexas, uma vez que podem promover lesão tecidual, distúrbios hemostáticos e cardiovasculares, hemorragias e parada respiratória, sendo tais patologias responsáveis pela morte de mais de 80.000 pessoas por ano. Além disso, tais acidentes são responsáveis por mais de 300.000 casos de lesões incapacitantes e amputações, as quais têm forte impacto socioeconômico (GUTIÉRREZ et al., 2017; WHO, 2019).

Devido à relevância dos acidentes com serpentes peçonhentas, a OMS (2019) estabeleceu uma série de estratégias para reduzir em 50% a morbidade e a

mortalidade associadas a tais acidentes, até 2030. Além disso, esse plano inclui o investimento no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para os envenenamentos. Desta forma, são cruciais os estudos que caracterizem de maneira detalhada os aspectos fisiopatológicos dos diferentes envenenamentos.

Nos últimos anos foi demonstrando o papel crucial de componentes do sistema imune, tais como os mastócitos, inflamassomas e mediadores lipídicos, para a proteção ou lesão e/ou morte em diferentes envenenamentos (ANDERSON et al., 2018; BARROS DOS REIS, 2020; METZ et al., 2006; PALM & MEDZHITOV, 2013; SARTIM et al., 2020; ZOCCAL et al, 2016; 2018; 2019), fato que torna alguns eventos inflamatórios potenciais alvos terapêuticos. Assim, o presente estudo teve como objetivo determinar o potencial inflamatório do veneno da serpente *Naja annulifera* e avaliar a contribuição do sistema complemento na imunopatologia das reações locais e sistêmicas associadas a este envenenamento.

CAPÍTULO 1 – Caracterização dos componentes e das propriedades inflamatórias do veneno da serpente *Naja annulifera*

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Ofidismo e serpentes peçonhentas

Acidentes envolvendo picadas por serpentes peçonhentas constituem um problema de saúde pública em áreas rurais de países tropicais e subtropicais da África, América Latina, Ásia e Oceania (CHIPPAUX et al., 2019; GUTIÉRREZ et al., 2017; HALILU et al., 2019; WHO, 2019).

Estimativas apontam que no mundo ocorram, por ano, cerca de 5.400.000 picadas, 2.700.000 envenenamentos e 138.000 mortes (GUTIÉRREZ et al., 2014; 2017; WHO, 2019).

Entre as regiões mais afetadas pelo ofidismo destaca-se a África Subsaariana (CHIPPAUX, 2011; KASTURIRATNE et al., 2008). Estudos demonstram que só nesta região acontecem, por ano, mais de 500.000 acidentes (CHIPPAUX et al., 2019), sendo que destes, 30.000 evoluem para óbito e 15.000 para lesões incapacitantes, o que inclui amputações de membros. Além disso, mais de 50.000 casos de transtornos psicológicos (estresse pós-traumático) têm sido diagnosticados em indivíduos pós-envenenamento (CHIPPAUX et al., 2019; GUTIÉRREZ et al., 2017; HALILU et al., 2019; WHO, 2019).

Este índice elevado de acidentes na África Subsaariana se deve ao fato da maioria da população desta região viver em condições precárias de moradia e trabalhar em atividades rurais, fatores que aumentam a susceptibilidade aos acidentes e que fazem do ofidismo também uma doença de cunho ocupacional (CHIPPAUX et al., 2019). Somado a isso, as lesões incapacitantes, as amputações de membros e os transtornos do estresse pós-traumático influenciam, de maneira significativa, a vida destas pessoas, uma vez que elas ficam impossibilitadas de trabalhar, transformando, desta forma, o ofidismo em uma doença de alto impacto socioeconômico (CHIPPAUX et al., 2019; GUTIÉRREZ et al., 2017; HALILU et al., 2019; WHO, 2019).

Outros agravantes para o ofidismo na África Subsaariana são a distância e a precariedade dos serviços de saúde, o que inclui falta de pessoal treinado e qualidade e/ou falta de soro anti-veneno (CHIPPAUX et al., 2019; GUTIÉRREZ et al., 2017; HALILU et al., 2019; WHO, 2019).

A soroterapia é o único tratamento capaz de neutralizar a ação dos venenos, sendo esta baseada na administração do soro anti-veneno, rico em anticorpos específicos contra as toxinas dos venenos (GUTIÉRREZ et al., 2014; 2017; TAMBOURGI, 2010). A eficácia de tal terapia tem sido demonstrada na neutralização das reações sistêmicas; no entanto, parece não apresentar capacidade de controlar as reações locais dos envenenamentos (GUTIÉRREZ et al., 2006).

Estima-se que existam no mundo cerca de 3709 espécies de serpentes (THE REPTILE DATABASE, 2021a), sendo que destas cerca de 15% são capazes de provocar acidentes graves envolvendo humanos (GOLD et al., 2002). As serpentes peçonhentas são encontradas em quatro famílias: Viperidae, Colubridae, Atractaspididae e Elapidae (POUGH et al., 2008). No continente africano, as serpentes da família Viperidae e Elapidae (WHO, 2010b) são as que mais provocam acidentes.

A família Elapidae é composta de 377 espécies, divididas em 52 gêneros (THE REPTILE DATABASE, 2021b). As espécies desta família estão distribuídas em regiões tropicais e temperadas da África, América, Ásia e Austrália, sendo encontradas em ambientes terrestres e aquáticos (POUGH et al., 2008; SLOWINSKI et al., 1997; YEE et al., 2003).

Uma característica importante da família Elapidae é que todos os seus membros são capazes de provocar envenenamentos graves em humanos. Além disso, os venenos destas serpentes apresentam uma característica em comum, a presença de neurotoxinas potentes. Tais toxinas são importantes na alimentação e defesa destas serpentes (TAKACS et al., 2004) e responsáveis por uma característica peculiar, observada na grande maioria dos envenenamentos por Elapídeos, a parada respiratória (BRAZIL, 1987; GUTIÉRREZ et al., 2017; WHO, 2010b).

Dentre os gêneros das serpentes da família Elapidae, de importância em saúde pública, o gênero *Naja* merece grande destaque devido ao número e a gravidade dos acidentes que estas serpentes provocam (GUTIÉRREZ et al., 2006; KOEN e WILLIAMS, 2011; PETRAS et al., 2010; WHO, 2010b).

1.1.1.1 Gênero *Naja*

O gênero *Naja* é composto por 31 espécies, sendo que destas, 11 habitam o continente Asiático e 20 o continente Africano (THE REPTILE DATABASE, 2021c; WALLACH et al., 2009). Tais serpentes são também conhecidas como Cobras e divididas em dois grupos: Cobras cuspidas (*spitting cobras*) e não cuspidas (*non-*

spitting cobras) (BERTHÉ et al., 2009; BROADLEY e WÜSTER, 2004; WALLACH et al., 2009).

As “*spitting cobras*” possuem adaptações na cavidade oral para cuspir veneno quando se sentem ameaçadas (BERTHÉ et al., 2009). Estas serpentes podem cuspir veneno a uma distância de até 3 metros do predador e/ou vítima, mirando a face e os olhos (BERTHÉ et al., 2009). O contato do veneno, com os olhos, pode provocar oftalmia, resultando em conjuntivite química extremamente dolorosa, com lacrimação e inchaço das pálpebras, ulceração da córnea e uveíte, levando a cegueira permanente do indivíduo (GUTIÉRREZ et al., 2017).

As espécies cuspeiras são *Naja ashei*, *N. atra*, *N. kaouthia*, *N. katiensis*, *N. mandalayensis*, *N. mossambica*, *N. naja*, *N. nigricincta*, *N. nigricollis*, *N. nubiae*, *N. oxyana*, *N. pallida*, *N. philippinensis*, *N. sagittifera*, *N. samarensis*, *N. siamensis*, *N. sputatrix*, *N. sumatrana* (BERTHÉ et al., 2009; WALLACH et al., 2009). Estas, além de serem chamadas de cuspeiras, são também conhecidas como cobras citotóxicas pelo fato de seus venenos provocarem lesões necróticas na região da picada (MÉNDEZ et al., 2011; WHO, 2010b).

O grupo de “*non-spitting cobras*” inclui *N. anchietae*, *N. annulata*, *N. annulifera*, *N. arábica*, *N. cristyi*, *N. haje*, *N. melanoleuca*, *N. multifasciata*, *N. nívea* e *N. senegalensis* (BROADLEY e WÜSTER, 2004; WALLACH et al., 2009). Estas serpentes são conhecidas como cobras não cuspeiras neurotóxicas, uma vez que os acidentes com estas, geralmente, provocam quadro neurotóxico “clássico”, que envolve parada respiratória fatal, cerca de 2 a 16 horas após a picada (WHO, 2010b).

Na prática clínica, tal separação entre espécies citotóxicas e neurotóxicas não auxilia, em nada, o estabelecimento de estratégias terapêuticas ideais, uma vez que os venenos de algumas espécies de *Naja* podem provocar lesão local acompanhada de distúrbios hemostáticos, hemorragias e neurotoxicidade (CHIPPAUX, 2013; MITRAKUL et al., 1984; WHITE, 2016). Somado a isto, o fato de várias espécies do gênero *Naja* terem sido pouco estudadas, até o momento, dificulta o estabelecimento de condutas terapêuticas ideais para os envenenamentos. Neste contexto, o veneno da serpente *N. annulifera*, de importância médica na África Subsaariana, tem sido pouco investigado.

1.1.2 *Naja annulifera*

N. annulifera é uma espécie de serpente peçonhenta que ocorre em alguns países da África Subsaariana (**Fig. 1A**), como África do Sul, Botsuana, Malawi, Moçambique, Namíbia, Suazilândia, Zâmbia e Zimbábue (BROADLEY e WÜSTER, 2004; WESTRIN e RAHMEL, 2011).

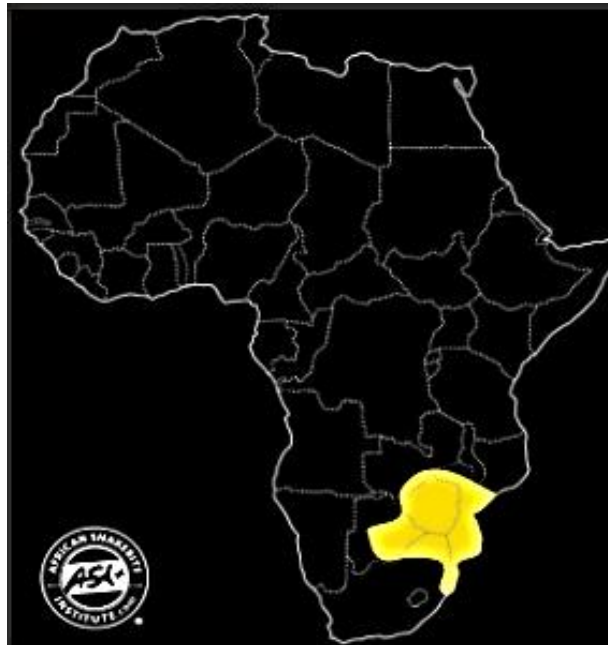


Figura 1- Mapa delimitando, em amarelo, a área de ocorrência de *N. annulifera* na África Subsaariana (<https://www.africansnakebiteinstitute.com/snake/african-snakes-snouted-cobra/>).

Esta serpente se adapta facilmente aos mais variados ambientes, uma vez que possui uma dieta generalista. Dentre os ambientes em que é encontrada estão as savanas, desertos, vegetações densas e áreas rochosas. Além disto, também é encontrada em locais próximos a habitações humanas, onde se encontram suas principais presas, os ratos (WESTRIN e RAHMEL, 2011). Além dos ratos, esta serpente se alimenta de outros pequenos vertebrados, incluindo sapos, lagartos e serpentes da sua e de outras espécies. Alimenta-se também de galinhas, pintos e ovos, sendo considerada uma praga por avicultores (CLINICAL TOXINOLOGY RESOURCERS, 2021; WESTRIN e RAHMEL, 2011).

Os indivíduos desta espécie são geralmente grandes, podendo alcançar 2,6 metros de comprimento. Apresentam cabeça grande e larga e focinho levemente curvado e pontiagudo, características que fazem com que a *N. annulifera* seja popularmente chamada de “*Snouted Cobra*” (cobra de focinho) (BROADLEY e WÜSTER, 2004; WESTRIN e RAHMEL, 2011).

Esta espécie apresenta diferentes padrões de coloração durante a vida (Fig. 2). Os jovens apresentam coloração amarelada ou esverdeada, com manchas escuras espalhadas pelo corpo, e uma faixa larga escura envolvendo o pescoço. Na fase adulta, os animais perdem a faixa escura, que envolve o pescoço, e o corpo se torna escurecido por completo, alcançando tons como preto, marrom ou cinza escuro.

Em algumas fases da vida, os indivíduos desta espécie, principalmente aqueles encontrados na África do Sul, apresentam faixas brancas ou amareladas em todo o corpo, que se alternam com as regiões de coloração escura, citadas anteriormente. Esta fase é conhecida como “*Banded Phase*” e, devido a ela, tal serpente adquire outro nome popular, “*Banded Cobra*” (cobra com faixas) (BROADLEY e WÜSTER, 2004; WESTRIN e RAHMEL, 2011).



Figura 2 - Espécimes de *N. annulifera* na África Subsaariana apresentando diferentes padrões de coloração (<https://www.africansnakebiteinstitute.com/snake/african-snakes-snouted-cobra/>).

1.1.2.1 Envenenamentos

Acidentes por *N. annulifera* ocorrem pelo contato constante da serpente com humanos, uma vez que (i) sua presa principal, os ratos, são encontrados, geralmente, próximos às habitações humanas; (ii) tal serpente é mantida em cativeiro

por diferentes centros de pesquisa e (iii) várias pessoas têm esta serpente como animal de estimação (WESTRIN e RAHMEL, 2011).

Os indivíduos acidentados sentem dor intensa no local da picada, seguida por queimação local, que se irradia para o corpo inteiro. Além disso, os pacientes apresentam tontura e ptose palpebral (WESTRIN e RAHMEL, 2011). Os indivíduos envenenados podem evoluir para parada respiratória, seguida de morte entre 2 e 16 horas após a picada, caso não haja tratamento. A soroterapia é o tratamento recomendado, sendo que em casos de parada respiratória a ventilação mecânica é indicada (ALVES, 1960; BLAYLOCK, 1982; CLINICAL TOXINOLOGY RESOURCERS, 2021; ENGELBRECHT, 2012; STROVER, 1961; WHO, 2010b; WESTRIN e RAHMEL, 2011). No entanto, a soroterapia e a ventilação mecânica nem sempre fazem a diferença, uma vez que óbitos têm ocorrido após tais condutas terapêuticas (ALVES, 1960; BLAYLOCK, 1982; HARPER & FRY, 2021; STROVER, 1961).

Existem relatos na antiga província de Transvaal, na África do Sul, de indivíduos acidentados pela *N. annulifera* que apresentaram distúrbios hematológicos e necrose no local da picada (WESTRIN e RAHMEL, 2011). Nesta mesma região foi reportado o caso de um indivíduo, envenenado pela *N. annulifera*, que desenvolveu reação anafilática instantânea e letal devido à sensibilização prévia ao veneno (HARPER & KEEPER, 2002).

Dados epidemiológicos, a respeito da clínica e distribuição dos acidentes com humanos, são escassos. Acidentes por *N. annulifera* parecem ser extremamente comuns na África do Sul e no Zimbábue, superando os casos de envenenamentos por outros Elapídeos. No passado, muitos dos acidentes atribuídos à *N. haje*, na África Subsaariana, na verdade, parecem ter sido provocados pela *N. annulifera*, uma vez que esta era uma subespécie de *N. haje*, sendo que as duas foram elevadas a espécies independentes por Ron Broadley (1995). Além do que, a *N. haje* não ocorre nas mesmas regiões que a *N. annulifera* (RON BROADLEY, 1995).

Além dos acidentes com humanos, dados epidemiológicos apontam que 60% dos acidentes ofídicos com cães, na África do Sul, são causados pela *N. annulifera* (LOBETTI e JOUBERT, 2004). Ainda, neste estudo foi demonstrado que cães envenenados por esta serpente apresentam alterações hematológicas, incluindo leucocitose com neutrofilia (LOBETTI e JOUBERT, 2004). Langhorn e colaboradores (2013) demonstraram que 70% dos cães envenenados pela *N. annulifera* apresentavam

aumento nos níveis séricos de Proteína C Reativa (PCR) e lesão cardíaca caracterizada pelo aumento nos níveis circulantes de Troponina Cardíaca I. Nagel et al. (2014) observaram que cães envenenados por *N. annulifera*, além de terem aumento nos níveis plasmáticos da PCR, apresentavam distúrbios hemostáticos, caracterizados por aumento de Tempo de Protrombina (TP) e Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) e redução nos níveis plasmáticos de antitrombina.

Embora de importância médica, humana e veterinária, os componentes e ação do veneno da *N. annulifera* foram pouco caracterizados até o momento. Algumas proteínas já foram isoladas, purificadas e sequenciadas a partir deste veneno, e os resultados demonstraram grande homologia destas proteínas com as “*Three Finger Toxins*” (3FTX) presentes em venenos de diferentes serpentes da família Elapidae (HEUS et al., 2013; JOUBERT, 1975a, b, c; JOUBERT, 1976; WEISE et al., 1973).

1.1.3 Composição dos venenos de serpentes

Venenos de serpentes são misturas complexas de componentes que possuem uma gama de ação tanto nas presas, como em vítimas humanas (CHIPPAUX et al., 1991; GUTIÉRREZ, 2002; KEMPARAJU e GIRISH, 2005). Estes componentes apresentam diferentes naturezas bioquímicas, o que inclui íons, aminoácidos livres, peptídeos, nucleotídeos, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas e proteínas, sendo as proteínas os componentes de maior relevância biológica nos envenenamentos (BARRAVIERA, 1999a; KANG et al., 2011). Muitas dessas moléculas possuem, como principal função biológica, imobilizar ou promover a morte da presa e ajudar no processo de digestão (CHIPPAUX et al., 1991).

Entre as principais classes de proteínas tóxicas, encontradas nos venenos de serpentes, destacam-se as Hialuronidases, Fosfolipases A₂ (FLA₂), Metaloproteinases (SVMP), Serinoproteinases (SVSP) e as “*Three Finger Toxins*” (3FTX) (GUTIÉRREZ et al., 2017). Esta diversidade na composição dos venenos é responsável pela ampla gama de efeitos biológicos e patológicos que os venenos produzem nas presas e vítimas, tais como, distúrbios cardiovasculares e hemostáticos, neurotoxicidade, lesão tecidual, inflamação e dor (GUTIÉRREZ et al., 2017).

Hialuronidases: a difusão das toxinas do veneno, do sítio de inoculação para a circulação, é essencial para o sucesso do envenenamento. Para tanto, é necessário que ocorra degradação de componentes da matriz extracelular (MEC), como proteínas e glicosaminoglicanos (GAGs) (KEMPARAJU e GIRISH, 2005). Os GAGs, juntamente

com outros componentes da MEC, formam um gel que é importante em diversos processos morfofuncionais. Estes componentes da MEC possuem certa viscosidade, característica que retarda a penetração de partículas estranhas e microrganismos nos tecidos. Entre os GAGs, alvo de fatores de virulência de algumas espécies de bactérias e de algumas enzimas de venenos animais, destaca-se o ácido hialurônico (KEMPARAJU e GIRISH, 2005; KOLAR et al., 2015; MAKRIS et al., 2004).

O ácido hialurônico é degradado em pequenos fragmentos por enzimas conhecidas como hialuronidases. As hialuronidases são encontradas em venenos de serpentes, lagartos e artrópodes e sua ação contribui para a difusão das toxinas dos venenos, do tecido onde foram inoculadas para a circulação. Estas enzimas também são conhecidas como fator de espraiamento (KEMPARAJU e GIRISH, 2005).

Fosfolipases A₂: um grupo de enzimas de relevância nos envenenamentos e em processos fisiológicos e patológicos são as FLA₂. As FLA₂ pertencem a uma família de enzimas que catalisa a hidrólise de fosfolipídios na ligação acil-éster, na posição *sn*-2, liberando ácidos graxos como ácido araquidônico, e lisofosfolipídeos (BURKE e DENNIS, 2009a,b; MOUCLIS & DENNIS, 2019; REYES, et al., 2010; PIROLLA et al., 2011). De acordo com Mouchlis e Dennis (2019), as FLA₂ são divididas em 16 grupos distintos, que podem ser agrupados em seis classes principais, e, dentre estas tem-se a classe das FLA₂ secretadas (sFLA₂s), que estão presentes nos venenos de várias espécies de serpentes.

Os estudos das sequências destas enzimas em venenos têm permitido dividi-las em dois subtipos: as que possuem aspartato/histidina na posição 49 e as que apresentam lisina nesta mesma posição. Esta diferença tem implicações na atividade catalítica da enzima, sendo que o aspartato/histidina na posição 49 possui papel central na capacidade destas enzimas em unirem-se ao cálcio, íon essencial para sua atividade catalítica. A substituição de aspartato/histidina por lisina faz com que a FLA₂ seja incapaz de se ligar ao cálcio e, com isso, a atividade catalítica é abolida (GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2004; BURKE e DENNIS, 2009a,b).

As FLA₂ de veneno ofídico exibem diversas atividades, tais como letal (BATH e GOWDA, 1991; CHWETZOFF et al., 1989a), inflamatória (CIRINO et al., 1989; VADAS et al., 1989; ZULIANI et al., 2005), pró- e anticoagulante (BRAUD et al., 2000; STEFANSSON et al., 1990; TENG et al., 1984), hiperalgésica (CHACUR et al., 2003; 2004), citotóxica (ARCE-BEJARANO et al., 2014; CHEN et al., 2010; CHWETZOFF et al., 1989b; GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2004;

MORA et al., 2005; MORA-OBANDO et al., 2014) e neurotóxica (β -neurotoxinas/neurotoxinas pré-sinápticas) (RIGONI et al., 2004).

Proteases: as proteases compõem um grupo de enzimas de grande importância nos venenos e, entre as principais classes destes componentes identificadas em venenos de serpentes, destacam-se as SVMP e SVSP. As **SVMPs** são representadas por uma série de enzimas dependentes de Zn^{2+} , filogeneticamente relacionadas às metaloproteinases da família das ADAMs (do inglês: *A Disintegrin And Metalloprotease*) e ADAMTS (do inglês: *ADAM with Thrombospondin type-1 motif*) de mamíferos (KANG et al., 2011; TAKEDA et al., 2012; TAKEDA, 2016; GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017) e, junto com estas, constituem o “clã” das adamolisinas/reprolisinas.

Em mamíferos, as metaloproteinases são caracterizadas como proteínas transmembrana ou glicoproteínas solúveis que influenciam uma série de funções, incluindo migração, adesão e sinalização celular; “shedding” de formas latentes de interleucinas e fatores de crescimento; morfogênese, remodelamento tecidual e coagulação (TAKEDA, 2016). Nos venenos ofídicos, tais enzimas parecem ter surgido por meio de recrutamento, duplicação e neofuncionalização de genes ancestrais, relacionados as ADAMs, para as glândulas de veneno (TAKEDA, 2016).

As SVMPs são divididas em três grupos principais (PI, PII e PIII), de acordo com seus respectivos domínios estruturais. As diferenças em suas estruturas contribuem para a diversidade de atividades que estas moléculas apresentam nos envenenamentos (TAKEDA et al., 2012; TAKEDA, 2016).

Estas moléculas promovem alterações no sistema hemostático por meio de vários mecanismos como inibição da agregação plaquetária, degradação de fibrinogênio e fibrina, indução da expressão do fator tecidual em leucócitos, ativação da protrombina e do fator X (BRAUD et al., 2000; KANG et al., 2011; KINI, 2011; MATSUI et al., 2000; SARTIM et al., 2015; TAKEDA et al., 2012; TAKEDA, 2016; YAMASHITA et al., 2014).

A ação das SVMPs sobre a hemostasia e sistema vascular (WU e HUANG, 2003; TANJONI et al., 2010) contribui para a hemorragia local e sistêmica observada nos envenenamentos (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; KANG et al., 2011; ROCHA e FURTADO, 2007).

Além dos distúrbios de coagulação, as SVMPs são também capazes de degradar a matriz extracelular dos tecidos (HERRERA et al., 2015) e a membrana

basal dos vasos (FREITAS-DE-SOUSA et al., 2017), provocar a morte de células endoteliais (TANJONI et al., 2010), lesão tecidual (BALDO et al., 2010; HERRERA et al., 2015; GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017), e inflamação (FARSKY et al., 2000; GALLAGHER et al., 2005; CLISSA et al., 2006; LOPES et al., 2009; SARTIM et al., 2015).

As **SVSPs** são enzimas que pertencem ao “*clã*” PA (do inglês: “*Proteases of mixed nucleophile, superfamily A*”) de proteases da família S1 da Quimiotripsina. Estas enzimas apresentam um mecanismo de catálise que envolve um resíduo de serina¹⁹⁵, altamente reativo estabilizado por um resíduo de histidina⁵⁷, e um resíduo de ácido aspártico¹⁰² (tríade catalítica), os quais são altamente conservados. Quanto a origem, é proposto que as SVSPs evoluíram de calicreínas glandulares. Estas enzimas apresentam alta especificidade para substratos macromoleculares e, diferente das serinoproteinases de mamíferos, as SVSPs não são susceptíveis a inibição pelas Serpinas (inibidores de serinoproteinases) endógenas (AMORIM et al., 2018; GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MEGALE et al., 2019).

Entre as ações das SVSPs nos envenenamentos destacam-se os efeitos sobre a hemostasia, uma vez que são capazes de clivar o fibrinogênio (AMORIM et al., 2018; MEGALE et al., 2019) e coagular o plasma e soluções de fibrinogênio humano (AMORIM et al., 2018), propriedades que permitem nomeá-las como “*Thrombin-like*”. No entanto, diferente da Trombina, as SVSPs promovem a geração de coágulos alterados, uma vez que não ativam o fator XIII da cascata de coagulação, evento molecular fundamental para a estabilização dos coágulos (AMORIM et al., 2018). As SVSPs também são capazes de inibir a agregação plaquetária (AMORIM et al., 2018) e promover, diretamente ou via plasminogênio, a destruição de coágulos (ZANG et al., 1995).

As SVSPs têm se mostrado moléculas multifuncionais nos envenenamentos, uma vez que além de promover disfunções hemostáticas, elas podem causar hipotensão, dor e inflamação, uma vez que são capazes de hidrolisar o cininogênio e a proteína C3 do sistema complemento promovendo, respectivamente, a geração de bradicinina (MEGALE et al., 2019) e da anafilatoxina C3a (YAMAMOTO et al., 2002).

“**Three Finger Toxins**”: as 3FTXs são proteínas globulares de baixa massa molecular, sem atividade enzimática, encontradas principalmente nos venenos de serpentes da Família Elapidae (CHIEN et al., 1994; GOPALAKRISHNAKONE et

al., 2017; KONSHINA et al., 2011; MUNAWAR et al., 2018; OSTHOFF, 1990). O nome deste grupo de toxinas é derivado de sua estrutura proteica caracterizada pela presença de três alças, com formato de dedos, que se estendem a partir de um núcleo hidrofóbico que é estabilizado por pontes dissulfeto. No entanto, apesar de apresentarem estrutura protéica comum, estas toxinas exibem diversas atividades farmacológicas, tendo como alvos uma variedade de receptores, canais iônicos e alguns processos fisiológicos (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017).

As 3FTXs são classificadas de acordo com seu modo de ação em neurotoxinas e cardiotoxinas (citotoxinas) (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018).

As neurotoxinas da família das 3FTXs são também conhecidas como toxinas curaremiméticas (α -neurotoxinas, neurotoxinas pós-sinápticas) e muscarínicas. Elas podem ativar ou bloquear receptores nicotínicos e muscarínicos para acetilcolina, nas junções neuromusculares, desta forma interferindo na neurotransmissão provocando parada respiratória e distúrbios cardiocirculatórios (BRAZIL, 1987; SLOWINSK et al., 1997; YEE et al., 2003; TAKACS et al., 2004; GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018).

As citotoxinas agem inserindo-se em membranas celulares e provocando lise celular (CHIEN, et al., 1994; MUNAWAR et al., 2018). Além disso, exibem afinidade por canais iônicos e tropismo por células musculares cardíacas (cardiotoxinas) e como consequência despolarizaram os cardiomiócitos, de modo dependente da abertura dos canais de cálcio, fazendo com que ocorra aumento no influxo de cálcio para dentro da célula induzindo parada sistólica (TONSING et al., 1983; OSTHOFF, 1990; CHIEN, et al., 1994).

Além das atividades descritas acima, algumas 3FTXs podem agir como inibidores enzimáticos e de alguns eventos hemostáticos, tais como, agregação plaquetária (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018).

1.1.4 Inflamação e envenenamentos

A inflamação é uma resposta adaptativa dos tecidos frente a estímulos de natureza diversa. Tal resposta pode ser induzida por lesões teciduais, estresse e mal funcionamento de células e tecidos, distúrbios metabólicos, infecções, entre outros (CHOVAIA & MEDZHITOV, 2014; MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV, 2010

MEDZHITOV e HORNG, 2009). Embora possa ser promovida por diferentes estímulos, o objetivo da inflamação, se aguda e controlada, é fazer com que os tecidos retornem à sua homeostase (MEDZHITOV, 2010; CHOVAIA & MEDZHITOV, 2014).

Considerando a diversidade de indutores, os mecanismos moleculares e celulares que direcionam os eventos do processo inflamatório podem ser também diversos, o que vai repercutir nas diferentes propostas fisiológicas da inflamação, tais como, defesa contra microrganismos infecciosos, eliminação de células mortas e resposta de reparo tecidual, adaptação ao estresse celular/tecidual e restauração de parâmetros fisiológicos/metabólicos (CHOVAIA & MEDZHITOV, 2014; MEDZHITOV, 2008; 2010).

Embora a inflamação tenha como objetivo principal o retorno dos tecidos a sua homeostase, se a mesma ocorrer de maneira exacerbada e/ou crônica, tal resposta pode ter consequências patológicas que incluem autoimunidade, autoinflamação, dano tecidual, inflamação sistêmica, fibrose, crescimento tumoral e o desenvolvimento de doenças metabólicas/homeostáticas (CHOVAIA & MEDZHITOV, 2014; MEDZHITOV, 2008; OKIN & MEDZHITOV, 2012). Estas consequências patológicas são responsáveis por índices significativos de morbidade e mortalidade observados em uma série de condições clínicas, entre elas, choque séptico, asma, artrite reumatoide e obesidade (EL-GALAWAY et al., 2010; PFIZER, 2021).

As respostas das células e tecidos frente aos diferentes estímulos são dependentes da magnitude destes. Em algumas situações de estresse celular/tecidual, mecanismos intracelulares e intrateciduals são capazes de restaurar a homeostase tecidual através da adaptação ao estresse ou através da para-inflamação. No entanto, se o estímulo é de magnitude elevada, levando a um intenso desbalanço homeostático, reforços extra teciduais são necessários, sendo o processo inflamatório uma resposta extrema a tais estímulos (CHOVAIA & MEDZHITOV, 2014). Neste sentido, a resposta inflamatória pode causar alterações no calibre e permeabilidade dos vasos da microcirculação sanguínea, culminando no escape de proteínas plasmáticas, tais como as do sistema complemento, cascata de coagulação e anticorpos, e infiltração de leucócitos. Todas estas alterações decorrem da geração coordenada de diferentes classes de moléculas, tais como, anafilatoxinas, mediadores lipídicos, interleucinas, moléculas de adesão celular, fibrinopeptídeos, cininas e quimiocinas (MEDZHITOV, 2008; 2010).

Uma vez no sítio inflamatório, as células e moléculas recrutadas vão reconhecer e remover o agente indutor e promover reparo tecidual, levando o tecido novamente a sua homeostase (FULLERTON e GILROY, 2016; MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV e HORNG, 2009; ROCK et al., 2010; SERHAN, 2010).

A resposta inflamatória pode ser iniciada de diferentes maneiras, e entre estas, por meio da ativação de receptores de reconhecimento de Padrões (PRRs, do inglês: *Pattern Recognizing Receptors*) Moleculares Associados a Microrganismos (MAMPs, do inglês: *Microorganisms-Associated Molecular Patterns*) e Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs, do inglês: *Damage-Associated Molecular Patterns*). Tais receptores estão presentes em células imunes e não imunes, ou na forma solúvel na circulação. Frente a estímulos ativadores, disparam cascatas de sinalização intracelular o que culmina na produção de moléculas efetoras, tais como, mediadores lipídicos, interleucinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, entre outras. Estas moléculas agindo em diferentes receptores/alvos vão contribuir para indução e manutenção dos diferentes eventos da resposta inflamatória, como, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, quimiotaxia de leucócitos, “clearance” de microrganismos e células mortas e indução de reparo (FULLERTON e GILROY, 2016; MEDZHITOV, 2008).

A inflamação induzida por MAMPs e DAMPs tem sido extensamente analisada por vários grupos de pesquisa. No entanto, os mecanismos envolvidos na indução de inflamação por venenos e toxinas animais e o impacto da inflamação, na patogênese dos envenenamentos por diferentes grupos de animais peçonhentos, carecem de mais investigações. Nos últimos anos, uma série de estudos tem emergido na literatura mostrando que a inflamação em diferentes envenenamentos, pode ser protetora, ou deletéria e até mesmo letal.

Entre os eventos iniciais envolvidos na inflamação induzida por venenos animais, tem sido demonstrado que PRRs tais como, TLR-2 (do inglês: *Toll-Like Receptor 2*), TLR-4, CD14 (do inglês: *Cluster of differentiation 14*), CD36 e NLRP3 (do inglês: *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*) estão envolvidos com o reconhecimento inicial de toxinas de venenos e, frente a tais achados, foi proposto o termo Padrões Moleculares Associados a Venenos (VAMPs, do inglês: *Venom-Associated Molecular Patterns*) (ZOCCAL et al., 2011; 2013; 2014; 2015; 2016; 2018; 2019; BARROS DOS REIS, 2020; BARROS DOS REIS et al., 2020).

Além do reconhecimento dos VAMPs, estudos mostraram que SVMPs são capazes de clivar e liberar o precursor de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) de membrana (MOURA-DA-SILVA et al., 1996), induzir a produção local das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6, e a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) (RUCAVADO et al., 2002) que podem contribuir para a necrose observada nos acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000).

Laing et al. (2003) observaram que camundongos inoculados com a SVMP Jararagina, isolada do veneno de *B. jararaca*, apresentaram inflamação com aumento nos níveis locais de TNF- α , IL-1 β e IL-6, hemorragia e dermonecrose. Neste modelo, a dermonecrose foi totalmente dependente dos receptores para TNF- α tipo 1 e 2 (TNFR-I e II), e para IL-6 (IL-6R), uma vez que animais *knockout* para tais receptores foram completamente protegidos da lesão dermonecrotica.

Alguns estudos mostraram que mastócitos atuam de forma protetora no envenenamento por *Atractaspis engadensis* e toxinas isoladas deste veneno, as sarafotoxinas. Assim, camundongos *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*, deficientes de mastócitos, são suscetíveis à hipotermia e letalidade decorrentes deste envenenamento. Tal proteção parece estar associada à liberação de enzimas dos grânulos dos mastócitos, capazes de neutralizar os componentes do veneno (METZ et al., 2006). Proteases como Carboxipeptidase A (SCHNEIDER et al., 2007), Quimase/Protease-4 (AKAHOSHI et al., 2011) e Triptase (ANDERSON et al., 2018), degradam toxinas não só do veneno de *A. engadensis*, mas também de outros venenos, como os de serpentes do gênero *Naja*.

A Caspase-1, componente essencial dos inflamassomas, importante para maturação das citocinas IL-1 β e IL-18, apresentou potencial protetor nos envenenamentos por *Crotalus atrox*, pois animais deficientes desta enzima mostraram agravamento da necrose na região de inoculação do veneno e hipotermia severa (PALM e MEDZHITOV, 2013).

Algumas FLA₂ de venenos de serpentes apresentam similaridade estrutural com FLA₂ inflamatórias de mamíferos (LEIGUEZ et al., 2014). Estas FLA₂ inflamatórias de mamíferos são capazes de liberar ácidos graxos das membranas celulares levando a produção de eicosanoides, e alguns estudos apontam que esta característica não está restrita apenas aos mamíferos.

Tem sido demonstrado que FLA₂ de venenos ofídicos são capazes de agir sobre neutrófilos e macrófagos disparando cascatas de sinalização intracelular envolvendo uma série de moléculas, incluindo FLA₂ celulares, tais como cFLA₂

(Fosfolipase A₂ citosólica) e iFLA₂ (Fosfolipase A₂ independente de Ca²⁺), e Ca²⁺, PKC (do inglês: *Protein Kinase C*), PTK (do inglês: *Protein- Tyrosine Kinase*), MAPK (do inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase*), PI3K (do inglês: *Phosphoinositide 3-kinase*), as quais são cruciais para biogênese de corpúsculos lipídicos, expressão gênica e proteica das Ciclooxygenases (COXs) e produção de PGD₂ (Prostaglandina D₂), PGE₂, PGJ₂, IL-1β e IL-10 (GIANNOTTI et al., 2013; LEIGUEZ et al., 2011; 2014; MOREIRA et al., 2011; 2013).

Curiosamente, em macrófagos, parte destes efeitos se deve a sinalização via TLR-2. Leiguez et al. (2014) demonstraram que animais *knockout* para esse PRR quando incubados com a FLA₂ MT-III, isolada do veneno de *B. asper*, não produzem prostaglandinas, interleucinas e não formam corpúsculos lipídicos. Estes autores ainda demonstraram que, mediante a incubação dos macrófagos com esta FLA₂, ocorre a geração dos ácidos palmítico e oleico. Tais lipídeos são ligantes de TLR-2 o que sugere que parte da ação inflamatória da MT-III ocorre de maneira indireta, via produtos da atividade desta FLA₂.

As FLA₂ de veneno ofídico são também capazes de induzir desbalanço vascular, uma vez que a inoculação destas, na cavidade peritoneal de camundongos, promove intenso escape de plasma, culminando na formação de edema (ZULIANI et al., 2005). O edema é um evento inflamatório clínico observado nos acidentes com algumas espécies de serpentes. Quando muito pronunciado pode provocar isquemia local e dor devido à compressão de fibras nervosas e musculares, levando a síndrome compartimental (DHAR, 2015; KYEREMANTENG et al., 2016; OAK et al., 2016). Tal sintoma pode ser acompanhado de hemorragia, bolhas e necrose, sendo esses quadros observados em acidentes envolvendo, por exemplo, serpentes do gênero *Naja* e *Bothrops* (CARDOSO et al., 2009; WHO, 2010a,b).

A contribuição de diferentes componentes imunes para o desenvolvimento do edema induzido por venenos e toxinas animais tem sido documentada na literatura. Por meio de uma série de experimentos de modulação farmacológica, Nascimento e colaboradores (2010) demonstraram que o veneno da serpente *B. moojeni* é capaz de provocar degranulação de mastócitos, *in vitro* e *in vivo*, com liberação de quantidades elevadas de histamina. Além disso, tal veneno foi capaz de promover edema de pata em camundongos, e a inibição da degranulação de mastócitos com Cromoglicato Dissódico ou esgotamento de conteúdo granular, com o composto 48/80, preveniu o inchaço. Adicionalmente, o tratamento dos animais com prometazina, cimetidina ou

tioperamida, antagonistas dos receptores para histamina dos tipos H1, H2 e H3/H4, respectivamente, inibiu o desenvolvimento do edema.

Considerando os achados de Nascimento et al. (2010), os mastócitos e seus mediadores podem ser considerados potenciais alvos terapêuticos, para mitigar o edema nos diferentes envenenamentos, uma vez que a degranulação de mastócitos parece ser um evento patogênico comumente elicitado por venenos de serpentes de diferentes gêneros e espécies (CASSAIS-E-SILVA & TEIXEIRA, 2017; CIRINO et al., 1989; DE TONI et al., 2015; MENALDO et al., 2017; NAKAMURA et al., 2019; SEBIA-AMRANE & LARABA-DJEBARI, 2013; WANG e TENG, 1988).

Além da degranulação de mastócitos, a produção de mediadores lipídicos, parece ser um evento inicial promovido por uma série de venenos ofídicos, que pode contribuir para o desenvolvimento das manifestações clínicas locais do envenenamento, tal como o edema (CIRINO et al., 1989; OLIVO et al., 2007; DE TONI et al., 2015; MENALDO et al., 2017; NAKAMURA et al., 2019; SEBIA-AMRANE & LARABA-DJEBARI, 2013; WANDERLEY et al., 2014; WANG e TENG, 1988). Neste contexto, os prostanóides, principalmente as prostaglandinas, merecem destaque.

Olivo e colaboradores (2007) identificaram que venenos botrópicos provocam edema exacerbado, que pode ser inibido pelo tratamento com inibidores de FLA₂ citosólica (dexametasona), COX-1 (SC-560), COX-2 (rofecoxib). Estes autores mostraram que estes venenos induzem aumento nos níveis de expressão das COXs, concomitante com aumento nos níveis de PGE₂ no sítio de inoculação. Além de influenciar o inchaço da pata, estes mediadores influenciam outros aspectos da fisiopatologia local dos envenenamentos, incluindo a neutrofilia tecidual (WANDERLEY et al., 2014). Embora o destaque seja para os prostanóides, alguns autores relatam a influência de outros mediadores lipídicos no edema, tais como os leucotrienos e PAFR (do inglês: *Platelet-activating factor Receptor*) (CIRINO et al., 1989; NASCIMENTO et al., 2010; WANG e TENG, 1988).

Embora tenha sido sugerido que as reações inflamatórias, nos acidentes com animais peçonhentos, sejam iniciadas via reconhecimento de VAMPs por PRRs, alguns estudos sugerem que DAMPs, gerados por ação dos venenos, podem disparar eventos inflamatórios.

Rucavado et al (2016) demonstraram que parte do desbalanço vascular, que culmina no edema no envenenamento por *B. asper*, é devido à geração de DAMPs

decorrentes da ação das toxinas deste veneno sobre uma série de componentes da matriz extracelular e plasma. Analisando o exsudato peritoneal, de animais injetados com veneno, foram detectados fragmentos de componentes da matriz extracelular e plasma, tais como ácido hialurônico e fibrinogênio, ATP, produtos de degradação da hemoglobina e alarminas. A transferência deste exsudato para camundongos foi capaz de provocar disfunções endoteliais, levando a formação de edema. Com intuito de detectar o envolvimento de PRRs neste efeito, camundongos foram tratados com Eritoran, antagonista de TLR-4, e inoculados com o exsudato, e interessantemente a reação edematogênica foi inibida.

Teixeira de Almeida e colaboradores (2020) demonstraram que SVMPs do veneno da serpente *B. atrox* são capazes de induzir desbalanço vascular, levando a formação de edema, produção de TNF- α e CCL2, e acúmulo de neutrófilos e monócitos na região da inoculação do veneno. De maneira elegante, empregando metodologias proteômicas, o grupo detectou que tais proteases agem em componentes da membrana basal dos vasos da região, degradando-os e gerando uma série de peptídeos, principalmente oriundos da clivagem da laminina. Tais peptídeos foram sintetizados e inoculados em camundongos e, curiosamente, todos os eventos inflamatórios observados frente a inoculação das proteases, foram também observados diante da inoculação dos peptídeos, reforçando a ideia de que além do reconhecimento dos VAMPs, DAMPs gerados pela ação dos venenos podem também contribuir para a patologia dos envenenamentos.

Katkar et al (2016) mostraram que o veneno da serpente *Echis carinatus* induz infiltrado massivo de neutrófilos no sítio de inoculação, levando a ativação destas células, culminando na liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês: *Neutrophil Extracellular Traps*), processo conhecido como NETose. Neste estudo foi mostrado que as NETs têm um papel dual neste envenenamento. As NETs podem bloquear os vasos sanguíneos, impedindo o acesso das toxinas para a circulação, protegendo os animais da letalidade associada a este envenenamento, e promover a retenção das toxinas do veneno no tecido intensificando o dano tecidual. Os autores ainda sugeriram que a ausência de enzimas que degradam DNA, no veneno de *E. carinatus*, seria o fator responsável pela retenção das toxinas. Neste mesmo estudo, foi mostrado que o veneno de *N. naja* era capaz de induzir a formação das NETs e que estas eram degradadas por DNAses presentes no veneno. Tal característica foi proposta como um mecanismo envolvido na letalidade, uma vez que a degradação

das NETs facilitaria o acesso das toxinas do veneno de *N. naja* à circulação promovendo os efeitos sistêmicos e morte.

As respostas inflamatórias locais nos envenenamentos podem ser acompanhadas de respostas inflamatórias sistêmicas. CHER et al. (2003) demonstraram que a inoculação da FLA₂ isolada do veneno de *N. sputatrix* promoveu edema e migração de leucócitos no pulmão de ratos e aumento na expressão dos genes de citocinas pró-inflamatórias. Foi também observado que quando o veneno da serpente *N. kaouthia* era inoculado, por via intramuscular em camundongos, esses animais apresentaram inflamação hepática e renal com aumento nos níveis sistêmicos de IL-1 β , TNF- α , IL-17 e IL-10 (SAHA et al., 2015). Dados semelhantes foram observados após inoculação intramuscular em ratos com o veneno de *N. hage*; no entanto, foi detectado apenas aumento sistêmico de Proteína C Reativa (PCR) e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (TOHAMY et al., 2014; ABDOU e IBRAHIM, 2015). No envenenamento experimental de camundongos com os venenos de *B. jararaca*, *B. asper* e *B. atrox* foi também observado aumento nos níveis séricos de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10, INF- γ e Óxido Nítrico (NO) (BARROS et al., 1998; PETRICEVICH et al., 2000).

Embora tenha sido detectado aumento plasmático de mediadores inflamatórios, após a inoculação de venenos e toxinas isoladas de várias serpentes, o impacto destas reações para os danos sistêmicos observados no envenenamento tem sido pouco documentado. Recentemente, Sartim e colaboradores (2020), investigando os mecanismos envolvidos na disfunção respiratória observada nos envenenamentos por *Crotalus durissus terrificus*, demonstraram que a principal toxina do veneno desta serpente, a Crotoxina, era a responsável pela patologia respiratória.

A injeção da Crotoxina, em camundongos, provocou alterações locais e sistêmicas caracterizadas por aumento nos níveis de marcadores associados a danos teciduais, tais como, CK (do inglês: *Creatine Kinase*), CK-MB (do inglês: *Creatine Kinase Muscle-Brain*) e AST (do inglês: *Aspartate Aminotransferase*), e marcadores inflamatórios, incluindo, neutrofilia e produção de IL-6 e CXCL-1. Além disso, a crotoxina provocou morte dos animais. Entre os eventos cruciais para a morte, detectou-se que esta toxina provoca mudanças histológicas intensas nos pulmões, incluindo, redução da área alveolar, congestão vascular, migração de neutrófilos, edema e hemorragia alveolar. Paralelamente a estas mudanças estruturais, altos níveis de interleucinas, leucotrienos e prostanóides foram detectados no tecido pulmonar

destes animais. Todas as alterações foram correlacionadas com o comprometimento de parâmetros associados a mecânica pulmonar/ventilatória, incluindo, redução de complacência pulmonar e capacidade inspiratória (SARTIM et al., 2020).

Considerando a presença de níveis elevados de prostanoídes no tecido pulmonar dos animais, e que a Crotoxina interfere com a liberação de acetilcolina, os animais foram tratados com Indometacina (inibidor não seletivo das COXs) ou Hexametônio (antagonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina) e, surpreendentemente, foram protegidos dos efeitos letais da toxina. Os animais, tratados com ambos os fármacos, tiveram melhora drástica na mecânica pulmonar, a qual foi associada com supressão na produção de mediadores inflamatórios nos pulmões, e redução nos parâmetros associados a danos renais, cardíacos e hepáticos, demonstrando assim, pela primeira vez, que eventos inflamatórios influenciam a patologia sistêmica de um envenenamento por serpente (SARTIM et al., 2020).

Dados clínicos de envenenamentos humanos por diferentes espécies de serpentes, como, *B. jararaca*, *Crotalus durissus terrificus*, *Daboia russelli*, *Vipera ammodytes* e *V. lebetina* revelaram que eventos inflamatórios também são estimulados em pacientes. Assim, foi detectada leucocitose com neutrofilia e aumento nos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, INF- γ , CXCL-8 (do inglês: *C-X-C motif chemokine ligand 8*), CCL3 (do inglês: *C-C motif ligand 3*) e CCL5. Além das citocinas, foi observado aumento nos níveis séricos de PCR, sTNFR-I (do inglês: *soluble Tumor Necrosis Factor*), histamina e triptase do mastócito (BARRAVIERA, 1999 a,b; STONE et al., 2013; AÇIKALIN e GÖKEL, 2015).

A resposta inflamatória pode contribuir para as lesões observadas nos envenenamentos, pois a presença de moléculas responsáveis pelos vários eventos inflamatórios nos tecidos ou na circulação pode alterar diferentes parâmetros fisiológicos vitais e, até mesmo, levar o indivíduo ao óbito (ADERKA, 1991; ANDERSEN et al., 2004; BURDON et al., 2000; KESHARI, et al., 2017; van der POLL et al., 2017; ZINGARELLI, 1994; ZOCCAL et al., 2016). Desta forma, a resposta inflamatória parece ser um importante alvo de estudo que pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas para os envenenamentos por serpentes.

A composição e o modo de ação do veneno da serpente *N. annulifera* foram pouco caracterizados até o momento. Os dados clínicos de acidentes com humanos e cães sugerem que o veneno desta serpente é potencialmente inflamatório. Sabendo-se que a inflamação pode ser um dos eventos que contribuem para as consequências deletérias do envenenamento, o Capítulo 1 desta tese apresenta a caracterização dos componentes e do processo inflamatório induzido pelo veneno da *N. annulifera*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Identificar os componentes tóxicos e com potencial inflamatório do veneno da *N. annulifera* e caracterizar as reações locais e sistêmicas induzidas pelo veneno em modelo murino.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o perfil eletroforético das proteínas presentes no veneno;
- ✓ Caracterizar a presença de resíduos de carboidratos (Manose e N-acetilglicosamina) nas proteínas do veneno;
- ✓ Analisar a presença do *Cobra Venom Factor* (CVF)/Proteína C3b like no veneno;
- ✓ Determinar, *in vitro*, as atividades enzimático-tóxicas do veneno (hialuronidásica, fosfolipásica, proteolítica, fibrinogenolítica e anticoagulante);
- ✓ Determinar o potencial letal do veneno em modelo murino;
- ✓ Caracterizar as reações inflamatórias locais provocadas pelo veneno em camundongos;
- ✓ Determinar as classes de mediadores envolvidos no desenvolvimento das reações locais;
- ✓ Caracterizar as reações inflamatórias sistêmicas em modelo de envenenamento moderado (subletal);
- ✓ Caracterizar a inflamação sistêmica em modelo de envenenamento grave (letal);
- ✓ Determinar as alterações histopatológicas locais e sistêmicas.

1.3 MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1 Caracterização bioquímica do veneno da *N. annulifera*

1.3.1.1 Venenos

O veneno da *N. annulifera* foi obtido da empresa LATOXAN Natural Active Ingredients (Valence, França). Os venenos das serpentes *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* e do escorpião *Tityus serrulatus* foram fornecidos pelo Instituto Butantan e tiveram seu uso autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (Processo: 010035/2015-0).

1.3.1.2 Dosagem proteica

A concentração proteica dos venenos foi determinada pelo método BCA (Bicinchoninic Acid) (Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc., EUA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. As concentrações finais dos venenos foram ajustadas para 5 mg/mL, em solução salina apirogênica. As amostras foram aliqüotadas e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

1.3.1.3 Quantificação de endotoxina

Amostras do veneno da *N. annulifera* (100 $\mu\text{g/mL}$), diluídas em salina apirogênica, foram encaminhadas ao Serviço de Controle de Qualidade do Centro Bioindustrial do Instituto Butantan (Seção de Controle Microbiológico) para determinação da presença de endotoxina. A avaliação foi realizada por meio do teste semiquantitativo LAL (*Limulus* ameobocytes lisate), usando o kit PYROGENT™ Gel Clot LAL Assays (Lonza, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de endotoxina determinada nas amostras foi de cerca de 0,0125 UE/ μg de veneno, valor que se encontra dentro do limite aceitável de endotoxina ($< 0,1$ UE/ μg) para ensaios biológicos (ZOCCAL, 2015).

1.3.1.4 Determinação do perfil eletroforético das proteínas do veneno

O perfil eletroforético do veneno de *N. annulifera* (15 μg) foi avaliado em gel de SDS-PAGE, em gradiente de concentração variando de 8 a 16%, segundo o método descrito por Laemmli (1970), em condições redutoras e não redutoras. A corrida eletroforética foi realizada a 160 V no sistema Amersham ECL Gel Running

(Amersham ECL Gel 8-16%, 10 wells, GE Healthcare Life Sciences, Suécia) em tampão de eletroforese 1X (Tris-Glicina-SDS). A coloração do gel foi feita pelo método de impregnação por prata, segundo Morrissey (1980). As bandas proteicas presentes nos géis tiveram suas massas moleculares estimadas em relação ao marcador de peso molecular (GE Healthcare Life Sciences) usando o Gel Logic 100 Imaging System Kodak.

1.3.1.5 Análise do perfil de glicosilação das proteínas do veneno de *N. annulifera*

O perfil de glicosilação das proteínas do veneno (15 µg) de *N. annulifera* foi avaliado por meio de *Western Blot* lectina utilizando-se metodologia adaptada de Tanaka (2011). Para tanto, as proteínas do veneno foram separadas em géis de SDS-PAGE a 12% em tampão de eletroforese 1X e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Thermo Scientific®, USA), como descrito por Towbin et al. (1979). As membranas foram bloqueadas em solução de PBS (Phosphate buffered saline) - BSA (Bovine serum albumin) (Sigma, USA) 5% por 2 horas a 37°C. Posteriormente, foram incubadas com as lectinas ConA (Concanavalina A-Sigma) ou WGA (do inglês: *Wheat Germ Agglutinin from Triticum vulgare*- Sigma) conjugadas à peroxidase diluídas, respectivamente, 1:1000 e 1:2000, em solução PBS-BSA 0,01%, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-Tween 20 (Sigma) 0,05%. A revelação das bandas, contendo resíduos de açúcar, foi feita pela adição de 20 mg/mL de DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Sigma) e H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio). As bandas proteicas tiveram suas massas moleculares estimadas em relação ao marcador de peso molecular (Invitrogen, USA), no Gel Logic 100 Imaging System Kodak.

1.3.1.6 *Western Blot* para detecção do *Cobra Venom Factor* (CVF) no veneno de *N. annulifera*

A presença de *Cobra Venom Factor* (CVF) no veneno de *N. annulifera* foi avaliada por *Western Blot*. As proteínas do veneno (15 µg) foram separadas em gel de SDS-PAGE a 12%, em tampão de eletroforese 1X, e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose, tal como descrito por Towbin et al. (1979). As membranas foram bloqueadas em solução de PBS-BSA 5% por 2 horas a 37°C. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com soro anti-CVF (obtido “*in house*” de coelhos imunizados com CVF de *N. naja*) diluído 1:2000 em solução de PBS-BSA 0,01%,

durante 1 hora a temperatura ambiente. Ao término da incubação, as membranas foram lavadas por 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05%.

A reatividade antigênica foi determinada pela incubação das membranas com soro conjugado específico IgG-AP (do inglês: *Goat anti-rabbit IgG labelled with alkaline phosphatase*, Promega, USA) diluído 1:15000, em solução PBS-BSA 0,01%, Tween 20 0,05%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas e as reações reveladas em tampão AP Buffer, contendo NBT/BCIP (p-nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4chloro-indolyl phosphate) (Promega), seguindo-se as indicações do fabricante.

As bandas imunorreativas tiveram suas massas estimadas em relação ao marcador de peso molecular (Invitrogen, USA) no Gel Logic 100 Imaging System Kodak.

1.3.2 Atividades Enzimático-Tóxicas

1.3.2.1 Atividade Fosfolipásica

A atividade FLA₂ do veneno de *N. annulifera* foi avaliada por meio de ensaio fluorimétrico utilizando-se o kit PLA₂ EnzyCheck™ Phospholipase A₂ Assay (Invitrogen, MA, USA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, amostras dos venenos de *N. annulifera* (0,5 µg) e de *C. d. terrificus* (controle positivo de atividade - 0,5 µg) e do veículo (salina apirogênica) foram diluídas em 50 µL de tampão da reação e adicionadas a placas brancas de 96 poços. Na sequência, foram adicionados aos poços, 50 µL de uma mistura contendo substrato de fluorescência apagada (FRET) em lipossomas compostos de 10 mM fosfatidilcolina e 10 mM de fosfatidilglicerol. O aumento na fluorescência foi acompanhado a cada 30 segundos, durante 10 minutos no leitor FLUOStar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha), a 37°C, nos comprimentos de onda de excitação e emissão respectivamente de 460 nm e 515 nm. Os resultados obtidos foram expressos como atividade específica, obtida pela seguinte fórmula: unidades de fluorescência / µg de veneno.

1.3.2.2 Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi avaliada pelo ensaio turbidimétrico descrito por Purkrittayamee et al. (1988), com algumas alterações. Amostras dos venenos de *N. annulifera* (20 µg) e *T. serrulatus* (20 µg) (controle positivo de atividade) ou veículo (salina apirogênica) foram incubadas por 15 minutos a 37°C, com 400 µL de tampão

acetato (200 mM acetato de sódio e 0,15 M de cloreto de sódio, p.H 6,0) e 100 µL de ácido hialurônico (Sigma) (1 mg/mL), para um volume final de 500 µL. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de tampão para interromper a reação (brometo de cetiltrimetilamônio (Sigma) a 2,5% em NaOH 2%).

O controle correspondente a 0% de turbidez consistiu em 500 µL de tampão acetato e 1 mL de brometo de cetiltrimetilamônio, enquanto o de 100% de turbidez, consistiu em 400 µL de tampão acetato, 100 µL de ácido hialurônico e 1 mL de tampão brometo de cetiltrimetilamônio. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro Multiskan EX (Labsystems, Finlândia) a λ 405 nm. Os resultados obtidos foram expressos como unidades de redução de turbidez (URT) por mg de veneno, calculada pela seguinte fórmula: $URT = \% \text{ de redução de turbidez} / \text{hidrólise de } 50\% \text{ do substrato} / \text{mg de veneno}$.

1.3.2.3 Atividade proteolítica

1.3.2.3.1 Atividade gelatinolítica

Amostras do veneno de *N. annulifera* foram submetidas à eletroforese, em condições não redutoras, para o ensaio de atividade proteolítica (zimografia), utilizando-se metodologia adaptada de Villas-Boas et al (2012). Para tanto, utilizou-se gel SDS-PAGE a 10%, acrescido de 1 mg/mL de gelatina. A corrida eletroforética foi efetuada a 60 V a 4°C no sistema Mighty Small (Hoefer Pharmacia Biotech, CA, EUA), em tampão de eletroforese 1X. Após a corrida, o gel foi lavado durante 1 hora em solução Triton X-100 (Sigma) a 2,5% e incubado a 37°C durante 16 horas em tampão substrato (50 mM de Tris, 200 mM de NaCl, 10 mM de CaCl₂ e 0,05% de Brij-35, pH 8,3). O gel foi corado em solução de “Comassie Brilliant Blue” R-250 (Sigma) 0,2%, durante 30 minutos sob agitação constante. As regiões da corrida eletroforética que ficaram claras indicam a presença de atividade proteolítica do veneno sobre o substrato gelatina. Como controle positivo foi utilizado o veneno de *B. jararaca* (10 µg).

1.3.2.3.2 Atividade fibrinogenolítica

Amostras de Fibrinogênio humano (Sigma) (30 µg) foram incubadas com concentrações crescentes do veneno de *N. annulifera*, na presença ou não de 10 mM de 1,10 Fenantrolina (1,10 Phe) ou Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF) inibidores, respectivamente, de SVMPs e SVSPs, durante 1 hora a 37°C sob constante agitação.

Como controle positivo da reação foi utilizado 3 UI de Trombina (Sigma). Após esta incubação, as amostras foram submetidas a eletroforese, em condições redutoras, em SDS-PAGE em gradiente de concentração de 8-16%. Os géis foram corados em solução de “Comassie Brilliant Blue” R-250 (Sigma) 0,2%, sob agitação constante durante 2 horas. Os fragmentos oriundos da clivagem tiveram suas massas moleculares estimadas em relação ao marcador de peso molecular (GE Healthcare Life Sciences) no Gel Logic 100 Imaging System Kodak.

1.3.3 Declaração de ética humana

Os ensaios utilizando amostras de origem humana (plasma, soro e sangue total) foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo SMS/SP (nº dos pareceres: **856.897 e 4.309.960**) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB-USP (nº do parecer **974.312**).

1.3.3.1 Ação do veneno de *N. annulifera* sobre o tempo de coagulação do plasma humano

1.3.3.2 Obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)

Amostras de sangue humano foram coletadas de indivíduos saudáveis em tubos contendo solução de citrato de sódio (3,2%) tamponado (BD Bioscience). Estas amostras foram centrifugadas a 260 x g, a temperatura ambiente para obtenção do PPP, e mantidas a – 20°C até o momento das análises.

1.3.3.3 Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa)

Amostras de PPP (50 µL) foram tratadas com concentrações crescentes do veneno de *N. annulifera* ou salina e incubadas, durante 3 minutos a 37°C, com 50 µL de Cefalina (Stago, USA). Na sequência as amostras de PPP, tratadas ou não com veneno, foram recalcificadas com CaCl₂ (0,025 M) e o tempo de coagulação acompanhado durante 240 segundos no sistema Stago Start (Stago, USA). Os resultados obtidos foram expressos como tempo de coagulação em segundos e *R-Time* (Razão Internacional Normalizada (RIN), obtido da seguinte fórmula: Tempo em segundos da amostra teste / Tempo em segundos da amostra controle. Foram consideradas desordens hemostáticas valores de *R-Time* acima de 1,3 (GULATI et al., 2011).

1.3.3.4 Tempo de Protrombina (TP)

Amostras de PPP (50 µL) foram incubadas com concentrações crescentes de veneno ou salina durante 3 minutos a 37°C. Após esta incubação, foi adicionado a mistura 100 µL de Tromboplastina (Stago, USA) e 0,025 CaCl₂ e o tempo de coagulação acompanhado durante 60 segundos no sistema Stago Star (Stago, USA). Os resultados foram apresentados como tempo de coagulação em segundos e *R-time* (Razão Internacional Normalizada (RIN)) calculado através da seguinte fórmula: Tempo em segundos da amostra teste / Tempo em segundos da amostra controle. As amostras com *R-time* acima de 1,3 foram consideradas com distúrbios hemostáticos (GULATI et al., 2011).

1.3.4 Ensaios “*in vivo*”

1.3.4.1 Animais

Camundongos BALB/c, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, pesando entre 18 e 22 g, foram utilizados para a determinação da atividade letal e reações locais e sistêmicas causadas pelo veneno. Todos os ensaios utilizando animais foram autorizados pelas Comissões de Ética no Uso de Animais de Experimentação do Instituto Butantan (CEUA-IB) (**protocolos nº 01092/13 e 1262/14**) e do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP) (**protocolo nº 057/2014**).

1.3.4.2 Atividade Letal (Dose letal 50%)

Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram inoculados, pela via intraperitoneal (i.p.), com quantidades crescentes do veneno de *N. annulifera* (20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg) ou salina estéril. Seis doses de veneno foram inoculadas (20, 40, 60, 80, 100 e 120 µg), perfazendo com isto 6 grupos experimentais e 1 grupo controle (salina apirogênica). As mortes foram determinadas durante 72 horas e a dose letal para 50% dos animais (DL₅₀) foi calculada pela análise de transformação em probitos (FINNEY, 1971).

1.3.4.3 Resposta inflamatória Local

1.3.4.3.1 Atividade edematogênica

Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram inoculados com 10 µg do veneno de *N. annulifera*, em volume de 50 µL (salina estéril), no tecido subcutâneo da

região plantar da pata posterior esquerda, sendo a pata contralateral (controle) injetada com 50 µL de salina apirogênica. A atividade edematogênica foi determinada segundo o método de Yamakawa et al. (1976), com algumas modificações. Para tanto, o aumento da espessura dos coxins foi avaliado, com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo–sensibilidade 0,01 mm), em vários períodos após inoculação do veneno/salina. Paralelamente à determinação da atividade edematogênica, ensaios de intervenção farmacológica foram realizados para avaliar a contribuição de mastócitos e mediadores lipídicos no desenvolvimento do edema provocado pelo veneno.

1.3.4.3.2 Modulação farmacológica do edema

1.3.4.3.2.1 Preparo dos inibidores

Todos os inibidores foram reconstituídos de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes. Cromoglicato dissódico (CD) e Dexametasona (Sigma, USA) foram reconstituídos em salina apirogênica na concentração final de 1 mg/mL. Indometacina, MK-886 e WEB-2086 (Cayman Chemical- USA) foram reconstituídos em DMSO (Dimethyl Sulfoxide), respectivamente, nas concentrações finais de 15, 9.8 e 5 mg/mL. Antes da inoculação, todos os inibidores foram diluídos em salina apirogênica para alcançar as concentrações exigidas em cada protocolo experimental.

1.3.4.3.2.2 Alvos e tratamentos

1.3.4.3.2.2.1 Mastócitos

A contribuição dos mastócitos foi avaliada utilizando-se Cromoglicato Dissódico, fármaco bloqueador de canais de Ca^{2+} , o qual previne a degranulação de mastócitos por estabilizar a membrana citoplasmática destas células (SPATARO & BOSMANN, 1976). Para tanto, grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram tratados durante três dias consecutivos, por via i.p., com 10 mg/kg de Cromoglicato Dissódico ou salina estéril (controle) (NASCIMENTO et al., 2010) e, duas horas após o último tratamento, o edema foi induzido.

1.3.4.3.2.2.2 Fosfolipásica A_2 citosólica

A influência da atividade da cFLA₂ foi determinada tratando-se os animais com Dexametasona, fármaco anti-inflamatório/imunossupressor que dentre seus vários alvos inibe indiretamente a cFLA₂ e, conseqüentemente, a produção de mediadores lipídicos (YAO et al., 1999). Grupos de animais (n=6) foram inoculados com 2 mg/kg

de Dexametasona (OLIVO et al, 2007), via i.p., 2 horas antes da indução do edema. Como controle, grupos de animais foram tratados com salina apirogênica.

1.3.4.3.2.2.3 Prostanóides

Para avaliar se prostaglandinas e tromboxanos influenciam ou não o edema de pata induzido pelo veneno de *N. annulifera*, camundongos BALB/c (n=6) foram tratados, por via i.p., com 10 mg/kg de Indometacina inibidor não seletivo das enzimas Ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1/2) (LUCAS, 2016), ou DMSO (controle), 30 minutos (WANDERLEY et al., 2014) antes da inoculação do veneno.

1.3.4.3.2.2.4 Leucotrienos

A participação dos leucotrienos no edema foi determinada através do tratamento de camundongos (n=6) com MK-886 (5 mg/kg), inibidor da proteína ativadora da enzima 5-lipoxigenase (FLAP) (MANCINI et al., 1992), por via i.p., 30 minutos antes da injeção de veneno (ZOCCAL et al, 2016). Como controle, grupos de animais foram inoculados via i.p. com DMSO.

1.3.4.3.2.2.5 Fator ativador de plaquetas (PAF)

Para determinar a influência do PAF no desenvolvimento do edema de pata, grupos de animais (n=6) foram tratados com antagonista do receptor de PAF (PAFR) WEB-2086 (5 mg/kg) (CIRINO et al, 1989), por via subcutânea (KOGA et al., 2016), 1 hora antes da indução do edema.

Seguido aos protocolos citados, o edema foi induzido e monitorado durante 24 horas e os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de aumento no volume das patas [%].

1.3.4.4 Resposta inflamatória sistêmica

1.3.4.4.1 Determinação da dose subletal inflamatória

Após o estabelecimento da DL₅₀, foram realizados ensaios com objetivo de determinar uma dose subletal do veneno que, quando inoculada por via intraperitoneal em camundongos BALB/c, fosse capaz de promover os efeitos deletérios do veneno, induzir aumento significativo em parâmetros inflamatórios sistêmicos e não promover a morte dos animais (envenenamento moderado). Para tanto, porcentagens do valor da DL₅₀ (50, 60 e 75%) foram testadas e, de acordo com os resultados obtidos, a dose

eleita para o estudo do processo inflamatório sistêmico provocado pelo veneno de *N. annulifera* foi 60% (56,48 µg) da DL₅₀.

Grupos de camundongos BALB/c (n=6) foram inoculados com 56,48 µg de veneno ou salina apirogênica, i.p., e eutanasiados em diferentes períodos com combinação de Quetamina/Xilazina (150/15 mg/kg) para obtenção de sangue e órgãos.

Além dos experimentos com a dose subletal, foi também avaliado se a inoculação da dose letal do veneno (94,14 µg) era capaz de promover inflamação sistêmica antes da morte.

Amostras de sangue dos animais de ambos os experimentos foram obtidas, por meio de punção cardíaca, e incubadas imediatamente com EDTA (Ethylenediamine Tetraacetic Acid) (2,5 mg/mL), como anticoagulante, os órgãos coletados e lavados rapidamente em PBS 1X e fixados em solução de formaldeído 10%. Do sangue obtido, uma parte foi utilizada para determinação das alterações leucocitárias sistêmicas, enquanto a outra parte foi usada para quantificação de mediadores inflamatórios. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue a 2800 x g, 4°C durante 10 minutos e armazenado a -80°C, até o momento das análises.

1.3.4.4.2 Alterações leucocitárias

Para avaliar alterações no número total de leucócitos circulantes, amostras de sangue (**item 1.3.4.4.1**) foram diluídas 1:10 em solução de Turk (Ácido acético 2%, Violeta de Genciana 0,1%) e submetidas a contagem em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos foram expressos como nº total de leucócitos por mL x 10⁴.

Amostras de sangue foram submetidas a extensão sanguínea e coradas com kit panótico rápido (Newprov- Paraná, Brasil) para determinar as alterações no número de células das diferentes populações leucocitárias. Os resultados obtidos foram expressos como % de leucócitos por mL de sangue.

1.3.4.4.3 Dosagem plasmática de mediadores inflamatórios

O aumento nos níveis plasmáticos de interleucinas e quimiocinas foi determinado por meio do BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation kit (BD Bioscience- USA), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, amostras de plasma ou curva padrão (25 µL) foram incubadas em tubos contendo 25 µL do mix de esferas revestidas com anticorpos de captura anti-IL-6/10/12; TNF-α, CCL2, INF-γ e com 25 µL de anticorpos de detecção marcados com ficoeritrina (PE),

durante duas horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esta incubação, as amostras foram lavadas com 300 µL de tampão de lavagem, a 200 x g, durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o “*pellet*” das esferas ressuspendido em 150 µL de tampão de lavagem. Por fim, a leitura das amostras foi realizada no BD FACSAria™ III (BD Bioscience), software de aquisição FACS DIVA. As quantidades de interleucinas e quimiocinas nas amostras foram determinadas no software FCAP Array 3.0 (BD Bioscience), levando-se em consideração curva padrão pré-estabelecida pelo kit. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL.

1.3.4.4 Análise histopatológica das patas e órgãos

O edema foi induzido em grupos de camundongos BALB/c (n=3), assim como descrito no item **1.3.4.3.1**. Após a indução do edema, os animais foram eutanasiados com uma combinação letal de Quetamina/Xilazina (300/30 mg/kg), em diferentes períodos, e tiveram os coxins de suas patas posteriores removidos. Além disso, dos animais do item **1.3.4.4.1**, foram extraídos diferentes órgãos (cérebro, pulmões, coração, fígado, rins e baço) para análise histopatológica. Após a remoção, os coxins e os órgãos foram fixados em solução de formaldeído 10%, durante 24 horas, e submetidos a técnica histológica de rotina, Hematoxilina/Eosina (H/E), na empresa Histotec (São Paulo, Brasil).

As amostras de tecido foram analisadas ao microscópio de luz, pelo Dr. Bruno Cogliati (FMVZ-USP), para detectar a presença de lesões necróticas, reações inflamatórias e focos hemorrágicos. Os resultados obtidos foram expressos em forma de escore histopatológico, variando de 0 a 3, sendo: 0= ausência de alterações; 1= presença de alterações discretas; 2= presença de alterações moderadas; 3= presença de alterações histopatológicas intensas/severas.

1.3.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média [X] e desvio padrão [SD] e analisados estatisticamente no programa Graphpad Prism 5.

Para comparações entre dois grupos experimentais o teste “*t student*” foi aplicado, enquanto para comparações de múltiplos grupos/condições experimentais aplicou-se os testes One-Way ou Two-way ANOVA seguidos de pós teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 O veneno da *N. annulifera* é composto por diversas proteínas

O conteúdo proteico do veneno de *N. annulifera* (VNa), determinado pelo método BCA, foi 728 µg de proteína por mg de veneno.

A análise do perfil eletroforético do veneno em gel de gradiente (**Fig. 3a**), em condições não redutoras, revelou a presença de bandas proteicas com massa molecular relativa [Mr] entre ~10 kDa e ~191 kDa. Em condições redutoras foram identificadas bandas com Mr entre ~6 kDa e ~187 kDa. Adicionalmente, por meio de “*Western Blot Lectina*”, utilizando-se a lectina WGA, foi detectado que o veneno apresenta proteínas com Mr de ~70, ~86 e ~103 kDa contendo resíduos de N-acetilglicosamina (**Fig. 3b**). Com o uso da lectina ConA, foram identificadas bandas proteicas com Mr de ~64, ~81 e ~164 kDa contendo resíduos de Manose (**Fig. 3c**).

Por meio de “*Western Blot*”, utilizando-se soro desenvolvido contra o CVF de *N. naja*, foi detectada a presença de duas bandas reativas no veneno de *N. annulifera*, com Mr ~138 e ~141 kDa (**Fig. 3d**).

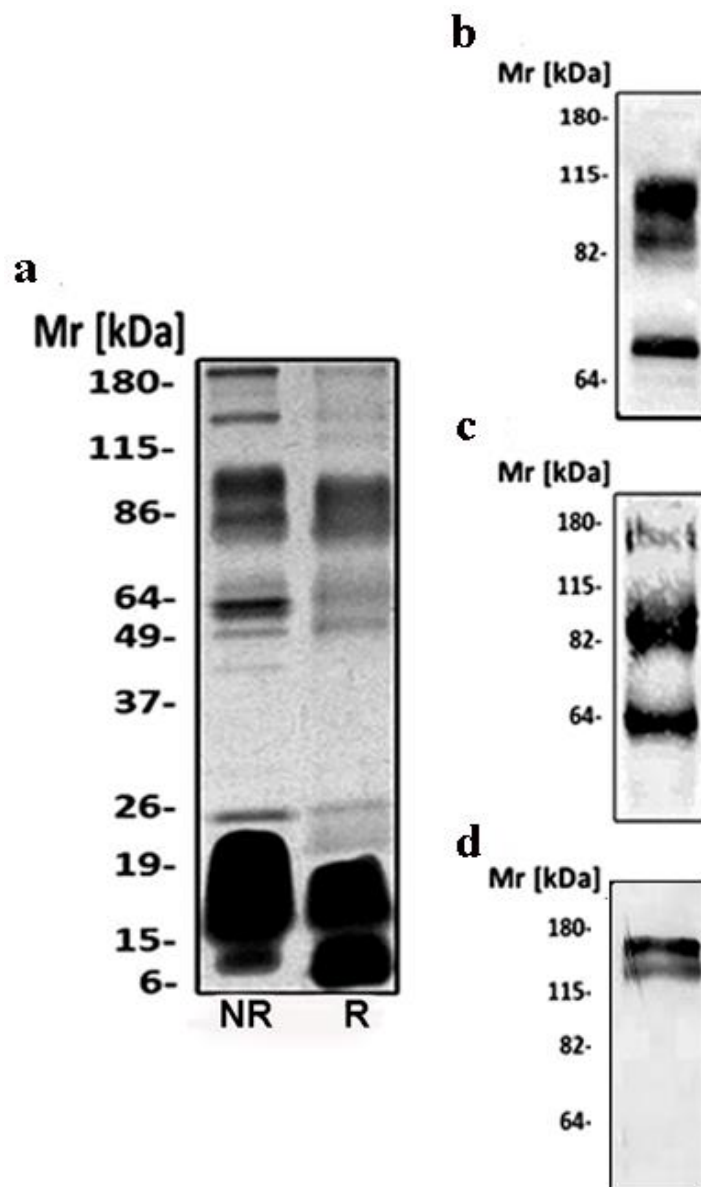


Figura 3 - Perfil proteico do veneno. Amostras contendo 15 μg do veneno de *N. annulifera* (VNa), em condições não redutoras (NR) e redutoras (R), foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE, em gradiente de concentração de 8-16% e, posteriormente, submetidas à revelação por impregnação por prata [a]. Adicionalmente, amostras do VNa, separadas em SDS-PAGE, foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. Na sequência, as membranas foram bloqueadas com PBS-BSA 5% e incubadas com as lectinas WGA [b] ou ConA [c], e a detecção dos resíduos de carboidratos realizada pela adição de DAB e H_2O_2 . Paralelamente, algumas destas membranas foram incubadas com soro anti-CVF [d] e, na sequência, a reatividade antigênica foi revelada pela adição do conjugado específico, marcado com fosfatase alcalina, e posterior adição de NBT/BCIP. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

1.4.2 As proteínas do veneno apresentam atividades enzimático-tóxicas

Diferentes ensaios para determinar as atividades tóxicas do veneno foram conduzidos *in vitro*. A **Fig. 4a** demonstra que o veneno de *N. annulifera* não apresenta atividade proteolítica sobre o substrato gelatina, quando comparado ao controle positivo, o veneno de *B. jararaca*, nas condições testadas. Por outro lado, o veneno possui proteases capazes de clivar a cadeia alfa do fibrinogênio, sendo esta ação mediada por SVMPs e SVSPs, uma vez que o uso de inibidores para essas duas classes de proteases inibiu a clivagem. Além disso, foi observado que o perfil de hidrólise destas proteases é diferente do produzido pela Trombina. A Trombina foi capaz de clivar a cadeia alfa do fibrinogênio gerando um fragmento com Mr ~ 60 kDa, enquanto as proteases do veneno clivaram a cadeia alfa gerando um fragmento com Mr ~ 40 kDa (**Fig. 4b**). Empregando ensaio fluorimétrico, tendo como controle positivo o veneno de *C. d. terrificus* (VCdt), foi observado que o veneno de *N. annulifera* apresenta atividade fosfolipásica significativa sobre uma mistura de substratos contendo fosfatidilserina e fosfatidilglicerol (**Fig. 4c**). Além das fosfolipases, por meio de ensaio turbidimétrico, foi detectado que o veneno contém em sua composição hialuronidases, assim como o controle positivo da reação, veneno do escorpião *T. serrulatus*. (**Fig. 4d**).

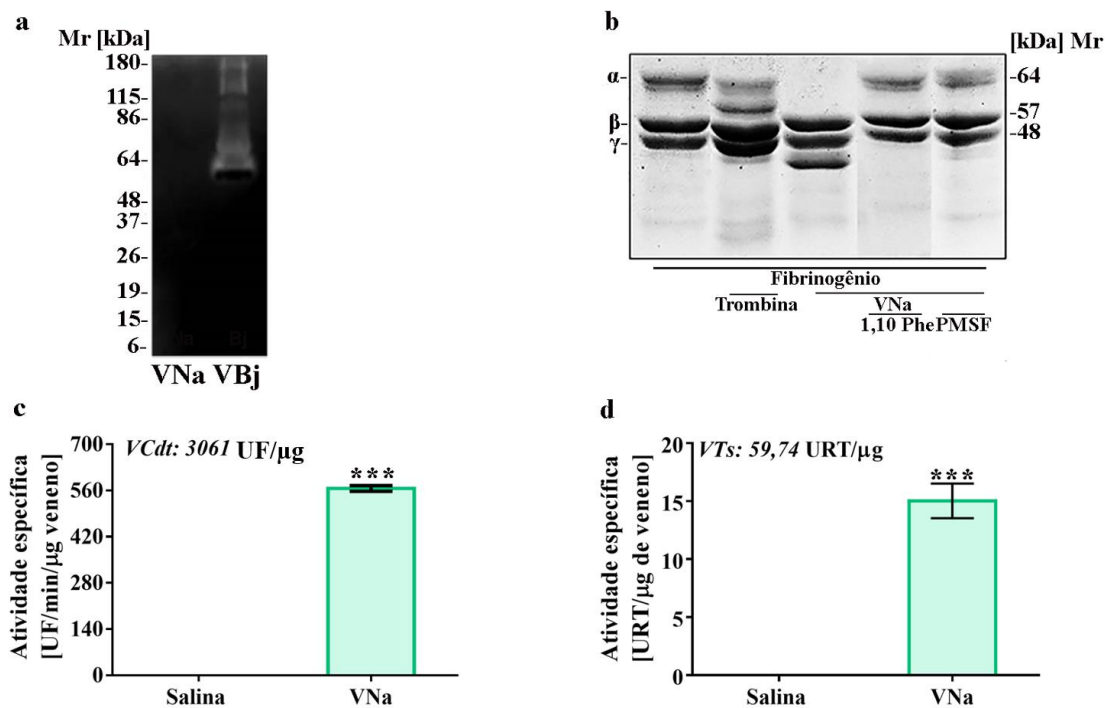


Figura 4 – Detecção de atividades enzimático-tóxicas no veneno de *N. annulifera*. Amostras dos venenos de *N. annulifera* (VNa) (30 μg) e *B. jararaca* (VBj - 10 μg) foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 10% acrescido de 1 mg/mL de gelatina. Posteriormente, o gel foi incubado com tampão substrato e corado em solução de “Comassie Brilliant Blue” para detecção das bandas com atividade gelatinolítica [a]. Amostras do VNa (2,5 μg) ou o controle positivo da reação, a Trombina (3 UI), foram incubadas na presença ou ausência de inibidores de proteases, durante 1 hora, com fibrinogênio humano (30 μg) a 37°C. Após esta incubação, as misturas foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e o gel corado em solução de “Comassie Brilliant Blue” para detecção dos fragmentos oriundos da clivagem [b]. O ensaio fluorimétrico foi conduzido incubando-se o VNa (0,5 μg), veículo (-) ou do controle positivo da reação, veneno de *C. d. terrificus* (VCdt - 0,5 μg), com mistura contendo 10 mM de fosfatidilserina e 10 mM de fosfatidilglicerol, a 37°C, e o aumento nos valores de fluorescência acompanhado durante 10 minutos, sendo os resultados obtidos expressos como atividade específica (UF/min/μg de veneno) [c]. Amostras do VNa, veículo (-) ou do controle positivo da reação, o veneno de *T. serrulatus* (VTs - 20 μg) foram incubadas durante 15 minutos a 37°C com solução contendo o substrato para esta reação, o ácido hialurônico. Após a incubação, a reação foi interrompida e as amostras submetidas à leitura espectrofotométrica. Os resultados obtidos foram expressos em URT/ mg veneno [d]. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

1.4.2.1 Distúrbios hemostáticos são elicitados pelo veneno da *N. annulifera*

A ação do veneno sobre o tempo de coagulação do plasma humano foi avaliada por meio de Tempo de Tromboplastina Parcialmente ativada (TTPa) e Tempo de Protrombina (TP), e os resultados expressos como tempo em segundos e *R-time* (razão internacional normalizada). A análise do TTPa revelou que o veneno interferiu no tempo de coagulação, de forma dose dependente, tornando o plasma incoagulável nas maiores concentrações utilizadas e prolongando o tempo de coagulação nas menores doses. O veneno não só interferiu com o tempo de coagulação, como também aumentou o valor do *R-time*. Em relação ao TP, só a maior concentração de veneno utilizada foi capaz de aumentar o tempo de coagulação e o *R-time* (Tabela 1).

Alterações no TTPa e TP promovidas pelo veneno de *N. annulifera*

Ensaio	C	2,5 µg	3,12 µg	6,25 µg	12,5 µg	25 µg	50 µg
<i>TTPa</i>	38	78,36	92,76	98,96	-	-	-
<i>R-Time</i>	1	2,06	2,31	2,26	5,04	4,85	6,17
<i>TP</i>	15,46	15,46	15,46	15,46	15,3	18,33	33,6
<i>R-Time</i>	1	1	1	1	1,16	1,33	1,6

Tabela 1 - Tempo de coagulação do PPP e valores de *R-time*: TTPa: tempo de tromboplastina parcialmente ativada; TP: tempo de protrombina; -: incoagulável; C: controle; *R-time*: escala de anormalidades no tempo de coagulação. Dados representativos de três experimentos reprodutíveis.

1.4.3 O veneno da *N. annulifera* causa reações hiperagudas *in vivo*

1.4.3.1 Altas doses do veneno da serpente *N. annulifera* são letais

A dose letal para 50% dos animais envenenados experimentalmente (DL_{50}) foi determinada inoculando-se concentrações crescentes de veneno, pela via intraperitoneal, em camundongos BALB/c. A morte dos animais envenenados ocorreu de 3 a 5 horas após a inoculação do veneno. Precedendo a morte, os animais apresentaram apatia, arqueamento da coluna, eriçamento de pelos, contrações abdominais fortes e dificuldade para se locomover e respirar, e próximo à morte, paralisia das patas traseiras.

A DL_{50} foi calculada pela análise da transformação de probitos (Probit) com intervalo de confiança de 95%. A DL_{50} do veneno de *N. annulifera* foi de 94,14 μ g (68,78-115,74).

1.4.3.2 O veneno de *N. annulifera* causa inflamação local hiperaguda

A **Fig. 5a** mostra que a injeção do veneno, na pata posterior esquerda de camundongos, induziu edema significativo, de início extremamente rápido. O edema alcançou pico máximo 20 minutos após a inoculação do veneno e perdurou por várias horas. No entanto, 24 horas após a indução, o edema regrediu completamente.

Análises histopatológicas demonstraram que a inoculação do veneno no tecido subcutâneo promoveu mudanças histológicas que variaram de discretas a intensas, em todos os períodos analisados (**Tabela 2**). Assim, foi observado que antes da inoculação do veneno, os tecidos das patas dos animais não apresentaram alterações histopatológicas dignas de nota (**Fig. 5b1**). No entanto, a avaliação das patas após a inoculação do veneno revelou que o mesmo foi capaz de promover desorganização da matriz colágena dérmica, edema subcutâneo (**Fig. 5b2**), congestão vascular (**Fig. 5b2**), migração de neutrófilos para derme (**Fig. 5b3**) e músculo (**Fig. 16 5b4,5**), necrose muscular (**Fig. 5b5**) e migração de células mononucleares (**Fig. 5b6**). Tais alterações perduraram por várias horas, em diferentes graus; porém, 24 horas (1440 minutos) após a inoculação do veneno, observou-se redução significativa no edema subcutâneo, ausência de congestão vascular, presença de poucos neutrófilos, aumento nos números de células mononucleares e reorganização da matriz colágena dérmica (**Fig. 5b6**).

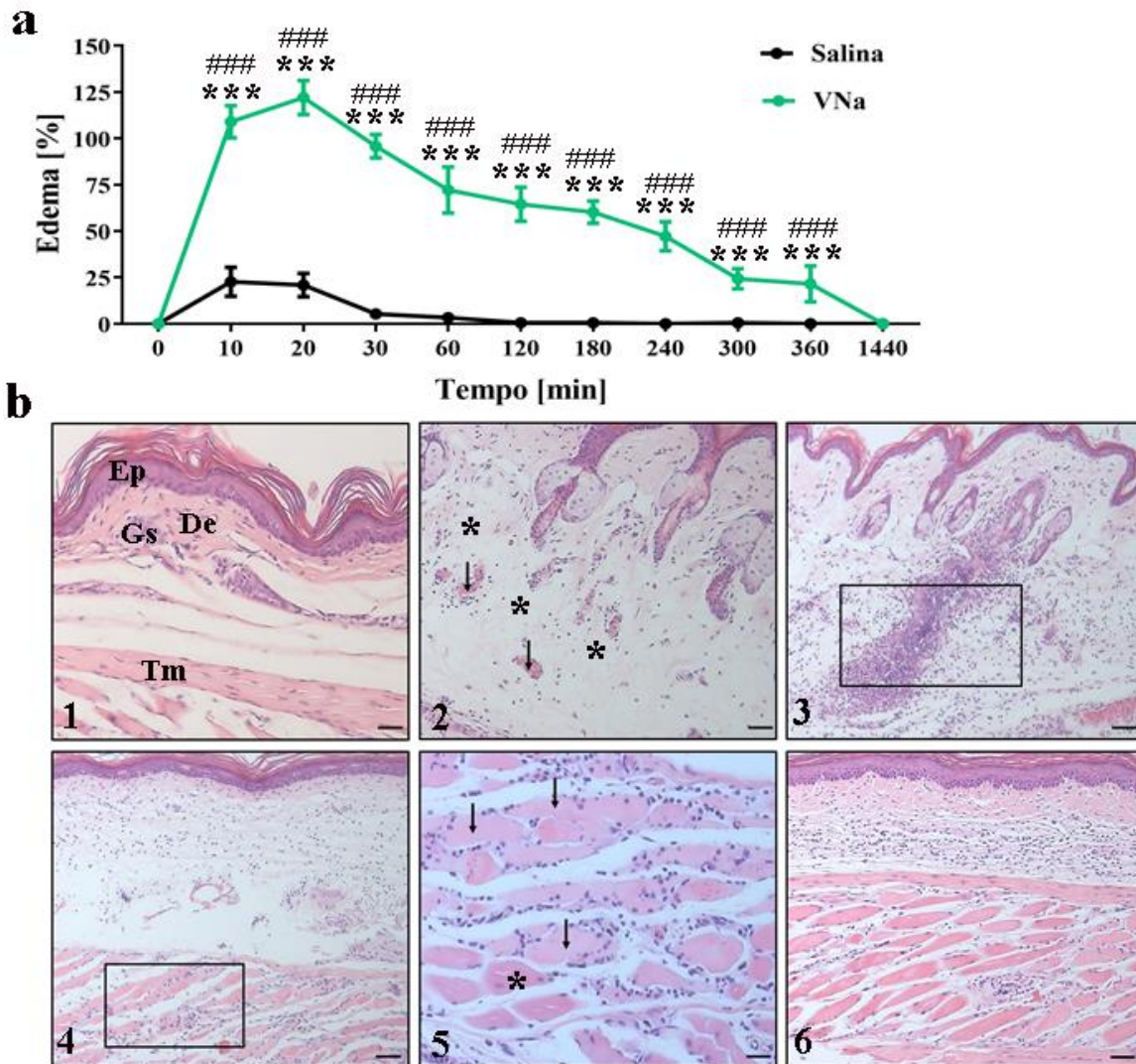


Figura 5 – Reações inflamatórias locais induzidas pelo veneno. Amostras do veneno da *N. annulifera* (VNa) foram inoculadas na pata esquerda traseira de camundongos BALB/c e a pata contralateral, direita, foi inoculada com igual volume de salina apirogênica. Após a inoculação, as patas dos camundongos foram medidas, com auxílio de um paquímetro em diferentes tempos para avaliar o aumento da espessura [a]. As cinéticas do edema foram comparadas estatisticamente por Two-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa x salina) e ### (Diferentes períodos x Tempo 0) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos. Paralelamente, camundongos BALB/c inoculados ou não com veneno foram eutanasiados em diferentes períodos, para obtenção de amostras do tecido subcutâneo dos coxins plantares das patas posteriores. Na sequência, as amostras de tecido foram fixadas em formaldeído (10%) e submetidas à técnica histológica de rotina (HE). A análise dos tecidos foi realizada ao microscópio de luz, nos aumentos de 100 ou 200 X, e o diagnóstico histopatológico determinado [b]. [1] Tecido subcutâneo antes da inoculação de veneno T0, aumento de 100 X. Gs=Glândula Sudorípara; Ep= Epitélio; De= Derme; Tm= Tecido Muscular. [2] Tecido subcutâneo 20 minutos após a injeção do VNa, aumento de 100 X. **Asterisco:**

Edema; **Seta:** Congestão Vascular. [3] Tecido subcutâneo 60 minutos após a inoculação do veneno analisado no aumento de 100 X. **Retângulo:** área de intenso infiltrado de neutrófilos. [4] Tecidos subcutâneo e muscular 240 minutos após a injeção do VNa. **Retângulo:** área de inflamação e necrose muscular. [5] Tecido muscular, 240 minutos após a inoculação do veneno, observado no aumento de 200 X. **Seta:** célula muscular necrótica; **Asterisco:** célula muscular viva. [6] Tecidos subcutâneo e muscular 1440 minutos após a injeção do VNa, e analisado no aumento de 100 X

Escore histopatológico das mudanças observadas após a inoculação de veneno nas patas.

Tempo (min)	Edema Subcutâneo	Congestão	Leucócitos			Inflamação Muscular	Escape de Hemácias	Necrose
			NØ	MØ	MΩ			
0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	0	0	0	0	0	0	0
20	1	1	+	0	0	0	0	0
30	2	2	++	0	0	2	1	0
60	3	3	+++	0	0	3	2	0
120	2	2	++++	+	0	3	0	0
180	1	1	++++	++	0	3	0	0
240	1	1	++++	0	++	3	0	1
300	1	1	++++	0	+++	2	0	0
360	1	1	+++	0	++++	2	0	0
1440	1	0	+	0	++++	0	0	0

Tabela 2 - Escore de alterações histopatológicas nas patas dos animais: 0- Inexistente; 1- Discreto; 2- Moderado; 3- Intenso. **Migração de células:** + Discreta; ++ Moderada; +++ Intensa; ++++ Muito intensa. **Tipo de célula:** NØ- Neutrófilos; MØ- Macrófagos; MΩ- Células mononucleares.

1.4.3.2.1 O edema induzido pelo veneno da *N. annulifera* é influenciado por mastócitos e mediadores lipídicos

Para determinar a influência de diferentes mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelo veneno da *N. annulifera* em camundongos BALB/c, foram empregados diferentes inibidores farmacológicos. Observou-se que os animais tratados com o fármaco cromoglicato dissódico (CD), inibidor da degranulação de mastócitos, apresentaram aumento na espessura de suas patas significativamente menor em relação aos animais tratados com veículo, durante os primeiros 30 minutos após a indução do edema, indicando influência de mastócitos nos momentos iniciais das reações locais. No entanto, nos períodos de análise posteriores, os animais dos grupos tratados com veículo ou CD não apresentaram diferenças estatísticas na espessura das patas (**Fig. 6a**).

Diferente do apresentado pelos animais tratados com CD, os animais tratados com a Dexametasona (Dexa), apresentaram redução significativa na espessura das patas em todos os períodos analisados, o que demonstra a contribuição da cFLA₂ e mediadores relacionados a atividade desta enzima (**Fig. 6b**).

Considerando-se que a cFLA₂ está envolvida na liberação de ácido araquidônico, substrato para a geração de diferentes mediadores lipídicos, a contribuição destes mediadores para o desenvolvimento do edema de pata induzida pelo veneno da *N. annulifera* foi testada.

A contribuição de Prostanóides foi avaliada tratando-se os animais com Indometacina (Indo), inibidor não seletivo das isoformas de COX-1/2. Observou-se que os Prostanóides influenciam significativamente o edema durante os primeiros 120 minutos, uma vez que houve redução do edema. No entanto, nos períodos mais tardios do edema, tal influencia não foi observada (**Fig. 6c**).

O papel dos LTs no desenvolvimento do edema, ao longo do tempo, foi determinado inibindo-se a enzima FLAP com o composto MK-886. Desta forma, observou-se que os LTs contribuem de forma significante no decurso temporal do edema, provocado pelo VNa, dado que o tratamento com o MK-886 reduziu a espessura das patas em quase todos os períodos de análise (**Fig. 6d**).

A participação do PAF, no desenvolvimento do edema de pata, foi analisada tratando-se os animais com WEB-2086, antagonista do receptor do PAF (PAFR). Diferente do observado para os outros mediadores, a ativação do PAFR

influenciou o edema apenas na primeira hora, enquanto nos períodos tardios nenhuma contribuição foi observada (Fig. 6e).

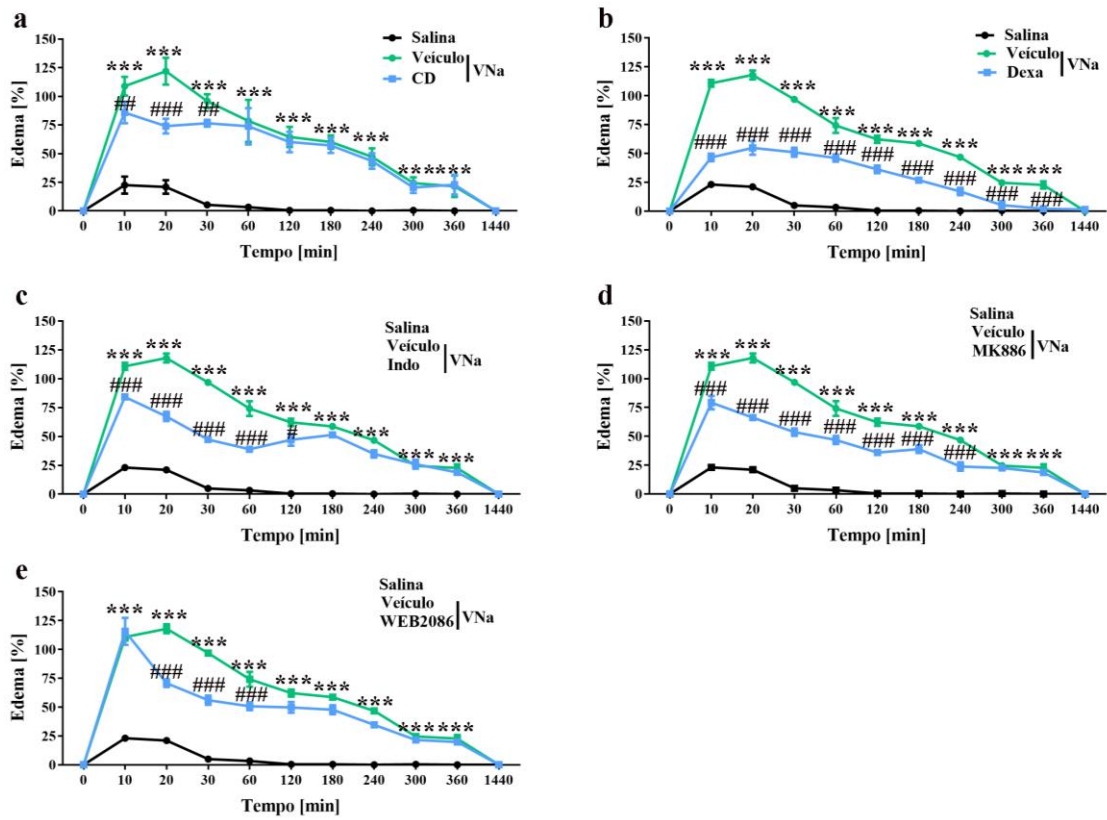


Figura 6 – Influência de diferentes mediadores inflamatórios no edema. Grupos de camundongos BALB/c foram pré-tratados com CD (10 mg/kg) [a], Dexa (2 mg/kg) [b], Indo (10 mg/kg) [c], MK-886 (5 mg/kg) [d], WEB-2086 (5 mg/kg) [e] ou veículo (salina ou DMSO). Em seguida, o edema foi induzido e avaliado durante 24 horas, sendo os resultados obtidos expressos como Edema [%]. As cinéticas do edema foram comparadas estatisticamente por Two-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa x salina) e ### (VNa + Veículo x VNa + Inibidores) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

1.4.3.3 Reações inflamatórias sistêmicas são observadas em modelo murino de envenenamento moderado

Grupos de camundongos BALB/c foram inoculados com salina ou 60% da DL₅₀ do veneno da *N. annulifera* por via intraperitoneal e, em diferentes períodos, eutanasiados para obtenção de sangue e órgãos para avaliação de parâmetros inflamatórios. A inoculação da dose subletal foi capaz de promover alterações nos animais como apatia, arqueamento da coluna, eriçamento de pelos, contrações abdominais e dificuldade para caminhar. Tais manifestações, observadas somente na primeira hora pós inoculação, foram de menor intensidade quando comparadas às observadas no envenenamento com a dose letal. Cabe ressaltar que a dose de 60% da DL₅₀ não foi capaz de provocar alterações histopatológicas dignas de nota nos órgãos analisados (dados não mostrados).

Os animais inoculados com a dose subletal do veneno não apresentaram aumento no número total de leucócitos (dados não mostrados), no entanto observou-se alterações nas porcentagens de linfócitos (**Fig. 7a**) e neutrófilos (**Fig. 7b**) circulantes. Estas alterações perduraram por várias horas, mas retornaram aos valores fisiológicos, 24 horas após a injeção do veneno. A inoculação da dose subletal foi também capaz de induzir aumento nos níveis plasmáticos de alguns mediadores inflamatórios como IL-6 (**Fig. 7c**) e CCL2 (**Fig. 7d**). O aumento nos níveis de CCL2 se manteve por várias horas e retornou aos valores basais 24 horas após a inoculação do veneno (**Fig. 7d**). Em relação a IL-6, houve aumento sistêmico nos níveis da mesma, com pico de detecção 1 hora após a inoculação do veneno. No entanto, diferentemente da CCL2 em que os valores permaneceram similares de 60 a 380 minutos, após a inoculação do veneno, os valores de IL-6 foram diminuindo ao longo do tempo (**Fig. 7c**).

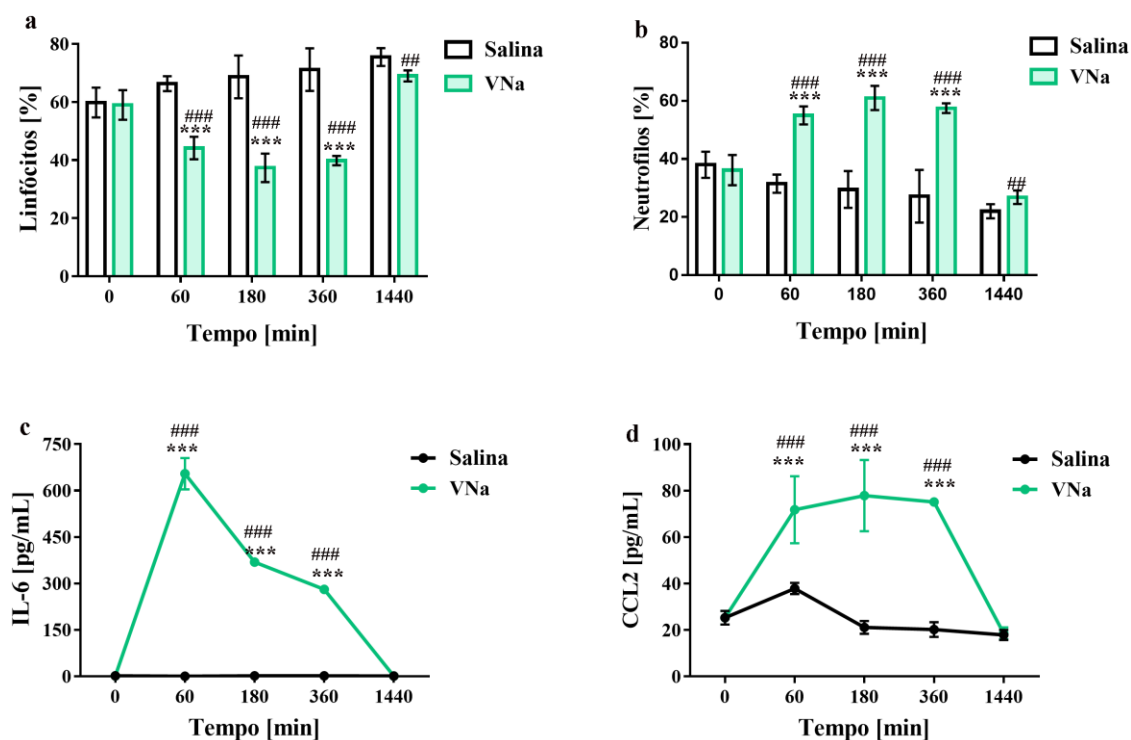


Figura 7 – Reações inflamatórias sistêmicas no envenenamento experimental moderado por *N. annulifera*. A inflamação sistêmica foi induzida pela inoculação de 56,78 μg do veneno da *N. annulifera* (VNa) por via intraperitoneal. Nos períodos de 60, 180, 360 e 1440 minutos após a inoculação do veneno, os animais foram eutanasiados, o sangue coletado e submetido à extensão sanguínea para análise das alterações leucocitárias [a,b]. Adicionalmente, do sangue obtido foi coletado o plasma para quantificação de diferentes mediadores inflamatórios. As dosagens de IL-6 [c] e CCL2 [d] foram realizadas utilizando-se o CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences), conforme as recomendações do fabricante. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL e apresentados como média \pm SD. Os dados gerados foram comparados estatisticamente pelo Two-Way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. *** (VNa x salina) e ### (Diferentes períodos x Tempo 0) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

1.4.3.4 Envenenamento experimental grave por *N. annulifera* provoca hiperinflamação sistêmica e pulmonar

A inoculação de 1DL₅₀ do veneno promoveu várias alterações comportamentais nos animais, tais como, apatia, arqueamento de coluna, eriçamento de pelos, dificuldade de locomoção e contrações abdominais fortes. A maioria dos animais inoculados com 1DL₅₀ morreu entre três e cinco horas após a inoculação do veneno, e considerando que neste período todos os animais estavam intensamente debilitados, em decorrência da ação do veneno, o período de cinco horas foi determinado como “*endpoint*” para eutanásia e obtenção de amostras dos animais sobreviventes.

Diferente dos animais inoculados com a dose subletal, os animais inoculados com 1DL₅₀ apresentaram aumento nos números totais de leucócitos circulantes (**Fig. 8a**), o qual foi acompanhado de neutrofilia (**Fig. 8c**) e monocitose (**Fig. 8d**). Entretanto, as porcentagens de linfócitos apresentaram-se reduzidas nestes animais (**Fig. 8b**). Estes animais apresentaram produção intensa de IL-6 (**Fig. 8e**) e CCL2 (**Fig. 8f**), quando comparada a dos animais injetados com a dose subletal. Além disso, os animais submetidos ao envenenamento grave apresentaram produção sistêmica de TNF- α (**Fig. 8g**).

De todos os órgãos avaliados, alterações histopatológicas dignas de nota foram encontradas apenas nos pulmões. Todos os animais envenenados apresentaram lesão pulmonar aguda (hiperaguda) (LPA) caracterizada por Dano Alveolar Difuso (DAD), com presença de intenso colapso alveolar (setas), espessamento e inflamação do septo alveolar (**Fig. 9**) (**Tabela 3**).

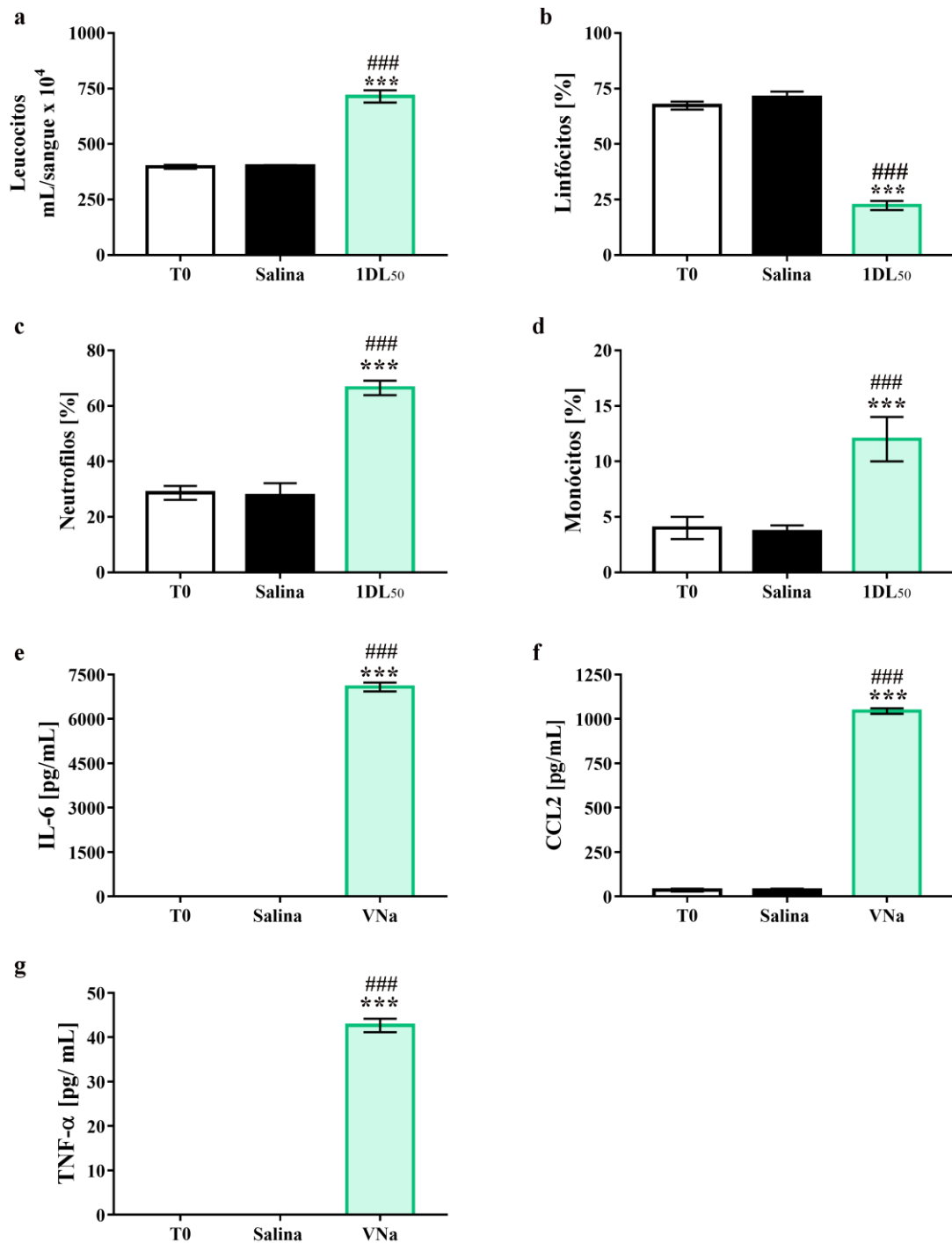


Figura 8 - Reações inflamatórias sistêmicas no envenenamento experimental grave por *N. annulifera*. A inflamação sistêmica foi induzida pela inoculação de 94,14 µg do VNa por via intraperitoneal. Cinco horas após a inoculação do veneno ou seguido à morte, o sangue dos animais foi coletado, a contagem celular realizada [a,b,c,d] e os mediadores inflamatórios quantificados por CBA [e,f,g]. Os resultados foram expressos como média ±SD e comparadas estatisticamente com One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa x salina) e ### (VNa x Tempo 0) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

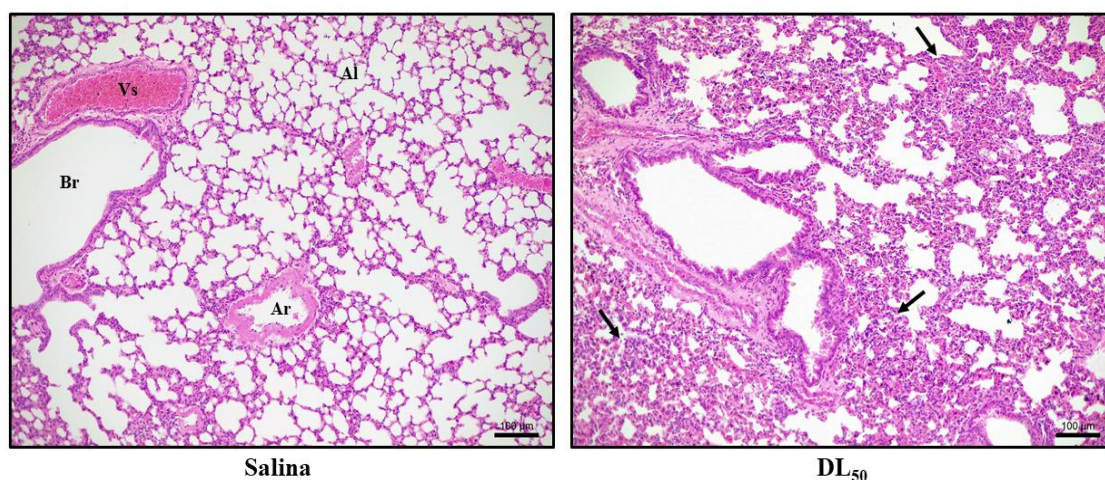


Figura 9 – Desenvolvimento de Lesão Pulmonar Aguda (LPA) no envenenamento experimental grave. Camundongos BALB/c foram inoculados com 1 DL₅₀ (94,14 µg) do veneno de *N. annulifera* ou salina por via intraperitoneal. Cinco horas após o envenenamento ou seguido a morte, os pulmões foram coletados, fixados e submetidos à coloração por HE. A análise do tecido pulmonar foi realizada em microscópio de luz, com aumento de 100 X e o diagnóstico histopatológico determinado. **Al** (alvéolos); **Vs** (vaso sanguíneo); **Br** (bronquíolo); **Ar** (Artéria). As setas indicam área de colapso alveolar. Dados representativos de três experimentos.

Escore histopatológico dos pulmões após envenenamento experimental grave

Condição experimental	Colapso Alveolar [área%]	Inflamação septal	Espessamento septal
T0	0	0	0
Salina	0	0	0
1DL₅₀	3 [70%]	2	3

Tabela 3 - Escore de alterações histopatológicas nos pulmões dos animais: 0- Inexistente; 1- Discreto; 2- Moderado; 3- Intenso.

1.5 DISCUSSÃO

Os venenos animais são misturas complexas de componentes que apresentam efeitos variados nas presas e em vítimas humanas e, entre estes, a inflamação local e sistêmica pode ser benéfica e/ou deletéria. Neste estudo por meio de várias estratégias experimentais, *in vitro* e *in vivo*, fomos capazes de identificar componentes tóxicos, de diferentes classes, no veneno da serpente *N. annulifera*. Estes são capazes de (i) degradar componentes celulares, teciduais e plasmáticos, induzir (ii) coagulopatias no plasma humano, (iii) reações inflamatórias locais mediadas por degranulação de mastócitos e produção de mediadores lipídicos, (iv) inflamação sistêmica em modelo envenenamento moderado, (v) inflamação sistêmica, (vi) lesão pulmonar hiperaguda e (vii) morte em modelo de envenenamento grave.

A análise do perfil eletroforético do veneno de *N. annulifera* revelou a presença de proteínas com massas moleculares diversas e, entre essas, destacam-se as proteínas de baixa massa molecular. Isto nos leva a sugerir que este veneno apresenta grandes quantidades de 3FTX (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018; KONSHINA et al., 2011; TONSING et al., 1983; OSTHOFF, 1990), e FLA₂ (BURKE & DENNIS, 2009a,b; GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018; MOUCLIS & DENNIS, 2019; PETRAS et al., 2010), as quais podem ser responsáveis por algumas manifestações clínicas do envenenamento por *N. annulifera*, como as lesões cardíacas e inflamação sistêmica em cães, e a necrose local e parada respiratória em humanos.

A glicosilação protéica é uma modificação pós-traducional em que a adição de carboidratos às proteínas aumenta a sua solubilidade, estabilidade e, em algumas situações, contribui para interação célula-célula, ligante-receptor e interação de enzimas-substratos ou enzimas-inibidores endógenos (SOARES e OLIVEIRA, 2009). Em relação aos venenos, foi demonstrado que a glicosilação proteica promove aumento ou redução das atividades tóxicas dos venenos (OSIPOV et al., 2004) e protege as toxinas da interação com inibidores presentes nas presas (ZELANIS et al., 2012).

No presente estudo foram detectadas, proteínas com resíduos de Manose e N-acetilglicosamina indicando a existência de SVMP e SVSP no veneno da *N. annulifera*, uma vez que estes carboidratos são encontrados principalmente nestas classes de toxinas (SHOIBONOV et al., 2005; ZELANIS et al., 2012). Além disso, as massas moleculares dos componentes glicosilados do veneno da *N. annulifera* são

similares às das SVMPs e SVSPs glicosiladas, encontradas no veneno da serpente *B. jararaca* (ZELANIS et al., 2012).

Os resíduos de Manose e N-acetilglicosamina são também encontrados em uma série de agentes patogênicos, tais como fungos e bactérias. A presença destes componentes em toxinas do veneno da *N. annulifera* pode funcionar como VAMPs, uma vez que tais resíduos são reconhecidos por PRRs associados à membrana (BROWN, 2006) e solúveis (FUJITA, 2002), promovendo os eventos inflamatórios iniciais que podem levar ao desenvolvimento das reações locais e sistêmicas associadas ao envenenamento.

Outra glicoproteína encontrada de maneira inédita no veneno de *N. annulifera* foi o CVF, uma proteína C3b like que interage com o fator B do sistema complemento, culminando na ativação da via alternativa de maneira exacerbada e descontrolada (VOGEL e FRITZINGER, 2010). De acordo com a imunorreatividade detectada por meio de *Western Blot*, duas bandas proteicas do veneno foram reconhecidas pelo soro anti-CVF, sugerindo a presença de mais de uma isoforma deste componente. No entanto, para confirmar isto, o isolamento e caracterização das frações do veneno apresentando o CVF serão necessários.

Embora o CVF seja uma glicoproteína encontrada nos venenos de algumas espécies de *Naja* (EGGERTSEN et al., 1981; OSIPOV et al., 2005; TAKAHASHI e HAYASHI, 1982; TAMBOURGI et al., 1994; von-ZABERN et al., 1982; van-DEN BERG et al., 1991), e outros indivíduos da família Elapidae, como *Hemachatus hemachatus* (REHANA e KINI, 2007) e *Ophiophagus hannah* (REHANA e KINI, 2007; ZENG et al., 2012) pouco se sabe, até o momento, sobre o real papel desta molécula na captura das presas e envenenamentos humanos. Acredita-se que a ativação desregulada da via alternativa do sistema complemento pelo CVF, e consequente geração de anafilatoxinas, poderia contribuir para vasodilatação sistêmica, levando a queda de pressão e choque; aumento da permeabilidade vascular para potencializar o acesso das toxinas para a circulação, levando a morte da presa (VOGEL e FRITZINGER, 2010; TAMBOURGI & van den BERG, 2014).

Nos venenos de serpentes são encontradas uma série de proteínas tóxicas, as quais podem ter atividade enzimática ou não (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018). Através de vários ensaios funcionais, detectou-se a presença de moléculas com atividade enzimática no veneno da *N. annulifera*.

Uma importante característica dos venenos elapídicos é a presença de toxinas de baixa Mr, como por exemplo, as FLA₂ (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; MUNAWAR et al., 2018; PETRAS et al., 2010; TANAKA et al., 2010). Por meio de ensaio fluorimétrico, detectamos a presença deste grupo de enzimas no veneno de *N. annulifera* que, através da clivagem de fosfolipídios ou inserção em membranas celulares, contribuem para letalidade (BATH e GOWDA, 1991; CHWETZOFF et al., 1989), inflamação (CIRINO et al., 1989; VADAS et al., 1989; ZULIANI et al., 2005), dor (CHACUR et al., 2003; 2004), lesão tecidual (CHWETZOFF et al., 1989; GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2004; MORA et al., 2005; CHEN et al., 2010; ARCE-BEJARANO et al., 2014; MORA-OBANDO et al., 2014) e neurotoxicidade (RIGONI et al., 2004) descritas nos envenenamentos por *Naja* e serpentes de outros gêneros.

Além das FLA₂, detectou-se a presença de hialuronidases no veneno, que além de facilitar a entrada das toxinas do veneno na circulação (GIRISH e KEMPARAJU, 2005; KEMPARAJU e GIRISH, 2006), contribuem para as reações locais dos envenenamentos por degradar o ácido hialurônico da matriz extracelular. Os fragmentos gerados na degradação do ácido hialurônico são reconhecidos por TLR-2 e TLR-4 levando ao aumento da permeabilidade vascular, bem como a produção de quimiocinas, promovendo assim inflamação (BITENCOURT et al., 2015; JIANG et al., 2005).

A atividade proteolítica dos venenos elapídicos, na maioria das vezes, é baixa ou inexistente (BRAZIL, 1987; TAMBOURGI et al., 1994; TAN e TAN, 1988; TAN e PONNUDURAI, 1992; TANAKA et al., 2010). Poucos estudos existem a respeito da atividade proteolítica do veneno de *N. annulifera*. Ao contrário do apresentado por Phillips e colaboradores (2012), nas condições experimentais utilizadas neste estudo, o veneno de *N. annulifera* não apresentou atividade proteolítica sobre a gelatina, o que parece ser algo comum aos venenos das serpentes da família Elapidae (TAMBOURGI et al., 1994). A falta de atividade gelatinolítica sugere a ausência de proteases com capacidade de destruir componentes proteicos da matriz extracelular, diferente do observado nos venenos de outras espécies de serpentes, tais como as do gênero *Bothrops* (HERRERA et al., 2015; FREITAS-DE-SOUSA et al., 2017). No entanto, testes *in vivo* e *in vitro*, frente a outras moléculas da matriz extracelular, como por exemplo, colágeno, elastina, laminina e fibronectina são

interessantes para concluir se o veneno destrói ou não os componentes proteicos da matriz.

Os distúrbios hemostáticos são uma marca registrada dos envenenamentos por serpentes da família Viperidae, no entanto pouco se sabe sobre tais distúrbios nos envenenamentos por serpentes da família Elapidae (WHITE, 2016).

Detectamos, por meio de ensaios funcionais, que o veneno da *N. annulifera* contém em sua composição SVMPs e SVSPs capazes de clivar a cadeia alfa do fibrinogênio humano, de uma maneira diferente da Trombina, levando a geração de um fragmento de 40 kDa. O veneno da *N. annulifera* não só apresentou ação sobre o fibrinogênio humano, como interferiu no tempo de coagulação do plasma humano, de maneira dose dependente, deixando o plasma incoagulável. Frente a estes achados propõe-se que as alterações hemostáticas observadas no plasma humano são em parte decorrentes da ação das SVMPs e SVSPs, já que detectamos um padrão de clivagem do fibrinogênio diferente do exercido pela Trombina. Além disso, as FLA₂ detectadas no veneno representam uma fonte de moléculas também anticoagulantes, uma vez que por meio da clivagem de fosfolipídios plasmáticos e de membrana, ligação a fosfolipídios plasmáticos e de membrana, sem necessariamente ocorrer à clivagem dos mesmos, ligação a proteínas da cascata de coagulação, como FXa, FVa, Protrombina e Trombina impedem que a formação do coágulo aconteça (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017). É interessante ressaltar que nossos resultados, *in vitro*, vão de encontro com os dados clínicos de cães envenenados, podendo os distúrbios de coagulação ser uma característica clínica importante nos envenenamentos por *N. annulifera* em diferentes espécies, sendo de grande importância os estudos que investiguem os mecanismos moleculares envolvidos nestes distúrbios.

Considerando a presença de toxinas com diferentes atividades e características bioquímicas no veneno da serpente *N. annulifera*, e que tais toxinas atuando como VAMPs ou via geração de DAMPs (fragmentação do ácido hialurônico, clivagem do fibrinogênio e clivagem/oxidação de fosfolipídios de membrana), são potenciais agentes indutores de inflamação, estudos *in vivo* foram realizados para caracterizar a letalidade e as reações inflamatórias locais e sistêmicas envolvidas neste envenenamento.

A dose letal do veneno de *N. annulifera* foi determinada em camundongos BALB/c e caracterizada como 94,14 µg/camundongo. Estes animais apresentaram, antes da morte, apatia, eriçamento de pelos, dificuldade para andar, arqueamento da

coluna, contrações abdominais fortes, paralisia das patas traseiras e dificuldade para respirar (dispneia). Embora a dispneia não tenha sido devidamente caracterizada nos animais envenenados por meio de provas de função pulmonar, tal sintoma poderia sugerir uma ação neurotóxica do veneno nos camundongos, uma das características historicamente relacionadas como a principal dos envenenamentos por serpentes da família Elapidae (WHITE, 2016; WHO, 2010a,b). Porém um fato que merece atenção, é que a dose letal do veneno da *N. annulifera* é elevada, sendo de 3 a 14 vezes maior quando comparada aos venenos de outras espécies do gênero *Naja*, (COSTA DE ALMEIDA et al., 2008; LIU et al., 2017; PETRAS et al., 2011; RAMOS-CERILLO et al., 2008). Esta alta toxicidade dos venenos elapídicos geralmente é atribuída a grande quantidade de 3FTX e FLA₂ neurotóxicas que correspondem de 50 a 95% dos componentes destes venenos (LAURIDSEN et al., 2017; LAUSTSEN et al., 2015; LIU et al., 2017; PETRAS et al., 2011; SANZ et al., 2019a,b).

Através de análises proteômicas, por espectrometria de massas, detectou-se que o veneno de *N. annulifera* é composto de 94% de 3FTX (dados não mostrados), e muitas delas sem atividade neurotóxica ou com atividade neurotóxica muito baixa (Weak Toxins). Assim, considerando-se os dados da DL₅₀ em comparação com os outros venenos elapídicos, podemos concluir que o mecanismo de letalidade deste veneno é devido a outros fatores que não a ação neurotóxica, como proposto pela literatura para a maioria dos venenos elapídicos.

Danos teciduais causados pela perfuração e inoculação de substâncias tóxicas, nas picadas por animais peçonhentos, podem desencadear diferentes reações teciduais, incluindo inflamação (ZOCCAL et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2019). Entre os eventos inflamatórios, a formação de edema pode ter consequências patológicas, como a isquemia tecidual, compressão de fibras nervosas e musculares, causando dor e imobilidade do membro afetado, levando à síndrome compartimental (DAHR, 2015; KYEREMANTENG et al., 2016; OAK et al., 2016).

A injeção do veneno de *N. annulifera* no tecido subcutâneo da pata de camundongos induziu edema que perdurou por várias horas, porém desapareceu completamente em 24 horas. Entre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento deste edema foi detectado que a degranulação de mastócitos e a produção de mediadores lipídicos contribuem para tal evento, uma vez que o uso de inibidores reduziu significativamente o volume das patas dos animais em diferentes períodos. Entre os inibidores usados, a DEXA e o MK-886 se destacaram, já que reduziram o

edema em quase todos os períodos de análise. Comparando-se os dois inibidores, a dexametasona mostrou-se mais potente em inibir o desenvolvimento do edema, uma vez que tal fármaco tem um espectro de ação em mais eventos inflamatórios (CRUZ-TOPETTE & CIDLOWSKI, 2015), quando comparado ao MK-886. No entanto, fica claro que a produção de LTs é um evento importante para o inchaço da pata, pois o MK-886 (inibidor da FLAP) interferiu no edema em praticamente todos os períodos de análise. Embora não tenha sido mostrado que a degranulação de mastócitos, produção de prostanóides e PAF estivessem envolvidas em todos os períodos de avaliação, é importante ressaltar que todos os inibidores utilizados foram capazes de reduzir o edema no momento de pico. Desta forma, considera-se que o inchaço de pata, induzido pelo veneno da *N. annulifera*, é incitado por vários mediadores, e que exista um evento central na patogênese do envenenamento que leve a produção de tais moléculas.

A mudança na espessura das patas dos animais foi acompanhada de infiltrado massivo de neutrófilos, 20 minutos após a inoculação do veneno, alcançando pico 120 minutos, e se perdurou até 360 minutos. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem aos sítios inflamatórios e entre suas atividades efetoras, estão a fagocitose de microrganismos e células mortas, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, quimiocinas, interleucinas, mediadores lipídicos e peptídeos antimicrobianos; e NETose. Para que os neutrófilos acessem os tecidos é necessário que uma série de moléculas quimiotáticas sejam produzidas, como a quimiocina CXCL-1/KC (homóloga a IL-8 humana) e o LTB₄ (LEY et al., 2018). Embora não tenhamos acessado os efeitos dos inibidores do edema no infiltrado de neutrófilos, podemos inferir que, de fato, existe algum mecanismo central na patogênese do envenenamento pela *N. annulifera* que leva a produção de LTB₄, com consequente aumento da permeabilidade vascular, desenvolvimento de edema e influxo de neutrófilos.

Além da migração de neutrófilos para os tecidos das patas, observou-se a presença de necrose muscular 240 minutos após a inoculação de veneno, decorrente da ação das FLA₂ e citotoxinas presentes no veneno (GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2004; MORA-OBANDO et al., 2014). Alternativamente, a necrose pode ser decorrente do processo inflamatório que está ocorrendo na pata, uma vez que neutrófilos e macrófagos ativados podem liberar uma série de moléculas efetoras, tais como enzimas e NETs, que podem provocar lesão tecidual (COLÓN et al., 2019;

DANIEL et al., 2019; KATKAR et al., 2016; JORCH & KUBE, 2017; MUÑOZ et al., 2019).

Considerando-se que as toxinas dos venenos e mediadores inflamatórios, produzidos localmente, conseguem acessar a circulação da presa/vítima e causar alterações sistêmicas e órgão específicas, avaliamos se o veneno da *N. annulifera* induz reações inflamatórias sistêmicas e alterações histopatológicas em órgãos. Para tanto, foram estabelecidos dois modelos experimentais, os quais representaram condições de envenenamento moderado, promovido pela dose subletal, e de envenenamento grave/severo, induzido pela dose letal do veneno.

Foi mostrado que a dose subletal do veneno da *N. annulifera* induz reações inflamatórias sistêmicas, com pico em 1 hora e declínio total em 24 horas. Estas reações foram caracterizadas por aumento na porcentagem de neutrófilos circulantes, e nos níveis plasmáticos de IL-6, CCL2 (MCP-1), e diferente dos cães envenenados por *N. annulifera* que apresentam dano cardíaco (LOBETTI e JOUBERT, 2004), os animais inoculados com a dose subletal não apresentaram dano em nenhum dos órgãos avaliados. Embora não tenha causado morte e danos teciduais, o aumento hiperagudo nos níveis circulantes de IL-6 e CCL2 pode ser potencialmente danoso, uma vez que tais eventos podem causar alterações respiratórias, cardiovasculares, hepáticas, neurológicas e hemostáticas (MATSUMOTO et al., 2019), fazendo-se necessária a avaliação destes aspectos clínicos em investigações futuras.

No modelo de envenenamento severo pela *N. annulifera* foi mostrado que antes da morte, ocorre inflamação sistêmica exacerbada quando comparada a induzida pela dose subletal. Entre os eventos inflamatórios induzidos pela injeção de 1DL₅₀ do veneno, foi detectada leucocitose, que não foi detectada nos animais submetidos a quadros de envenenamento moderado. Isso sugere que o desbalanço provocado no envenenamento severo é de alguma forma percebido pela medula óssea. Sabe-se que uma série de mediadores inflamatórios, como C5a (KAJITA & HUGLI, 1990), Fator B (ADAMIKI et al., 2019), LTB₄, PAF, IL-8 (JAGELS & HUGLI, 1992), G-SCF (do inglês: *Granulocyte colony-stimulating factor*) (ULICH et al., 1988), IL-6 (ULICH et al., 1988), TNF- α , IL-1 β (ULICH et al., 1987) e PGE₂ (ULICH et al., 1986), e ligantes de TLRs (SHUETTPELZ & LINK, 2013) são capazes de agir nos progenitores mieloides na medula óssea promovendo sua proliferação, diferenciação e liberação na corrente sanguínea, culminando em leucocitose com neutrofilia. Entre os mediadores inflamatórios detectados nos animais envenenados com a dose letal, foram observados

níveis extremamente elevados de IL-6 e, em menor quantidade, de TNF- α . Tal combinação de interleucinas pode ser a responsável pela liberação de leucócitos da medula óssea, uma vez que tal combinação e a leucocitose não foram detectadas nos animais envenenados com a dose subletal de veneno. No entanto, as duas doses provocaram aumento na porcentagem de neutrófilos, sugerindo que tal evento ocorra de diferentes maneiras nos diferentes quadros de envenenamento experimental. Enquanto a dose letal induziu liberação dos estoques medulares de neutrófilos, levando a leucocitose, é possível que a dose subletal diminua os níveis fisiológicos de neutrófilos marginantes, levando ao aumento dos níveis circulantes de tais células. Considerando-se estas possibilidades, investigações da medula óssea destes animais devem ser realizadas.

A leucocitose é um evento inflamatório que ocorre frente a várias situações, tais como, reações a medicamentos, traumas e infecções. No entanto, tal evento é uma característica importante no contexto clínico, sendo em algumas situações considerado mal prognóstico pois tem correlação com índices elevados de mortalidade em uma série de doenças infecciosas ou não (ASADOLLAHI et al., 2010; CHABOT-RICHARDS & GEORGE, 2014; CRABTREE et al., 2001).

Além da neutrofilia, detectou-se monocitose nos animais submetidos ao envenenamento letal. O aumento nos números de monócitos circulantes pode ser apenas reativo, ou seja, ocorrer devido ao desbalanço extremo e liberação massiva de mediadores inflamatórios induzidos pela dose letal (LYNCH, et al., 2017). No entanto, o aumento no número de monócitos inflamatórios circulantes e emigração destas células, para os rins e pulmões de camundongos, está relacionado com a mortalidade na sepse, uma vez que tais células apresentam papel deletério neste contexto (CEBINELI, 2018). Além disso, aumento na quantidade destas células tem sido caracterizado também em humanos com sepse letal (GAINARU et al., 2018), o que sugere que no envenenamento letal pela *N. annulifera* os monócitos, através da liberação de mediadores inflamatórios, proteases, fatores de crescimento e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem, de alguma forma, contribuir para a letalidade associada ao envenenamento (MA et al., 2019).

O envenenamento letal provocou produção sistêmica exacerbada de IL-6 nos animais, demonstrando que esta interleucina é uma das moléculas inflamatórias chave no envenenamento pela *N. annulifera*.

A IL-6 é uma glicoproteína de 21 kDa, produzida por células imunes e não imunes. Esta citocina age em dois diferentes receptores, mIL-6R (ligado a membrana) e sIL-6R (solúvel), e pode ter propriedades pró- e anti-inflamatórias. No tocante as propriedades pró-inflamatórias, se destacam a indução da expressão de moléculas de adesão, aumento de permeabilidade vascular, produção de quimiocinas, de proteínas de fase aguda e liberação de proteases por leucócitos ativados. Já em relação às propriedades anti-inflamatórias, a IL-6 pode, por exemplo, promover controle da dor e induzir apoptose de leucócitos ativados.

Em diferentes condições inflamatórias sistêmicas, tal como em doenças autoimunes, se observa aumento nos níveis plasmáticos de IL-6, o que a torna um alvo terapêutico, uma vez que a mesma tem relação com diferentes eventos inflamatórios patogênicos (CALABRESE & STEFAN, 2014; HUNTER & JONES, 2015; JONES & JENKINS, 2018; RINCON, 2012; SCHELLER et al., 2011).

Considerando que a IL-6 é uma interleucina chave em uma série de reações fisiológicas, imunológicas e patológicas é possível que ela seja uma das responsáveis pela inflamação sistêmica e até mesmo morte no envenenamento letal. Além de promover leucocitose/neutrofilia/monocitose, a IL-6 provoca ativação e liberação de proteases por estas células, fator que pode amplificar os efeitos deletérios da dose letal do veneno (JONES & JENKINS, 2018).

Uma característica importante da IL-6 e do TFN- α , é a capacidade que estas interleucinas têm em promover a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (MEDZHITOV, 2010). Entre estas proteínas estão a hepcidina e a ferritina, que regulam os níveis de ferro no organismo. O ferro é um íon importante para o transporte de oxigênio pelas hemácias e a sua deficiência leva a quadros de anemia, que é responsável por elevados índices de morbidade e mortalidade em todo o mundo (CAMASCHELLA, 2015). Além do que, existe forte correlação entre altos níveis de IL-6/Hepcidina/Ferritina e baixos níveis de ferro e anemia em alguns tipos de câncer e doenças inflamatórias (NEMETH et al., 2004; NAKAGAWA et al., 2014; NOGUCHI-SASAKI et al., 2016). Sendo assim, é possível que a alta quantidade de IL-6 induzida pela dose letal leve a redução drástica nos níveis de ferro promovendo um quadro hiperagudo de anemia, o qual teria como consequência a oxigenação insuficiente dos tecidos, assim contribuindo para a morte dos animais.

Como já relatado, tanto os animais envenenados com a dose subletal e letal do veneno produzem quantidades sistêmicas significativas de IL-6, no entanto, os

animais submetidos ao envenenamento letal produziram cerca de 11 vezes mais IL-6 (~7300 pg/mL). Isto sugere que a IL-6 é um dos principais agentes inflamatórios envolvidos na letalidade deste envenenamento, pois em modelos experimentais de sepse observou-se que a letalidade estava associada à quantidade de IL-6 produzida pelos animais, sendo que os animais que produziam quantidades acima de 3000 pg/mL desta interleucina morriam (REMICK et al., 2005).

Além das proteínas de fase aguda, a IL-6 tem a capacidade de induzir a produção de CCL2 (BISWAS et al., 1998), como observado em nosso modelo experimental. A CCL2 é uma quimiocina de 13 kDa, produzida por células imunes e não imunes, que age promovendo a migração de monócitos para os tecidos em condições fisiológicas e inflamatórias. Além de atrair monócitos, ela pode também atrair e ativar células dendríticas, basófilos, linfócitos T e células NK e, assim como outros mediadores inflamatórios, altos níveis de CCL2 têm sido observados em diferentes condições patológicas (MURPHY, 2014; OSAKA et al., 2016; SATISH et al., 2009).

No nosso modelo de envenenamento grave, a produção de CCL2 pode estar correlacionada com o aumento na porcentagem de monócitos circulantes, uma vez que esta quimiocina promove liberação de monócitos da medula óssea (SHI & PAMER, 2011). Além disso, a CCL2 e IL-6 se autorregulam em relação a sua produção, o que pode justificar a produção concomitante de ambas nos nossos modelos de envenenamento (BISWAS et al., 1998).

Paralelo à detecção de IL-6 e CCL2, detectamos a presença de níveis circulantes significativos de TNF- α nos animais inoculados com 1DL₅₀ do veneno.

O TNF- α é uma proteína de 52 kDa, produzida por células imunes e não imunes, o qual apresenta duas formas, uma transmembrana e outra secretada. Esta interleucina medeia suas ações por meio de dois receptores, TNFRI e TNFRII, produzindo uma série de eventos fisiológicos e inflamatórios.

No tocante a inflamação, o TNF- α leva a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, produção de quimiocinas, interleucinas e eicosanoides. Embora importante para uma série de eventos inflamatórios e fisiológicos, o TNF- α tem se demonstrado responsável por eventos patogênicos em uma série de doenças de natureza inflamatória, posto que esta interleucina é citotóxica para diferentes tipos celulares, provoca liberação de proteases por leucócitos ativados, o que amplifica o dano tecidual. Além destes efeitos, o TNF- α , agindo individualmente ou junto com

outros mediadores inflamatórios, é capaz de provocar dor e distúrbios hemostáticos (CROFT & SIEGEL, 2017; KALLIOLAS & IVASHKIV, 2016; MALAVIYA et al., 2017).

Os animais envenenados com a dose letal apresentaram aumento sistêmico nos níveis de TNF- α , evento inflamatório não observado nos animais inoculados com a dose subletal, o que sugere que esta citocina contribui para o desbalanço provocado pela inflamação induzida pela dose letal. A produção de TNF- α nos animais injetados com dose letal pode ser devida a elevada liberação de DAMPs, promovida por esta dose e/ou pelo aumento da expressão/atividade da enzima conversora do TNF- α (TACE, do inglês: *Tumour Necrosis Factor-alpha Converting Enzyme*), enzima responsável pela liberação do TNF- α associado à membrana (MALAVIYA et al., 2017; KALLIOLAS & IVASHKIV, 2016). Além disso, a quantidade de SVMP, presente na DL₅₀, pode ser um dos principais fatores indutores da liberação de TNF- α sistemicamente, uma vez que estas enzimas agem como TACE-like provocando a liberação de TNF- α por macrófagos (MOURA-DA-SILVA et al., 1996).

Além do aumento sistêmico nos níveis de mediadores inflamatórios e leucocitose, a inoculação da dose letal do veneno de *N. annulifera* provocou LPA caracterizada por DAD (colapso alveolar, espessamento dos septos alveolares e infiltrado inflamatório septal), sendo a LPA/DAD achados histológicos característicos da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), condição clínica caracterizada por hipoxemia sistêmica severa, devido a dano pulmonar direto ou indireto, e que apresenta alto grau de letalidade (40%) (BOSMANN & WARD, 2014; BUTT et al., 2016; HAN & MALLAMPALLI, 2015; LIN et al., 2010; RIOS et al., 2017).

Como observado em nosso modelo experimental de envenenamento letal, fica claro que o veneno de *N. annulifera* promove DAD que culmina em SDRA que poderia ser uma das causas da morte dos animais envenenados e, possivelmente, também de humanos envenenados, já que apresentam comprometimento respiratório (WHO, 2010b). Além disso, existe correlação entre os achados histológicos da DAD e a morte decorrente da SDRA (CARDINAL-FERNÁNDEZ et al., 2016; RIOS et al., 2017).

Assim como na sepse (MATSUMOTO et al., 2018), o envenenamento experimental severo por *N. annulifera* provocou aumento sistêmico de interleucinas e quimiocinas, as quais são fatores de risco para o desenvolvimento da SDRA (RIOS et

al., 2017), uma vez que em pacientes e modelos experimentais de LPA/SDRA foram encontrados altos níveis de IL-6, TNF- α e CCL2 no lavado broncoalveolar e no plasma (BOSMANN et al., 2013; BOSMANN & WARD, 2014; BUTT et al., 2016; CROSS & MATTHAY, 2011; FRINK et al., 2001; HAN & MALLAMPALLI, 2015; LIN et al., 2010; MALAVIYA et al., 2017; PROCTOR et al., 2006; RUSSKAMP et al., 2015).

Neste capítulo foi demonstrado que a inflamação é um evento de destaque nos aspectos patológicos do envenenamento pela serpente *N. annulifera*, uma vez que tal envenenamento se assemelha a quadros de sepse e LPA/SDRA (**Fig. 10**). Sendo assim, identificar as principais vias inflamatórias envolvidas nos danos associados ao envenenamento foi o objetivo do capítulo II desta tese. Neste, foi investigada a influência do sistema complemento nas reações locais e sistêmicas do envenenamento experimental por *N. annulifera* em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

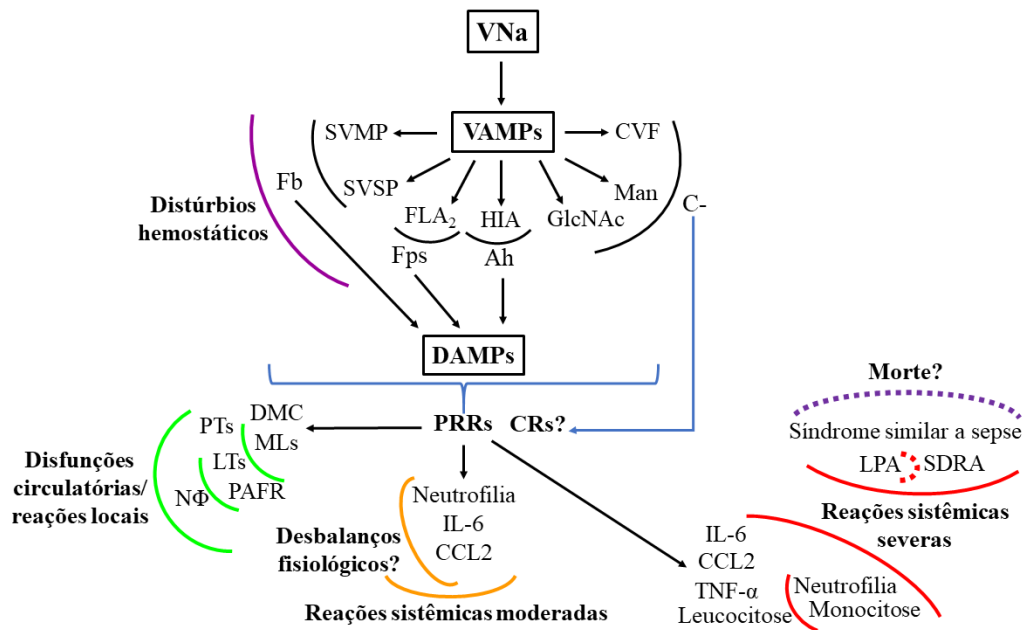


Figura 10 – Representação esquemática dos componentes e eventos inflamatórios envolvidos no envenenamento pela serpente *N. annulifera*. VNa: veneno da serpente *N. annulifera*; linhas pretas: componentes do veneno e seus alvos; linhas roxas: alterações na coagulação; chave azul: ligantes e receptores; linhas verdes: inflamação local; linhas laranjas: inflamação sistêmica induzida pela dose subletal; linhas vermelhas: inflamação sistêmica induzida pela dose letal; linha vermelha pontilhada: consequência da LPA; linha roxa pontilhada: consequência da síndrome similar a sepsse; seta azul: possível contribuição do sistema complemento e seus receptores na imunopatologia do envenenamento; VAMPs (*do inglês: Venom Associated Molecular Patterns*): Padrões Moleculares Associados a Venenos; SVMPs (*do inglês: Snake Venom Metalloproteinases*): Metaloproteinases; SVSPs (*do inglês, Snake Venom Serineproteases*): Serinoproteinases; FLA₂: Fosfolipases A₂; HIA: Hialuronidases; GlcNAc: Resíduos de N-acetilglicosamina; Man: Resíduos de Manose; CVF: *Cobra Venom Factor*; Fb: Fibrinogênio; Fps: Fosfolípidios de membrana ou plasmáticos; Ah: Ácido hialurônico; C-: Sistema complemento; DAMPs (*do inglês: Damage Associated Molecular Patterns*): Padrões Moleculares Associados a Danos; PRRs (*do inglês: Patterns Recognition Receptors*): Receptores de Reconhecimento de Padrões; CRs (*do inglês: Complement receptors*): Receptores de complemento; DMC: Degranulação de mastócitos; MLs: Mediadores lipídicos; PTs: Prostanóides; LTs: Leucotrienos; PAFR (*do inglês, Platelet Activating Factor Receptor*): Receptor do fator de ativação plaquetária; NΦ: Neutrófilos; LPA: Lesão Pulmonar Aguda; SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo;

1.6 CONCLUSÃO

O veneno de *N. annulifera* é composto por proteínas de natureza tóxica e pró-inflamatória, incluindo proteínas com resíduos de Manose e N-acetilglicosamina, CVF, FLA₂ e Hialuronidasas. Além destas, o veneno também contém SVMP e SVSP com propriedades fibrinogenolíticas, as quais promovem distúrbios hemostáticos no plasma humano. Considerando todos estes componentes identificados e suas ações, uma série de DAMPs podem ser gerados que, provavelmente, influenciam reações inflamatórias locais e sistêmicas observadas no envenenamento.

As toxinas presentes no veneno induzem reações inflamatórias locais hiperagudas, destacadas por edema mediado por degranulação de mastócitos e produção de mediadores lipídicos. Além disto, o veneno promove reações inflamatórias sistêmicas, em modelos de envenenamento experimental moderado e severo, caracterizadas por neutrofilia, monocitose e aumento nos níveis plasmáticos de CCL2, IL-6 e TNF- α .

No tocante ao envenenamento severo, o qual culmina em morte dos animais, o veneno provoca alterações histopatológicas pulmonares hiperagudas caracterizadas por DAD, o qual é uma característica observada em casos de SDRA.

Considerando-se todos os dados obtidos, conclui-se que as inflamações local, sistêmica e pulmonar são características imunopatológicas de destaque no envenenamento pela serpente *N. annulifera*, e que a disfunção respiratória observada nos indivíduos envenenados é decorrente de LPA e possível desenvolvimento de SDRA.

CAPÍTULO 2 – Contribuição do Sistema complemento para a imunopatologia do envenenamento pela serpente *N. annulifera*

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Sistema complemento

O sistema imune, como um sistema de reconhecimento, apresenta uma série de sensores associados a células ou solúveis e, entre estes, destaca-se o Sistema complemento.

O Sistema complemento é composto por mais de 50 moléculas incluindo, Moléculas de Reconhecimento de Padrões (PRMs, do inglês: *Pattern Recognition Molecules*), proenzimas, proteases, complexos multimoleculares, anafilatoxinas, opsoninas, receptores e reguladores (BOHLSON et al, 2019). Este conjunto de moléculas promove imunovigilância e respostas imunes inatas e adaptativas (REIS, et al., 2019), funções que são de extrema importância para a defesa do organismo e homeostase tecidual (BOHLSON et al, 2019). Além da contribuição para eventos imunológicos, tem-se atribuído ao complemento diferentes papéis em contextos não imunes, como comprometimento de células tronco, desenvolvimento neural e cardíaco, sobrevivência celular e ativação de vias metabólicas (FREELEY et al., 2016; GORELIK et al., 2017; KOLEV et al., 2015; MORTENSEN et al., 2017).

As proteínas do complemento podem ser encontradas (i) na forma solúvel no plasma, líquido intersticial e linfa (ii) associadas às membranas citoplasmática e mitocondrial (receptores e reguladores) e (iii) em estoques endossomais e lisossomais (FREELEY et al., 2016; RUPRECHT, et al., 2006). Estas proteínas, em sua grande maioria, se encontram na forma não ativa; no entanto, frente à MAMPs e DAMPs (REIS, et al., 2019), elas podem ser ativadas por meio de clivagem proteolítica, culminando na geração de uma série de fragmentos biologicamente ativos. Entre estes estão as opsoninas (C3b, iC3b, C4b) e anafilatoxinas (C3a, C4a, C5a), que são de extrema importância na indução e manutenção de diferentes eventos imunológicos, incluindo a fagocitose e morte de microrganismos, remoção de células apoptóticas e imunocomplexos, quimiotaxia e produção de mediadores inflamatórios.

Embora o complemento seja de suma importância para o desenvolvimento e manutenção das respostas imunológicas, a ativação descontrolada e deficiências de componentes do complemento têm sido associadas a uma série de patologias de

natureza infecciosa, inflamatória e degenerativa (FREELEY et al., 2016; LO & WOODRUFF, 2020; REIS, et al., 2019; RUPRECHT, et al., 2006).

2.1.2 Rotas intrínsecas de ativação do complemento

A ativação do sistema complemento pode ocorrer por rotas intrínsecas (canônicas) e/ou extrínsecas (não canônicas). Entre as rotas intrínsecas têm-se as vias clássica, das lectinas e alternativa (BOHLSON et al, 2019; REIS, et al., 2019; LO & WOODRUFF, 2020).

A via clássica possui como PRM o complexo C1. O C1 é um complexo macromolecular, dependente de Ca^{2+} , formado pelas subunidades C1q, C1r e C1s (C1q_{6r}2s₂) (PEERSCHKE & GHEBREHIWET, 2014).

O C1q é uma molécula que apresenta um domínio haste, estruturalmente relacionado ao colágeno (*região colágeno like*), e um domínio globular (*cabeça globular*) responsável pelo reconhecimento de MAMPs e DAMPs (PEERSCHKE & GHEBREHIWET, 2014). Entre os alvos deste complexo destacam-se imunocomplexos formados entre IgG ou IgM com antígenos, fosfatidilserina exposta na superfície de células apoptóticas, Pentraxinas, tais como PCR (Proteína C-Reativa), PAS (Proteína Amilóide Sérica) e PTX3 (Pentraxina 3), DAMPs como o HMGB1 (do inglês: *High Mobility Group Box 1 Protein*), e alguns componentes da parede celular de bactérias, tais como lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicoico (BOHLSON et al, 2019; KIM et al., 2018; KINDT et al., 2008; LO & WOODRUFF, 2020; LOOS et al., 1986; MURPHY et al., 2014; ROUMENINA et al., 2008; RICKLIN et al., 2016).

Após interação com seus alvos, o complexo C1 adquire uma conformação que permite a autoativação das moléculas de C1r presentes no complexo. O C1r é uma serinoprotease que possui como substrato a proenzima C1s.

O C1s, convertido em sua forma ativa pelo C1r, cliva o C4 gerando dois fragmentos, o C4a e o C4b. No momento da clivagem, o C4b expõe em sua estrutura um sítio de ligação, o grupamento tioester importante para a ligação do C4b na superfície alvo próximo ao complexo C1 e, com isso, ocorre a ligação da molécula C2 ao C4b. O C2 é uma serinoprotease produzida na forma de zimogênio, que quando ligado ao C4b é convertida pelo C1s em sua forma ativa, o fragmento C2a, enquanto o fragmento C2b se difunde e não apresenta atividade biológica conhecida. O complexo formado, C4b2a, é a C3 convertase da via clássica que cliva/ativa a proteína C3

(BOHLSON et al, 2019; LO & WOODRUFF, 2020; MARKIEWISK & LAMBRIS, 2007; RICKLIN et al., 2011).

A via das lectinas pode ser iniciada por uma série de PRMs e enzimas associadas a eles (BOHLSON et al, 2019; GARRED et al., 2016; LO & WOODRUFF, 2020; REIS, et al., 2019). Os PRMs envolvidos na ativação desta via são conhecidos como lectinas, e estão divididos em duas famílias de proteínas denominadas Colectinas (CLs) e Ficolinas (FNs). As CLs são representadas pelas proteínas MBL (*do inglês: Mannose-Binding Lectin*), CL-10, -11 e -12, e pelos surfactantes pulmonares (SP) A (SP-A) e D (SP-D). Já a família das FNs é composta por três membros FN-M, FN-L e FN-H (BOHLSON et al, 2019; DELVES et al., 2018; GARRED et al., 2016).

As lectinas que agem como PRMs têm características estruturais comuns, apresentando em seus monômeros uma região rica em cisteína, um domínio similar ao colágeno acoplado a uma região de reconhecimento de carboidratos (domínio CRD). Os monômeros destas moléculas formam trímeros que se oligomerizam e formam parte de complexos macromoleculares envolvidos com a atividade da via das lectinas. Estes complexos moleculares circulam associados a três serinoproteases, MASP-1 (*do inglês: Mannan-binding lectin associated serine protease-1*), MASP-2 e MASP-3 (GARRED et al., 2016).

Os PRMs desta via apresentam especificidade para uma variedade de MAMPs, bem como para vários DAMPs (BOHLSON et al, 2019; LO & WOODRUFF, 2020). Entre os MAMPs reconhecidos pelos PRMs da via das lectinas, destacam-se nucleotídeos CpG, RNA de fita dupla, Manose, N-acetilglicosamina, Fucose, N-acetilmanosamina, L-fucose, D-manose, N-acetilgalactosamina, ácido lipoteicoico, 1,3 β -glicanos e alguns tipos de lipopolissacarídeos (FUJITA, 2002; GARRED et al., 2016; MARKIEWISK e LAMBRIS, 2007). Quanto aos ligantes endógenos, estes PRMs reconhecem ácidos nucleicos, ATP (*do inglês: Adenosine Triphosphate*), IgM, HMGB1, proteínas da família S100, Pentraxinas (PCR, PAS e PTX3), e carboidratos alterados em células apoptóticas, necróticas e tumorais (GARRED et al., 2016; HENRIKSEN et al., 2013; MA et al., 1999; McMULLEN, et al., 2006; PALANIYAR et al., 2004; RATAJCZACK et al., 2018; 2019).

A ativação da via das lectinas se inicia mediante a ligação dos PRMs em suas moléculas alvo, de uma maneira dependente de Ca^{2+} . Este reconhecimento do ligante leva a autoativação da enzima MASP-1, que ativa as outras duas enzimas presentes no complexo, MASP-2 e MASP-3 (HÉJA et al., 2012; DOBÓ et al., 2014).

Quando ativadas, estas enzimas são capazes de ativar moléculas do complemento, sistema de cininas e cascata de coagulação (DOBÓ et al., 2014; GARRED et al., 2016). No tocante ao complemento, MASP-2 ativa C4 e C2, enquanto MASP-1 ativa apenas C2 (HÉJA et al., 2012), culminando na formação da C3 convertase da VL, que é estrutural e funcionalmente idêntica à da VC (C4b2a) (BOHLSON et al., 2019; LO & WOODRUFF, 2020). MASP-3 age como regulador da VL e funciona como ativador exclusivo do Pró Fator D em Fator D (FD), que é uma enzima crucial para a ativação da via alternativa do complemento (DOBÓ et al., 2016).

O reconhecimento de MAMPs e DAMPs pelos PRMs das vias clássica ou das lectinas é um evento inicial considerado de suma importância para o desenvolvimento das reações inflamatórias (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; LO & WOODRUFF, 2020). Adicionalmente, a clivagem/ativação do componente central do complemento, a proteína C3, é imprescindível para a propagação da ativação e funções efetoras deste sistema (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; HARRISON, 2018; LACHMANN, 2009).

Presente em níveis plasmáticos elevados (1-1.9 mg/mL) (FALCÃO et al., 2009; LACHMANN, 2009), o C3 é uma proteína de 190 kDa composta de duas cadeias, α e β , e assim como o C4, apresenta um domínio tioester intramolecular lábil (domínio TED) (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; HARRISSON, 2018; LACHMANN, 2009; MORIKIS & LAMBRIS, 2005).

O C3 é o substrato das C3 convertases das vias clássica e das lectinas, e sua clivagem origina dois fragmentos, C3a e C3b (MORIKIS & LAMBRIS, 2005). O fragmento C3a se difunde e modula uma série de eventos inflamatórios (ASGARI et al., 2013; COLTHARD & WOODRUFF, 2015; LOHMAN et al., 2017) e o C3b apresenta rearranjos estruturais que levam à exposição do domínio tioester, evento molecular que pode culminar em: 1) destruição local ou em fase fluida por agentes nucleofílicos, entre estes a água; 2) ou ligação covalente deste domínio a grupamentos hidroxila (OH) ou amina (NH₂) localizados, respectivamente, em carboidratos e proteínas presentes em células próprias ou de microrganismos (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; HARRISSON, 2018; LACHMANN, 2009).

A ligação covalente do C3b a seus alvos faz com que esta molécula exponha sítios de ligação para o Fator B (FB). O FB é uma serinoprotease, homóloga à molécula de C2, que circula como zimogênio, e tem a capacidade de formar um complexo com o C3b (C3bB) de maneira dependente de Mg²⁺. Após a ligação ao C3b,

o FB expõe sítios de reconhecimento para a enzima FD, a qual cliva o FB em dois fragmentos, Ba e Bb. O fragmento Ba se difunde, e não apresenta atividade biológica, e o fragmento Bb permanece conjugado ao C3b, formando o complexo C3bBb, a C3 convertase da via alternativa do complemento, uma enzima extremamente instável. Para que esse complexo não seja dissociado rapidamente, a C3 convertase da via alternativa é estabilizada pela Properdina (P). Além de estabilizar a convertase da via alternativa, a P acelera a deposição de C3 na região de ativação desta via (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; HARRISSON, 2018; MORIKIS & LAMBRIS, 2005; LACHMANN, 2009).

Na via alternativa, a porção Bb da C3 convertase é a responsável pela ativação de C3, culminando na geração de mais C3b, que vai se conjugar a mais moléculas de FB, repetindo os passos iniciais para ativação desta via. Tal processo é conhecido como “*loop de ativação*”, evento essencial da via alternativa e imprescindível para amplificar a atividade das outras vias do complemento (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; LACHMANN, 2009; HARRISSON, 2018). Além disto, o “*loop de ativação*” é fundamental na potencialização das reações inflamatórias, uma vez que a maioria dos fragmentos de C3 e C5 detectados em sítios inflamatórios é proveniente da ativação da via alternativa (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; THURMAN & HOLERS, 2006; RICKLIN et al., 2007).

Em sistemas experimentais *in vitro*, com proteínas purificadas do complemento humano, foi mostrado que devido a sua labilidade, a ponte tioéster de C3 pode ser hidrolisada lenta e espontaneamente (mecanismo de *tick over*), por diferentes agentes caotrópicos e nucleofílicos. Assim, é gerado o C3(H₂O), que apresenta propriedades C3b like, uma vez que interage com o FB e forma uma C3 convertase semelhante à da via alternativa (C3(H₂O)Bb) e que ativa pequenas quantidades de C3 (RICKLIN et al., 2007; FROMELL et al., 2020). Alguns autores sugerem que este mecanismo de ativação da via alternativa contribui para a constante imunovigilância do organismo, colocando novamente a via alternativa como via central do complemento (RICKLIN et al., 2007). No entanto, recentemente, foi demonstrado que talvez a hidrólise de C3 não seja um mecanismo potente de ativação imune, uma vez que o C3(H₂O) em modelo de sangue total humano não foi capaz de promover geração da anafilatoxina C5a e do complexo sTCC (do inglês: *soluble Terminal Complement Complex*), e hemólise (FROMELL et al., 2020). Além do que, induz uma fraca geração

de C3a sugerindo que talvez a hidrólise contínua de C3 possa ser necessária para manter parâmetros homeostáticos e não iniciar reações imunes.

Tal como descrito para as outras rotas intrínsecas de ativação do complemento, alguns estudos sugerem que PRMs podem também iniciar a ativação da via alternativa. Assim, resultados presentes literatura sugerem que a Properdina, molécula estabilizadora da C3 convertase da via alternativa, possa agir como PRM.

Foi demonstrado que a Properdina possui habilidade de se ligar a vários DAMPs, tais como DNA oriundo de NETose, Mieloperoxidase (MPO) e GAGs nas superfícies de células normais, apoptóticas e tumorais (KEMPER et al., 2008; YEN et al., 2016), e MAMPs, entre estes Zimozan, lipopolissacarídeos e a bactérias, como *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydomphila pneumoniae* (CORTES et al., 2011; CHEN et al., 2018; SPTIZER et al., 2007). Após a ligação aos seus alvos, a Properdina interage com moléculas de C3 e C3b, promovendo a formação de C3 convertases da via alternativa, sendo esse reconhecimento essencial para ativação e propagação desta via (RICKLIN et al., 2007; SPTIZER et al., 2007), uma vez que a neutralização da Properdina por anticorpos impede a ativação (YEN et al., 2016).

Independente da via, a geração de C3b tem três consequências (i) opsonização de alvos para promover aumento da fagocitose de células próprias apoptóticas, microrganismos e imunocomplexos; (ii) formação de C3 convertases da via alternativa e (iii) formação de C5 convertases, as quais serão de suma importância para a fase final de ativação do complemento (MORIKIS & LAMBRIS, 2005; REIS et al., 2019; RICKLIN et al., 2007).

A ligação de uma molécula de C3b, às C3 convertases das diferentes vias, gera dois novos complexos macromoleculares, C4b2a3b ou C3bBb3b, ou seja as C5 convertases, que apresentam como substrato o componente C5 (MORIKIS & LAMBRIS, 2005). As moléculas de C3b, recentemente associadas às C3 convertases, têm a capacidade de interagir com a molécula de C5, tornando-a suscetível à clivagem pelo C2a ou FBb. O C5 é uma proteína de 190 kDa formada por duas cadeias, α e β . Diferente de C3 e C4, não apresenta domínio tioéster (MORIKIS & LAMBRIS, 2005). Após a sua clivagem, dois fragmentos são gerados, C5a que se difunde e funciona como um potente indutor de reações inflamatórias (BOSSMANN et al., 2013; RUSSKAMP et al., 2015; SHUTOV et al., 2016) e o C5b que se mantém associado à C5 convertase, iniciando e fase final de ativação do complemento que culmina com a formação do complexo de ataque a membrana (MAC, do inglês: *Membrane Attack*

Complex) (MORIKIS & LAMBRIS, 2005; MORGAN, 2015; MORGAN et al., 2016; MORGAN et al., 2017).

O C5b, recém-gerado, se liga a outras duas proteínas plasmáticas, C6 e C7, formando um novo complexo molecular C5b67. A ligação de C6 e C7 ao C5b leva a alterações conformacionais nestas moléculas que culminam na liberação deste complexo da C5 convertase, para fase fluida, e exposição de regiões hidrofóbicas extremamente lábeis nestas moléculas, que são sítios de interação fraca com a membrana plasmática (MORGAN, 2015; MORGAN et al., 2016; MORGAN et al., 2017). Grande parte destes complexos é hidrolisada em fase fluida, ou interage com reguladores solúveis, entre estes, Vitronectina e Clusterina, ou com componentes como C8 e C9. As interações com estas moléculas, em fase solúvel, mascaram os sítios de inserção na membrana celular deste complexo; no entanto, levam a formação de complexos terminais solúveis do complemento (sTCC, do inglês: *soluble Terminal Complement Complex*) (MORGAN, 2015; MORGAN et al., 2016; MORGAN et al., 2017), os quais são potentes indutores de vários eventos inflamatórios (BOSSI et al., 2004; CHAUAN e MOORE, 2011; LAUDISI et al., 2013; MORGAN, 2015; TRIANTAFILOU et al., 2013).

Por outro lado, parte do C5b67 interage com a membrana citoplasmática e pode se ligar ao componente C8. O C8 é uma proteína de 151 kDa, composta de três cadeias, α , β e γ (MORIKIS & LAMBRIS, 2005). Inicialmente, a cadeia β do C8 se liga ao C7, que juntamente com a cadeia α , aumenta a interação/inserção do complexo na bicamada lipídica da membrana. No entanto, tal inserção não é profunda o suficiente para formar poros nas células alvo e levá-las à lise. Na sequência, a cadeia γ do C8 expõe sítios de interação para o componente C9, o qual se liga e se insere de maneira profunda na membrana. Adicionalmente, várias moléculas de C9 (C9n) são recrutadas, se polimerizam em torno do C5b678 formando o MAC. Este complexo macromolecular faz poros na membrana da célula alvo, levando à lise por instabilidade osmótica, influxo de água e perda de eletrólitos, sendo este um potente mecanismo indutor da morte de microrganismos (MORGAN, 2015; MORGAN et al., 2016; MORGAN et al., 2017).

2.1.3 Rotas extrínsecas de ativação do Sistema complemento

Em adição às rotas intrínsecas de ativação do complemento, diferentes grupos de pesquisa têm demonstrado a existência de vias não canônicas para ativação do sistema. Estas rotas extrínsecas podem ser mediadas por proteases filogeneticamente relacionadas às do complemento, como as da cascata de coagulação (AMARA et al., 2010; HUBER-LANG et al., 2006; KANSE et al., 2012) e sistema de cininas (IRMSCHER et al., 2017), bem como proteases secretadas por leucócitos ativados (HUBER-LANG et al., 2002; VOGT, 1996, 2000; YOSHIMURA et al., 2003) e, até mesmo, proteases endossomais e lisossomais (LISZEWSKI et al., 2013; SATYAM et al., 2017).

No tocante a ativação mediada por proteases da cascata de coagulação, vários mecanismos têm sido demonstrados, em estudos *in vivo* e *in vitro*. Huber-Lang e colaboradores (2006) observaram que camundongos selvagens e *knockout* para o componente C3 apresentavam edema, produção de quimiocinas e neutrofilia pulmonar após a instilação de imunocomplexos, levando a um quadro de LPA, independente da presença C3. A LPA era totalmente inibida em camundongos *knockout* para C5 ou tratados com anticorpos neutralizantes do fragmento C5a, incluindo os animais deficientes de C3, demonstrando a existência de rotas adicionais para a clivagem de C5. Avaliando o plasma e amostras de diferentes tecidos dos animais *knockout* para C3, observou-se alta expressão de trombina no fígado destes animais, e elevados níveis circulantes desta proteína quando comparado aos animais selvagens, sugerindo influência desta enzima na ativação do complemento em animais *knockout* para C3. Em experimentos nos quais animais selvagens e *knockout* para C3 foram tratados com inibidores de trombina como a Antitrombina III (AT-III) ou Hirudina, foi demonstrado que a geração de C5a era fortemente inibida, prevenindo o desenvolvimento da LPA confirmando, assim, a ativação do C5 pela trombina e a influência desta ativação em uma patologia pulmonar.

Outros estudos detectaram que a ativação do complemento por proteases da cascata de coagulação não era restrita apenas a Trombina e que também acontecia em humanos. Amara et al. (2010) observaram que além da trombina, os fatores IXa Xa, XIa, e Plasmina eram capazes de clivar os componentes C3 e C5 humanos purificados. A ação do FXa induziu a geração dos fragmentos C3a e C5a os quais, quando analisados por espectrometria de massas, apresentavam massas moleculares iguais aos

de C3a e C5a gerados pelas convertases das rotas intrínsecas. Estes fragmentos mostraram-se altamente ativos, uma vez que foram quimiotáticos para mastócitos e neutrófilos. Além disso, utilizando os inibidores de fator Xa, enoxaparina e fondaparinux, a clivagem de C3 foi bloqueada.

Foi observado também que a ativação do complemento pelo fator Xa acontecia em sistemas experimentais *ex vivo*, uma vez que em amostras de soro e plasma humanos, esta enzima reduzia a atividade hemolítica da VC, promovia geração de C3a e C5a e formação de sTCC, os quais são fortes indicadores da ativação do complemento. Adicionalmente aos resultados *ex vivo*, observou-se alta correlação entre os níveis aumentados de C5a e complexos Trombina/Antitrombina (TAT) em pacientes que sofreram politraumatismo, indicando que a liberação de DAMPs influencia a ativação do complemento por rotas extrínsecas (AMARA et al., 2010).

Kanse e colaboradores (2012) detectaram que a Proteína Ativadora do Fator VII (FSAP, do inglês: *Factor Seven- Activating Protein*) circula complexada com os componentes C3 e C5. O FSAP circula como zimogênio e apresenta sítios de reconhecimento para histonas e nucleossomos, os quais são liberados de células que sofreram lesão e, frente ao reconhecimento destes DAMPs, o FSAP é ativado. Detectou-se que o FSAP ativo cliva C3 e C5 humanos purificados, de maneira igual às convertases canônicas, culminando na geração de C3a e C5a funcionais, uma vez que se mostraram fortemente quimiotáticos, respectivamente, para mastócitos e neutrófilos. Paralelamente, detectou-se que o FSAP promove geração sérica de C5a, e que indivíduos com politraumatismo grave apresentavam atividade da FSAP e nucleossomos circulantes elevados, o que se correlacionava positivamente com os níveis aumentados de C5a.

A Calicreína, enzima importante para eventos hemostáticos, inflamatórios e cardiovasculares mostrou-se como potente ativador da via alternativa do complemento. Imscher et al. (2017) observaram que a Calicreína cliva o C3 humano diretamente. O sequenciamento dos fragmentos gerados identificou que a Calicreína age como a C3 convertase, clivando o C3 no mesmo ponto da cadeia alfa de C3 (Arg748-Ser749), gerando C3a e C3b. Além de C3, a Calicreína mostrou-se capaz de ativar o fator B, gerando Bb, de maneira idêntica ao fator D. Interessantemente, o C3b gerado pela Calicreína foi capaz de se ligar a células tumorais, e o C3a capaz de matar bactérias. Ineditamente, demonstrou-se que a atividade Calicreína é completamente suprimida

pelo Fator H (FH), regulador da via alternativa, e na presença do Fator I (FI), o C3b gerado pela Calicreína é degradado.

Além das proteases circulantes, leucócitos ativados são capazes de liberar uma série de enzimas que têm como substrato algumas proteínas do complemento.

Entre as células residentes dos tecidos, os mastócitos quando ativados por estímulos inflamatórios degranulam e liberam vários componentes, entre eles histamina, heparina e uma série de proteases, incluindo a β -triptase. Esta enzima é altamente expressa em mastócitos e é capaz de clivar os componentes C3, C4 e C5, gerando as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a. Com exceção do C4a, C3a e C5a foram altamente ativos quando incubados com mastócitos, levando a degranulação com liberação de altos níveis de β -hexosaminidase (FUKOIA et al., 2008). Além disso, estudos detectaram que o C3a gerado pela ação da β -triptase humana promove contração do íleo de cobaias (SCHWARTZ et al., 1983).

Os neutrófilos, geralmente, são as primeiras células a migrar para focos infecciosos e sítios inflamatórios (ROSALES, 2018) e, assim como os mastócitos, estas células quando ativadas liberam várias enzimas e radicais de oxigênio e nitrogênio com propriedades antimicrobianas e potencialmente lesivas para os tecidos (LEY et al., 2018).

Vogt (1996) detectou que a Mieloperoxidase (MPO), liberada de neutrófilos humanos ativados com Zimosan, é capaz de agir sobre o componente C5, promovendo sua interação com C6, C7, C8 e C9, formando o MAC, capaz de promover a lise de hemácias. Neste mesmo estudo verificou-se que a ação sobre o C5 só ocorria na presença de cloreto (Cl^-) e Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), os quais são essenciais para a geração de hipoclorito (HOCl) pelos neutrófilos, sugerindo que tais radicais poderiam ser os responsáveis pela conversão de C5. Foi observado, que inibidores de MPO (azida) e agentes degradantes de H_2O_2 (catalase) inibiam a geração de HOCl e a conversão de C5. Estes autores detectaram que HOCl oxida o C5, alterando sua conformação, gerando uma molécula C5b like capaz de interagir com os componentes da fase final de ativação do complemento sem a necessidade de clivagem.

Neutrófilos humanos estimulados com PMA (do inglês: *Phorbol Myristate Acetate*) e incubados com C5 em cultura, apresentaram níveis elevados da anafilatoxina C5a nos sobrenadantes. Interessantemente, foi mostrado que proteases secretadas pelos neutrófilos clivavam o C5, gerando fragmentos quimiotáticos para neutrófilos. Na presença de SBTI (do inglês: *Soybean Trypsin Inhibitor*) e SLPI (do

inglês: *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*), inibidores de serinoproteases, a ação sobre o C5 e suas consequências foram completamente suprimidas (HUBER-LANG et al., 2002).

Entre as serinoproteases secretadas por neutrófilos, a Elastase merece destaque devido ao seu amplo espectro de substratos e influência no desenvolvimento de várias condições patológicas. Esta enzima tem se mostrado um potente indutor da ativação do componente C5, uma vez que por clivagem proteolítica promoveu a geração de C5a e formação de MAC, o qual demonstrou-se lítico para hemácias de cobaias (VOGT, 2000). Além disso, a Elastase também levou a formação de quantidades elevadas de sTCC em modelos de inflamação induzida por circulação extracorpórea, os quais foram reduzidos frente ao tratamento com o inibidor específico da Elastase, ONO-6818 (YOSHIMURA et al., 2003).

Recentemente, estudos têm emergido na literatura demonstrando que as rotas extrínsecas de ativação do complemento não são restritas apenas ao espaço extracelular e ao soro, podendo acontecer dentro de células imunes e não imunes.

Liszewski et al. (2013) descreveram que células T humanas em repouso apresentavam níveis elevados de RNA mensageiro codificante para as Catepsinas (CTS) B, CTSG e CTSL endossomais e lisossomais, os quais foram aumentados frente a ativação destas células. Adicionalmente, a expressão de RNA mensageiro para C3 e para o receptor de C3a (C3aR) também foi aumentada.

Foi detectado que a CTSL se localiza com a molécula C3 em lisossomos, retículo endoplasmático e vesículas secretórias nas células T e, frente a estímulos ativadores (sinalização via TCR, anti-CD3, anti-CD46), a CTSL clivou o C3, gerando C3a e C3b. Este grupo demonstrou que o C3a gerado, se liga no C3aR em compartimentos intracelulares, e ativa a via mTOR (do inglês: *mammalian target of rapamycin*), a qual é requerida para a sobrevivência das células T CD4+, e contribui para as respostas efetoras destas células. De maneira elegante, o grupo apresentou que a CTSL, C3, C3a e C3b, são translocados para a superfície celular, sinalizando de maneira a controlar as atividades efetoras destas células.

O bloqueio da atividade da CTSL, com anticorpos ou inibidores (ALX-260-133-M001), inibiu a geração intracelular de C3a e C3b, efeito que suprime a atividade efetora, e é letal para as células T. Interessantemente, foi observado que pacientes que apresentavam artrite autoimune tiveram exacerbação da doença devido ao descontrole da atividade da CTSL e geração de C3a intracelular. Tais moléculas

foram responsáveis pela elevação dos níveis de mediadores inflamatórios no líquido sinovial destes pacientes. Surpreendentemente, a atividade da CTSL e a geração de C3a foram normalizadas pelo tratamento das células T dos pacientes com doses não letais de inibidor de catepsina, além do que a produção de mediadores inflamatórios foi mitigada. Estes autores sugeriram que esta rota extrínseca de ativação do complemento é de grande importância, uma vez que até mesmo indivíduos deficientes de C3 sistêmico/plasmático, apresentam C3 intracelular e toda a maquinaria para a sua ativação.

Além das células T, a geração intracelular de C3a foi também detectada em neutrófilos, monócitos, células B e T CD8+, fibroblastos, células endoteliais e de epitélio uterino. No entanto, a maquinaria envolvida na geração de C3a nestas células não foi ainda determinada (LISZEWSKI et al., 2013), porém parece que diferentes Catepsinas são responsáveis pela clivagem de C3 em diferentes sítios anatômicos e tipos celulares.

Satyam et al. (2017) observaram que após isquemia mesentérica, as células lesionadas do epitélio intestinal de camundongos apresentavam aumento intenso na expressão de fragmentos de C3 intracelularmente. Além disso, em animais descomplementados sistemicamente com CVF a lesão e a geração intracelular de fragmentos de C3 ainda ocorreram. Observou-se também que células do epitélio intestinal humano, frente à incubação com MAMPs (LPS) ou submetidas à privação de oxigênio, apresentavam aumento na expressão gênica de C3, C5, FB, CTSB e CTSL, e geração de C3a intracelular. Incubando-se estas células com E-64-d, inibidor de CTSs, observou-se o bloqueio da geração de C3a. Surpreendentemente, o uso de animais *knockout* para CTSB ou tratados com E-64-d e submetidos à lesão intestinal por isquemia mesentérica, apresentaram redução no escore de lesão tecidual, o qual foi acompanhado de forte inibição da geração intracelular de C3a.

Independente da rota, a ativação do complemento deve ser extremamente controlada, uma vez que a ativação em excesso pode ser danosa. Para tanto, existem diversas moléculas reguladoras solúveis ou ancoradas nas membranas celulares. Dentre os reguladores solúveis encontra-se o Fator H (FH), Fator I (FI), Proteína Ligadora de C4b (C4bP, do inglês: *C4b-binding Protein*), Inibidor de C1 (C1-INH, do inglês: *C1 Inhibitor*), MAP-1 (do inglês: *Mannan-binding lectin associated protein 1*), MAP-2, Carboxipeptidase N, Vitronectina e Clusterina. Os reguladores de membrana são representados por Fator Acelerador do Decaimento (DAF, do inglês: *Decay-*

accelerating Factor (CD55), Proteína Cofator de Membrana (MCP, do inglês: *Membrane Cofactor Protein* (CD46), CR1 (do inglês: *Complement Receptor 1* (CD35) e CD59. Todos estes reguladores agem em diferentes etapas da ativação do complemento, podendo inibir a formação de novas convertases, potencializando a degradação de fragmentos ativos, dissociando convertases e outros complexos macromoleculares e interferindo na formação do MAC (BAJIC et al., 2015; KINDT et al., 2008; MURPHY et al., 2014; REIS et al., 2019).

2.1.4 Anafilatoxinas e seus receptores

A ativação do complemento leva à clivagem de diferentes proteínas e geração de fragmentos ativos com propriedades biológicas diversas. Entre os fragmentos gerados estão os peptídeos C3a, C4a e C5a. Estas moléculas são capazes de promover uma série de eventos inflamatórios (ASGARI et al., 2013; BOSSMANN et al., 2013; COLTHARD & WOODRUFF, 2015; LOHMAN et al., 2017; RUSSKAMP et al., 2015; SHUTOV et al., 2016; WANG et al., 2017), que em parte se assemelham aos observados em casos de anafilaxia (REBER et al., 2017) e, por isso, foram denominadas como anafilatoxinas.

A ação das anafilatoxinas é mediada por receptores canônicos (C3aR, C5aR1, C5aR2) e não canônicos (PAR-1 e PAR-4), todos pertencentes à família de receptores acoplados a proteína G (LAUMONNIER et al., 2017; WANG et al., 2017).

A ativação destes receptores por seus ligantes elicit funções pleiotrópicas que contribuem tanto para a homeostase tecidual, como para perpetuar e regular respostas imunes protetoras. No entanto, a geração exacerbada das anafilatoxinas e a ativação descontrolada destes receptores têm sido observadas em uma série de condições clínicas influenciadas pela inflamação, incluindo infecções (HERRMANN et al., 2018), câncer (GUGLIETTA et al., 2016; NABIZADEH et al., 2016), doenças trombóticas (GUGLIETTA et al., 2016; SAUTER et al., 2018), respiratórias (PROCTOR et al., 2006; BOSSMAN et al., 2013), autoimunes (WOODRUFF et al., 2002) e alérgicas (BAELDER et al., 2005).

2.1.4.1 Receptores canônicos

2.1.4.1.1 C3aR

Assim como todos os receptores acoplados à proteína G, o receptor para a anafilatoxina C3a (C3aR) apresenta um domínio N-terminal extracelular, três alças extracelulares, sete domínios transmembrana, três alças intracelulares e uma calda carboxi-terminal importante para o acoplamento à proteína G e disparo do sinal (COULTHARD et al., 2018; LAUMONNIER et al., 2017). Este receptor, em humanos, apresenta 40% de homologia estrutural com o receptor para a anafilatoxina C5a do tipo 1 (C5aR1) (AMES et al., 1996), e diferente deste e outros receptores acoplados à proteína G, apresenta uma longa alça extracelular (*2^o loop*), conservada nas diferentes espécies animais em que o receptor foi detectado, a qual apresenta alguns sítios sulfatados cruciais para ligação/sinalização do eixo C3a-C3aR (CHAO et al., 1999; COULTHARD et al., 2018; GAO et al., 2003).

A expressão gênica e proteica deste receptor é detectada em várias células, podendo variar entre diferentes espécies e tipos celulares (AMES et al., 1996; LAUMONNIER et al., 2017) e ser induzida ou aumentada frente a estímulos inflamatórios (LAUMONNIER et al., 2017; TAKABAYASHI et al., 2004). Além disso, a expressão proteica deste receptor pode ser detectada em diferentes compartimentos celulares, como membrana citoplasmática, lisossomos, membrana do retículo endoplasmático e vesículas secretórias (LAUMONNIER et al., 2017; LISZEWSKI et al., 2013).

C3a é o principal ligante/ativador do C3aR. No entanto, ligantes não canônicos, como o neuropeptídeo TLQP-21, oriundo do metabolismo do VGF (*do inglês: VGF Nerve Growth Fator*), podem também interagir com este receptor (CERO et al., 2014).

A ligação do C3a ao C3aR elicita uma série de respostas moleculares que variam dependendo do tipo celular e do contexto da reação, podendo a ativação deste eixo ser pró-inflamatória ou anti-inflamatória (COULTHARD et al., 2015).

A ativação de plaquetas, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos via o eixo C3a-C3aR estimula a liberação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , o qual é um mensageiro celular de suma importância nas reações inflamatórias, uma vez que elicita uma série de respostas efetoras nestas células (DAFFERN et al., 1995; ELSNER et al., 1994; LOHMAN et al., 2017; TAKAFUJI et al., 1994; SAUTER et al., 2018).

O C3a é um potente agente quimiotático para mastócitos (AMARA et al., 2010; KANSE et al., 2012) e eosinófilos (DAFFERN et al., 1995) e, via o aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , promove a degranulação destas células (DAFFERN et al., 1995; LOHMAN et al., 2017; TAKAFUJI et al., 1994). No tocante aos mastócitos, esta ativação leva a liberação de altas quantidades de histamina, causando um desbalanço endotelial o qual será essencial para a formação de edema (LOHMAN et al., 2017). Além disso, via produção de prostanóides, o eixo C3a-C3aR também promove alterações hemodinâmicas (KERKOVITS et al., 2019).

Já nos eosinófilos, o C3a provoca degranulação com liberação de várias enzimas e geração de espécies reativas de oxigênio, que são tóxicos para helmintos parasitas e para os tecidos do hospedeiro (COULTHARD et al., 2015; DAFFERN et al., 1995; TAKAFUJI et al., 1994).

No tocante à produção de mediadores inflamatórios, a contribuição do eixo C3a-C3aR é extremamente dependente do contexto e do tipo celular, podendo apresentar funções imunoestimulantes, bem como imunossupressoras.

Foi demonstrado que células B, ativadas por C3a, liberam grandes quantidades de PGE_2 , e, interessantemente, têm a produção de anticorpos suprimida, sugerindo que o eixo C3a- PGE_2 seria o responsável por estes efeitos. Tratando-se células B com Indometacina, inibidor não seletivo das COXs, na presença de C3a, a produção de anticorpos permaneceu intacta sugerindo, desta forma, propriedades inibitórias do C3a, via PGE_2 (MORGAN, 1987). Além das células B, tem sido demonstrado que o C3a provoca geração de outros prostanóides em células de kupffer, tais como, PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, e TXB_2 , mediadores importantes para a atividade de vias metabólicas nestas células, uma vez que a neutralização do C3a com anticorpos bloqueou tais eventos (PÜSCHEL et al., 1993).

Além dos estudos em células, foi observada que a geração e/ou inoculação sistêmica de C3a em camundongos promoveu a liberação de níveis elevados de TXA_2 , os quais foram acompanhados de vasoconstrição e elevação na pressão arterial destes animais. Foi detectado que animais *knockout* para COX-1 ou receptor TP (do inglês: *Thromboxane Receptor*) inoculados com C3a, não apresentavam alterações cardiovasculares. Além disso, os animais deficientes de COX-1 não exibiam elevação nos níveis de TXA_2 , demonstrando desta forma indução direta da produção de prostanóides *in vivo* pelo C3a, e a contribuição destas interações para desbalanços circulatórios (KERKOVITS et al., 2019).

Em relação à contribuição do C3a na produção de interleucinas, esta anafilatoxina pode agir modulando negativamente ou positivamente tal evento inflamatório.

Estudos mostraram que PBMCs (do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) expostas ao C3a, previamente à ativação por ligantes de Toll, como LPS, tiveram a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α completamente inibida. No entanto, células previamente ativadas com LPS, apresentaram potencialização na produção destas interleucinas, demonstrando que a anafilatoxina C3a é um potente imunomodulador (FISCHER et al., 1999; TAKABAYASHI et al., 1996).

Além de modular eventos inflamatórios *in vitro*, estudos *in vivo* têm confirmado que, em modelos de lesão de isquemia e reperfusão intestinal, a ativação do eixo C3a-C3aR influencia negativamente o desenvolvimento da patologia, uma vez que animais *knockout* para o C3aR apresentavam agravamento da lesão, devido a intensa infiltração e degranulação de neutrófilos no tecido lesionado. Utilizando-se um agonista peptídico do C3aR ou fazendo-se transplante de medula óssea contendo células positivas para o C3aR, foi demonstrado que a patologia era fortemente atenuada devido à redução no infiltrado de neutrófilos e inibição da ativação destas células. Mecanicamente, demonstrou-se que tal atenuação era devido a ação direta do C3a na medula óssea, uma vez que esta anafilatoxina inibiu a produção de G-CSF (do inglês: *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), por células do estroma da medula óssea, molécula de extrema importância para a produção e liberação de neutrófilos da medula óssea para a circulação (WU et al., 2013).

As ações do C3a parecem ser dependentes, em sua grande maioria, de outros sistemas efetores complexos, entre estes, os inflamassomas. Asgari et al. (2013), observaram que monócitos humanos incubados com LPS, apresentaram produção de IL-1 β aumentada 4 vezes aumentada, na presença de C3a. Curiosamente, estes monócitos apresentavam aumento na expressão proteica de NLRP3 e da forma ativa da caspase 1, ambos necessários para a maturação da IL-1 β .

Utilizando uma série de ensaios de modulação farmacológica, estes autores mostraram que a ativação do C3aR, em macrófagos estimulados com LPS, provocava efluxo de ATP, de maneira dependente de ERK1/2 (do inglês: *Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1 and 2*). Este ATP, via ativação de receptores do tipo P2X7, promoveu oligomerização do NLRP3, processamento da pró-caspase 1 em sua forma madura, a qual converte a pró-IL-1 β em sua forma ativa. Além de apresentar um

possível papel protetor, estes mecanismos parecem governar condições patológicas, tais como a rejeição de transplantes. Neste estudo, detectou-se que todos estes mecanismos influenciavam a geração de células Th17 humanas *in vitro*, e que tais mecanismos governavam a rejeição aguda de transplantes renais, já que tais moléculas foram detectadas em biópsias obtidas destes pacientes.

2.1.4.1.2 C5aR1

O C5aR1 tem como ligantes específicos produtos da clivagem de C5 (C5a e C5a desArg). Enquanto a anafilatoxina C5a se liga com alta afinidade ao C5aR1, a sua forma desarginada (C5a desArg) se liga com afinidade 100 vezes menor (HIGGINBOTTOM et al., 2005).

Devido a sua importância no processo inflamatório e em várias condições clínicas, o C5aR1 e sua sinalização têm sido extensamente caracterizados *in vitro* e *in vivo*, e uma série de inibidores tem sido desenvolvida e submetida a diferentes fases de ensaios clínicos para uso terapêutico (HAWKSWORTH et al., 2017; WOODRUFF et al., 2011).

Este receptor foi clonado, pela primeira vez em 1991 (BOULAY et al., 1991; GERARD & GERARD, 1991), e caracterizado como uma proteína de 45 kDa (GERARD & GERARD, 1991; LAUMONIER et al., 2017), glicosilada (PEASE & BARKER, 1993), e diferente do C3aR, apresentando sítios sulfatados na região N-terminal os quais são de suma importância para a ligação do C5a ao receptor e respostas efetoras envolvendo o mesmo (FARZAN et al., 2001; IPPEL et al., 2009).

Em humanos e camundongos, a expressão gênica e proteica do C5aR1 foi detectada, principalmente, em leucócitos de diferentes populações e órgãos, bem como em células estruturais de vários órgãos, incluindo rins, fígado, cérebro, ovários, intestino, adrenais, músculo cardíaco e tecido adiposo subcutâneo e da glândula mamária (LAUMONIER et al., 2017). Quanto à localização celular, o C5aR1 foi detectado, principalmente, na membrana citoplasmática em forma de homodímero (C5aR1-C5aR1) e em forma de heterodímero associado a alguns receptores, tais como C5aR2 (C5aR1-C5aR2) e CCR5 (do inglês: *C-C chemokine receptor type 5*) (C5aR1-CCR5). Estas interações são importantes para o tráfego destes receptores, entre a membrana e o citoplasma, bem como para suas respostas efetoras (HÜTTENRAUCH et al., 2005; LAUMONIER et al., 2017; LI et al., 2019). Além da membrana celular, o

C5aR1 tem sido detectado intracelularmente; no entanto, as organelas nas quais ele está acoplado ainda não foram elucidadas (ARBORE et al., 2016; NIYONZIMA et al., 2017).

A ligação do C5a ao C5aR1 provoca mudanças conformacionais neste receptor que culminam na ativação da proteína G (MONK et al., 2007; SARMA & WARD, 2012). As consequências desta ativação serão dependentes do tipo celular, e do tipo de subunidade α da proteína G acoplada, uma vez que em algumas células essa subunidade pode ser $G_{\alpha i}$ (inibidora da produção de cAMP) ou $G_{\alpha s}$ (estimulante da produção de cAMP) (GOLDSMITH & DHANASEKARAN, 2007; SARMA & WARD, 2012). Em células da linhagem hematopoiética, onde o C5aR1 é expresso em níveis maiores, a predominância é da subunidade $G_{\alpha s}$, e frente a sua ativação, uma cascata de sinalização complexa é iniciada (SARMA & WARD, 2012). Entre os eventos chave desta sinalização, destacam-se a ativação da PLC β 2 (do inglês: *Phospholipase C β 2*) e adenilato ciclase, as quais promovem, respectivamente, aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e cAMP que são cruciais para a propagação do sinal (GOLDSMITH & DHANASEKARAN, 2007; MONK et al., 2007). Frente a isso, uma série de proteínas sensíveis a tais moléculas são ativadas, incluindo cFLA $_2$ e PI-3K (do inglês: *Phosphatidylinositol 3-Kinase*). A ativação destas moléculas elicitava uma série de reações importantes para a atividade biológica do C5a. A ativação da cFLA $_2$ culmina na liberação do ácido araquidônico da membrana citoplasmática, o qual será essencial para a produção de diversos eicosanoides (MOUCLIS & DENNIS, 2019).

O aumento citoplasmático de cAMP culmina na ativação da PKA (do inglês: *Protein Kinase A*), enquanto a ação da PI-3K gera PIP $_3$ (do inglês: *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) que ativa a PKB (do inglês: *Protein Kinase B*). A PKA e a PKB fosforilam ERK1/2 e MAPK p38 (do inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase p38*) as quais migram para o núcleo e ativam os fatores de transcrição CREB (do inglês: *cAMP-Response Element Binding Protein*), NF κ B e STAT3 (do inglês: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), bem como aumentam a atividade de alguns fatores de transcrição ativados, como o AP-1 (do inglês: *Activator Protein 1*), promovendo desta forma a expressão de vários genes (GOLDSMITH & DHANASEKARAN, 2007; JACOB et al., 2011; MONK et al., 2007; PAN et al., 2009; PERIANAYAGAM et al., 2006; RIEDEMAN et al., 2004; SARMA & WARD, 2012; ZHANG et al., 2018; WILMER et al., 1998).

Um dos fatores que fazem o eixo C5a-C5aR1 ser altamente inflamatório, e por vezes destrutivo, é a capacidade que este eixo tem de se retroalimentar, como demonstrado em modelo de sepse induzida por CLP (do inglês: *Cecal Ligation and Puncture*), em que a geração de C5a potencializa a expressão gênica e proteica do C5aR1 em vários órgãos e populações leucocitárias. Este evento foi correlacionado com a letalidade na sepse, uma vez que a neutralização deste receptor com anticorpos, além de reduzir a expressão dele, protegeu os animais da morte (RIEDEMANN et al., 2002).

Entre os alvos do C5a encontram-se as células endoteliais, as quais são sensíveis a ação desta anafilatoxina. A ativação do C5aR1, nestas células, dispara a expressão genica e proteica de SELE (do inglês: *Selectin E*), ICAM1 (do inglês: *Intercellular Adhesion Molecule 1*) (CD54) e VCAM1 (do inglês: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*), moléculas imprescindíveis para a diapedese de leucócitos (ALBRECHT et al., 2004). Além disso, a exposição de diferentes tipos de células endoteliais humanas (HUVEC e HMEC1) ao C5a provoca aumento na expressão e polimerização de actina-F culminando em retração celular, o que leva a perda de função de barreira destas células, causando aumento da permeabilidade e promovendo, assim, exsudação de fluidos (SCHURAUFSATER et al., 2002).

O C5a é um potente agente edematogênico (RUSSKAMP et al., 2015; BOSMANN et al., 2013), uma vez que induz distúrbios endoteliais de maneira direta (SCHURAUFSATER et al., 2002) e indireta. Uma das características marcantes do C5a é a capacidade que ele tem de induzir a produção de uma série de mediadores inflamatórios, principalmente LTB₄ (LEE et al., 2018; MARLEAU et al., 1999; SADIK et al., 2012). Se ativados, em conjunto ou isoladamente, os eixos C5a-C5aR1 e LTB₄-BLT1, são capazes de provocar ativação de neutrófilos, levando a secreção de Elastase (van den BERG et al., 2014) a qual degrada uma série de moléculas juncionais nas células endoteliais, tais como JAM-C (do inglês: *Junctional Adhesion Molecule C*), desestabilizando a junção entre células, contribuindo para a formação de edema e migração leucocitária (COLOM et al., 2015; DI GENARO et al., 2009). Além disso, a ativação conjunta do C5aR1 e BLT1, se não controlada, influencia uma série de condições patológicas, incluindo hipoxemia e hemorragia pulmonar grave em infecções fúngicas (LEE et al., 2018), bem como edema e destruição óssea e cartilaginosa na artrite reumatoide (SADIK et al., 2012).

Entre as funções canônicas do eixo C5a-C5aR1 se destacam a quimiotaxia e produção de diferentes tipos celulares. Os neutrófilos são as células mais sensíveis às ações do C5a em todos os aspectos de sua biologia. A geração sistêmica de C5a tem como consequência leucocitose, caracterizada por neutrofilia, com predominância de células não segmentadas, fato que demonstra a ação direta do C5a na medula óssea, local de armazenamento de células com essas características (JAGELS & HUGLI, 1992; KAJITA & HUGLI, 1990).

Além de promover o aumento no número de leucócitos circulantes, o C5a, seja local e/ou sistemicamente, promove mudanças que darão subsídios para que estas células migrem para os tecidos inflamados e exerçam suas atividades efetoras. O C5a, gerado nos tecidos, pode ser exposto por células endoteliais na luz dos vasos e ser reconhecido por C5aR1 em neutrófilos circulantes, promovendo ativação/aumento da afinidade da integrina β -2 (Mac-1 (do inglês: *Macrophage-1 antigen*), CR3 (do inglês: *Complement Receptor 3*) (CD11b/CD18), com consequente adesão e espraiamento destas células sobre o endotélio (MIYABE et al., 2017). Paralelamente, a ativação do C5aR1 em neutrófilos provoca aumento da expressão tanto de CD11b como de CD18, potencializando desta forma a adesão destas células ao endotélio (BREKKE et al., 2007; JAGELS et al., 2000).

Células ativadas por C5a, nos tecidos ou em circulação, produzem quantidades elevadas de alguns fatores quimiotáticos, os quais ficam expostos nos tecidos e na luz vascular, potencializando ainda mais a ativação dos neutrófilos, e em menor extensão de monócitos, causando a migração destas para o tecido inflamado em direção ao gradiente de substâncias quimiotáticas (MIYABE et al., 2017; SADIK et al., 2012). LTB₄ e a IL-8 (CXCL-8) são os principais fatores quimiotáticos induzidos pela ativação do C5aR1, uma vez que inibidores da 5-LOX (MK-0591) e anticorpos neutralizantes de IL-8 têm consequências drásticas na migração de neutrófilos induzida pelo C5a (EMBER et al., 1994; MARLEAU et al., 1999).

Adicionalmente à produção dos fatores quimiotáticos, o C5a é capaz de disparar, diretamente em diferentes tipos celulares, a produção de interleucinas, como IL-1 β , IL-6, IL-12 (p40) e TNF- α , e fatores de crescimento, incluindo G-SCF e GM-SCF (do inglês: *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) (JI et al., 2016; RUSSKAMP et al., 2015).

Além da influência direta do eixo C5a-C5aR1 nos eventos moleculares envolvidos com a migração celular, tal eixo tem a capacidade de influenciar as funções

efetoras de tais células. Em uma série de experimentos envolvendo o antagonismo do C5aR1 em modelo de sangue total humano, Brekke e colaboradores (2007) mostraram que o C5a é um potente indutor da explosão respiratória e fagocitose em granulócitos, principalmente neutrófilos, frente a infecções bacterianas.

Um fator adicional, à potência e perigo da ativação não controlada do eixo C5a-C5aR1 em neutrófilos, é a extensão desta ativação, uma vez que além de promover uma miríade de eventos inflamatórios, a ativação deste eixo pode suprimir alguns mecanismos de controle de reações inflamatórias.

De maneira elegante, Guo e colaboradores (2006) mostraram que neutrófilos oriundos de ratos submetidos à CLP apresentavam resistência aos mecanismos moleculares envolvidos no apoptose, característica reproduzida *in vitro* frente a incubação de neutrófilos de animais saudáveis com soro de animais submetidos a CLP ou com C5a purificado. Curiosamente, a inibição farmacológica da PI-3K e PKB, as quais são ativadas frente ao C5a, deixava os neutrófilos dos animais suscetíveis à morte por apoptose. Além disso, neutralizando-se o C5a, o mesmo evento se repetia. Estes autores observaram que o tanto o soro de animais submetidos à CLP como o C5a potencializavam a expressão da proteína BCL-X_L (do inglês: *B-cell lymphoma-extra large*), a qual apresenta propriedades anti-apoptóticas, e reduzia drasticamente a expressão de Bim, proteína pró-apoptótica, nos neutrófilos. Tais dados justificam o potencial destrutivo destas células em condições inflamatórias, não controladas, envolvendo o C5a. Interessantemente, este fenótipo antiapoptótico em neutrófilos também foi observado em pacientes humanos com sepse, sendo dependente de fatores plasmáticos, incluindo o C5a (JIMENEZ et al., 1997; PERIANAYAGAM et al., 2002).

Assim como observado para o eixo C3a-C3aR, o eixo C5a-C5aR1 também pode ser ativado intracelularmente. De maneira elegante, Arbore e colaboradores (2016) observaram que linfócitos T CD4⁺ em repouso apresentavam expressão genica e proteica, no compartimento intracelular (exclusivamente), de C5 intacto e C5aR1. Frente a sinais ativadores de CD3 e CD46, a expressão de C5 intacto aumentava, e frente a estes sinais era clivado intracelularmente originando C5a, capaz de sinalizar via C5aR1. Entre as consequências desta ativação, foi observada a polarização destas células para um fenótipo Th1, com produção de altos níveis de Interferon- γ (IFN- γ), evento suprimido frente ao bloqueio farmacológico e silenciamento gênico do C5aR1. Curiosamente, todos estes eventos intracelulares levaram ao aumento da expressão

gênica, principalmente dos genes *NLRP3* e *IL1B*, os quais são associados à ativação do inflamassoma.

Ainda, frente a ativação intracelular do C5aR1, os níveis proteicos de NLRP3, caspase 1 ativada e IL-1 β foram aumentados. A adição de MCC950 e Z-YVAD-FMK, respectivamente, inibidores de NLRP3 e caspase 1, suprimiu a produção de IFN- γ por estas células, demonstrando uma possível influência do eixo C5a-C5aR1 intracelular na ativação do inflamassoma e polarização para o perfil Th1. Estes autores detectaram que o silenciamento gênico do C5aR1, reduzia drasticamente a ativação do inflamassoma NLRP3 e a maturação da IL-1 β .

Uma das maneiras de provocar ativação do NLRP3 é via geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que é um dos efeitos da sinalização do eixo C5a-C5aR1. A ativação do CD3 e CD46, junto com a ativação do C5aR1 intracelular, provocou a geração de ERO, e o silenciamento gênico do C5aR1 reduziu a geração de ERO e ativação do NLRP3 e maturação de IL-1 β . Desta forma, estes autores propuseram que, em células T CD4+ humanas, a ativação intracelular do C5aR1 controla a ativação de NLRP3, constituindo assim uma maquinaria celular denominada de complossoma, essencial para a polarização destas células e atividades efetoras das mesmas.

Niyonzima e colaboradores (2017) demonstraram que a maquinaria do complossoma está também presente em monócitos humanos, e direciona uma série de eventos celulares e moleculares dependentes de C5, assim como em células T. Este estudo apresentou que monócitos humanos em repouso apresentam estoques intracelulares de C5 intacto e C5a, os quais aumentam significativamente frente à fagocitose de cristais de colesterol por estas células. A fagocitose destes cristais promove a formação o inflamassoma de NLRP3 e secreção de IL-1 β , eventos inibidos frente ao bloqueio da expressão gênica de C5 nos monócitos. Curiosamente, em pacientes apresentando deficiência sérica de C5 a maquinaria envolvendo C5 e C5a foi detectada em altos níveis em monócitos, de maneira funcionalmente relevante, já que foi correlacionada com formação do inflamassoma NLRP3 e ativação da pró-IL-1 β também frente à fagocitose de cristais de colesterol.

Neste estudo detectou-se também que os monócitos expressam intracelularmente FB, FD e C3, os quais são importantes para a formação da C3 convertase da via alternativa. Empregando silenciamento gênico destas moléculas, bem como a inibição farmacológica da C3 convertase da via alternativa, com um inibidor

direcionado para o interior dos monócitos, a geração intracelular de C5a e maturação de IL-1 β foram totalmente inibidas, demonstrando que a ativação intracelular do complemento influencia respostas direcionadas a DAMPs, como é o caso dos cristais de colesterol, sugerindo que o complossoma seja uma maquinaria essencial para células do sistema imune (NIYONZIMA et al., 2017).

A resposta do eixo C5a-C5aR1 é de 50 a 100 vezes mais potente em relação à do eixo C3a-C3aR e, desta forma, mecanismos de supressão são necessários para impedir que a ativação deste eixo seja deletéria. Mecanismos de inibição intracelulares controlam a atividade do C5aR1 e de outros receptores acoplados a proteína G. Após a deflagração da cascata de sinalização ocorre a fosforilação da calda citoplasmática do C5aR1, região importante para o acoplamento das subunidades da proteína G. Quando fosforilada, esta região se torna sítio de ligação para β -arrestinas, as quais bloqueiam a ligação da proteína G, dessensibilizando o receptor e promovendo internalização dele para reciclagem ou degradação lisossomal (DOS SANTOS et al., 2014; GOLDSMITH & DHANASEKARAN, 2007; LI et al., 2019; SARMA & WARD, 2012).

Além dos mecanismos acima citados, a ativação do C5aR1 pode ser controlada pelo segundo receptor para C5a, o C5aR2.

2.1.4.1.3 C5aR2

O C5aR2 apresenta como ligantes C5a, C5a desArg e C3a. Este receptor foi clonado por Ohno e colaboradores (2000) e apresenta-se como uma proteína de 37 kDa, glicosilada e sulfata na região N-terminal, com 58% de similaridade estrutural com o C5aR1. A expressão gênica deste receptor ocorre concomitante à expressão do C5aR1, no entanto, em menor quantidade (LAUMONIER et al., 2017; LI et al., 2019).

Em humanos C5aR2 é expresso, principalmente, em células imunes mielóides e algumas populações de células linfóides, bem como em células não hematopoiéticas, sendo esse padrão similar ao detectado em camundongos. No tocante ao sítio celular, C5aR2 é detectado na membrana citoplasmática e, em humanos, a expressão deste receptor tem sido relatada também em compartimentos intracelulares de neutrófilos, monócitos, macrófagos e células NK (LAUMONIER et al., 2017; LI et al., 2019; OHNO et al., 2000).

Uma característica estrutural marcante no C5aR2 é a ocorrência de mutações na região intracelular das alças transmembrana 3 e 7. Estas regiões apresentam motivos conhecidos como DRY e NPxxY, os quais são indispensáveis para o acoplamento da proteína G e disparo do sinal. No entanto, a mutação que o C5aR2 carrega nestas regiões faz com que resíduos de arginina sejam trocados por resíduos de leucina e, assim, a proteína G fica impossibilitada de se acoplar a essa região e disparar o sinal e promover atividades imunoestimulantes (LAUMONIER et al., 2017; LI et al., 2019). Além disso, parece que não são apenas as mutações nos domínios DRY e NPxxY que impedem o C5aR2 de estimular muitos eventos inflamatórios, uma vez que a reconstituição destes domínios com arginina não muda suas atividades (LI et al., 2019).

No tocante a cascata de sinalização e atividades efetoras do C5aR2, muito se tem debatido em decorrência da ausência de ferramentas genéticas e farmacológicas para analisar esse receptor. Embora haja essas dificuldades, alguns estudos têm sido conduzidos demonstrando que o C5aR2 é um receptor regulador/anti-inflamatório (LI et al., 2019).

Foi observado *in vitro* que frente a ativação do C5aR2 em macrófagos humanos, ocorre o recrutamento direto da arrestina- β , de uma maneira independente da proteína G. Considerando que as arrestinas influenciam a dessensibilização, internalização e degradação de receptores ativados, é altamente sugestivo que o C5aR2 seja um receptor de controle da sinalização de outros receptores acoplados à proteína G (CROKER et al., 2016).

Estudos comprovaram que o C5aR2 apresenta mecanismos de internalização constitutiva. Frente à ligação do C5a ou C5a desArg ao C5aR2 de neutrófilos e basófilos, o complexo ligante-receptor é internalizado e degradado, constituindo este um possível mecanismo de regulação da biodisponibilidade de C5a. Além disso, estudos mostraram que este receptor tem a capacidade de se conjugar ao C5a-C5aR1 na membrana celular e promover a internalização deste complexo (LI et al., 2019; SCOLA et al., 2009).

Interessantemente, a neutrofilia sistêmica induzida pelo C5a é inibida por completo, frente ao tratamento de camundongos com um agonista peptídico do C5aR2 (P32) (CROKER et al., 2016).

Recentemente Li et al. (2020) mostraram que a ativação dos receptores C3aR, C5aR e CKMLR1 (do inglês: *Chemokine Receptor-Like 1*) promovem a

fosforilação de ERK1/2, evento molecular fortemente inibido pelo agonismo do C5aR2. Estes mesmos autores detectaram que a ativação de macrófagos humanos por ligantes específicos para TLRs (1, 2, 3, 4, 7), receptores de lectina tipo C (Dectina 1 e 2, Mincle (do inglês: *Macrophage inducible Ca₂₊- dependent lectin receptor*) e STING (do inglês, *cytosolic DNA Sensor Stimulator of Interferon Genes*) promove aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α , os quais são drasticamente reduzidos mediante a ativação do C5aR2.

2.1.4.2 Receptores não canônicos

2.1.4.2.1 PAR1 e PAR4

Diferente das anafilatoxinas C3a e C5a, que apresentam receptores específicos e bem caracterizados, a existência de um receptor para a anafilatoxina C4a foi discutida por muito tempo. Esta questão foi, recentemente, resolvida por Wang e colaboradores (2017). Testando o C4a frente a um painel de diversos receptores acoplados à proteína G, estes autores observaram que a anafilatoxina C4a se liga com alta afinidade, sinalizando via arrestina- β , em células CHO K1 (células de ovário de hamster chinês) expressando apenas Receptores Ativados por Protease (PAR, do inglês: *Protease-Activated Receptor*) dos tipos 1 (PAR1) e/ou 4 (PAR4), sendo um ligante não convencional destes receptores (WANG et al., 2017).

PAR1 e PAR4 fazem parte de um grupo específico, composto por quatro receptores acoplados à proteína G que precisam ser clivados em sua porção N terminal, geralmente por alguma serinoprotease, como a trombina, para poder disparar sua sinalização e exercer suas atividades biológicas. Estes receptores são expressos em células endoteliais, plaquetas, leucócitos e células musculares, e frente à ativação por seus agonistas, uma série de respostas são incitadas, incluindo hemostasia, trombose, distúrbios circulatórios e inflamação (MAZHARIAN et al., 2007; ARACHICHE et al., 2013; SCHOERGENHOFER et al., 2018).

Wang e colaboradores (2017) observaram que o C4a interage especificamente com PAR1 e PAR4, uma vez que não apresentou associação com PAR2 e PAR3, bem como para os outros receptores de anafilatoxinas, expressos em células CHO K1 transfectadas com tais receptores.

Em células endoteliais humanas, o C4a induziu fosforilação de ERK 1/2, que não foi suprimida pela adição de toxina pertussis, inibidor clássico de sinalização

via proteína G, demonstrando que a ativação dos PARs por C4a dispara uma cascata de sinalização celular não convencional em relação aos ligantes clássicos. Embora não tenha sido suprimido pela inibição da proteína G, o tratamento das células com RWJ56110, antagonista do PAR1, e anticorpos direcionados para PAR4 promoveram o bloqueio da sinalização via ERK1/2, fato que indica que o C4a age via tais receptores. Adicionalmente, detectou-se que em células endoteliais (HMEC-1), o C4a provocou liberação dos estoques intracelulares de cálcio e formação de fibras de actina nestas células, eventos moleculares que demonstram que esta anafilatoxina é capaz de provocar perturbação endotelial, causando aumento da permeabilidade vascular. Referente a este evento, o PAR1 apresenta efeito predominante, já que o RWJ56110, antagonista deste receptor, protegeu as células da perturbação, enquanto a inibição do PAR4 com tcY-NH2 não alterou este efeito.

É importante ressaltar que tal estudo foi desenvolvido tendo como alvo da anafilatoxina C4a apenas células endoteliais e, considerando-se que vários tipos celulares expressam PAR1 e PAR4, é possível que estes eixos sejam ativados, por exemplo, em leucócitos e plaquetas, disparando a ativação destas células, levando a respostas efetoras que podem ser fisiológicas e/ou patológicas.

2.1.5 Complemento e envenenamentos por serpentes

No final do século 19 e início do século 20 Ewing (1894), trabalhando com coelhos envenenados experimentalmente com o veneno da serpente *Crotalus adamanteus*, observou que o soro obtido destes animais perdia a atividade bactericida após o envenenamento. Posteriormente, Stephens e Myers (1898) e Flexner e Nogushi (1902) também demonstraram que os venenos de diferentes espécies de serpentes, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Naja*, agiam sobre o soro de diferentes espécies de mamíferos, *in vivo* e *in vitro*, abolindo a atividade bactericida deles. Além da atividade bactericida, observou-se que a hemólise provocada por alguns desses venenos não ocorria na ausência de soro, e que tal atividade era reestabelecida na presença de soro fresco, porém completamente inibida quando do aquecimento do soro a 56°C, sugerindo participação do complemento nestes efeitos. Além disso, foi observado que a atividade hemolítica do soro era dependente da origem deste, já que em algumas situações o tratamento do soro de diferentes espécies com veneno, ao invés de potencializar a hemólise, inibia a mesma (FLEXNER e NOGUSHI, 1902).

Buscando os possíveis componentes de tais venenos, responsáveis por tais efeitos, Müller-Eberhard e Fjellström (1972) isolaram do veneno da serpente *N. naja* uma glicoproteína de 144 kDa com mobilidade eletroforética em pH 8,6, semelhante à das globulinas- β do soro de mamíferos. Foi observado que essa proteína era hábil em converter eletroforeticamente o C3 sérico, na presença de cátions bivalentes, como o Mg^{2+} , de maneira dependente do FB e FD, demonstrando assim que esta proteína era um possível ativador da via alternativa. Devido às suas propriedades e por ter sido primeiramente detectada apenas em venenos de serpentes pertencentes ao gênero *Naja* (cobras), esta molécula ficou conhecida como *Cobra Venom Factor* (CVF).

O CVF é uma molécula não tóxica, similar ao componente C3 do complemento. O CVF apresenta massa molecular ~150 kDa, é composto por 3 cadeias, α , β e γ unidas por pontes dissulfeto. Contém em sua estrutura o domínio CUB, de suma importância para a ligação do CVF a seu alvo, o FB, e devido a essa propriedade, o CVF é caracterizado como uma molécula C3b-like (HARRISON et al., 2018; VOGEL e FRITZINGER, 2010).

Embora o CVF seja uma molécula C3b-like, diferente do C3b, o CVF não possui em sua estrutura o domínio TED (domínio tioéster), região importante para ligação de C3b em superfícies ativadoras, e, portanto, a ativação do complemento promovida pelo CVF ocorre em fase fluida (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; VOGEL et al., 1984; VOGEL e FRITZINGER, 2010).

O CVF exerce sua atividade ligando-se ao FB formando o complexo CVF-FB. Este complexo adquire atividade catalítica após a clivagem do FB pelo fator FD. Tal complexo possui habilidade de clivar grandes quantidades de C3 e C5, tanto *in vitro* como *in vivo*; com isso, a ação contínua deste complexo leva ao consumo exacerbado de C3 (KRISHNAN et al., 2009; VOGEL e MÜLLER-ERBERHARD, 1982; VOGEL e FRITZINGER, 2010). Essa atividade exacerbada sobre os fatores C3 e C5 do complemento se deve a alta estabilidade da C3/C5 convertase formadas pelo CVF com o FB. Enquanto a C3 convertase de mamíferos é extremamente instável e tem meia vida de 1,5 minutos, a C3 convertase formada pelo CVF tem meia vida de até 7 horas. Ainda, quanto às características relacionadas à ativação exacerbada do complemento pelo CVF, demonstrou-se que a C3/C5 convertase formada pelo mesmo não é suscetível à regulação por reguladores do complemento de mamíferos (VOGEL e FRITZINGER, 2010).

Além do veneno de *N. naja*, o CVF foi detectado no veneno de outras espécies do gênero *Naja* (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017; OSIPOV et al., 2005; TAMBOURGI et al., 1994), e interessantemente duas isoformas desta molécula foram detectadas no veneno de *N. melanoleuca* (OSIPOV et al., 2005). Além do que as propriedades do CVF podem variar entre as espécies de *Naja*, uma vez que o CVF detectado no veneno de *N. haje*, por exemplo, não tem a capacidade de formar C5 convertase (von ZABERN et al., 1980).

Moléculas com atividade similares à do CVF foram também encontradas nos venenos de outras espécies de serpentes da família Elapidae, como *Austrelaps superbis* (moléculas AVF-1 e -2, do inglês: *Austrelaps Venom Factor-1,-2*) (REHANA & KINI, 2007), *Hemachatus haemachatus* (GOPALAKRISHNAKONE et al., 2017) e *Ophiophagus hannah* (molécula OVF, do inglês: *Ophiophagus Venom Factor*) (ZENG et al., 2012).

Até o momento, pouco se sabe sobre o papel biológico do CVF na captura das presas e envenenamentos humanos. No entanto, acredita-se que a ativação exacerbada do complemento por ação do CVF culmina na geração de anafilatoxinas, as quais poderiam contribuir para disfunção endotelial local e sistêmica, fator que poderia facilitar o escape das toxinas do veneno para circulação e chegada das mesmas aos seus alvos (VOGEL e FRITZINGER, 2010; TAMBOURGI e VAN DEN BERG, 2014).

O CVF é um potente ativador da via alternativa do complemento, e por isso tal componente tem sido extensivamente utilizado como ferramenta para depletar o complemento em várias espécies animais, utilizadas como modelos experimentais de diferentes patologias. A injeção de altas doses de CVF nestes animais causa uma complementopatia de consumo caracterizada por redução nos níveis de vários componentes do complemento. No entanto, tal ação apresenta efeitos colaterais, uma vez que induz a geração de quantidades elevadas de anafilatoxinas (SCHMID et al., 1997; TILL et al., 1987).

Till e colaboradores (1982) observaram que a injeção do CVF de *N. naja* em ratos, por via endovenosa, causava abolição completa da atividade hemolítica do soro dos animais em poucos minutos. Adicionalmente, o soro destes animais era quimiotático para neutrófilos. Foi também observado que a inoculação do CVF causava neutropenia transiente, seguida de neutrofilia e aumento da expressão de CD11b nestas células (SCHMID et al., 1997; TILL et al., 1987). Estes eventos foram acompanhados de adesão e migração de neutrófilos para os pulmões, e disfunção do

endotélio pulmonar, uma vez que a injeção de CVF causava morte de células endoteliais, exsudação de proteínas plasmáticas, hemorragia e deposição de fibrina nos alvéolos. De acordo com os achados, postulou-se que o CVF seria um potente indutor de LPA.

Curiosamente, a utilização de anticorpos, capazes de induzir depleção de neutrófilos, e de catalase e superóxido dismutase, enzimas que degradam H_2O_2 e O_2^- inibiu a fisiopatologia da LPA, sugerindo que as alterações provocadas pelo CVF podem ser decorrentes da ativação dos neutrófilos por anafilatoxinas (TILL et al., 1987). Além disso, a geração de C5a decorrente da atividade do CVF parece ser fator crucial para o desenvolvimento completo da LPA, já que o uso do CVF de *N. haja*, o qual não tem capacidade de gerar C5a, não promoveu o desenvolvimento da LPA, e anticorpos neutralizantes do C5a inibiram por completo todos os parâmetros associados à patologia (MULLIGAN et al., 1996; SCHMID et al., 1997; TILL et al., 1987).

Além da interação com o complemento, as ações do CVF parecem influenciar outros sistemas bioquímicos. Assim, animais inoculados com CVF apresentaram aumento nos níveis pulmonares de uma série de eicosanoides, como TXA_2 , 6-keto-PGF1- α , LTB_4 e LTC_4 , e tratando-se os animais com indometacina e ibuprofeno ou U6685, inibidores respectivamente, das COXs ou 5-LOX, todos estes eicosanoides foram reduzidos, bem como a disfunção endotelial/edema induzido pelo CVF (MORGANROTH et al., 1988).

Foi relatado que o CVF, além de provocar as alterações pulmonares, tem a capacidade de induzir aumento da permeabilidade intestinal, de maneira independente de eicosanoides, e hipotensão severa (YOUNGER et al., 2001). Assim como a LPA, a hipotensão é dependente do eixo C5a-C5aR1, já que o tratamento dos animais com PMX53, antagonista do C5aR1, inibiu tal efeito (PROCTOR et al., 2006).

Embora os mecanismos pelos quais o CVF ativa o Complemento, levando a condições patológicas tenham sido elucidados, a real importância da ativação do complemento e as consequências dela para a patogênese e morte nos envenenamentos carecem de mais estudos.

Entre os animais peçonhentos de importância médica em que as consequências da ativação do complemento para o envenenamento foram elucidadas, destacam-se os estudos relacionados aos envenenamentos por aranhas do gênero *Loxosceles*. Os acidentes com estas aranhas apresentam manifestações clínicas locais

(cutânea) e/ou sistêmica, e entre as consequências sistêmicas deste envenenamento está a hemólise intravascular disseminada.

Tambourgi e colaboradores (1995) observaram que a hemólise de eritrócitos humanos, tratados com os venenos de *Loxosceles*, só ocorria na presença de soro humano autólogo, sendo tais efeitos abolidos pelo aquecimento do soro ou seu tratamento com EDTA, agente quelante de Ca^{2+} e Mg^{2+} , indicando a contribuição do complemento. A contribuição do complemento foi confirmada pela incubação de eritrócitos, tratados com veneno, com soro humano autólogo depletado da proteína C9. Neste estudo foi identificada uma proteína de 35 kDa (F35) no veneno de *Loxosceles* capaz de reproduzir os efeitos do veneno sobre os eritrócitos, na presença de soro. Foi observado que esta proteína apresentava a capacidade de se ligar à membrana dos eritrócitos e promover a deposição dos componentes C1q, C2, C3, C4, C5 e FB sobre estas células. Além disso, estes autores detectaram que a lise das células era mediada pela via alternativa, já que o uso de EGTA, um quelante específico de Ca^{2+} , capaz de interferir na atividade da VC e VL, não preveniu a hemólise.

Estudos posteriores demonstraram que a toxina F35 apresentava sequência similar à de fosfolipases D, tendo como substrato a esfingomielina, sendo caracterizada como uma esfingomielinase D. Considerando o substrato desta enzima, foi proposto que a ativação do complemento e o seu papel na patogênese do envenenamento poderia ser decorrente de eventos subsequentes à ligação da toxina na membrana celular e clivagem da esfingomielina (TAMBOURGI et al., 1998).

Sabendo que as células próprias são protegidas da lise mediada pelo complemento por uma série de reguladores, e que a ausência destes reguladores é a causa de algumas doenças hemolíticas, Tambourgi e colaboradores (2000) demonstraram que a incubação de eritrócitos humanos com veneno total ou esfingomielinase não interferia na expressão de CD55/DAF, CR1 ou CD59 na membrana dos eritrócitos. No entanto, foi detectada redução drástica na expressão das Glicoforinas (GP) A, B e C

As glicoforinas são proteínas altamente expressas em eritrócitos, e ricas em ácido siálico, característica que contribui para a regulação da ativação da via alternativa, uma vez que são sítios de ligação para o FH. Estes autores detectaram que, na presença do veneno ou da esfingomielinase D, as GPA, GPB, GPC são clivadas em regiões intra- e extra-celulares de maneira independente de enzimas do veneno. A contribuição de proteases endógenas no evento de clivagem das GPs foi confirmada

pelo uso de inibidores de proteases, sendo que a 1,10 Phe, inibidor de metaloproteinasas, protegeu as células da remoção.

Adicionalmente aos mecanismos de remoção de glicoforinas, foi demonstrado que eritrócitos humanos expostos a esfingomielinase D eram intensamente marcados com anexina V, indicando perda de assimetria da membrana celular e exposição de fosfatidilserina (TAMBOURGI et al., 2002). A fosfatidilserina é reconhecida como DAMP pelo complexo C1, e após a incubação de eritrócitos humanos com a esfingomielinase foi detectada a deposição de C1q, PAS e PCR, iniciadores da VC, bem como do regulador C4Bp. O uso de soro humano depletado de PAS e/ou PCR não alterou a hemólise mediada pelo complemento autólogo. No entanto, a depleção de C1q reduziu drasticamente a hemólise, o que indicou que a associação do C1q às hemácias, tratadas com a esfingomielinase D, é um evento inicial importante para a ativação do complemento e lise celular (TAMBOURGI et al., 2005).

Além da influência nos eventos sistêmicos, a ativação do complemento parece também contribuir para alguns eventos das reações locais dos envenenamentos por *Loxosceles*, uma vez que coelhos depletados de complemento com CVF, ou deficientes do componente C6, apresentaram redução no infiltrado de neutrófilos na região da lesão dermonecrotica (TAMBOURGI et al., 2005).

No tocante aos envenenamentos por serpentes peçonhentas, alguns estudos *in vitro* e *in vivo* têm emergido na literatura, sugerindo potencial contribuição do complemento à fisiopatologia destes envenenamentos.

Farsky e colaboradores (2000) mostraram que a incubação de soro humano normal com veneno da serpente *B. asper* reduzia significativamente a atividade hemolítica do soro, tanto pela via alternativa como pela via clássica. Estes autores observaram que a redução da atividade hemolítica do soro estava relacionada com ativação do complemento pelo veneno, uma vez que após a incubação, o soro se tornou quimiotático para neutrófilos humanos *in vitro*, e que a quimiotaxia era devido à ativação do C5aR1, sendo que o uso de anticorpos neutralizantes para este receptor abolia tal propriedade. A ativação de C5 se mostrou necessária para a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos injetados com veneno, uma vez que camundongos A/J, naturalmente deficientes da proteína C5, apresentaram falha na migração. Neste estudo foi demonstrado que um dos fatores do veneno envolvidos na ativação do complemento era uma SVMP conhecida como BaP-1. Esta induziu quimiotaxia de neutrófilos dependente de fragmentos de C3, dado que o uso de sCR1

(do inglês: *soluble Complement Receptor 1*) reduzia significativamente a migração de neutrófilos. Embora estes autores tenham demonstrado que o veneno de *B. asper* causava ativação do complemento, os mecanismos envolvidos nesta ativação, bem como a influência de tais eventos na patologia do envenenamento não foram explorados.

Incubando amostras de soro humano com venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, *Micrurus*, *Naja* ou *Trimeresurus*, diferentes autores mostraram que tais venenos são capazes de provocar complementopatias caracterizadas por redução drástica nas atividades das vias alternativa, das lectinas e/ou clássica (DELAFONTAINE et al., 2018; PIDDE-QUEIROZ et al., 2010; TAMBOURGI et al., 1994; TANAKA et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2001). Estas complementopatias eram decorrentes da ativação do complemento, uma vez que estes autores detectaram níveis altos de C3a, C4a e C5a nas amostras de soro após incubação com os diferentes venenos. Nestes estudos, foi detectado que todos estes venenos apresentavam SVMP e/ou SVSP capazes de clivar diretamente os componentes C3, C4 e C5 humanos purificados, bem como o regulador das vias clássica e das lectinas, C1-INH (DELAFONTAINE et al., 2018; PIDDE-QUEIROZ et al., 2010; TANAKA et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2001).

Delafontaine e colaboradores (2018) demonstraram que as SVMPs são importantes nestes efeitos, uma vez que 1,10 Phe, inibidor desta classe de proteases reduziu drasticamente a geração de C5a e a formação de sTCC no soro humano incubado com o veneno da serpente *B. lanceolatus*. Além disso, o C5a gerado por clivagem direta do C5 humano purificado pelas proteases do veneno era altamente funcional, disparando a ativação de neutrófilos, como caracterizado pelo aumento drástico nos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} . Além disso, estes autores detectaram que as SVMP reduzem a atividade inibitória do C1-INH, via clivagem desta molécula.

Interessantemente, uma SVSP e uma SVMP encontradas respectivamente nos venenos das serpentes *T. flavoviridis* (Flavoxobin) e *B. pirajai* (P-I SVMP) foram caracterizadas como C3 convertases like, uma vez que se mostraram capazes de clivar diretamente o componente C3, no mesmo ponto que as C3 convertases de rotas intrínsecas, gerando C3a e C3b (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010; YAMAMOTO et al., 2002).

Alguns estudos têm revelado que em acidentes humanos, com diferentes espécies de serpentes, a ativação do complemento acontece. Pacientes envenenados por

N. nigricollis apresentam reações locais caracterizadas por necrose e bolhas e as análises dos aspirados destas bolhas apresentaram níveis aumentados de produtos de degradação do componente C3. Além disso, os níveis plasmáticos de C3 intacto e FB apresentavam-se muito reduzidos nos indivíduos envenenados por esta serpente (WARREL et al., 1976).

Stone e colaboradores (2013) detectaram a geração sistêmica de C3a, C4a e C5a em indivíduos envenenados pela serpente *Daboia russelii*. O aumento nos níveis destas anafilatoxinas foi concomitante ao aumento sistêmico de histamina, triptase do mastócito e IL-6, os quais podem ser induzidos por anafilatoxinas. Embora estes estudos tenham detectado marcadores relacionados à ativação do complemento após o envenenamento, tais autores não detectaram correlação entre a ativação do complemento com nenhum dos eventos patológicos apresentados pelos pacientes.

Considerando que a (i) geração de anafilatoxinas e a sinalização via seus respectivos receptores direcionam uma série de eventos inflamatórios protetores e/ou patológicos, (ii) que a real influência da ativação do complemento na patogênese dos envenenamentos por serpentes permanece pouco explorada e (iii) que o envenenamento pela serpente *N. annulifera* produz vários eventos inflamatórios sugestivos de ativação do complemento, o segundo capítulo desta tese foi dedicado a análise do perfil e mecanismos envolvidos na ativação do complemento e o impacto destas reações na imunopatologia do envenenamento por esta serpente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivos gerais

Avaliar a capacidade do veneno de *N. annulifera* em ativar o complemento em modelos experimentais, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, e determinar o impacto desta ativação no desenvolvimento da imunopatologia do envenenamento.

2.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Analisar a ação do veneno de *N. annulifera* sobre as rotas canônicas (vias alternativa, das lectinas e clássica) de ativação do complemento em soro humano normal (SHN);
- ✓ Determinar se o veneno induz geração de anafilatoxinas e sTCC em SHN;
- ✓ Avaliar a presença de proteases no veneno capazes de agir diretamente sobre componentes purificados do complemento humano envolvidos com a ativação e regulação da cascata;
- ✓ Determinar o potencial inflamatório do veneno de *N. annulifera* em modelo *ex vivo* de sangue total humano (ativação do complemento, produção de eicosanoides, interleucinas e quimiocinas);
- ✓ Analisar a influência da ativação do complemento na produção de eicosanoides e quimiocinas, por meio de intervenção farmacológica em modelo *ex vivo* de sangue total humano;
- ✓ Analisar se o veneno de *N. annulifera* promove ativação sistêmica das rotas canônicas do complemento em modelos experimentais de envenenamento *in vivo*;
- ✓ Determinar se o veneno promove geração sistêmica da anafilatoxina C5a em modelos murinos de envenenamento experimental moderado e severo;
- ✓ Caracterizar a contribuição do eixo C5a-C5aR1 no desenvolvimento das reações locais provocadas pelo veneno (edema, produção de mediadores lipídicos e quimiocinas, infiltrado de neutrófilos);
- ✓ Avaliar a contribuição do C5aR1 nas reações sistêmicas em modelo de envenenamento moderado (alterações leucocitárias e produção sistêmica de mediadores inflamatórios);

- ✓ Analisar a contribuição do C5aR1 nas reações sistêmicas em modelo de envenenamento severo (alterações leucocitárias, produção sistêmica de mediadores inflamatórios, lesão pulmonar e sobrevida).

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Ação do veneno da *N. annulifera* sobre o complemento humano

2.3.1.1 Obtenção do Soro Humano Normal (SHN) e tratamentos

Sangue humano foi coletado de indivíduos saudáveis, na ausência de anticoagulantes e mantido à temperatura ambiente por 10 minutos e refrigerado a 4°C, durante 4 horas para permitir a formação de coágulo. Na sequência, o coágulo foi removido e o sangue centrifugado a 400 x g para obtenção do SHN, o qual foi armazenado a – 80°C até o momento dos ensaios.

Para determinar se o veneno de *N. annulifera* age ou não sobre o complemento, amostras de SHN (200 µL) foram incubadas durante 30 minutos, em agitação constante a 37°C, com 50 µg do veneno ou salina apirogênica. Após estas incubações, as misturas foram submetidas a ensaios funcionais.

2.3.1.2 Ensaio Hemolítico

2.3.1.2.1 Via alternativa

A ação do veneno de *N. annulifera* sobre a atividade da via alternativa do complemento foi determinada segundo a metodologia de Joiner e colaboradores (1983), com algumas modificações. Suspensões de eritrócitos de coelho (E^R) a 2% foram lavadas por três vezes em PBS a 405 x g por 15 minutos a 4°C. Seguido a estas lavagens os E^R foram lavados em tampão APB (do inglês: *Alternative Pathway Buffer*) (5 mM sódio-barbital, 7 mM cloreto de magnésio, 10 mM EGTA, 150 mM cloreto de sódio– pH 7,3), a 405 x g por 10 minutos, e utilizados para a realização do ensaio hemolítico.

Amostras de SHN, tratadas com veneno ou não, foram diluídas 1:10 em tampão APB. Alíquotas dessas diluições, variando de 10 a 100 µL, foram incubadas em placas de fundo em U de 96 poços com 50 µL da suspensão a 2% de E^R e volumes de APB suficientes para completar o volume final de 150 µL. Como controle negativo (branco) ou positivo (100% de hemólise), incubou-se E^R, respectivamente, com APB ou água destilada. As placas foram incubadas a 37° C por 30 minutos e, na sequência, centrifugadas a 328 x g por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de “fundo chato” e as absorbâncias determinadas a λ414 nm no leitor Multiskan EX (Labsystems).

A partir dos valores de absorvância (Ab), foram calculadas as porcentagens de hemólise [y] pela fórmula:

$$[y] = (Ab^{SHN+VENENO} - Ab^{BRANCO}) / (Ab^{100\%LISE} - Ab^{BRANCO}) * 100.$$

Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de hemólise.

2.3.1.2.2 Via clássica

Para a análise da ação do veneno sobre a atividade da via clássica do complemento foi utilizada a metodologia descrita por Klerx et al. (1983), com algumas modificações. Para tanto, utilizou-se eritrócitos de carneiro (E^S), sensibilizados com anticorpos de coelho anti-E^S (hemolisina). Suspensões de E^S a 2% foram lavadas por três vezes com PBS, a 720 x g durante 10 minutos a 4°C e, em seguida, incubadas, a 37° C por 30 minutos, com dose subaglutinante de hemolisina (1:500). Os E^S foram, então, lavados com o tampão VBS (do inglês: *Veronal Buffered Saline*) (720 mM cloreto de sódio, 8,9 mM 5,5 dietilbarbiturato de sódio, 22,4 mM ácido barbitúrico, 1 mM cloreto de magnésio, 0,15 mM cloreto de cálcio– pH 7,3), a 405 x g por 10 minutos, e utilizados para a realização do ensaio hemolítico.

Amostras de SHN, previamente incubadas com veneno ou salina apirogênica foram diluídas 1:80 em VBS. Alíquotas destas diluições, variando de 10 a 100 µL, foram incubadas em placas de fundo em U de 96 poços com 50 µL da suspensão a 2% de E^S sensibilizados e volumes de VBS suficientes para completar o volume final de 150 µL. Como controle negativo (branco) ou positivo (100% de lise), E^S sensibilizados foram incubados, respectivamente, com VBS ou água destilada. As placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e, a seguir, centrifugadas a 304 x g por 5 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de “fundo chato” e as absorvâncias determinadas a λ414 nm no leitor Multiskan EX (Labsystems). A partir dos valores de absorvância (Ab), foram calculadas as porcentagens de hemólise [y]:

$$[y] = (Ab^{SHN+VENENO} - Ab^{BRANCO}) / (Ab^{100\%LISE} - Ab^{BRANCO}) * 100.$$

Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de hemólise.

2.3.1.3 ELISA

2.3.1.3.1 Via das lectinas

Para avaliar a ação do veneno sobre a via das lectinas foi utilizada a metodologia descrita por Petersen et al. (2001), com algumas modificações. Placas de ELISA (Costar®, USA) foram sensibilizadas com 10 µg de manose (Sigma, USA)

overnight a 4°C em câmara úmida. Após este período, as placas foram lavadas com PBS/Tween 20 0,05% e bloqueadas com PBS/BSA 1%, durante 1 hora a 37° C. Após o bloqueio, as placas foram lavadas novamente com PBS e incubadas por 2 horas a 37°C com amostras de SHN tratadas com veneno, salina (controle positivo (C+), ou aquecidas a 56°C (controle negativo (C-), foram diluídas (1:100, 1:200, 1:400 e 1:600) em tampão BVB²⁺ (VBS acrescido de 0,5mM Mg²⁺; 2mM Ca²⁺; 0,1% BSA, pH 7,5). Após esta incubação, as placas foram submetidas à lavagem com o tampão BVB²⁺.

Na sequência as placas foram incubadas com anticorpos anti-C4b humano (goat anti-human C4b - Quidell, EUA) (1:2000) por 1 hora a 37° C. Após esta incubação, as placas foram lavadas, novamente, 3 vezes com BVB²⁺, e incubadas com anticorpos específicos conjugados com peroxidase (rabbit anti-goat IgG-horseradish peroxidase - Zymed, EUA) (1:500) durante 1 hora.

Por fim, as placas foram lavadas 3 vezes com BVB²⁺/Tween 0,05%, e as reações reveladas durante 30 minutos com OPD (ortophenildiamine) (Sigma, EUA) e H₂O₂. As reações foram interrompidas pela adição de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) 4N (normal), e as densidades óticas (D.O.) determinadas em espectrofotômetro (Multiskan EX Labsystems) a 492 nm. Os resultados obtidos foram expressos como Deposição de C4b [%], obtido com a seguinte formula:

$$[\%] = (D.O.^{SHN+VENENO} - D.O.^{C-}) / (D.O.^{C+} - D.O.^{C-}) * 100$$

Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de deposição de C4b.

2.3.1.4 Análise da geração de anafilatoxinas e sTCC no SHN

2.3.1.4.1 Anafilatoxinas

Amostras de SHN foram tratadas com salina apirogênica ou veneno (50 µg) e incubadas a 37°C, em agitação constante, durante 30 minutos. Após esta incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 20 mM de EDTA. A quantificação de anafilatoxinas foi realizada com o uso dos kits Human C3a ELISA, Human C4a ELISA e Human C5a ELISA (BD Biosciences PharMingen, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras de curva padrão ou soro foram diluídas em tampão de ensaio dos respectivos kits (C3a: 1:40.000, C4a: 1:5.000, C5a: 1:500) e incubadas (100 µL) durante 2 horas, a temperatura ambiente em placas revestidas com anticorpos de captura anti-C3a, anti-C4a ou anti-C5a. Após essa incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de

lavagem (300 µL) e incubadas durante 1 hora com solução de detecção contendo anticorpos anti-C3a, anti-C4a ou anti-C5a conjugados com Biotina, e solução contendo Estreptavidina conjugada a Peroxidase. Após esta incubação, as placas foram lavadas sete vezes e as reações reveladas durante 30 minutos com TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). Por fim, as reações foram interrompidas com H₃PO₄ (ácido fosfórico) 1M (molar) e as placas submetidas à leitura espectrofotométrica a 450 nm.

Os resultados obtidos foram expressos em µg/mL de C3a/C3a desArg ou C4a/C4a desArg; e ng/mL de C5a/C5a desArg, levando-se em consideração as curvas padrão pré-estabelecidas pelo fabricante.

2.3.1.4.2 Análise da formação de sTCC no SHN

Amostras de SHN foram tratadas com salina apirogênica ou veneno (50 µg) e incubadas a 37°C, em banho maria, durante 30 minutos. Após esta incubação, as reações foram interrompidas com 20 mM de EDTA. A formação de sTCC foi detectada pelo MicroVue SC5b-9n Plus EIA kit (QUIDEL Corporation), seguindo-se as recomendações do fabricante. As amostras de SHN, tratadas com veneno ou não, foram diluídas em tampão de ensaio do kit (1:150) e incubadas (100 µL) durante 1 hora, a temperatura ambiente em placas revestidas com anticorpos de captura anti-SC5b-9.

Na sequência, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (300 µL) e incubadas, durante 1 hora, com solução contendo anticorpos de detecção conjugados com peroxidase (50 µL). Após esta incubação, as placas foram lavadas sete vezes (300 µL) e as reações reveladas durante 30 minutos com TMB (100 µL). Por fim, as reações foram interrompidas com H₂SO₄ 4N e as placas submetidas à leitura espectrofotométrica a 450 nm (Leitor Multiskan EX Labsystems). Os resultados obtidos foram expressos em ng/mL de sTCC.

2.3.1.5 Ação do veneno sobre proteínas do complemento humano

2.3.1.5.1 Análise da clivagem de componentes solúveis do complemento humano

Amostras de veneno (2,5 µg) foram incubadas durante 30 minutos a 37°C com componentes do complemento humano purificados, envolvidos com ativação (C1q, Pró-enzima C1s, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, FB, FD, Properdina) e regulação (C1-INH, FH, FI, C4bP) (2,5 µg) (CompTech, Inc), na presença ou não de 10 mM de 1,10 Phe e PMSF, respectivamente, inibidores de SVMP e SVSP. Após esta

incubação, as reações foram interrompidas pela adição de 15 mM de EDTA. As misturas foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 10%, em condições redutoras ou não, assim como descrito por Laemmli (1970) e as reações reveladas pelo método de impregnação por prata, segundo Morrissey (1980). As massas moleculares ou intensidade das bandas oriundas das clivagens foram estimadas no Gel Logic 100 Imaging System Kodak.

Por fim, para avaliar se a clivagem de C3, C4 e C5 culminava ou não na geração direta de anafilatoxinas, amostras provenientes destas reações foram submetidas à quantificação de C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg e C5a/C5a desArg por CBA (do inglês: *Cytometric Bead Array*).

2.3.1.6 Modelo *ex vivo* de inflamação em sangue total humano

Para avaliar se a ativação do complemento humano pelo veneno de *N. annulifera* influencia o desenvolvimento de eventos inflamatórios adjacentes, tais como produção de mediadores lipídicos e quimiocinas, o modelo *ex vivo* de inflamação em sangue total humano descrito por Mollnes e colaboradores (2002) foi empregado. Em tal modelo, todos os elementos sanguíneos são preservados, sendo o ideal para demonstrar interações entre os diferentes sistemas presentes no sangue, tais como, complemento, leucócitos e coagulação; e para o *screening* de novas moléculas anti-inflamatórias.

Amostras de sangue foram coletadas de indivíduos saudáveis na presença de 50 µg/mL do anticoagulante Lepirudina (Refludan®, Colgene, USA), que é um inibidor específico da Trombina e não tem efeito sobre a ativação do complemento (MOLLNES et al., 2002). Imediatamente após a coleta, o sangue foi incubado com concentrações crescentes do veneno de *N. annulifera* a 37°C, durante 1 hora, para avaliar se neste contexto o veneno promoveria formação de coágulos. Em nenhuma das concentrações testadas o veneno foi capaz de coagular o sangue (dados não mostrados), característica importante para a condução dos ensaios posteriores.

Para caracterizar a inflamação provocada pelo veneno de *N. annulifera in vitro*, amostras de sangue total anticoaguladas com Lepirudina, foram incubadas com concentrações crescentes do veneno, variando de 3,125 a 100 µg/mL, ou salina apirogênica, a 37°C durante 30 e 60 minutos, sob agitação constante. Após as incubações as amostras foram centrifugadas a 4°C, 405 x g durante 10 minutos. O plasma foi obtido, as reações interrompidas pela adição de 20 mM de EDTA, as

amostras aliquotadas e armazenadas a -80°C para posterior quantificação de marcadores de ativação do complemento, mediadores lipídicos, interleucinas e quimiocinas. Adicionalmente, experimentos de intervenção farmacológica foram realizados para determinar a influência de diferentes componentes do complemento humano nos eventos inflamatórios promovidos pelo veneno de *N. annulifera* no modelo de sangue total.

2.3.1.6.1 Influência do complemento nos eventos inflamatórios no modelo *ex vivo* de sangue total humano

2.3.1.6.1.1 Preparo dos inibidores

O Peptídeo análogo a Compstatina Cp40 (Cp40) (Tyr(D)-Ile-[Cys-Val-Trp(Me)-Gln-Asp-Trp-Sar-Ala-His-Arg-Cys]-mIle-NH₂), gentilmente cedido pelo Prof. John D. Lambris (Universidade da Pensilvânia-USA), foi reconstituído em salina apirogênica na concentração final de 1 mg/mL, e mantido a -80°C até o momento dos experimentos.

O SB290157 (N²-[2-(2,2-diphenylethoxy)acetyl]-L-Arg,2,2,2-trifluoroacetate) (Cayman Chemical) foi reconstituído em DMSO na concentração final de 3,125 mg/mL, de acordo com as recomendações do fabricante, e armazenado a -20°C.

O PMX205 (N(2)-(3-phenylpropanoyl)-L-Orn-L-Pro-3-D-Cha-L-Trp-L-Arg) e o Peptídeo 32 (P32) (Arg-His-Tyr-Pro-Tyr-Trp-Arg), gentilmente cedidos pelo Prof. Trent M. Woodruff (Universidade de Queensland-Austrália) foram diluídos, respectivamente em glicose 5% e salina apirogênica,. Ambos os inibidores foram reconstituídos na concentração final de 1 mg/mL e acondicionados a -20°C, até a realização dos experimentos.

2.3.1.6.1.2 Alvos e tratamentos

2.3.1.6.1.2.1 Influência de C3/C3b

A contribuição da ativação de C3, nos eventos inflamatórios no modelo de sangue total, foi avaliada utilizando-se o peptídeo Cp40, o qual pertence a uma família de peptídeos inibidores (Compstatinas) da ativação de C3 e da atividade do fragmento C3b, sendo o Cp40 6000 vezes mais potente quando comparado à primeira geração de Compstatina (QU et al., 2013). Para tanto, amostras de sangue total humano foram tratadas com 20 µM de Cp40 (GUSTAVSEN et al., 2016) ou salina (veículo).

2.3.1.6.1.2.2 Contribuição do eixo C3a-C3aR

A participação do receptor para a anafilatoxina C3a, na produção de mediadores inflamatórios no modelo de sangue total, foi determinada por meio do bloqueio deste receptor com o antagonista SB290157 (AMES et al., 2001) (20 μ M) (SAUTER et al., 2018) ou veículo (DMSO).

2.3.1.6.1.2.3 Influência do eixo C5a/C5adesArg-C5aR1

O impacto da ativação do receptor para C5a, nos eventos inflamatórios *in vitro* provocados pelo veneno de *N. annulifera*, foi determinado com o uso do peptídeo cíclico antagonista do C5aR1 PMX205 (WOODRUFF et al., 2005) (20 μ M) (HERRMANN et al., 2017) ou seu veículo (Glicose 5%).

2.3.1.6.1.2.4 Modulação do eixo C5a/C5adesArg-C5aR2

A ativação do C5aR2 tem apresentado uma ação benéfica, em alguns modelos de doenças inflamatórias, dado que ele reduziu parâmetros inflamatórios, decorrentes da ativação da ativação do C5aR1 e TLRs (CROKER et al., 2016; LI et al., 2020). Para testar se no contexto do envenenamento tal modulação interferiria na produção de mediadores inflamatórios, amostras de sangue total foram tratadas com 100 μ M de P32 (CROKER et al., 2016) ou seu veículo (salina).

A incubação com os diferentes inibidores foi realizada à temperatura ambiente, durante cinco minutos. Na sequência, as misturas foram incubadas com o veneno de *N. annulifera* (25 μ g/ mL) durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C, sob agitação constante. Ao término das incubações, as amostras foram centrifugadas a 405 x g durante 10 minutos a 4°C, o plasma coletado, as reações interrompidas com EDTA e as amostras armazenadas a -80°C, para posterior análise.

2.3.1.6.1.2.5 Participação das SVMPs

Amostras do veneno de *N. annulifera* foram incubadas com 20 mM de 1,10 Phe, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Na sequência, estas misturas foram incubadas com sangue total humano durante 30, 60 e 120 minutos, a 37°C sob agitação. As amostras foram, então, centrifugadas a 405 x g por 10 minutos a 4°C, o plasma coletado, e as reações interrompidas com EDTA. O plasma obtido foi armazenado a -80°C para posterior mensuração dos mediadores inflamatórios.

2.3.1.6.1.3 Análise da geração de anafilatoxinas e sTCC nos modelos de sangue total e clivagem direta

A quantificação de anafilatoxinas, no plasma obtido dos experimentos de sangue total e das incubações de componentes purificados do complemento humano com veneno, foi realizada por meio do kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Anaphylatoxin kit (BD Bioscience), de acordo com as recomendações do fabricante.

Amostras de plasma (1:500, 1:5000, 1:10.000) ou das misturas dos experimentos de clivagem direta (1:3000) foram diluídas em tampão do kit e incubadas (25 µL) com uma mistura de esferas (25 µL), revestidas com anticorpos de captura anti-C3a/C4a/C5a, durante duas horas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Ao término da incubação, as amostras foram lavadas, com tampão de lavagem (500 µL), por cinco minutos a 200 x g. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos de detecção conjugados com PE, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 1 hora. Por fim, as amostras foram lavadas e ressuspendidas em tampão de lavagem (150 µL). A determinação dos valores de fluorescência foi realizada no FACS CANTO II, por meio do software de aquisição FACS DIVA.

Para determinar a quantidade de anafilatoxinas nas amostras, os valores de fluorescência obtidos foram analisados software FCAP Array 3.1, levando-se em consideração a curva padrão preestabelecida pelo fabricante. Os resultados foram expressos em µg (C3a e C4a) ou ng (C5a)/mL.

A quantificação de sTCC nas amostras de plasma dos experimentos de sangue total foi realizada de acordo com o item **2.3.1.4.2** deste capítulo.

2.3.1.6.1.4 Quantificação de mediadores lipídicos no sangue total

2.3.1.6.1.4.1 LTB₄

A análise da produção de LTB₄ nas amostras de plasma foi realizada por meio de ELISA de competição com o Leukotriene B₄ ELISA kit (Cayman chemical), de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, amostras de plasma, diluídas 1:20 (50 µL), ou curva padrão (50 µL), foram incubadas com LTB₄ conjugado com acetilcolinesterase (AChE) (50 µL), e soro policlonal de coelho anti-LTB₄ (50 µL) em placas revestidas com anticorpos de camundongos anti-IgG de coelho, durante 18 horas, a 4°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (300 µL) e as reações reveladas com reagente de Ellman (acetilcolina, 5'5-ditio-bis-(2- ácido nitro

benzoico) (200 μ L), ao abrigo da luz, durante duas horas. Os valores de densidade óptica foram determinados a λ 415 nm, no leitor Multiskan EX (Labsystems) e a quantidade de LTB₄ nas amostras determinada no ELISA Competitive Analysis tool-Cayman. Os resultados gerados foram expressos em pg/mL.

2.3.1.6.1.4.2 PGE₂

A produção de PGE₂ nas amostras de plasma foi determinada por ELISA de competição, com o Prostaglandin E₂ ELISA kit-Monoclonal (Cayman Chemical), seguindo-se as orientações do fabricante.

Brevemente, amostras de plasma, diluídas 1:20 (50 μ L), ou curva padrão (50 μ L), foram incubadas com PGE₂ conjugada a AChE (50 μ L), e anticorpo monoclonal de camundongo anti-PGE₂ (50 μ L), em placas revestidas com anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo, durante 16 horas, 4°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e a reação desenvolvida com o reagente de Ellman (acetilcolina, 5 5-ditio-bis-(2- ácido nitro benzoico) (200 μ L), ao abrigo da luz, durante uma hora. A densidade óptica das amostras foi mensurada a λ 415 nm e a quantidade de PGE₂ determinada no ELISA Competitive Analysis tool-Cayman. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL.

2.3.1.6.1.4.2 TXB₂

A dosagem de TXB₂, metabolito estável do TXA₂, nas amostras de plasma foi realizada com o Thromboxane B₂ ELISA kit (Cayman chemical), de acordo com as recomendações do fabricante.

Amostras de plasma, diluídas 1:30 (50 μ L), ou curva padrão (50 μ L) foram incubadas com TXB₂ conjugado com AChE (50 μ L), e com o soro policlonal de coelho anti-TXB₂ (50 μ L), em placas revestidas com anticorpos de camundongos anti-IgG de coelho, durante 18 horas e a 4°C. Ao término desta incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem e as reações reveladas com reagente de Ellman (acetilcolina, 5 5-ditio-bis-(2- ácido nitro benzoico) (200 μ L), protegidas da luz e durante uma hora e meia. A densidade óptica das amostras foi determinada a λ 415 nm no leitor Multiskan EX (Labsystems) e a quantidade de TXA₂ estimada no ELISA Competitive Analysis tool-Cayman. Os resultados gerados foram expressos em ng/mL.

2.3.1.6.1.5 Dosagem de Interleucinas no sangue total

A quantificação de interleucinas no modelo de sangue total humano foi realizada com o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit, de acordo com as recomendações do fabricante.

Amostras de curva padrão (25 µL) do kit ou plasma (25 µL) foram incubadas com esferas revestidas com anticorpos (25 µL) de captura anti-IL-1β/6/8/10/12p70; anti-TNF-α e com anticorpos de detecção conjugados com PE (25 µL), durante três horas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Na sequência, as misturas foram lavadas (500 µL) e ressuspensas (150 µL) em tampão de lavagem. A mensuração dos valores de fluorescência foi realizada no FACS CANTO II, software de aquisição FACS DIVA, e a quantidade de cada interleucina determinada no software FCAP Array 3.1, de acordo com a curva padrão pré-determinada pelo fabricante. Os resultados gerados foram expressos em pg/mL.

2.3.1.6.1.6 Quantificação de Quimiocinas no sangue total

A análise da produção de quimiocinas no modelo de sangue total humano foi realizada utilizando-se o kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit, de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de plasma (25 µL), diluído 1:10 ou a curva padrão (25 µL) do kit, foram incubadas com esferas revestidas com anticorpos (25 µL) de captura anti-CCL2 (MCP-1)/5; anti-CXCL8/9/10 (IL-8/MIG (do inglês: *Monokine Induced by Gamma Interferon*)/IP10 (do inglês: *Interferon Gamma Inducible Protein-10*), e com anticorpos de detecção conjugados com PE (25 µL), durante três horas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Na sequência, as misturas foram lavadas (500 µL) e ressuspensas (150 µL) em tampão de lavagem. A mensuração dos valores de fluorescência foi realizada no FACS CANTO II, software de aquisição FACS DIVA, e as quantidades das diferentes quimiocinas determinadas no software FCAP Array 3.1, considerando-se a curva padrão preestabelecida pelo fabricante. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL.

2.3.1.7 Ativação sistêmica do complemento *in vivo*

2.3.1.7.1 Envenenamento sistêmico experimental

Para determinar se o veneno de *N. annulifera* promove ativação sistêmica do complemento em modelos experimentais *in vivo*, grupos de camundongos BALB/c

(n=6) foram inoculados com as doses sub-letal (56,48 µg) ou letal (94,14 µg) do veneno, ou salina apirogênica, pela via i.p. Os animais foram submetidos a eutanásia, 30 minutos após o envenenamento experimental, com combinação de anestésicos (170 mg/kg de Quetamina; 17 mg/kg Xilazina). O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca e incubado por uma hora, à temperatura ambiente, para permitir a formação de coágulo. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g durante 15 minutos a 4°C, o soro coletado e armazenado a -80°C até o momento das análises.

2.3.1.7.2 Determinação da atividade residual

2.3.1.7.2.1 Via alternativa

A atividade da via alternativa foi avaliada por meio do kit Mouse Alternative Complement Pathway Assay (HycultBiotech), de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras de soro dos animais envenenados (EXP) e dos controles positivo (animais injetados com salina (C+) e negativo (soro inativado a 56° por 30 minutos (C-) foram diluídas (1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500), em tampão do kit, e incubadas (100 µL) em placas sensibilizadas com LPS, durante 1 hora a 37°C.

Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem e incubadas com anticorpos biotinilados anti-C9 por 1 hora a 37°C. Na sequência, as placas foram lavadas quatro vezes e incubadas, durante 1 hora a 37°C, com conjugado Estreptavidina-Peroxidase. Por fim, as placas foram novamente lavadas e as reações reveladas, durante 30 minutos, com TMB. As reações foram interrompidas pela adição de H₂C₂O₄ (ácido oxálico) 2N e as densidades ópticas (D.O.) determinadas a 450 nm no Cytation™ 3 (BioTek Instruments). Os resultados obtidos foram expressos como atividade da VA [%], obtida pela seguinte fórmula:

$$[\%] = (D.O.^{EXP} - D.O.^{C-}) / (D.O.^{C+} - D.O.^{C-}) * 100$$

2.3.1.7.2.2 Via das lectinas

A atividade da via das lectinas foi avaliada com o kit Mouse Lectin Complement Pathway Assay (HycultBiotech), de acordo com as recomendações do fabricante.

Placas sensibilizadas com Manose foram incubadas, durante 30 minutos a 37°C, com tampão ativador e, em seguida, lavadas quatro vezes com tampão de lavagem do kit. Em seguida, amostras de soro dos animais envenenados (EXP) e dos

controles positivo (animais injetados com salina (C+) e negativo (soro inativado a 56° por 30 minutos (C-), previamente diluídas (1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500) em tampão do kit (100 µL) foram incubadas durante 1 hora a 37°C em tais placas. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes e incubadas com anticorpos anti-C9 conjugados com biotina por 1 hora a 37°C. Na sequência, as placas foram lavadas quatro vezes e incubadas por 1 hora a 37°C com o conjugado Estreptavidina-Peroxidase. Por fim, as placas foram novamente lavadas e as reações reveladas, durante 30 minutos, com TMB. As reações foram interrompidas com de H₂C₂O₄ 2N e as densidades ópticas estabelecidas a 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em atividade da VL [%], determinada pela seguinte fórmula:

$$[\%] = (D.O.^{EXP} - D.O.^{C-}) / (D.O.^{C+} - D.O.^{C-}) * 100$$

2.3.1.7.2.3 Via Clássica

A ativação da via clássica *in vivo* foi determinada com o kit Mouse Classical Complement Pathway Assay (HycultBiotech), de acordo com as recomendações do fabricante.

Amostras de soro dos camundongos injetados com veneno e dos controles positivo (animais inoculados com salina) (C+) e negativo (soro inativado a 56°) (C) foram diluídas (1:25, 1:50, 1:100, 1:200 e 1:500) e incubadas (100 µL) em placas sensibilizadas com IgM humana, 37°C, durante 1 hora. Após esta incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão de lavagem do kit e incubadas com anticorpos anti-C9 conjugados à biotina, por 1 hora a 37°C. Na sequência, as placas foram lavadas 4 vezes e incubadas durante 1 hora a 37°C com conjugado Estreptavidina-Peroxidase. Em seguida, as placas foram lavadas e as reações reveladas, durante 30 minutos, com TMB. H₂C₂O₄ 2N foi utilizado para interromper as reações e as densidades ópticas determinadas no Cytation™ 3 (BioTek Instruments) aλ450 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade da VC [%], calculada através da seguinte fórmula:

$$[\%] = (D.O.^{EXP} - D.O.^{C-}) / (D.O.^{C+} - D.O.^{C-}) * 100$$

2.3.1.7.3 Análise da geração sistêmica de C5a

A quantificação dos níveis de C5a gerados após o envenenamento foi realizada com o Mouse Complement C5a ELISA kit (ABCAM), conforme as recomendações do fabricante.

Resumidamente, amostras de soro obtidas dos animais do item **2.3.1.7.1** e da curva padrão foram diluídas em tampão do kit. As amostras diluídas (1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000) (100 µL) foram incubadas em placas, revestidas com anticorpos de captura anti-C5a murino, durante duas horas e meia à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem (300 µL) do próprio kit e na sequência incubadas com anticorpos de detecção conjugados a biotina (100 µL) por uma hora a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, e incubadas com solução contendo Estreptavidina-Peroxidase durante 45 minutos. Por fim as placas foram lavadas e as reações reveladas com TMB (100 µL) durante 30 minutos em câmara escura e as reações interrompidas pela adição de CH₃SO₂OH (ácido metanossulfônico) 5% (50 µL). As densidades ópticas obtidas foram determinadas no leitor Multiskan EX Labsystems a λ 450 nm e os valores de C5a circulantes calculados de acordo com curva padrão do kit. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL.

2.3.1.8 Contribuição do eixo C5a-C5aR1 no envenenamento experimental

Grupos de camundongos BALB/c foram tratados, por via s.c., com 1 mg/kg (reações locais e envenenamento sistêmico moderado) ou 2 mg/kg (envenenamento sistêmico severo) (KUMAR et al., 2020) de PMX205 24 e 1 hora antes das diferentes condições de envenenamento experimental.

2.3.1.8.1 Efeito do bloqueio do C5aR1 nas reações locais

2.3.1.8.1.1 Impacto do bloqueio do C5aR1 no edema

Uma hora após a segunda injeção de PMX205, amostras de veneno de *N. annulifera* (10 µg) foram injetadas no tecido subcutâneo da região do coxim plantar da pata posterior esquerda, enquanto a pata contralateral foi injetada apenas com salina estéril. O edema foi monitorado com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo – sensibilidade 0,01 mm), durante 24 horas, e os resultados expressos como Edema [%].

2.3.1.8.1.2 Obtenção de tecidos e extração de mediadores

Grupos de camundongos BALB/c tratados com PMX205 (n=6) ou veículo (n=6) foram inoculados no tecido subcutâneo, do coxim plantar, da pata posterior esquerda, com 10 µg do veneno de *N. annulifera*, e a pata direita com salina apirogênica. Esses animais foram eutanasiados, 20, 60 e 120 minutos após o

envenenamento experimental, com overdose de anestésicos (300 mg/kg de Quetamina; 30 mg/kg Xilazina), e tiveram seus coxins plantares extraídos com o auxílio de bisturis descartáveis estéreis.

Os coxins foram imediatamente acondicionados e homogeneizados (Polytron Homoginizador) em tampão de lise (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 1 µg/mL de leupeptina, 28 µg/mL de aprotinina, 1 mM de PMSF, 10% Glicerina). Os homogenatos obtidos foram centrifugados durante 15 minutos, 1500 x g, 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e novamente centrifugados a 1500 x g, 4°, por 15 minutos. Por fim, os sobrenadantes foram filtrados, aliquotados e armazenados a -80°C, até o momento das análises.

2.3.1.8.1.3 Contribuição do C5aR1 na produção de quimiocinas e mediadores lipídicos nas patas

A quantificação de interleucinas e quimiocinas, no homogenato de tecido subcutâneo dos animais envenenados, foi realizada com o kit LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay/Mouse anti-virus response panel (13 plex), conforme as recomendações do fabricante.

Amostras de homogenato de tecido (25 µL) ou curva padrão foram diluídas 1:2 em tampão do kit e incubadas com um *mix* de esferas (25 µL) revestidas com anticorpos de captura anti-interferons $\alpha/\beta/\gamma$; anti-Interleucinas 1 β /6/10/12; CCL-2/5; CXCL-1/10; TNF- α e GM-CSF durante duas horas sob agitação constante. Ao término desta incubação, as misturas foram lavadas a 405 x g durante 5 minutos e, na sequência, incubadas com anticorpos de detecção biotinizados (25 µL) durante uma hora ao abrigo da luz. (25 µL) Por fim, as amostras foram lavadas e ressuspensas em tampão de lavagem (150 µL).

A aquisição dos dados das amostras foi realizada no FACS Aria III, com o software FACS DIVA e, os valores de fluorescência obtidos, analisados no BioLegend's LEGENDplex™ Data Analysis Software. Os resultados foram expressos em pg/mL.

A quantificação de mediadores lipídicos foi realizada tal como descrito nos itens 2.3.1.6.1.4.1, 2.3.1.6.1.4.2 e 2.3.1.6.1.4.3 deste capítulo.

2.3.1.8.1.4 Contribuição do C5aR1 para a migração de neutrófilos para o tecido subcutâneo

A análise do infiltrado de neutrófilos, no tecido subcutâneo envenenado, foi realizado por ELISA com o kit Mouse MPO (Myeloperoxidase) ELISA (Hycultbiotech), de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras do homogenato, diluído 1:10 (100 µL), ou curva padrão, foram incubadas à temperatura ambiente, em placas revestidas com anticorpos de captura anti-MPO durante uma hora. Após esta incubação, as placas foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas com anticorpo de detecção biotinizado (100 µL), por uma hora à temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram novamente lavadas e incubadas com Estreptavidina-Peroxidase (100 µL), por uma hora. Por fim, as placas foram lavadas e as reações reveladas durante 30 minutos com TMB (100 µL). As reações foram interrompidas com H₂C₂O₄ 2N (50 µL) e à leitura espectrofotométrica foi feita no Cytation™ 3 (BioTek) a 450 nm. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL.

2.3.1.8.2 Efeito da inibição do C5aR1 nas reações sistêmicas

Após a realização dos tratamentos com PMX205, grupos de camundongos BALB/c foram inoculados, por via i.p. com as doses subletal (n=6) ou letal (n=6) do veneno de *N. annulifera*. Os animais foram eutanasiados após uma (dose subletal) e cinco horas (dose letal) com combinação de anestésicos (170 mg/kg de Quetamina; 17 mg/kg Xilazina). Amostras de sangue, dos animais de ambos os grupos, foram obtidas por punção cardíaca e adicionadas a tubos contendo EDTA (2,5 mg/mL) como anticoagulante. Os pulmões dos animais inoculados com a dose letal do veneno foram coletados e lavados em PBS 1X e fixados em solução de formaldeído 10%.

Do sangue obtido, uma parte foi utilizada para determinação das alterações leucocitárias, e a outra usada para a quantificação de mediadores inflamatórios. O plasma foi obtido por centrifugação do sangue a 2800 x g por 10 minutos, a 4°C, e armazenado a -80°C até o momento das análises.

2.3.1.8.2.1 Alterações leucocitárias

Amostras de sangue, obtidas dos animais envenenados, foram diluídas 1:10 em solução de Turk (Ácido acético 2%, Violeta de Genciana 0,1%) e submetidas a contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como n° total de leucócitos por mL x 10⁴. Em paralelo, para determinar as alterações no número das

diferentes populações de leucócitos circulantes, amostras de sangue foram submetidas a extensão sanguínea e coradas com kit panótico rápido (Newprov). Os resultados foram expressos em % de leucócitos por mL de sangue.

2.3.1.8.2.2 Dosagem plasmática de Interleucinas e Quimiocinas

Os níveis sistêmicos de interleucinas e quimiocinas foram determinados por meio do BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation kit (BD Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de plasma ou curva padrão (25 µL) foram incubadas em tubos contendo 25 µL de esferas revestidas com anticorpos de captura contra TNF- α , IL-6/10/12, CCL-2, INF- γ e com 25 µL de anticorpos de detecção marcados com PE, durante duas horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esta incubação, as amostras foram lavadas com 300 µL de tampão de lavagem, a 200 x g, durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e o “*pellet*” contendo as esferas ressuspendido em 150 µL de tampão de lavagem. Por fim, a leitura das amostras foi realizada no BD FACSAria™ III (BD Bioscience) e os valores de citocinas determinados com o software FCAP Array 3.0 (BD Bioscience), levando-se em consideração a curva padrão, pré-estabelecida pelo kit. Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.3.1.8.2.3 Contribuição do eixo C5a-C5aR1 para a lesão pulmonar aguda

Após a remoção (item 2.3.1.8.2), os pulmões foram fixados em solução de formaldeído 10%, durante 24 horas, e submetidos à técnica histológica de rotina e coloração por Hematoxilina/Eosina (H/E) na empresa Histotec.

As amostras de tecido pulmonar foram examinadas ao microscópio de luz, pelo Dr. Bruno Cogliati (FMVZ-USP), para detectar a presença de lesões necróticas, danos alveolares, infiltrados inflamatórios e focos hemorrágicos. Os resultados obtidos foram expressos em forma de escore histopatológico, variando de 0 a 3, sendo: 0= ausência de alterações; 1= presença de alterações discretas; 2= presença de alterações moderadas; 3= presença de alterações histopatológicas severas.

2.3.1.8.2.4 Contribuição do eixo C5a-C5aR1 para a letalidade associada ao envenenamento

Grupos de camundongos (n=6) foram previamente tratados, como descrito no item 2.3.1.8, com 1, 2, 5 ou 10 mg/kg de PMX205. Estes animais foram

envenenados por via i.p. com 1DL₅₀ do veneno de *N. annulifera*, acompanhados durante 72 horas e o número de mortes registrado para determinação da curva de sobrevivência [%].

2.3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média [X] e desvio padrão [SD] e analisados estatisticamente no programa Graphpad Prism 5. Para comparações entre dois grupos experimentais o teste “*t student*” foi aplicado, enquanto para comparações de múltiplos grupos/condições experimentais aplicou-se os testes One-Way ou Two-way ANOVA seguidos de pós teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 O veneno de *N. annulifera* dispara ativação do complemento humano *in vitro*

Amostras de SHN expostas ao veneno de *N. annulifera* foram submetidas a diferentes ensaios funcionais, para detectar as possíveis interações do veneno com o complemento humano. Empregando ensaios hemolíticos foi possível detectar que o veneno interfere de maneira intensa na atividade hemolítica da via alternativa, uma vez que, diferente das amostras de SHN incubadas com salina que apresentaram 100% da capacidade hemolítica, as amostras tratadas com veneno apresentaram apenas 12% de tal atividade (**Fig. 11a**). Adicionalmente, foi observada uma redução significativa na atividade hemolítica da via clássica, uma vez que frente a exposição do SHN ao veneno, o máximo de atividade hemolítica alcançada foi de 39% (**Fig 11c**).

Em placas revestidas com manose, detectou-se que as amostras de SHN incubadas com salina apresentaram 100% da atividade da via das lectinas, caracterizada pela deposição de C4b. As amostras de soro tratadas com veneno apresentaram redução na atividade desta via, sendo o nível de atividade detectada de 38% (**Fig. 11b**).

Além de causar redução na atividade funcional das vias alternativa, clássica e das lectinas, a exposição do SHN ao veneno da *N. annulifera* provocou a geração de altos níveis das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, bem como de sTCC (**Fig. 11d, e, f, g**).

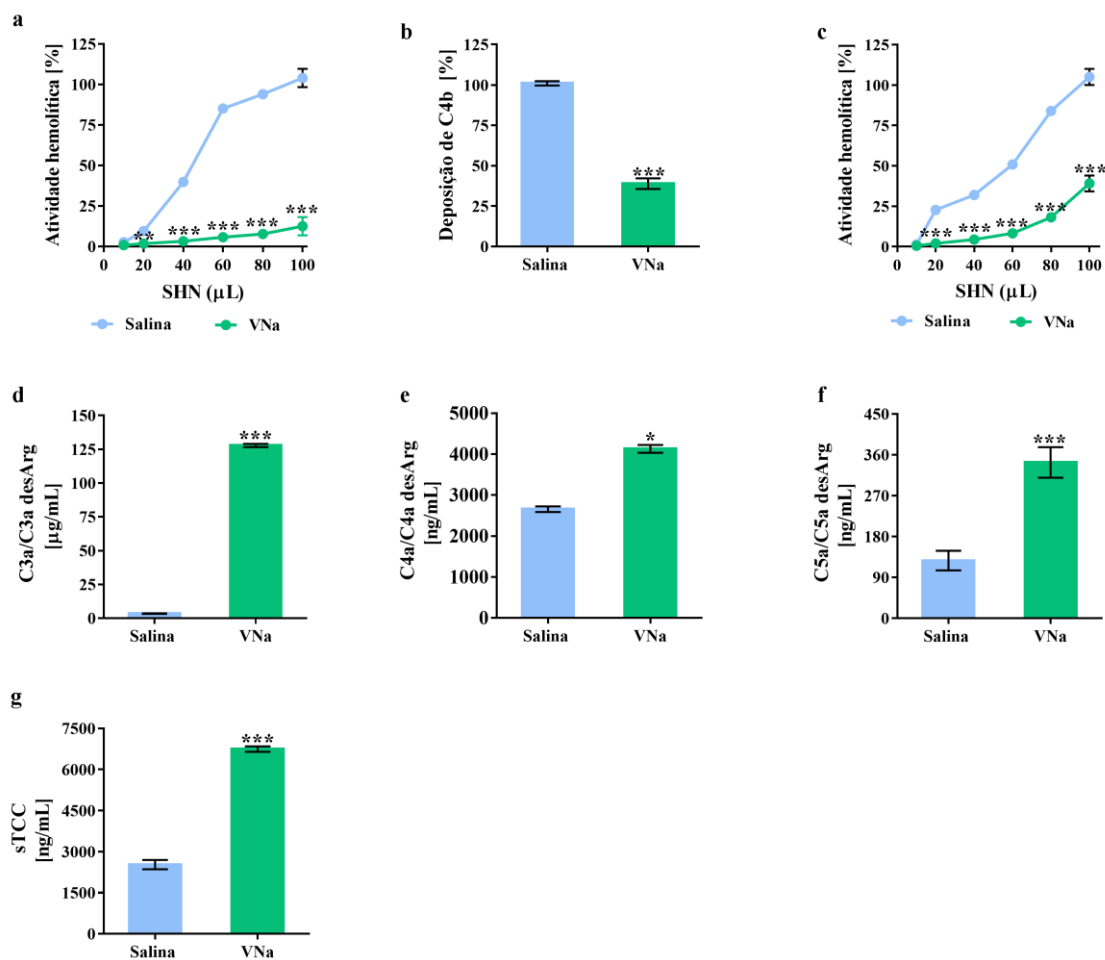


Figura 11 – Ativação do complemento humano pelo veneno de *N. annulifera* (VNa). Amostras de SHN foram incubadas com 50 µg do VNa, durante 30 minutos a 37°, sob agitação constante. A atividade hemolítica das vias alternativa [a] e clássica [c] foi determinada utilizando respectivamente eritrócitos de coelho e de carneiro, e os resultados obtidos expressos como % de Atividade hemolítica. A atividade da via das lectinas foi determinada por ELISA, em placas sensibilizadas previamente com manose, e os resultados expressos como deposição de C4b [%] [b]. A quantificação de anafilatoxinas [d,e,f] e sTCC [g] foi realizada por ELISA. Os dados obtidos foram expressos como média ±SD. As curvas de hemólise foram comparadas estatisticamente por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. A deposição de C4b e quantificação de anafilatoxinas e sTCC foram analisadas estatisticamente pelo teste *t student*. *** (veneno x salina) representa a diferença estatística $p < 0,0001$; ** $p < 0,009$; * $p < 0,02$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.2 SVMP e SVSP do veneno de *N. annulifera* clivam componentes do complemento humano

A **Fig. 12a** mostra que proteases do veneno foram capazes de clivar a cadeia α de C3 gerando um fragmento, cadeia α' , com Mr \sim 107 kDa. Ainda foi possível demonstrar que quando as amostras foram tratadas com 1,10 Phe, a clivagem foi inibida, indicando a ação de SVMP sobre o componente C3. Diferente do observado na incubação com 1,10 Phe, a incubação com PMSF não foi capaz de inibir a clivagem, pelo contrário, intensificou a clivagem da cadeia alfa.

Foi detectado que o veneno de *N. annulifera* apresenta proteases hábeis em clivar a cadeia α de C4, gerando um fragmento, cadeia α' , com Mr \sim 85 kDa. A clivagem do componente C4 foi parcialmente inibida quando as amostras foram tratadas tanto com 1,10 Phe como PMSF, indicando a ação tanto de SVMP como de SVSP sobre C4 (**Fig. 12b**).

A **Fig. 12c** demonstra que o veneno foi capaz de degradar as cadeias α e β de C5, como observado pela redução significativa na intensidade das bandas relacionadas às mesmas (**Apêndice A**). Tal degradação parece não ter gerado fragmentos detectáveis no SDS-PAGE. Observou-se também que quando inibidores de SVMP e SVSP foram adicionados à reação, a degradação das cadeias alfa e beta foi intensificada (**Apêndice A**).

Considerando que a clivagem direta de tais componentes pode ser funcional, ou seja, resultar na geração de anafilatoxinas, tais peptídeos foram quantificados após a incubação do veneno com C3, C4 e C5.

Observou-se que as proteases do veneno da *N. annulifera* são capazes de clivar C3, C4 e C5 de maneira funcional, uma vez que após as incubações níveis significativos de C3a (**Fig. 12d**), C4a (**Fig. 12e**) e C5a (**Fig. 12f**) foram detectados. A geração de todas estas anafilatoxinas foi inibida na presença de 1,10 Phe sugerindo que SVMPs são as principais responsáveis por este efeito do veneno. Adicionalmente e, em menor extensão, a geração de C4a e C5a foi mitigada na presença de PMSF, indicando que as SVSP também agem sobre C4 e C5 de maneira funcional.

No tocante a outros componentes do complemento humano, tanto solúveis como ancorados na membrana citoplasmática, as análises realizadas por SDS-PAGE, bem como por citometria de fluxo, não revelaram nenhum tipo de alteração nestas moléculas.

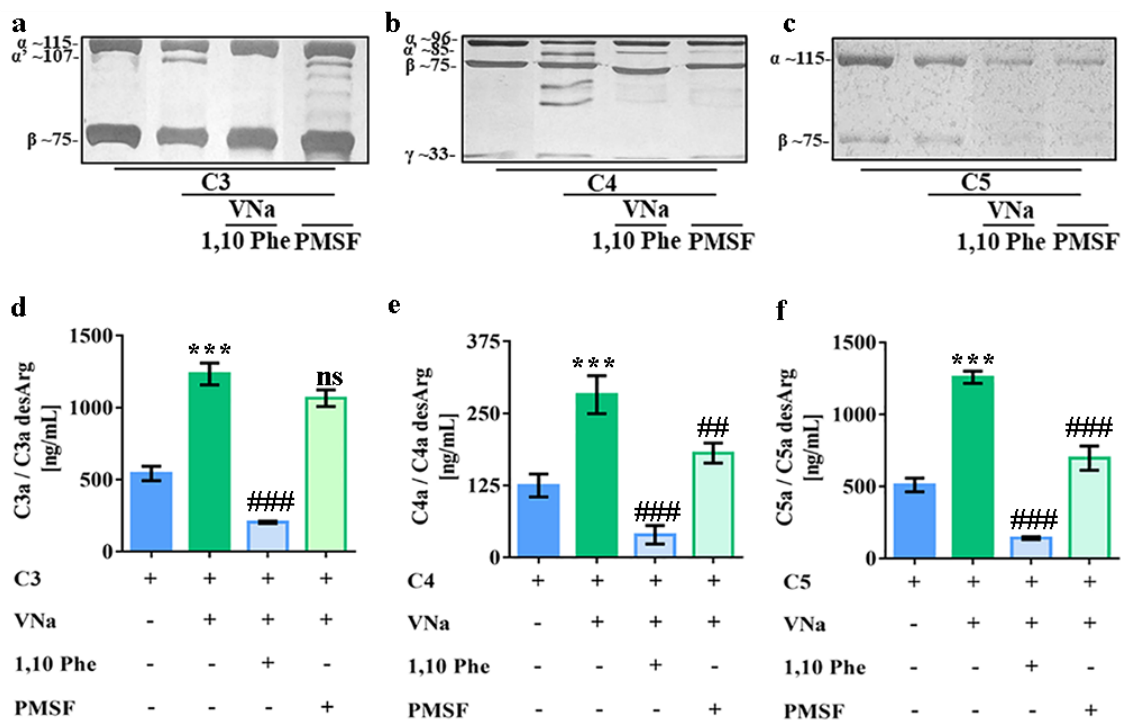


Figura 12 - Ação direta do veneno da *N. annulifera* (VNa) sobre C3, C4 e C5. Amostras dos componentes C3 [a], C4 [b] ou C5 [c] humano purificados (2,5 µg) foram tratadas com salina ou veneno (2,5 µg) e incubadas durante 30 minutos a 37° sob agitação constante. Paralelamente, em algumas destas misturas foram adicionados 20 mM dos inibidores 1,10 Phe ou PMSF. As reações foram interrompidas pela adição de 15 mM de EDTA e as misturas submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 10%, e as reações reveladas por impregnação por prata. As massas moleculares ou intensidade das bandas foram determinadas no Gel Logic 100 Imaging System Kodak. Adicionalmente, amostras destas misturas foram analisadas para detecção de C3a/C3a desArg, C4a/C4a desArg e C5a/C5a desArg por meio do CBA Human anaphylatoxin kit. Os resultados observados foram expressos como ng/mL. Os dados obtidos foram expressos como média ± SD e analisados por One-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (veneno + veículo x salina) e ### (veneno + veículo x veneno + inibidores) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.3 As toxinas do veneno de *N. annulifera* causam tempestade de mediadores inflamatórios no modelo *ex vivo* sangue total humano

O modelo *ex vivo* de inflamação em sangue total humano foi empregado para avaliar se em um modelo em que se preserva todos os elementos sanguíneos, o veneno de *N. annulifera* era capaz de induzir ativação do complemento e qual seria o impacto desta ativação em alguns eventos inflamatórios, tais como, produção de eicosanoides e quimiocinas.

Assim, observou-se que de maneira dose e tempo dependentes o veneno da *N. annulifera* promoveu a ativação do complemento, que culminou na geração de altas quantidades de C3a, C5a e sTCC (**Fig. 13a, b,c**). Além disso, o veneno induziu, também de maneira dose e tempo dependentes, a produção de quantidades elevadas de PGE₂ e TXB₂ (**Fig. 14b, c**). No entanto, a produção de LTB₄ foi inversamente proporcional, *i.e.*, quantidades baixas de veneno induziram altos níveis de LTB₄, enquanto quantidades elevadas pareceram modular/suprimir tal evento (**Fig. 14a**).

Foi também detectado que o veneno foi capaz de induzir a produção de CXCL8, CCL2 e CCL5, de maneira dose e tempo dependentes (**Fig. 15a,b,c**).

Além de promover a produção de mediadores inflamatórios, o veneno causou hemólise de forma dose (50-100 µg/mL) e tempo dependentes (dados não mostrados). Considerando-se que (i) o grupo heme livre da hemoglobina apresenta propriedades pró-inflamatórias, por ativar o CD14 e o complemento pela via alternativa (THOMAS et al., 2019) (ii) que no envenenamento humano por *N. annulifera* e em nosso modelo experimental *in vivo*, a hemólise não é observada e que (iii) o presente trabalho teve por objetivo avaliar as interações entre complemento e veneno, uma dose inflamatória e pouco hemolítica (25 µg/mL) foi estabelecida para os experimentos de modulação farmacológica do complemento.

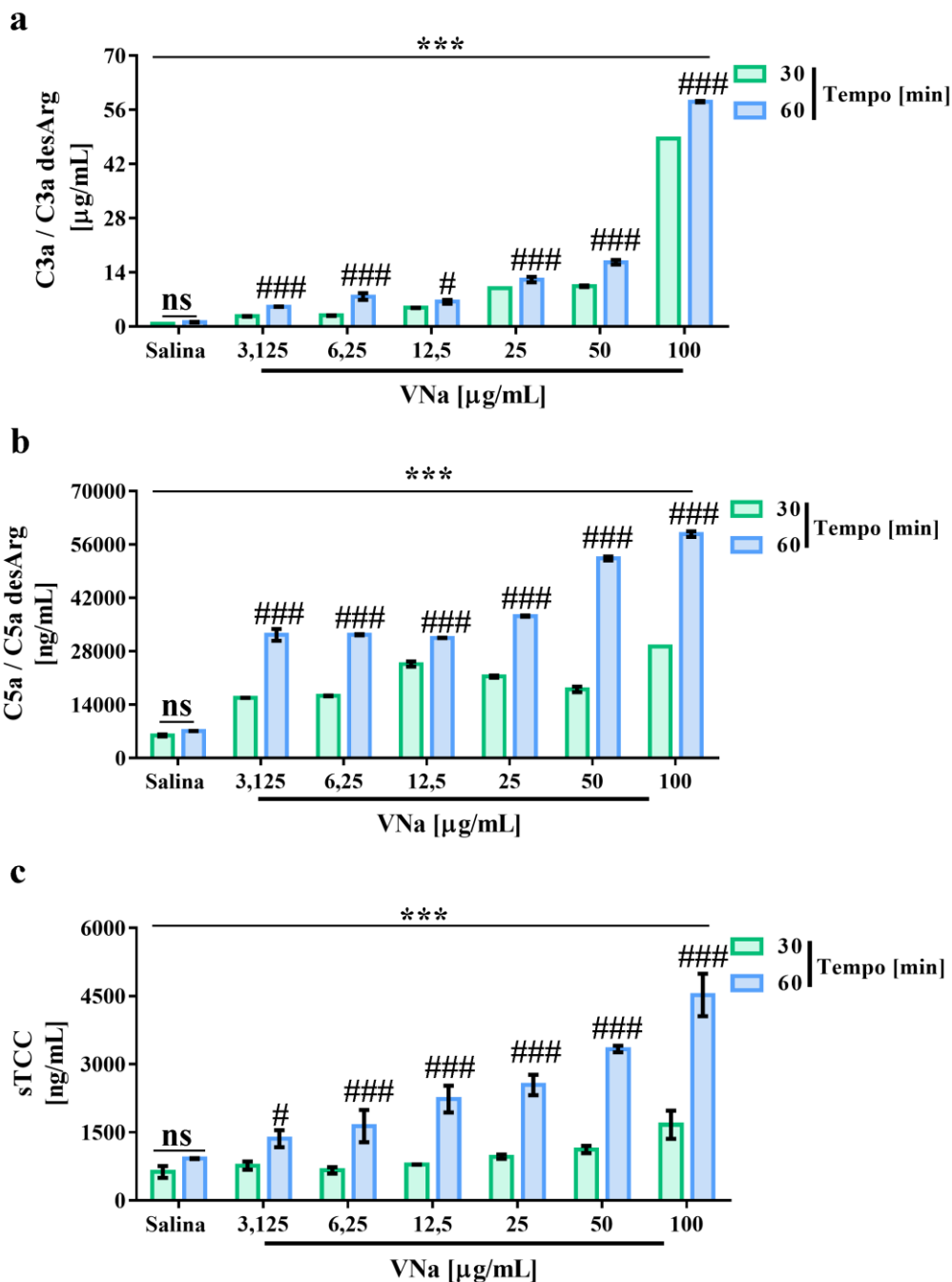


Figura 13 – O veneno de *N. annulifera* (VNa) causa ativação do complemento em modelo *ex vivo* de sangue total humano. Amostras de sangue humano foram incubadas com salina apirogênica ou concentrações crescentes do VNa a 37°, sob agitação constante, durante 30 e 60 minutos. Na sequência, as misturas foram centrifugadas, o plasma coletado, e as reações interrompidas pela adição de 20 mM EDTA. A geração de anafilatoxinas [a,b] foi analisada com o CBA Human anaphylatoxin kit e a formação de sTCC [c] com auxílio do MicroVue SC5b-9n Plus EIA kit. Os resultados foram expressos em µg ou ng/mL. Os dados obtidos foram apresentados como média ±SD e analisados por Two-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (veneno x salina) e ### (30 x 60 minutos) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

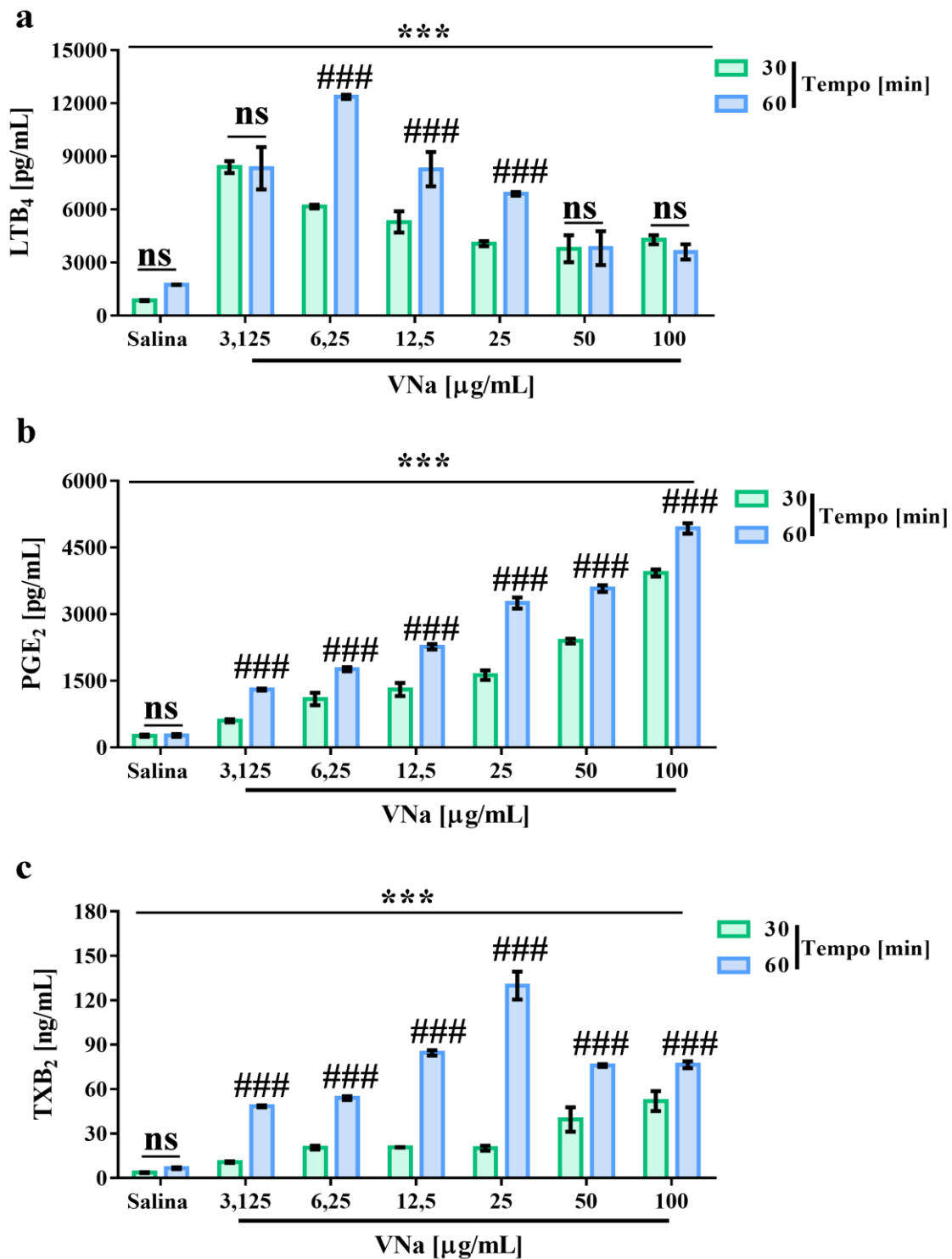


Figura 14 – O veneno de *N. annulifera* (VNa) provoca liberação de mediadores lipídicos em modelo *ex vivo* de sangue total humano. Amostras de plasma obtidas da exposição previa de sangue humano ao VNa foram submetidas a quantificação de mediadores lipídicos com os LTB₄ [a], PGE₂ [b] e TXB₂ [c] EIA kits. Os resultados foram apresentados como pg ou ng/mL. Os dados obtidos foram expressos como média \pm SD e analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (veneno x salina) e ### (30 x 60 minutos) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

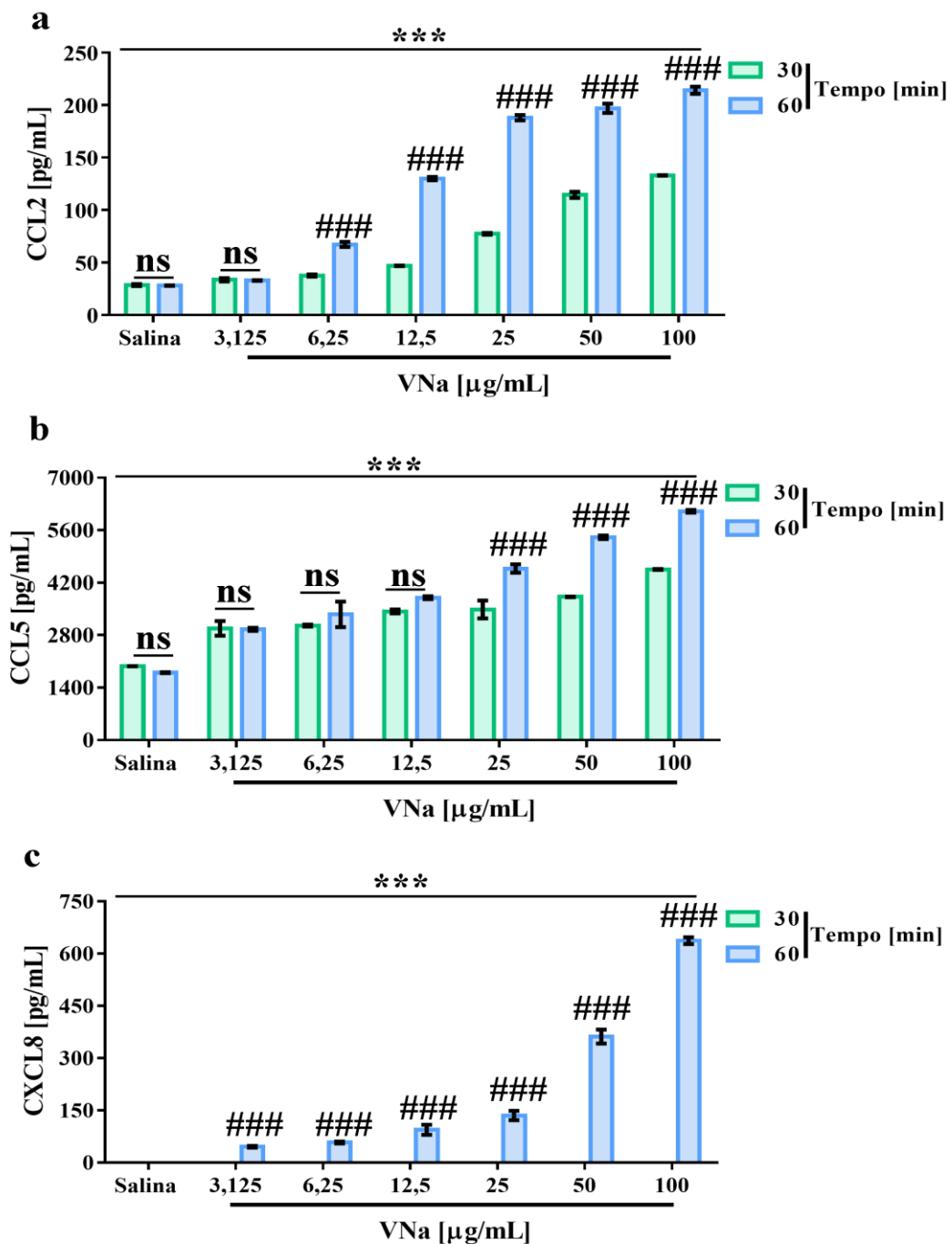


Figura 15 – O veneno da *N. annulifera* (VNa) promove aumento nos níveis plasmáticos de quimiocinas em modelo *ex vivo* de sangue total humano. Amostras de plasma oriundas da incubação previa de sangue humano com o VNa foram submetidas a mensuração de quimiocinas com o CBA human chemokine kit. Os resultados obtidos foram apresentados como pg/mL. Os dados obtidos foram expressos como média \pm SD e analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (veneno x salina) e ### (30 x 60 minutos) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.3.1 Contribuição de C3/C3b

O peptídeo Cp40 foi utilizado para determinar a contribuição de C3/C3b. O tratamento com este peptídeo foi capaz de reduzir drasticamente a geração da anafilatoxina C3a (**Fig. 16a**) e a produção de LTB₄ (**Fig. 16d**) induzidas pelo veneno em todos os períodos analisados. No entanto, a geração de C5a (**Fig. 16b**) e a formação de sTCC (**Fig. 16c**) não foram afetadas na presença deste inibidor. A produção de PGE₂, CCL2 e CXCL8 foram mitigadas na presença do Cp40, enquanto a de TXB₂ não foi alterada frente ao tratamento com tal peptídeo.

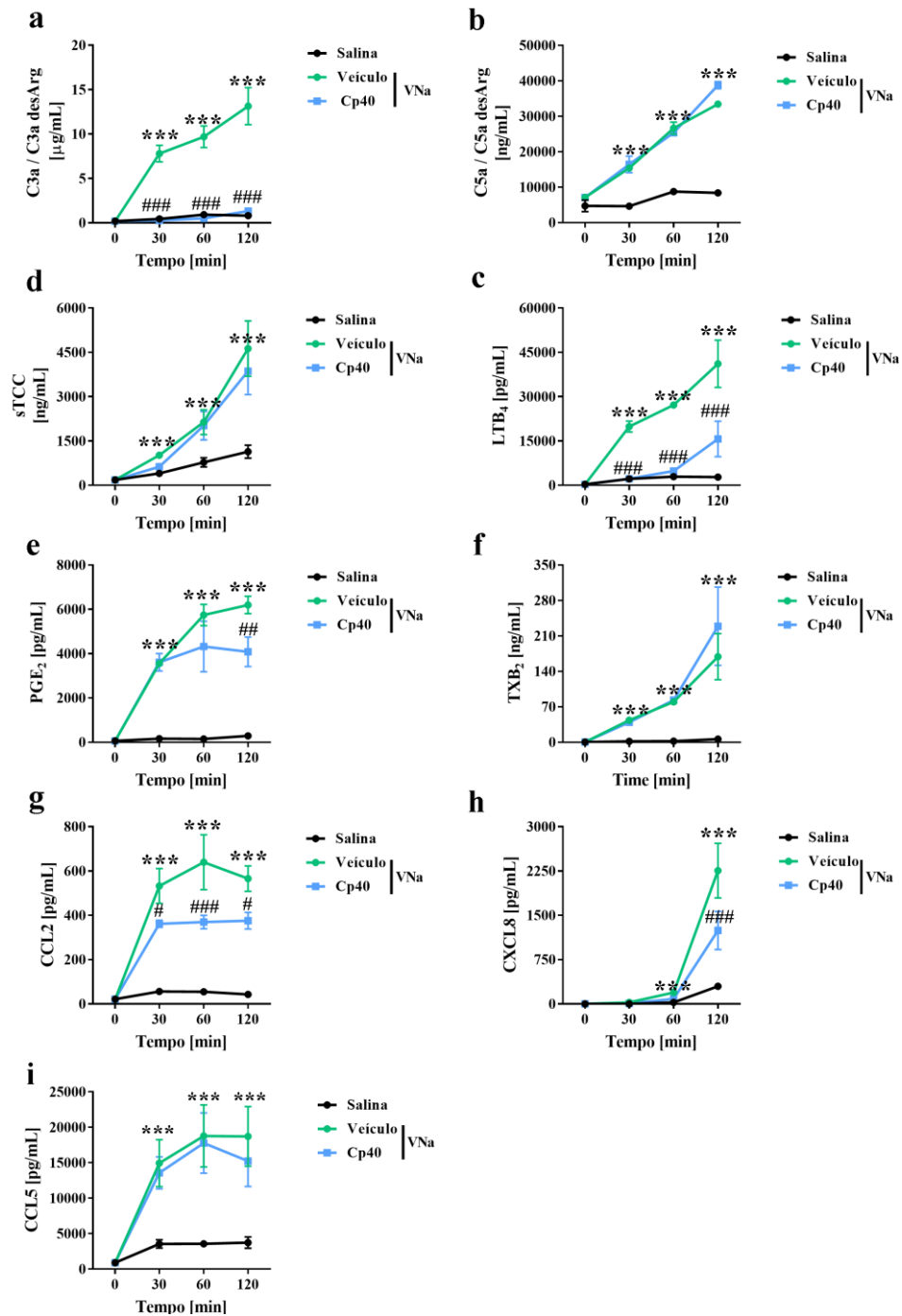


Figura 16 – Influência de C3/C3b na inflamação induzida pelo veneno da serpente *N. annulifera* (VNa) sangue humano. Amostras de sangue humano foram incubadas, à temperatura ambiente, com 20 μM de Cp40 durante cinco minutos e, em seguida, incubadas com VNa durante, 30, 60 e 120 minutos a 37°C sob agitação constante. Na sequência, o plasma foi obtido e marcadores de ativação do complemento [a,b,c], eicosanoides [d,e,f] e quimiocinas [g,h,i] quantificados por ELISA ou CBA. Os resultados foram expressos como μg , ng ou pg/mL . Os dados foram apresentados como média \pm SD e analisados por Two-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + Cp40) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.3.2 Contribuição das SVMPs

Considerando que o veneno de *N. annulifera* pode ativar o complemento por rotas extrínsecas via SVMP e/ou SVSP, podendo ser esse o motivo da falha do Cp40 em controlar a geração de C5a, sTCC e outros mediadores, foi analisado se a inibição de SVMP com 1,10 Phe seria capaz de controlar os eventos inflamatórios no sangue total. Surpreendentemente, a inibição de SVMPs inibiu, em todos os tempos avaliados, a geração das anafilatoxinas C3a (**Fig. 17a**), C5a (**Fig. 17b**), bem como a formação de sTCC (**Fig. 17c**).

Além de contribuir para a ativação do complemento neste modelo, as SVMP demonstraram ser responsáveis pela geração de outros mediadores inflamatórios, uma vez que o uso de 1,10 Phe suprimiu a produção de LTB₄ (**Fig. 17d**), PGE₂ (**Fig. 17e**), TXB₂ (**Fig. 17f**), CXCL8 (**Fig. 17i**) e, em menor extensão, a produção da quimiocina CCL2 (**Fig. 17g**). No entanto, a produção de CCL5 permaneceu inalterada (**Fig. 17h**).

Uma vez que a inibição das SVMPs foi capaz de controlar a geração de anafilatoxinas, sTCC e mediadores inflamatórios “*downstream*” a ativação do complemento, e considerando que a ativação do complemento disparada pelo veneno da *N. annulifera* é mediada por rotas extrínsecas, a sinalização via receptores para anafilatoxinas e suas consequências nos eventos inflamatórios disparados pelo veneno em sangue total foi acessada.

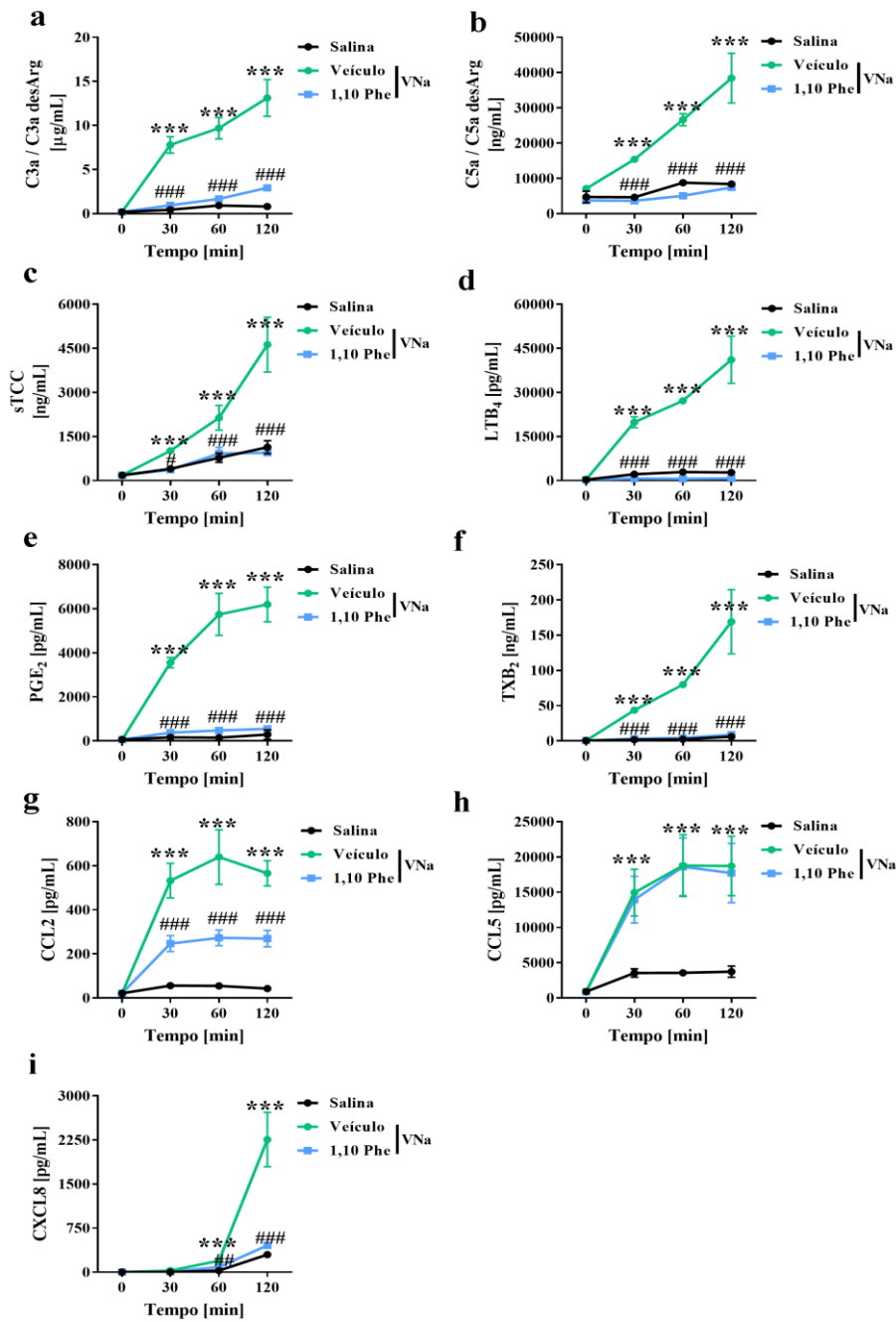


Figura 17 – Contribuição das SVMP na inflamação induzida pelo veneno da *N. annulifera* (VNa) no sangue humano. Amostras de VNa foram incubadas com 20 mM de 1,10 Phe ou veículo (etanol) durante 15 minutos. Na sequência, as misturas foram incubadas com sangue humano durante 30, 60 e 120 minutos a 37°C sob agitação constante, e ao término de cada período de incubação o plasma coletado para quantificação de marcadores de ativação do complemento [a,b,c], eicosanoides [d,e,f] e quimiocinas [g,h,i] quantificados por ELISA e CBA. Os resultados obtidos das mensurações foram apresentados como μg , ng ou pg/mL . Os dados foram expressos como média \pm SD e analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + 1,10 Phe) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.3.3 Influência do C3aR

A sinalização via C3aR foi interrompida com o SB290157, antagonista deste receptor. Foi observado que o bloqueio da sinalização do C3aR potencializava a produção de CCL5 (Fig. 18e), bem como de TXB₂ (Fig. 18c), e em menor extensão de LTB₄ e PGE₂ (Fig. 18a,b). Por outro lado, atenuou a produção das quimiocinas CCL2 (Fig. 18d) e CXCL8 (Fig. 18g).

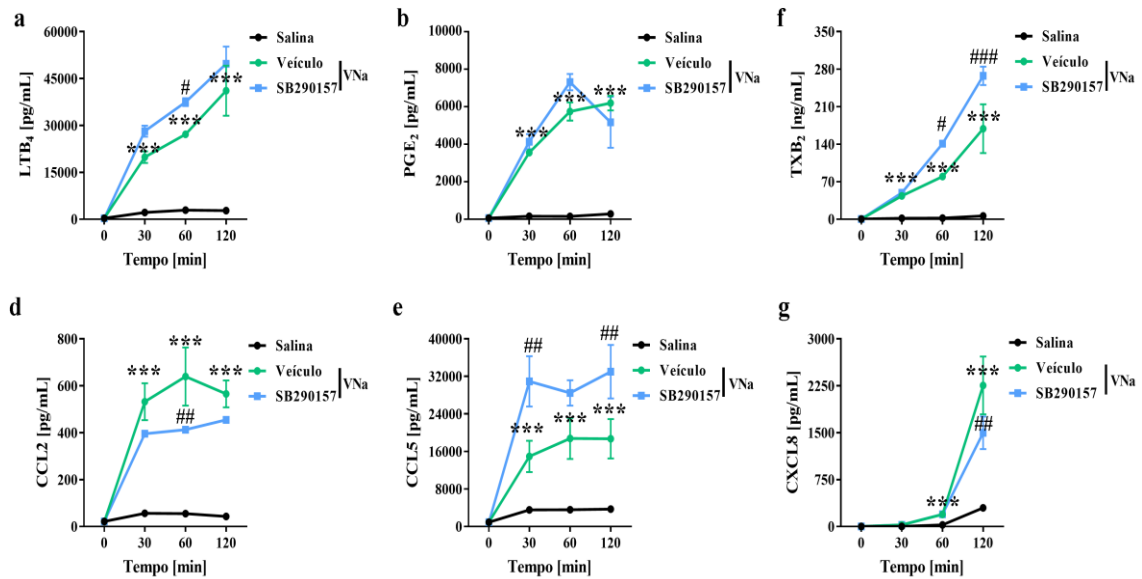


Figura 18 – Contribuição do C3aR na inflamação induzida pelo veneno de *N. annulifera* (VNa) no sangue humano. Amostras de sangue humano foram tratadas com 20 μ M de SB290157 ou veículo (DMSO) durante cinco minutos e, em seguida, expostas ao VNa durante, 30, 60 e 120 minutos a 37°C sob agitação constante. Nestas misturas foram analisadas a produção de mediadores lipídicos [a,b,c] e quimiocinas [d,e,f] por ELISA e CBA. Os resultados foram apresentados como ng ou pg/mL. Os dados obtidos foram expressos como média \pm SD e analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + SB290157) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.3.4 Participação do C5aR1

A participação do C5aR1 na produção de mediadores foi determinada via interrupção da sinalização deste receptor com o antagonista peptídico PMX205. A **Figura 18** mostra que a ativação do eixo C5a-C5aR1 é responsável pela produção de quase todos os mediadores inflamatórios detectados no sangue humano após a exposição ao veneno.

O bloqueio do C5aR1 inibiu drasticamente a produção de LTB₄ (**Fig. 19a**) e CXCL8 (**Fig. 19f**) em todos os períodos de análise. Adicionalmente, a produção de PGE₂ (**Fig. 19b**) e TXB₂ (**Fig. 19c**) foi também dependente do C5aR1, uma vez que o PMX205 reduziu, de maneira expressiva, a produção destes mediadores em 30 e 60 minutos. A produção da quimiocina CCL2 foi influenciada pelo eixo C5a-C5aR1, dado que o tratamento PMX205 reduziu a sua produção em todos os períodos de análise (**Fig. 19d**). No tocante a CCL5, a sua produção se manteve igual à observada nas amostras de sangue tratadas com o veneno + veículo (**Fig. 19e**).

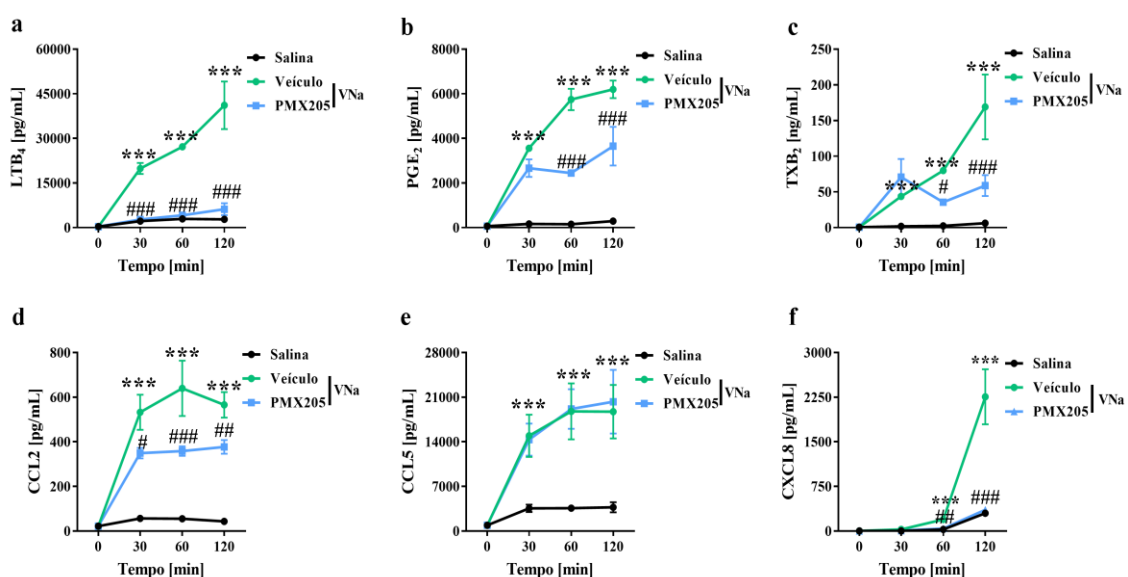


Figura 19 – Influência do C5aR1 na inflamação induzida pelo veneno da serpente *N. annulifera* (VNa) no sangue humano. Amostras de sangue humano foram tratadas com 20 μ M de PMX205 ou veículo (Glicose 5%) durante cinco minutos e, em seguida, expostas ao VNa durante, 30, 60 e 120 minutos a 37°C sob agitação constante. Nestas misturas foram analisadas a liberação de mediadores lipídicos [a,b,c] e quimiocinas [d,e,f]. Os resultados obtidos foram apresentados como média \pm SD e analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + PMX205) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.3.5 Modulação do C5aR2

A modulação do C5aR2 foi alcançada com o peptídeo agonista P32. A ativação deste receptor foi capaz de potencializar significativamente a produção de PGE₂ (Fig. 20b) e CCL5 (Fig. 20e) e, em menor extensão, a produção de LTB₄ (Fig. 20a).

O tratamento com o P32 foi capaz de mitigar a produção de CCL2, 30 e 60 minutos após a exposição do sangue ao veneno (Fig. 20d), no entanto, não teve efeito sobre a produção de TXB₂ (Fig. 20c) e CXCL8 (Fig. 20f).

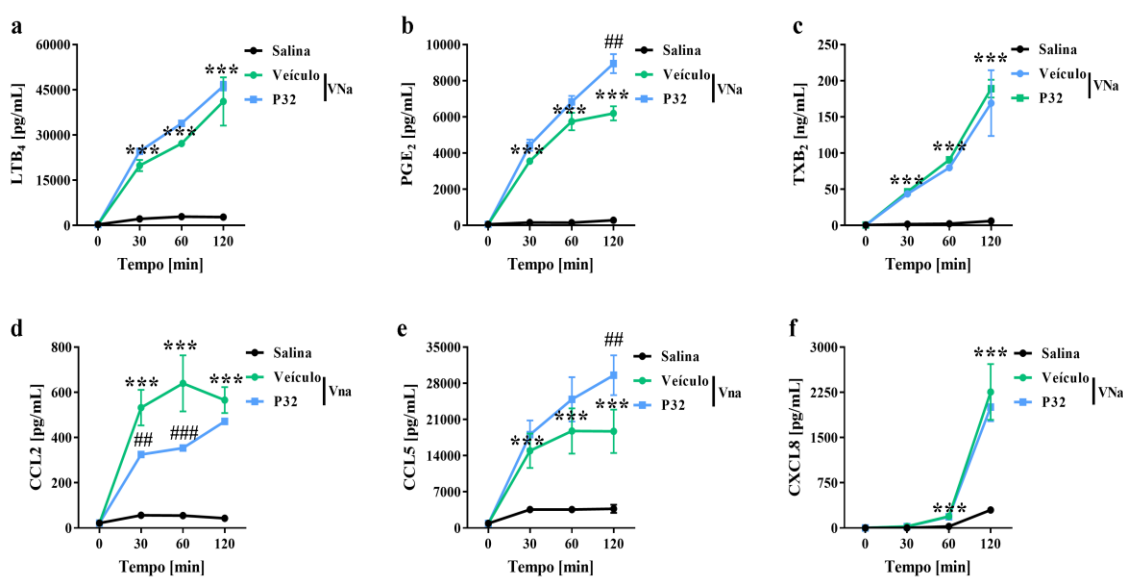


Figura 20 – Modulação da atividade do C5aR2 na inflamação induzida pelo veneno de *N. annulifera* (VNa) no sangue humano. Amostras de sangue humano foram tratadas com 100 μ M de P32 ou veículo (salina apirogênica) durante cinco minutos e, em seguida, expostas ao VNa durante, 30, 60 e 120 minutos a 37°C sob agitação constante. Destas misturas foram analisados os níveis plasmáticos de eicosanoides [a,b,c] e quimiocinas [d,e,f] por ELISA e CBA. Os resultados obtidos foram apresentados como ng ou pg/mL. Os dados gerados foram expressos como média \pm SD e analisados por Two-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + P32) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

Uma vez que as SVMPs se mostraram importantes para os eventos inflamatórios no modelo de sangue total, o que inclui a geração de C5a, e que o bloqueio do C5aR1 foi capaz de interferir em praticamente todos os eventos inflamatórios *in vitro*, tal receptor foi alvo de inibição *in vivo* para determinar a contribuição do eixo C5a-C5aR1 nos eventos inflamatórios provocados pelo veneno de *N. annulifera* em modelo experimental murino de envenenamento moderado e severo.

2.4.4 O veneno de *N. annulifera* induz complementopatia sistêmica em modelos de envenenamento moderado e grave

Por meio de ensaios funcionais, foi possível observar consumo intenso dos fatores da via alternativa, nos camundongos 30 minutos após o envenenamento com 1DL₅₀ por via i.p. (**Fig. 21a**). Uma redução significativa na atividade da via alternativa também foi observada nos animais inoculados com a dose subletal do veneno, porém em menor extensão se comparada aos animais injetados com 1DL₅₀ (**Fig. 21a**).

Detectou-se, também, que as duas doses de veneno utilizadas nos experimentos foram capazes de reduzir a atividade da via das lectinas *in vivo*. (**Fig. 21b**). Além disso, foi verificado que o veneno induziu consumo dos fatores da via clássica *in vivo*, sendo que este foi similar entre os animais inoculados com as doses subletal e letal (**Fig. 21c**).

Adicionalmente, aos diferentes perfis de depleção dos fatores da via alternativa nos animais, detectou-se redução similar e expressiva nos níveis de C5a nestes animais, principalmente nos camundongos injetados com 1DL₅₀ do veneno (**Fig. 21d**).

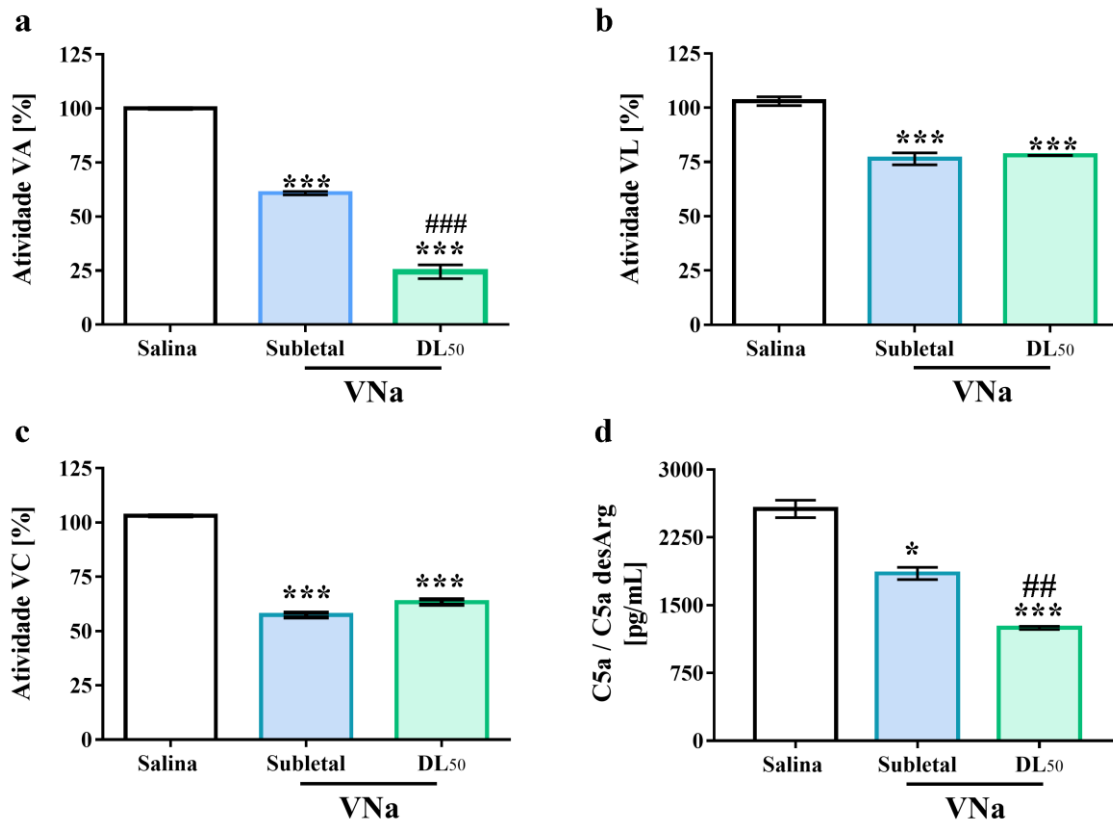


Figura 21 – Ativação do complemento *in vivo* pelo veneno da serpente *N. annulifera* (VNa). Camundongos BALB/c foram inoculados pela via i.p, com o VNa, e eutanasiados 30 minutos após para obtenção de sangue e soro. As atividades das vias alternativa (VA), das lectinas (VL) e clássica (VC) foram determinadas no soro destes animais por ELISA, e os resultados expressos como [%] da atividade da VA [a], VL [b] ou VC [c]. Adicionalmente, a quantificação de C5a nas amostras foi realizada com o Mouse Complement C5a ELISA kit e os níveis de C5a expressos como pg/mL. Os dados foram expressos como média \pm SD e analisados por One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa x salina) e ### (dose subletal x dose letal) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$, $p < 0,001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.5 A ativação do eixo C5a-C5aR1 influencia o desenvolvimento das reações locais

O tratamento de animais com o PMX205 interferiu de maneira significativa em praticamente todos os períodos do edema (**Fig. 22a**), com destaque especial para 20 minutos após a injeção do veneno, momento de pico da reação (**Fig. 22b**). Além disso, detectou-se que o C5a gerado pelo veneno da *N. annulifera* causava a liberação intensa de LTB₄ (**Fig. 22c**), PGE₂ (**Fig. 22d**) e TXB₂ (**Fig. 22e**), no tecido subcutâneo, também 20 minutos após a inoculação do veneno, os quais foram suprimidos pelo PMX205. Adicionalmente, uma hora após a indução do edema, foram detectados altos níveis de Mieloperoxidase (MPO) (**Fig. 22f**) e da quimiocina KC/CXCL1 (**Fig. 22g**) no tecido subcutâneo, indicando intensa infiltração e ativação de neutrófilos, também dependentes do eixo C5a-C5aR1.

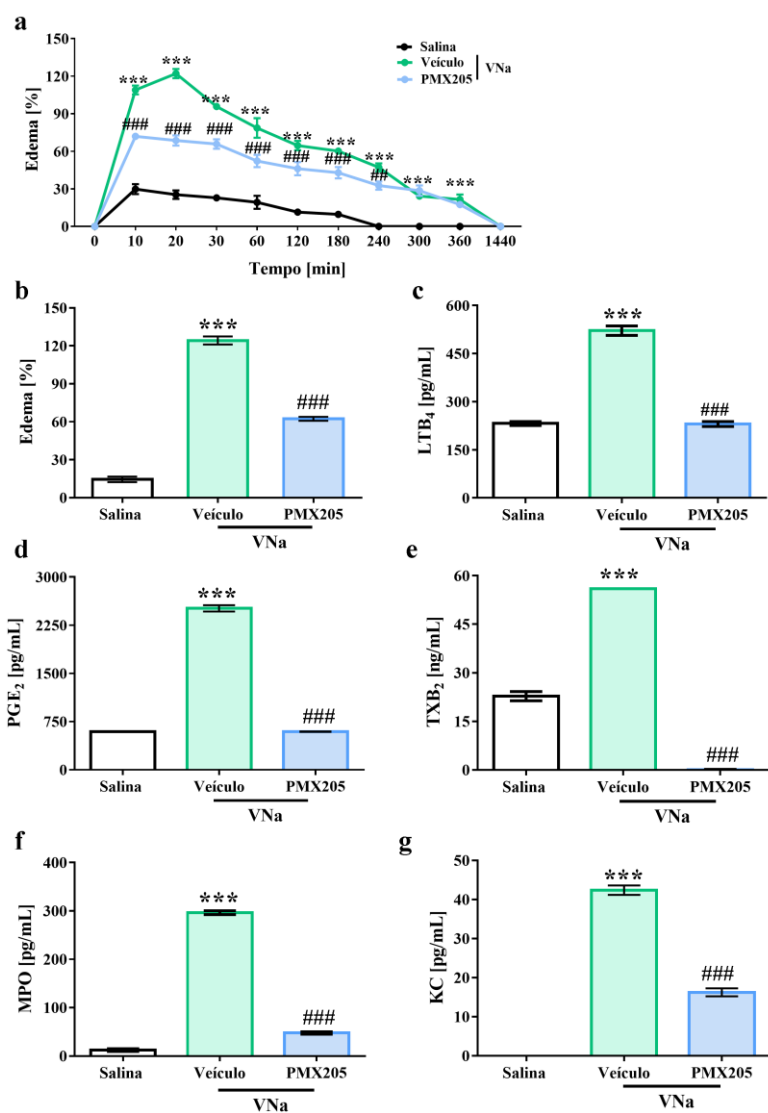


Figura 22 - Participação do eixo C5a – C5aR1 nas reações locais. Grupos de camundongos BALB/c foram tratados, 24 e 1 hora antes da indução do edema, com 1 mg/kg de PMX205 ou veículo pela via subcutânea. O edema foi induzido pela inoculação de 10 µg do veneno da *N. annulifera* (VNa) no coxim plantar da pata posterior esquerda de camundongos e a pata contralateral, direita, foi utilizada como controle, sendo inoculada com salina aprotogênica. O edema foi mensurado durante 24 horas e os resultados expressos como % de edema. Grupos de animais submetidos a tais condições experimentais foram eutanasiados 20, 60 e 120 minutos após a inoculação do VNa para obtenção de tecido subcutâneo e mensuração de mediadores lipídicos, MPO e quimiocinas por ELISA e CBA. Os resultados destas mensurações foram expressos em pg ou ng/mL. Os dados obtidos foram expressos como média ±SD. As cinéticas do edema foram comparadas estatisticamente por Two-Way ANOVA e a quantificação de mediadores nas patas pelo One-Way ANOVA, ambos seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + PMX205) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.6 Reações inflamatórias sistêmicas no envenenamento moderado são dependentes da ativação do eixo C5a-C5aR1

A inoculação da dose subletal do veneno causou redução na porcentagem de linfócitos circulantes e aumento na porcentagem de neutrófilos. Estas reações foram induzidas de maneira dependente do C5aR1, visto que o bloqueio deste receptor protegeu os animais destas alterações (**Fig. 23a**). Demonstrou-se também que a produção de IL-6 e MCP-1 (CCL2) foi totalmente dependente da interação do C5a com seu receptor, no envenenamento experimental moderado, dado que o PMX205 suprimiu a produção de tais mediadores (**Fig. 23c-d**).

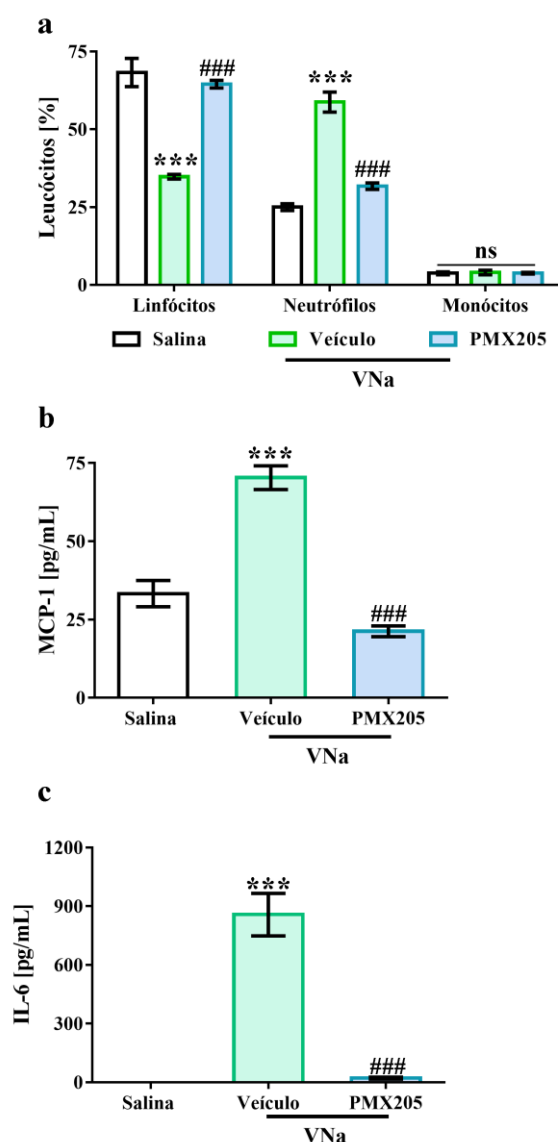


Figura 23 – O eixo C5a-C5aR1 elicitia reações sistêmicas no envenenamento experimental moderado. Grupos de camundongos BALB/c foram tratados, 24 e 1 hora antes da inoculação do veneno de *N. annulifera* (VNa), com 1 mg/kg de PMX205 ou veículo pela via subcutânea. A inflamação sistêmica foi induzida pela inoculação de 56,78 µg do VNa por via intraperitoneal. Uma hora após a inoculação do veneno, os animais foram eutanasiados, o sangue coletado e submetido à extensão sanguínea para análise das alterações leucocitárias. Adicionalmente, os níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios foram determinados utilizando-se o CBA Mouse Inflammation Kit. Os resultados obtidos foram expressos em pg/mL, e apresentados como média ±SD. As alterações leucocitárias foram comparadas estatisticamente com o Two-Way ANOVA e a quantificação de mediadores plasmáticos pelo One-Way ANOVA, ambos seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + PMX205) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.7 A ativação do C5aR1 é responsável por alterações hematológicas e desenvolvimento de Lesão Pulmonar Aguada (LPA) no envenenamento experimental grave

Assim como a dose subletal, a inoculação de 1DL₅₀ do veneno em camundongos causou aumento na porcentagem de neutrófilos circulantes, bem como redução nas porcentagens de linfócitos. No entanto, diferente do modelo de envenenamento moderado, tal dose induziu aumento nos números de leucócitos totais e aumento na porcentagem de monócitos circulantes, sendo estas alterações hematológicas influenciadas pelo C5aR1 (Fig. 24a-d).

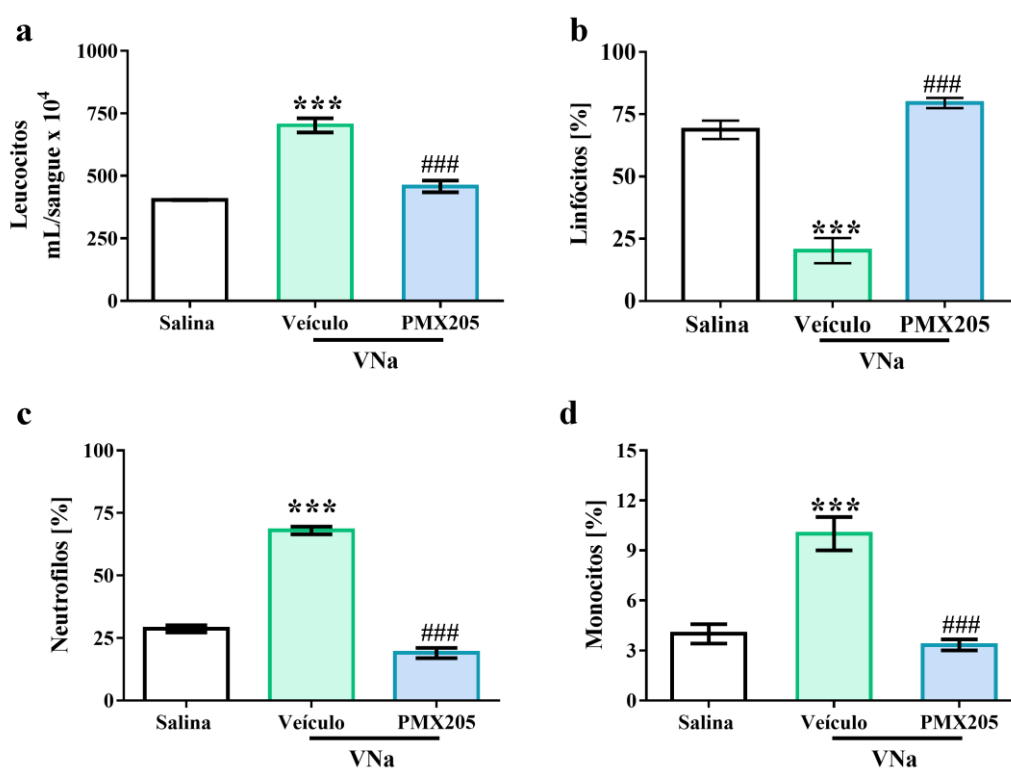


Figura 24 – As alterações hematológicas no envenenamento experimental grave são induzidas pela sinalização via C5a-C5aR1. Grupos de camundongos BALB/ c foram tratados, 24 e 1 hora antes da inoculação do veneno de *N. annulifera* (VNa), com 2 mg/kg de PMX205 ou veículo por via subcutânea. A inflamação sistêmica foi induzida pela inoculação de 94,14 µg do VNa por via intraperitoneal. Cinco horas após a inoculação do veneno ou seguido a morte, o sangue dos animais foi coletado e submetido à extensão sanguínea para análise das alterações leucocitárias. Os resultados foram expressos como média ±SD. As alterações leucocitárias foram comparadas estatisticamente com One-Way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + PMX205) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

Entre as alterações teciduais promovidas pela injeção de 1DL₅₀ do veneno, observou-se a LPA/DAD, a qual foi caracterizada por intenso colapso alveolar, espessamento e inflamação septal moderada. Estas mudanças teciduais foram totalmente mediadas pelo eixo C5a-C5aR1, uma vez que o PMX205 aboliu todas estas alterações (Fig. 25a-d).

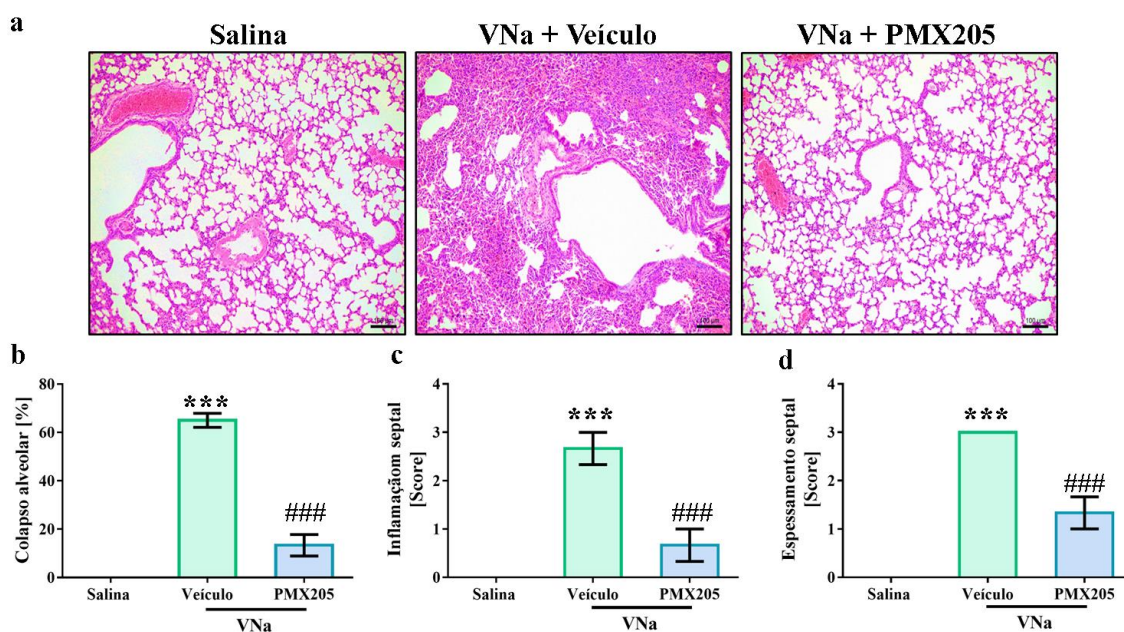


Figura 25 – A LPA causada pelo envenenamento letal por *N. annulifera* (VNa) é dependente do eixo C5a-C5aR1. Grupos de camundongos BALB/ c foram tratados, 24 e 1 hora antes da inoculação do veneno de *N. annulifera*, com 2 mg/kg de PMX205 ou veículo pela via subcutânea. A inflamação sistêmica foi induzida pela inoculação de 94,14 µg do VNa por via intraperitoneal. Cinco horas após a inoculação do veneno ou seguido à morte, os pulmões foram coletados, fixados e submetidos à técnica histológica de rotina. As amostras foram analisadas para a detecção de alterações inflamatórias pulmonares e os resultados expressos como [%] de colapso alveolar e score, sendo 1- alterações leves; 2- alterações moderadas; 3- alterações graves. Os resultados foram expressos como média ±SD. O score de cada condição experimental foi comparado estatisticamente com One-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + PMX205) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.4.8 A interrupção da sinalização via C5aR1 não protege os animais da produção sistêmica de mediadores inflamatórios e da letalidade associada ao envenenamento grave

Os animais envenenados com 1DL₅₀ e tratados com o PMX205 apresentaram aumento nos níveis sistêmicos de IL-10, no entanto, tiveram a produção de IL-6, CCL2 e TNF- α potencializadas (**Fig. 26a-d**). Adicionalmente, detectou-se que os animais envenenados e tratados com doses crescentes do PMX205 (1, 2, 5 e 10 mg/kg) não foram protegidos da morte frente a inibição do eixo C5a-C5aR1(dados não mostrados).

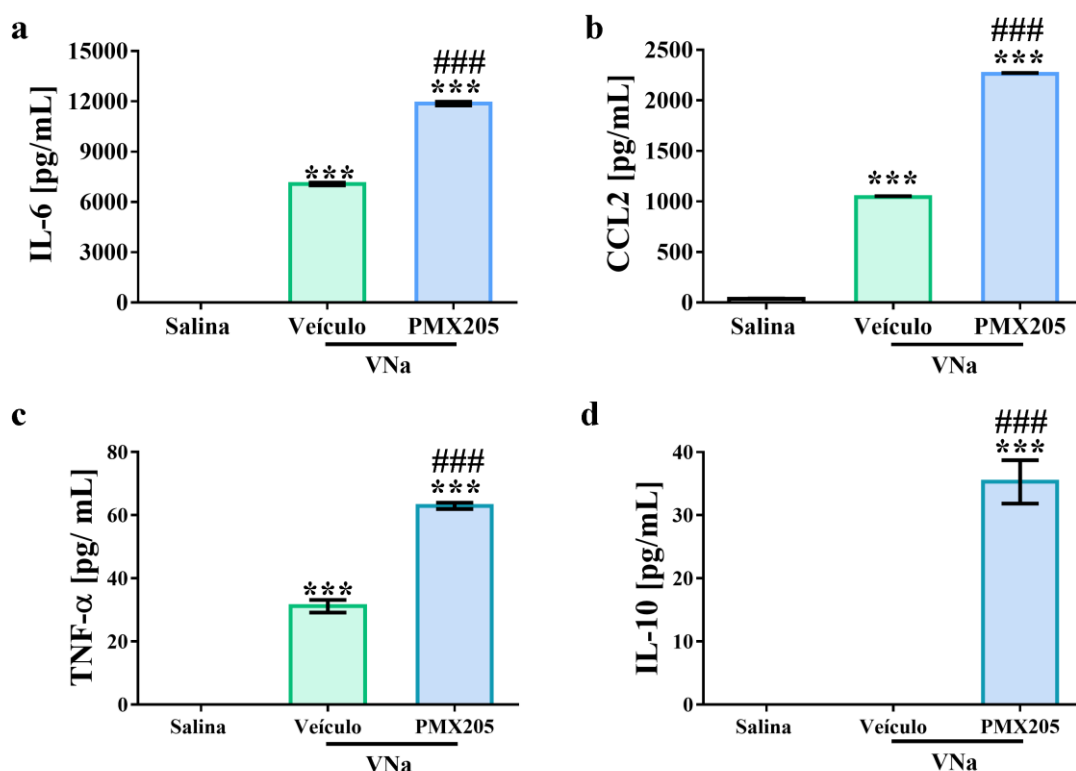


Figura 26 – O bloqueio do C5aR1 aumenta a produção de mediadores inflamatórios no envenenamento grave. Grupos de camundongos BALB/ c foram tratados, 24 e 1 hora antes da inoculação do veneno de *N. annulifera* (VNa), com 2 mg/kg de PMX205 ou veículo por via subcutânea. A inflamação sistêmica foi induzida pela inoculação de 94,14 μ g do VNa por via intraperitoneal. Cinco horas após a inoculação do veneno ou seguido à morte, o sangue dos animais foi coletado, o plasma obtido e submetido à quantificação de mediadores inflamatórios com o CBA Mouse Inflammation Kit. Os níveis de interleucinas foram expressos como pg/mL. Os resultados foram expressos como média \pm SD. As alterações na produção dos mediadores inflamatórios foram comparadas estatisticamente com One-Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** (VNa + veículo x salina) e ### (VNa + veículo x VNa + PMX205) representam as diferenças estatísticas $p < 0,0001$. Dados representativos de três experimentos.

2.5 DISCUSSÃO

A ativação do complemento por venenos de serpentes tem sido relatada na literatura (DELAFONTAINE et al., 2018; FARSKY et al., 2000; MONZAVI et al., 2019; PIDDE-QUEIROZ et al., 2010; TAMBOURGI et al., 1994; STONE et al., 2013; TANAKA et al., 2012; WARREL et al., 1976); no entanto, o real impacto desta ativação permanece pouco esclarecido. No presente estudo, acoplando diversas estratégias experimentais *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* detectou-se que o veneno da *N. annulifera* dispara a ativação do complemento, principalmente por rotas extrínsecas, apresentando como resultado a geração das anafilatoxinas, com destaque para C5a. A ligação desta anafilatoxina ao seu receptor, o C5aR1, foi capaz de elicitar reações hiperinflamatórias, hiperagudas, caracterizadas pela liberação intensa de mediadores lipídicos, interleucinas e quimiocinas, formação de edema e indução de LPA.

Foram identificados no veneno da *N. annulifera* componentes contendo resíduos de Manose e N-acetilglicosamina, bem como a proteína CVF os quais são potentes ativadores das rotas intrínsecas do complemento. Empregando diferentes ensaios funcionais, tendo soro humano normal como fonte de complemento, foi detectado que os componentes do veneno provocam, *in vitro*, redução significativa da atividade do sistema, principalmente da via alternativa.

As complementopatias são caracterizadas por ativação e consumo rápido de componentes do complemento (LI et al., 2018) sugerindo, assim, que o veneno da *N. annulifera* causa ativação do complemento. No entanto, considerando que em algumas secreções animais, incluindo venenos, tem sido relatado a presença de inibidores do complemento (TAMBOURGI & van-den-BERG, 2014), produtos referentes a ativação foram quantificados. A redução na atividade das rotas intrínsecas disparada pelo veneno foi devida à ativação do complemento humano, uma vez que foram detectados níveis elevados das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a. Adicionalmente, observou-se níveis aumentados de sTCC, fator que reforça a ideia de que o veneno dispara a ativação do complemento e que esta ativação alcança a via final.

Interessantemente, as complementopatias são uma característica importante em uma série de doenças inflamatórias e estão correlacionadas com a gravidade e desfecho das mesmas (BREEN et al., 2012; BURK et al., 2012; LENDAK et al., 2018; LI et al., 2019; REN et al., 2012).

Indivíduos com sepse ou que sofreram politraumatismo, e evoluíram para o óbito, apresentaram complementopatias caracterizadas pela depleção nos níveis de C3 e C4 (BURK et al., 2012; LENDAK et al., 2018; REN et al., 2012). Além disso, no tocante a sepse, as complementopatias apresentaram correlação positiva com elevação nos níveis de Dímero-D, indicando que a depleção de fatores do complemento, de alguma forma, se correlaciona com os distúrbios hemostáticos presentes na sepse (REN et al., 2012). Quanto ao politraumatismo, foi demonstrado que a complementopatia dos pacientes era caracterizada por ativação robusta, já que níveis significantes de marcadores de ativação foram detectados nestes pacientes. Além disso, este estudo detectou que os indivíduos que evoluíram para o óbito apresentavam níveis maiores de C3a, C5a e sTCC, bem como inflamação sistêmica exacerbada quando comparados aos sobreviventes (BURK et al., 2012). Adicionalmente, a elevação nos níveis, por exemplo, de C5a sérico apresenta correlação positiva com o aumento nos níveis de marcadores relacionados à lesão celular, tal como nucleossomos (KANSE et al., 2012), e marcadores relacionados a distúrbios de hemostasia, como o complexo trombina-antitrombina (TAT) (AMARA et al., 2010). Desta forma, postulamos que indivíduos envenenados pela *N. annulifera* apresentam complementopatia devido à robusta ativação do complemento, e que estes eventos podem influenciar vários aspectos fisiopatológicos do envenenamento e ditar a gravidade e o desfecho do mesmo.

Além das proteínas contendo resíduos de Manose e N-acetilglicosamina, e do CVF detectados no veneno da *N. annulifera*, foram identificadas, por ensaios funcionais, SVMP e SVSP com propriedades fibrinogenolíticas. Considerando a diversidade de substratos destas classes enzimáticas (FERRAZ et al., 2019), testou-se a ação direta do veneno sobre componentes solúveis e associados à membrana do sistema complemento humano.

O veneno da *N. annulifera* apresentou SVMP e SVSP capazes de clivar diretamente os componentes C3, C4 e C5 humanos purificados de maneira funcional, uma vez que estas enzimas promoveram a geração das anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, sendo a geração de anafilatoxinas dependente principalmente da ação direta de SVMPs. Assim, estes resultados apontam que a ativação do complemento humano pelo veneno da *N. annulifera* ocorre também por rotas extrínsecas, mediadas principalmente por SVMPs. Isto pode contribuir para as alterações na atividade do complemento detectadas nas amostras de SHN, expostas ao veneno, bem como para ativação de vias de sinalização inflamatórias já que a clivagem direta de C3 e C5 por proteases de

veneno ofídico leva a geração de C3a e C5a funcionais capazes de disparar sinalização por cálcio em neutrófilos humanos (DELAFONTAINE et al., 2018) e aumentar a expressão na superfície celular de CD11b, C3aR e C5aR1 em monócitos e granulócitos humanos (LUCHINI et al., 2019).

Geralmente, as complementopatias são acompanhadas de aumento sistêmico nos níveis de mediadores inflamatórios (FLIERL et al., 2008; KESHARI et al., 2017; MODI et al., 2014; MONZAVI et al., 2019). Porém, a influência do consumo e ativação de componentes do complemento em envenenamentos por serpentes peçonhentas não é conhecida, e considerando que o veneno da *N. annulifera* tem ação sobre o complemento humano *in vitro*, as possíveis consequências desta ativação foram investigadas. Para tanto, o modelo *ex vivo* de sangue total humano foi utilizado, uma vez que neste, elementos celulares e humorais do sangue são preservados. Tal modelo, portanto, permite simular um ambiente fisiológico, possibilitando a observação das múltiplas interações entre células e moléculas sanguíneas com as toxinas de venenos (LUCHINI et al., 2019), bem como com outros agentes inflamatórios (MOLLNES et al., 2002; THOMAS et al., 2019).

A exposição do sangue total humano a doses crescentes do veneno da serpente *N. annulifera*, ao longo do tempo, promoveu diferentes cenários, todos com uma característica em comum, ambientes altamente inflamatórios. O veneno nas condições experimentais empregadas causou ativação do complemento, a qual foi acompanhada de elevação nos níveis plasmáticos de eicosanoides e quimiocinas, eventos que reforçam a ideia de que o veneno causa reações inflamatórias sistêmicas em humanos, assim como detectado neste estudo em camundongos, fatores que podem predispor os indivíduos envenenados a uma série de alterações deletérias (BOSSMAN et al., 2013; CÓLON et al., 2019; KAMBAS et al., 2008; KESHARI et al., 2017; RUSSKAMP et al., 2015; SALTER et al., 2018; van-der-POLL et al., 2017).

Interessantemente, neste modelo não foi observada geração significativa da anafilatoxina C4a (dados não mostrados), fato que sugere que em condições experimentais que mimetizem cenários fisiológicos, a ativação das vias clássica e das lectinas não aconteça na mesma proporção do observado nos ensaios hemolíticos e de deposição de C4b *in vitro*. Além do que, a ativação destas vias pode ser sutil a ponto de servir apenas como evento iniciador da ativação do complemento no sangue total humano (LACHMANN, 2009), enquanto a amplificação ficaria na dependência da via

alternativa, visto que, por exemplo, a exposição do SHN ao veneno reduziu de maneira drástica a atividade hemolítica desta via.

A não geração de níveis significativos de C4a, nas amostras de sangue expostas ao veneno, sugere também que a clivagem do C4 humano purificado, por SVMs e SVSPs, pode ser inespecífica. Tais enzimas poderiam agir de maneira promíscua, uma vez que a molécula de C4 apresenta homologia estrutural com os componentes C3 e C5 (PERKINS et al., 1990) e a geração de C4a, por clivagem direta, ser de baixa intensidade quando comparada à de C3a e C5a. Adicionalmente, no sangue existem várias células expressando PAR-1 e PAR-4 (MAZHARIAN et al., 2007; ARACHICHE et al., 2013; SCHOERGENHOFER et al., 2018), os quais são os receptores do C4a (WANG et al., 2017); desta forma é factível que a baixa quantidade de C4a gerada é rapidamente consumida pelas células sanguíneas, e talvez estimule alguma resposta biológica nas mesmas.

Nas amostras de sangue expostas ao veneno detectou-se níveis elevados das anafilatoxinas C3a e C5a, bem como a formação de sTCC, caracterizando um cenário capaz de provocar distúrbios potencialmente lesivos e, até mesmo, letais (KESHARI et al., 2017).

Considerando o perfil de ativação do complemento nas amostras de sangue incubadas com o veneno, é sugestivo que os níveis aumentados de C3a e C5a sejam oriundos da atividade da via alternativa, bem como das rotas extrínsecas mediadas pela ação de proteases que compõe o veneno e, até mesmo, por enzimas da cascata de coagulação ativadas (AMARA et al., 2010; KANSE et al., 2012), ou secretadas por leucócitos ativados (HUBER-LANG et al., 2002; VOGT et al., 1996; 2000; YOSHIMURA et al., 2003) na presença do veneno. Embora, tais evidências existam, a quantificação de moléculas relacionadas com a ativação da via alternativa deve ser realizada. Entre os eventos moleculares da ativação desta via tem-se a clivagem da proenzima FB pelo FD, culminando na geração do fragmento Bb (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; LACHMANN, 2009; HARRISSON, 2018). Assim, acessar a geração deste fragmento nas amostras de sangue tratadas com o veneno da *N. annulifera*, bem como em pacientes envenenados, seria de grande valia, uma vez que níveis aumentados deste fragmento apresentam correlação positiva com desenvolvimento de LPA, falência renal aguda e morte de pacientes que sofreram politraumatismo (GANTER et al., 2007).

Todas as doses de veneno testadas no modelo do sangue total foram capazes de induzir geração significativa de C3a, o que sugere que esta anafilatoxina seja importante para influenciar vários eventos envolvidos no envenenamento pela *N. annulifera*, devido a sua capacidade imunomodulatória (ASGARI et al., 2013; FISCHER et al., 1999; MORGAN, 1987; TAKABAYASHI et al., 1996; WU et al., 2013).

Ativando o C3aR em mastócitos, o C3a provoca degranulação com liberação de altos níveis de histamina, causando disfunções microcirculatórias, como aumento da permeabilidade vascular, promovendo escape de fluidos (LOHMAN et al., 2017). Adicionalmente, via COX-1 e -2, a ativação do C3aR causa aumento na produção de PGE₂ (MORGAN, 1987; PÜSCHEL et al., 1993) promovendo vasodilatação. Desta forma, a ação conjunta destes mediadores pode ser em parte responsável pelo edema no envenenamento pela *N. annulifera*. Ainda, via indução da liberação de altos níveis de TXA₂, o C3a causa vasoconstrição sistêmica, promovendo hipertensão (KERKOVITS et al., 2019), que um é fator de risco para infarto agudo do miocárdio (PICARIELLO et al., 2011), podendo ser esta a causa de lesão cardíaca observada em cães envenenados pela *N. annulifera* (LANGHORN et al., 2013).

Por meio da ativação plaquetária, a sinalização via C3a-C3aR elicitava reações pró-trombóticas, caracterizadas por mobilização de cálcio, degranulação plaquetária, aumento da expressão da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ e, conseqüente, ligação ao fibrinogênio (SALTER et al., 2018), e NETose (GUGLIETA et al., 2016). Esses eventos têm sido associados ao desenvolvimento e gravidade de casos de acidente vascular cerebral, bem como do infarto agudo do miocárdio (LIBERALE et al., 2019; SALTER et al., 2018), podendo assim os danos cardíacos detectados em cães envenenados pela *N. annulifera* ser um evento mediado tanto por ação direta de toxinas do veneno sobre as células cardíacas, como por mediadores e eventos tromboinflamatórios estimulados pela ação do veneno. Ademais, níveis aumentados de C3a e outros fragmentos de C3 têm sido detectados em pacientes com diferentes condições clínicas que necessitaram de terapia intensiva, sendo estas moléculas preditivas de mal prognóstico, já que tais pacientes evoluíram para falência múltipla de órgãos (KARASU et al., 2019).

Elevação nos níveis da anafilatoxina C5a também foi detectada frente à ação do veneno no sangue humano, em todas as doses e tempos testados. O C5a promove uma série de eventos inflamatórios, que geralmente são exacerbados e estão

associados a uma série de condições patológicas (BOSMANN et al., 2013; KAMBAS et al., 2008; KESHARI et al., 2017; RIEDEMAN et al., 2002; RUSSKAMP et al., 2015), e que podem ser chave no envenenamento pela *N. annulifera*.

A geração excessiva de C5a está associada a perturbações intensas na microcirculação, principalmente na função de barreira do endotélio, bem como na perfusão de tecidos (KARASU et al., 2019; SCHURAUFSATER et al., 2002). Disparando a sinalização do C5aR1, o C5a causa ativação de diferentes tipos celulares, fato que leva à produção de LTB₄, que junto com outros mediadores lipídicos, vão promover aumento intenso da permeabilidade vascular, e vasodilatação sistêmica, causando um escape de fluidos exacerbado para tecidos inflamados ou não, culminando em edema em múltiplos sítios, tendo como resultado final choque hipovolêmico, o qual pode ser também uma das causas de morte no envenenamento pela *N. annulifera* (COLOM et al., 2015; DI GENNARO et al., 2009; KARASU et al., 2019; LEE et al., 2018; MARLEAU et al., 1999; SADIK et al., 2012; van-den-BERG et al., 2014). Além disso, também via geração de leucotrienos e TXA₂, por neutrófilos, o C5a tem se mostrado capaz de provocar lesão renal aguda direta ou indiretamente em indivíduos com choque hemorrágico, uma vez que causa redução no fluxo sanguíneo e filtração glomerular (GULBINS et al., 1993). Embora não tenhamos detectado presença de alterações histopatológicas renais nos animais envenenados com as doses letal e subletal, avaliar a presença de alterações bioquímicas sistêmicas referentes a mudanças na função renal esclarecerá se este tipo de alteração contribui ou não para o envenenamento.

As ações do C5a são capazes de comprometer a homeostase de todo o sistema circulatório, dado que além de causar disfunções endoteliais relacionadas à permeabilidade, a ativação do receptor para esta anafilatoxina causa redução drástica na expressão gênica e proteica de várias moléculas protetoras das células endoteliais, monócitos e neutrófilos, bem como moléculas anticoagulantes e/ou antitrombóticas. Em contrapartida, potencializa a expressão de moléculas pró-coagulantes como o fator tecidual, deixando o sistema circulatório, bem como outros tecidos, predispostos ao desenvolvimento de distúrbios hemostáticos, caracterizados por coagulopatias de consumo, bem como a formação de trombos (KAMBAS et al., 2008; KESHARI et al., 2017; SKJEFLO et al., 2017; THOMAS et al., 2019). Tais eventos podem estar envolvidos nas coagulopatias detectadas nos cães envenenados pela *N. annulifera* (LANGHORN et al., 2013) e, talvez em humanos envenenados, já que o veneno

causou distúrbios de hemostasia no plasma humano *in vitro*. No entanto, o sistema experimental utilizado foi composto apenas por plasma sem células, sendo interessantes investigações que usem sistemas que mimetizem cenários fisiológicos, como o modelo de sangue total humano.

O C5a pode causar alterações bioquímicas sistêmicas, via lesão tecidual (KARASU et al., 2019; KESHARI et al., 2017), ou até mesmo por meio de ativação celular e potencialização de rotas metabólicas. A ativação do C5aR1, em neutrófilos humanos de indivíduos com choque hemorrágico, leva ao aumento do consumo de glicose por estas células, o que culmina na ativação da via glicolítica, promovendo a secreção de prótons e lactato por estas células, eventos que culminam em acidose metabólica. A acidose metabólica pode ser um fator de risco no envenenamento, já que se muito intensa pode causar depressão do sistema nervoso central, que pode progredir para estado de coma, bem como causar problemas cardiovasculares levando a hipoperfusão o que teria como desfecho a morte do indivíduo envenenado (DENK et al., 2017; KARASU et al., 2019).

Altos níveis de sTCC foram detectados, de maneira dose e tempo dependente, nas amostras de sangue que entraram em contato com o veneno da serpente *N. annulifera*, suportando a hipótese que o veneno independente do sistema experimental empregado causa ativação do complemento humano até as etapas finais.

A formação de sTCC é mais um fator que reforça a ação inflamatória do veneno da *N. annulifera* em humanos acidentados. Adicionalmente, assim como para as anafilatoxinas, incrementos nos níveis teciduais e circulantes de sTCC influenciam vários aspectos inflamatórios nos mais variados contextos patológicos (KESHARI et al., 2017; MICHAILIDOU et al., 2018).

A geração sistêmica de sTCC em camundongos leva a ativação do inflamassoma NLRP3, em macrófagos e células dendríticas (LAUDISI et al., 2013) e em células gliais, causando inflamação sistêmica e no sistema nervoso central (MICHAILIDOU et al., 2018). Além disso, considerando que o sTCC promove produção de IL-1 β via NLRP3, e que o eixo NLRP3-IL-1 β é responsável pela regulação da produção de LTB₄ e PGE₂ no edema pulmonar letal no envenenamento escorpiônico (ZOCCAL et al., 2016; 2018; 2019), é possível considerar que o sTCC, via indução de eicosanoides e outras moléculas que rompam a homeostase endotelial, causem disfunções cardiovasculares nos indivíduos envenenados pela *N. annulifera*. Em acordo com isso, foi apresentado que o sTCC, via indução da geração de PAF,

Bradicinina (BOSSI et al., 2014) e PGE₂ (MORGAN, 2016) causa vasodilatação sistêmica e perda da função de barreira do endotélio, culminando em escape vascular e formação de edema. Este mecanismo pode estar ocorrendo no envenenamento pela *N. annulifera*, uma vez que tal veneno causa edema mediado por PAF e prostanóides.

Interessantemente, a formação de sTCC é mais uma característica inflamatória do veneno da *N. annulifera*, que aponta para possíveis reações tromboinflamatórias no envenenamento, posto que a ação deste complexo, sobre plaquetas e monócitos humanos, causa a liberação de micropartículas expressando fator tecidual, que são potenciais plataformas para a formação de trombos (ERICKSON et al., 2019; ØVSTEBØ et al., 2014). Além do que, níveis plasmáticos de sTCC aumentados estão associados com a predisposição ao desenvolvimento de tromboembolismo venoso (HØILAND et al., 2019), bem como a danos no sistema nervoso central (MICHAILEDIOU et al., 2018).

Desta forma, postulamos que o perfil de ativação do complemento em modelo de sangue total humano, disparado pelo veneno da serpente *N. annulifera*, remete a um quadro de inflamação sistêmica tal qual ao observado na sepse (KESHARI et al., 2017), e que via indução de diferentes classes de mediadores inflamatórios, a ativação do complemento nos pacientes envenenados pode levar a um espectro amplo de condições clínicas, o que inclui desenvolvimento de LPA/SDRA, disfunções endoteliais e circulatórias, bem como ser fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios relacionados à hemostasia e morte.

A ativação de PRRs solúveis ou ligados à membrana por DAMPs, MAMPs e VAMPs, bem como os receptores para anafilatoxinas, dispara a produção de mediadores inflamatórios (MEDZHITOV, 2008;2010; REIS et al., 2019; ZOCCAL et al., 2014) de diferentes classes, entre estes, os eicosanóides, incluindo leucotrienos e prostanóides (THOMAS et al., 2019; ZOCCAL et al., 2014; 2016).

A exposição do sangue humano ao veneno da serpente *N. annulifera* foi capaz, via PRRs e/ou receptores para anafilatoxinas (THOMAS et al., 2019; ZOCCAL et al., 2014; 2016), de provocar ativação da enzima 5-LOX, fator que culminou na produção de LTB₄. Curiosamente, nas amostras de sangue humano que entraram em contato com doses baixas do veneno observou-se produção de quantidades elevadas deste mediador, enquanto doses altas do veneno induziram quantidades menores de LTB₄, sugerindo a existência de algum componente do veneno que quando em

quantidades aumentadas suprime a produção de LTB₄. Interessantemente, doses maiores do veneno induziram aumento expressivo na produção de PGE₂.

Tem sido postulado que a PGE₂ apresenta efeitos supressores na produção de LTB₄ e, via aumento nos níveis intracelulares de cAMP, potencializa a ativação do inflamassoma NLRP3 e a liberação de IL-1 β , como observado no envenenamento pelo escorpião *T. serrulatus*, sendo tais eventos moleculares cruciais para o edema pulmonar e letalidade associada a tal envenenamento (ZOCCAL et al., 2016; 2018; 2019). A exposição de macrófagos humanos aos venenos das serpentes *B. jararaca* e *B. jararacuçu* na presença PGE₂ também potencializou a produção de IL-1 β e suprimiu e de MIP-1 α (do inglês: *Macrophage Inflammatory 1-alpha*) (ZOCCAL et al., 2018b). Sendo assim, é possível que tais eventos moleculares também governem aspectos imunopatológicos do envenenamento pela *N. annulifera*.

O LTB₄ exerce sua atividade biológica via dois receptores acoplados à proteína G: BLT₁, que apresenta alta afinidade por tal mediador, e o BLT₂, receptor de baixa afinidade (YOKOMIZO, 2015). A expressão do BLT₁ ocorre em vários tipos celulares e a sua ativação em células endoteliais leva ao aumento da permeabilidade vascular, potencializado também pela ativação deste receptor em neutrófilos, o que leva a secreção de Elastase, a qual via degradação de moléculas juncionais, entre as células endoteliais, altera a função de barreira destas células causando edema e infiltração de neutrófilos (COLOM et al., 2015; DI GENARO et al., 2009; LEE et al., 2018; MARLEAU et al., 1999; SADIK et al., 2012; van den BERG et al., 2014). Interessantemente, a injeção do veneno da *N. annulifera* no tecido subcutâneo de camundongos causou edema intenso, inibido em todos os períodos pelo uso de MK-886, inibidor da FLAP, enzima importante para ativação da 5-LOX (MANCINI et al., 1992), demonstrando que nossos dados *ex vivo*, com sangue humano, estão em acordo com os achados em camundongos. Assim, postulamos que no envenenamento humano pela *N. annulifera*, o LTB₄ contribui para perturbações endoteliais, em nível local e até mesmo sistêmico, que podem promover múltiplos edemas e choque.

Produtos oriundos da ativação do complemento (BULT et al., 1985), bem como leucotrienos gerados pela atividade da 5-LOX (MEHTA et al., 1986), são capazes de induzir a geração de prostanóides, que juntamente com o LTB₄, podem contribuir para as alterações vasculares locais e sistêmicas causadas pelo veneno.

Surpreendentemente, a ação do veneno sobre as células do sangue humano levou a geração de produtos oriundos da atividade das enzimas COX-1 e -2 e, entre tais

produtos, detectou-se aumento na produção de PGE₂, bem como elevação intensa nos níveis de TXA₂.

Todas as doses de veneno foram capazes de promover elevação nos níveis de PGE₂. A elevação nos níveis desta prostaglandina ocorreu de maneira tempo dependente, fato que sugere que a primeira onda de PGE₂, detectada nas amostras de sangue, é decorrente da atividade da enzima COX-1, expressa constitutivamente em vários tipos celulares, enquanto a potencialização na produção desta prostaglandina, detectada em períodos mais tardios, se dá por ação da COX-2, enzima induzida por estímulos inflamatórios (RUCKER & DHAMOON, 2020).

A PGE₂ age em quatro diferentes receptores acoplados à proteína G, EP1-4, que são expressos em vários tipos celulares, incluindo leucócitos e células endoteliais (FRIEDMAN et al., 2015; JANG et al., 2020), e agindo com o LTB₄, esta prostaglandina pode contribuir para as perturbações vasculares detectadas no envenenamento, dado que ela causa vasodilatação sistêmica, provocando edema, hipotensão e choque (AUDOLY et al. 1999; HRISTOVSKA et al. 2007; ZHANG et al. 2000). Adicionalmente, a PGE₂ baixa o limiar de excitação de neurônios sensoriais, tornando-os mais sensíveis a vários estímulos potencialmente algésicos, tais como mediadores inflamatórios (JANG et al., 2020), sendo este um possível mecanismo envolvido na dor apresentada por pacientes humanos acidentados com a *N. annulifera* (WESTRIN & RAHMEL, 2011).

De maneira notável, foi detectado que o veneno da *N. annulifera* causou aumento drástico na atividade da enzima sintase do TXA₂, como observado pelos níveis extremamente elevados de TXB₂, detectados no plasma após exposição do sangue as toxinas do veneno. Via ativação do receptor TP (*do inglês: Thromboxane Prostanoid Receptor*) em vários tipos celulares, o TXA₂ causa uma série de reações que podem ser patológicas (KERKOVITS et al., 2019; KOBAYASHI et al., 2016; RUCKER & DHAMOON, 2020).

Entre as maiores fontes de TXA₂ circulante, as plaquetas merecem destaque. Frente a estímulos diversos ocorre aumento da atividade da COX-1 nestas células, fato que leva ao aumento da atividade da sintase do TXA₂, culminando na geração de TXA₂. O TXA₂, agindo de maneira autócrina, leva a síntese *de novo* do mesmo, fato que promove aumento nos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺, disparando a ativação plaquetária, culminando em mudanças morfológicas, aumento da expressão e ativação da integrina αIIbβIII, interação com o fibrinogênio, assim favorecendo a

formação de trombo (CRESCENTE et al. 2019; FRIEDMAN et al., 2015; RUCKER & DHAMOON, 2020).

Considerando os níveis altos de TXB₂ detectados após a ação do veneno, é possível que reações tromboinflamatórias façam parte da patogênese do envenenamento pela *N. annulifera*, já que este prostanóide é considerado um marcador de ativação plaquetária (HOTTZ et al., 2020) e níveis aumentados dele estão positivamente correlacionados com uma série de condições clínicas graves, incluindo embolismo pulmonar, acidente vascular cerebral e infarto agudo do miocárdio (FRIEDMAN et al., 2015; RUCKER & DHAMOON, 2020). Tais dados reforçando, ainda mais, a hipótese de que os danos cardíacos nos cães envenenados sejam, em parte, decorrentes da geração de mediadores inflamatórios que perturbam a hemostasia, bem como a circulação, posto que o TXA₂ também pode causar vasoconstrição e potencializar essas condições clínicas (RUCKER & DHAMOON, 2020).

Embora o TXA₂ seja extensivamente descrito na literatura como um potente agente vaso- e broncoconstritor em células musculares (RUCKER & DHAMOON, 2020), Kobayashi e colaboradores (2016) demonstraram que a ativação do receptor TP em modelos experimentais de LPA/SDRA causa ruptura da barreira endotelial alveolar, promovendo assim escape de fluidos culminando em edema excessivo. Interessantemente, estes autores mostraram que no caso das reações inflamatórias pulmonares, a ativação do TP nas células endoteliais promove aumento nos níveis intracelulares de cálcio, levando a polimerização das fibras de actina, e redução na expressão de moléculas juncionais, como a E-caderina, fatores que causam retração na célula endotelial culminando na quebra da função de barreira destas células e formação de edema, fatores agravantes da LPA/SDRA (KOBAYASHI et al., 2016). Sendo assim, este mediador pode influenciar, em parte, a LPA/DAD provocada pelo veneno, bem como disfunções circulatórias do envenenamento.

Interessantemente, os dados obtidos no modelo *ex vivo* de sangue total humano foram de encontro com aqueles observados *in vivo*, uma vez que a inibição farmacológica das Ciclooxygenases com Indometacina reduziu significativamente o edema induzido pelo veneno, e por isso consideramos que os prostanóides contribuem para disfunções endoteliais observadas no envenenamento.

Frente aos achados, postulamos que a indução da produção de LTB₄, PGE₂ e TXA₂ pelo veneno da *N. annulifera* são fatores que predispõe os indivíduos envenenados para disfunções endoteliais/vasculares, que são fatores de risco para tais

pacientes, uma vez que podem causar patologias distintas, como hipo/hipertensão, tromboinflamação, choque, lesão tecidual, e que podem evoluir para falência múltipla de órgãos.

Simultaneamente a ativação do complemento e geração de mediadores lipídicos, o veneno da *N. annulifera* foi capaz de regular positivamente a liberação das quimiocinas CCL2 e CCL5, as quais são produzidas de maneira constitutiva, bem como causou a produção de CXCL8, quimiocina induzida por estímulos inflamatórios.

A família das quimiocinas é composta por cerca de 50 ligantes os quais podem sinalizar de maneira promíscua em mais de 20 receptores acoplados a proteínas G. Estes receptores são expressos diferencialmente em todas as populações leucocitárias, bem como em células não pertencentes à linhagem hematopoiética, e exercem funções homeostáticas (receptores homeostáticos/fisiológicos) e inflamatórias (receptores inflamatórios). Considerando a diversidade dos ligantes, receptores, bem como o sinal disparado por eles, têm sido proposto que a combinação das diferentes quimiocinas forma cenários únicos que vão ditar respostas fisiológicas ou patológicas de maneira específica (HUGHES & NIBBIS, 2018; LÓPEZ-COTARELO et al., 2017; PROUDFOOT & UGOCCIONI, 2016; TANG & WANG, 2018).

As células sanguíneas humanas tratadas com o veneno da *N. annulifera* apresentaram regulação positiva na produção de CCL2 resultado que vai de encontro ao observado nos modelos murinos de envenenamento experimental. Assim, considerando todos os mediadores e eventos inflamatórios detectados neste estudo, é possível que muitos deles possam ser em parte estimulados pela ação desta quimiocina, uma vez que via ativação do CCR2, a CCL2 provoca a produção de IL-6, CXCL8 (humanos)/KC (do inglês: *Keratinocyte Derived Chemokine* (CXCL1) (camundongos), ativação da cFLA₂ levando a produção de mediadores lipídicos, e aumento da expressão e ativação de integrinas culminando em adesão e migração de neutrófilos (FRINK et al., 2006; LÓPEZ-COTARELO et al., 2017).

Paralelamente ao aumento nos níveis da CCL2, detectou-se a geração de CXCL8 com todas as doses de veneno empregadas, fato que demonstra que esta quimiocina é importante na imunopatologia do envenenamento, já que além de quimiotática para neutrófilos (EMBER et al., 1994; MARLEAU et al., 1999), ela estimula a liberação de neutrófilos da medula óssea (JAGELS & HUGLI, 1992), ambos eventos detectados local e sistemicamente em animais experimentalmente envenenados.

Via ativação dos receptores CXCR1 e/ou CXCR2, a CXCL8 causa ativação de neutrófilos, que culmina em explosão respiratória com produção de ERO, liberação de collagenase e NETose (LÓPEZ-COTARELO et al., 2017). Tais eventos moleculares podem amplificar a ação deletéria do veneno (KATKAR et al., 2016) sobre os tecidos dos pacientes envenenados. Adicionalmente, em conjunto com outros mediadores inflamatórios gerados no sangue frente a exposição ao veneno, a CXCL8 causa também disfunções vasculares contribuindo para o edema no envenenamento, dado que esta molécula causa quebra da estrutura de barreira formada por células endoteliais, via redução da expressão gênica e proteica de ZO-1 (do inglês: *Zonula occludens 1*), Claudina-5 e Ocludina, moléculas de extrema importância para tal função (YU et al., 2013).

Interessantemente a CXCL8 é um potente agente pró-coagulante, uma vez que provoca ativação plaquetária levando a emissão de pseudópodes, evento importante para a formação de trombo em diferentes condições inflamatórias. Além disso, esta quimiocina é um potente agente indutor de eventos eripatóticos, por causar encolhimento, formação de bolhas e desorganização da bicamada fosfolipídica da membrana de eritrócitos, eventos potencializados pela atividade das COX-1 e -2 e um de seus produtos, a PGE₂ (BESTER & PRETORIUS, 2016). Sendo assim, é plausível que tais alterações ocorram nos eritrócitos dos indivíduos envenenados, na presença da PGE₂ e CXCL8, eventos que poderiam alterar a oxigenação dos tecidos, levando a hipoxemia sistêmica.

Nas amostras de sangue envenenadas, foi observado aumento expressivo nos níveis de CCL5, quimiocina produzida pela ativação de células T, macrófagos e plaquetas (LV et al., 2012). Considerando os tempos de exposição das células sanguíneas ao veneno, é provável que parte do incremento nos níveis plasmáticos desta quimiocina seja oriundo de monócitos ativados pelo veneno (ASWAD et al., 2017) e plaquetas que possivelmente degranularam, dado que essa quimiocina é estocada em grânulos alfa (KIM & CONWAY, 2019) e liberada rapidamente, frente a vários estímulos ativadores de plaquetas, incluindo o TXA₂ (MACHLUS et al., 2016), bem como C3a e C5a (KIM & CONWAY, 2019), mediadores que foram produzidos nas amostras de sangue expostas ao veneno.

A ativação dos receptores CCR1, 2, 3 e/ou 5, por CCL5, além de ser quimiotática para neutrófilos, monócitos e linfócitos (LÓPEZ-COTARELO et al., 2017), tem sido associada com a patogênese de várias doenças, incluindo disfunção

endotelial, sendo um agente altamente edematogênico (CANAVESE et al., 2010) e uma potente indutora de eventos hipertensivos (MIKOLAJCZYK et al., 2016), os quais podem se desenvolver frente ao envenenamento pela *N. annulifera*.

Frente aos achados, considera-se que a presença das quimiocinas produzidas, no envenenamento experimental *ex vivo*, gera um ambiente imunoestimulante, que por meio da potencialização da atividade efetora dos diferentes tipos celulares presentes no sangue causaria desbalanços funcionais, bem como lesão tecidual, os quais amplificariam os efeitos danosos diretos do veneno e até mesmo dos outros mediadores inflamatórios detectados.

Empregando as diferentes metodologias *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, ficou claro que o envenenamento pela *N. annulifera* é caracterizado por uma reação inflamatória intensa, a qual envolve diferentes tipos celulares, e diferentes classes de mediadores inflamatórios. Assim, partindo do princípio que tais mediadores podem regular a produção uns dos outros, e que isso poderia ditar o desenvolvimento e desfecho de várias condições patológicas, o que inclui os envenenamentos por animais peçonhentos (BARROS DOS REIS, 2020; BARROS DOS REIS et al., 2020 SARTIM et al., 2020; ZOCCAL et al., 2016; 2018a,b;2019), a influência da ativação do complemento humano e murino para a produção de eicosanoides, quimiocinas, bem como para o edema, a inflamação sistêmica e LPA foram examinadas empregando-se uma série de ensaios de modulação farmacológica *ex vivo* e *in vivo*, tendo como alvo proteínas solúveis, SVMP e receptores para anafilatoxinas.

O veneno da *N. annulifera* apresentou uma serie de componentes ativadores do complemento humano, principalmente ativadores de C3, entre estes as SVMPs e CVF, sendo tais proteínas potentes indutores da geração de C3a e formação de sTCC (BREKKE et al., 2007; LUCHINI et al., 2019; PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). Considerando que a clivagem do C3 é um evento central na ativação do complemento por rotas intrínsecas, a ativação do componente C3 foi inibida pelo peptídeo análogo da Compstatina, o Cp40. Este peptídeo apresenta alta afinidade pela molécula de C3 humana e de outros primatas, e via ligação ao C3 intacto e/ou ao fragmento C3b inibe intensamente a ativação do complemento (QU et al., 2012).

O Cp40 tem sido considerado um potencial agente terapêutico em modelos de várias doenças de natureza inflamatória, autoinflamatória e autoimune, incluindo sepse (SILASI-MANSATI et al., 2010; 2015), periodontite (BOSTANCI et al., 2018),

choque hemorrágico (van GRIENSVEN et al., 2019), hemoglobinúria paroxística noturna (RISITANO et al., 2014) e anemia autoimune (BAAS et al., 2020).

O bloqueio da clivagem de C3 com o Cp40 foi capaz de inibir completamente a geração da anafilatoxina C3a e, de maneira inesperada, esse peptídeo não apresentou efeito sobre a geração de C5a e formação de sTCC, fato que reforça a ideia de que a ativação do complemento pelo veneno da *N. annulifera*, principalmente no que tange a ativação do componente C5 e todos os eventos “*downstream*” à sua ativação, ocorrem por rotas extrínsecas. Curiosamente, detectou-se que a inibição da clivagem do C3 pelo Cp40 é capaz de mitigar a produção de LTB₄ e PGE₂, bem como de CCL2 e CXCL8. Tais resultados apontam para uma possível influência do fragmento C3a na produção destes mediadores, dado que 1) foi o único produto da ativação do complemento reduzido concomitantemente a tais mediadores; 2) esta anafilatoxina apresenta propriedades imunoestimulantes (ASGARI et al., 2013; FISCHER et al., 1999; GUGLIETA et al., 2016; LOHMAN et al., 2017).

Posto que as SVMPs são altamente inflamatórias (FARSKY et al., 2000; LUCHINI et al., 2019; MOURA-DA-SILVA et al., 1996), que tais enzimas foram detectadas no veneno da *N. annulifera* e se mostraram capazes de agir diretamente sobre o componente C5, e que essa é a possível causa da falha do Cp40 em controlar a geração de produtos referentes a ativação de tal componente, a 1,10 Phe, inibidor de metaloproteinases, foi adicionada nas reações. Surpreendentemente, a geração de todos os produtos referentes a ativação do complemento foi completamente suprimida e, com exceção da quimiocina CCL5, todos os mediadores inflamatórios elicitados na presença do veneno foram também drasticamente inibidos.

Desta forma, postulamos que as SVMPs do veneno apresentam um papel fundamental na ativação do complemento humano, bem como em eventos concomitantes a esta ativação, sendo possível que nos casos de envenenamento, os produtos oriundos da ação destas proteases, as anafilatoxinas, sejam os responsáveis por vários dos eventos imunopatológicos causados pelo veneno. Partindo deste pressuposto, os receptores para anafilatoxinas foram alvo de intervenção farmacológica para confirmar se a geração de anafilatoxinas pelas SVMPs do veneno seriam as responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios no sangue total humano, bem como pelas alterações locais e sistêmicas observadas nos diferente modelos murinos de envenenamento empregados neste estudo.

Com base nos resultados de que o Cp40 reduziu a geração de C3a e concomitantemente LTB₄, PGE₂, CCL2 e CXCL8, o receptor para C3a foi bloqueado com o antagonista não peptídico, SB290157. Curiosamente, o tratamento com este antagonista potencializou a produção de todos os mediadores lipídicos identificados, bem como os níveis quimiocina CCL5. Por outro lado, reduziu de maneira branda os níveis de CCL2 e CXCL8. Estes efeitos sugerem que no contexto do envenenamento pela serpente *N. annulifera*, o C3a pode apresentar funções duais, uma vez que pode controlar de maneira negativa a produção dos mediadores lipídicos e CCL5, bem como estimular em parte a produção de CCL2 e CXCL8, fatores que reforçariam as propriedades imunomodulatórias do eixo C3a-C3aR. É importante ressaltar que o bloqueio do C3aR neste contexto pode não ser o ideal, uma vez que o veneno induz a geração de níveis elevados de C5a e, possivelmente, o bloqueio do C3aR, poderia potencializar a sinalização via C5aR1 e causar elevação nos níveis dos mediadores que tiveram sua produção potencializada, bem como outros eventos inflamatórios. Além disso, tem sido relatado que o SB290157 pode não ser um antagonista ideal do C3aR, posto que alguns estudos têm demonstrado que esta molécula tem também a capacidade de ativar o C3aR e disparar sinalização por cálcio e secreção de enzimas, respectivamente, por mastócitos e macrófagos humanos (LEE et al., 2020; MATHIEU et al., 2005), e potencializar a hiperreatividade das vias aéreas, na fase efetora do modelo de asma induzido pelo extrato do fungo *Aspergillus fumigatus* em camundongos (BAELDER, et al., 2005).

Levando em conta os achados deste estudo e a incerteza das reais propriedades farmacológicas do SB290157 reportadas por diferentes autores (BAELDER, et al., 2005; LEE et al., 2020; MATHIEU et al., 2005), para determinar se de fato a sinalização via eixo C3a-C3aR contribui de alguma forma para os eventos inflamatórios induzido pelo veneno da serpente *N. annulifera* no modelo *ex vivo*, novas ferramentas farmacológicas que tenham como alvo o C3aR precisarão ser desenvolvidas e testadas, uma vez que moléculas bloqueadoras deste receptor são escassas.

Recentemente, foi reportado o desenvolvimento de antagonistas peptídicos (BR111) (LOHMAN et al., 2017) e tiofenos (JR14a) (ROWLEY et al., 2020) altamente inibidores do C3aR, os quais foram capazes de inibir a sinalização por Ca²⁺ em macrófagos humanos, inibir a degranulação de mastócitos *in vitro* e *in vivo*, neutrofilia tecidual e aumento nos níveis de IL-6, CCL2 e TNF- α . Alguns destes

eventos inflamatórios são característicos do envenenamento experimental pela *N. annulifera* e, desta forma, o uso de tais ferramentas farmacológicas serão de grande valia para determinar se de fato o eixo C3a-C3aR impacta ou não na imunopatologia deste envenenamento.

O veneno da *N. annulifera* se mostrou um potente indutor da geração da anafilatoxina C5a, via ação das SVMPs e, curiosamente, vários dos eventos inflamatórios elicitados pelo veneno nos modelos *in vivo* e *ex vivo* de envenenamento experimental são sugestivos da ação desta anafilatoxina (BOSMANN et al., 2013; EMBER et al., 1994; JAGELS & HUGLI, 1992; KAJITA & HUGLI, 1990; RUSSKAMP et al., 2015; MARLEAU et al., 1999), assim, a sinalização disparada por ela, via C5aR1, foi interrompida com o antagonista peptídico PMX205. A produção de LTB₄ e CXCL8 foi bruscamente reduzida na presença do PMX205, demonstrando total dependência do eixo C5a-C5aR1 para a produção destes mediadores. Adicionalmente, a interrupção da sinalização do C5aR1 reduziu de maneira significativa os níveis plasmáticos de CCL2, PGE₂ e TXB₂.

Estes resultados colocam a ativação o eixo C5a-C5aR1 como evento chave na produção de mediadores inflamatórios elicitada pelo veneno da *N. annulifera* no sangue humano, apontando desta forma que vários dos eventos inflamatórios do envenenamento que são influenciados por tais mediadores, tenham seu início e propagação via tal eixo.

A sinalização do eixo C5a-C5aR1 disparou vários eventos inflamatórios no sangue total exposto ao veneno, e, partindo das evidências (i) que as ações do C5aR1 contribuem para inflamações exacerbadas, (ii) que em várias situações são deletérias (GUO et al., 2006; LEE et al., 2018; RIEDEMAN et al., 2002; RUSSKAMP et al., 2015; SADIK et al., 2012), e considerando (iii) que a ativação do C5aR2 reduz as ações do C5aR1 por dessensibilizar, internalizar e degradar tal receptor (LI et al., 2019; SCOLA et al., 2009), sendo esta uma possível maneira de controlar as ações deste eixo, foram conduzidos experimentos em que o C5aR2 foi ativado.

A ativação do C5aR2 foi induzida pelo peptídeo agonista P32 (CROKER et al., 2016) e, curiosamente, a sinalização via C5aR2 potencializou a produção de PGE₂ e CCL5, e em menor extensão de LTB₄. Tais dados sugerem que ativação deste receptor, no envenenamento pela *N. annulifera*, possa ser prejudicial, uma vez que provoca aumento na produção de mediadores relacionados com disfunções vasculares e ativação plaquetária, eventos que poderiam potencializar os efeitos deletérios do

veneno. A produção da quimiocina CCL2 foi mitigada frente a ativação do C5aR2, fazendo este eixo interessante de ser ativado caso se confirme um papel deletério para os monócitos neste envenenamento, posto que esta quimiocina causa liberação destas células da medula óssea (SHI & PAMER, 2011), sua ativação, bem como é um forte indutor de NETose (LÓPEZ-COTARELO et al., 2017), evento molecular que tem se mostrado altamente deletério nos envenenamentos por *E. carinatus* (KATKAR et al., 2016).

A quimiocina CCL5 foi produzida de maneira intensa no sangue humano frente a exposição ao veneno da *N. annulifera* e, curiosamente, a inibição da atividade das SVMPs, que foi capaz de reduzir todos os marcadores de ativação do complemento e mediadores controlados pelo eixo C5a-C5aR1, não interferiu na produção desta quimiocina. Isto sugere que a indução do incremento nos níveis da CCL5 seja mediada por outros eventos moleculares, que podem incluir sinalização via receptores para MAMPs, DAMPs e VAMPs presentes nas células sanguíneas.

Frente aos achados de intervenção farmacológica, confirmou-se que a produção de mediadores inflamatórios no sangue humano exposto ao veneno da *N. annulifera* é fortemente influenciada pela geração da anafilatoxina C5a e ativação de um dos seus receptores, o C5aR1. Desta forma, a ativação e contribuição do complemento na imunopatologia do envenenamento *in vivo* foi examinada nos diferentes modelos murinos de envenenamento experimental.

Primariamente, o perfil de ativação sistêmica do complemento foi caracterizado em camundongos submetidos aos protocolos de envenenamento experimental moderado e severo, e nos dois modelos experimentais foram detectadas complementopatias em diferentes graus. Tais dados vão de encontro aos resultados observados *in vitro* empregando SHN, mostrando que independente do modelo experimental empregado, a ativação do complemento é uma característica patogênica presente no envenenamento pela serpente *N. annulifera*.

Curiosamente, o perfil de complementopatia referente as vias clássica e das lectinas não apresentou diferenças entre os diferentes protocolos de envenenamento experimental, reforçando a ideia de que a ativação de tais vias, no contexto do envenenamento pela *N. annulifera*, seja de fato um evento inicial para ativação do complemento (EKDAHL et al., 2019; FROMELL et al., 2020; LO & WOODRUFF, 2020) independente do estímulo iniciador e magnitude deste.

Diferente do observado para as vias clássica e das lectinas, o envenenamento experimental causou complementopatia referente a via alternativa totalmente dependente do contexto do envenenamento. Os animais inoculados com $1DL_{50}$ do veneno apresentaram redução intensa na atividade da via alternativa, detectada rapidamente 30 minutos após a inoculação do veneno, resultado que põe a ativação desta via como evento molecular de destaque no envenenamento grave pela *N. annulifera*, dado que a ativação da mesma está totalmente relacionada com o desenvolvimento de LPA/DAD (GANTER et al., 2007), alterações pulmonares detectadas nos animais envenenados com a dose letal.

As complementopatias referentes a ativação exacerbada da via alternativa têm sido relatadas em vários modelos experimentais de doenças inflamatórias, incluindo lesão da isquemia e reperfusão renal murina (KOTIMAA et al., 2015), politraumatismo suíno (LACKNER et al., 2020) e humano (GANTER et al., 2007), sendo uma característica interessante destas patologias a elevação nos níveis do fragmento Bb (GANTER et al., 2007; KOTIMAA et al., 2015; SCHUBART et al., 2019). Sendo assim, a neutralização deste fragmento/protease poderia ser interessante para reduzir os efeitos deletérios do envenenamento grave, já que a inibição do mesmo se mostra protetora em modelos experimentais de lesão de isquemia e reperfusão renal (KOTIMAA et al., 2015), artrite reumatoide espontânea em camundongos K/BxN e hemoglobinúria paroxística noturna (SCHUBART et al., 2019).

Partindo dos resultados que o veneno da *N. annulifera* é um potente indutor da geração de C5a *in vitro* e *ex vivo*, que a produção de mediadores inflamatórios foi dependente do eixo C5a-C5aR1, e que o veneno causou ativação sistêmica do complemento *in vivo*, a geração sistêmica de C5a foi examinada.

Curiosamente, os animais submetidos aos envenenamentos moderado e grave apresentaram redução nos níveis circulantes da anafilatoxina C5a, efeito que foi dependente da dose de veneno empregada. De maneira notável, a depleção nos níveis de C5a circulante foi da mesma magnitude que a observada na complementopatia dos fatores da via alternativa. Isto sugere que quanto maior a depleção do C5a, mais grave o envenenamento, já que quanto maior a geração de C5a, mais C5a se liga ao C5aR1 (RIEDEMANN et al., 2002) e potencializa, na mesma magnitude, a expressão gênica e proteica deste receptor em vários tipos celulares. Tais fatores seriam os responsáveis pela remoção rápida do C5a circulante (KIRSCHFINK & MOLLNES, 2003; OPPERMANN & GOTZE, 1994; WU et al., 2020) e estariam correlacionados com o

grau de inflamação dos animais envenenados e talvez com a intensidade da disfunção orgânica, já que os mecanismos discutidos foram observados na sepse induzida por CLP em ratos (RIEDEMANN et al., 2002) e em modelos de isquemia intestinal em camundongos (WU et al., 2020).

A elevação nos níveis locais e sistêmicos de mediadores inflamatórios pode levar a disfunções endoteliais que podem ser altamente deletérias e até mesmo fatais (BOSSI et al., 2014; GULBINS et al., 1993; KARASU et al., 2019; KERKOVITS et al., 2019; KESHARI et al., 2017; KOBAYASHI et al., 2016; LOHMAN et al., 2017; RUSSKAMP et al., 2015; van-der POLL et al., 2017; YU et al., 2013).

Neste estudo detectamos que o veneno da *N. annulifera* causa disfunções endoteliais intensas uma vez que promove a formação de edema exacerbado na pata de camundongos, o qual é reduzido significativamente, ao longo do tempo, frente ao tratamento com inibidores da síntese de diferentes classes de mediadores lipídicos, fato que apontou para a existência de algum evento molecular central capaz de induzir a síntese destas moléculas e levar ao aumento da permeabilidade intenso.

Surpreendentemente, a geração de C5a e ativação do C5aR1 mostraram-se responsáveis pelo desenvolvimento do edema, uma vez que o bloqueio da sinalização do eixo C5a-C5aR1 com o PMX205 reduziu o edema ao longo do tempo, com destaque para o momento do pico, em que o inchaço foi reduzido pela metade. Curiosamente, 20 minutos após a injeção do veneno, o qual representa o momento máximo de disfunção, detectou-se elevação nos níveis locais de LTB₄, PGE₂ e TXB₂ que foram reduzidos a níveis basais frente o bloqueio da sinalização do C5aR1, indo estes dados de encontro aos observados no modelo *ex vivo* de sangue total humano empregado neste estudo.

Frente a estes achados postula-se que, mecanisticamente, a geração de C5a leva a ativação do C5aR1, nas células endoteliais, causando aumento da expressão e polimerização de actina-F promovendo contração celular (SCHURAUFSATER et al., 2002) e aumento da permeabilidade vascular. Adicionalmente, a sinalização via eixo C5a-C5aR1, no endotélio e em outras células, causa ativação da cFLA₂, culminando na liberação de ácido araquidônico o qual é metabolizado pelas Ciclooxygenases e na sequência pelas enzimas sintase da PGE₂ e do TXA₂ levando a produção, respectivamente, de PGE₂ e TXA₂ (FRIEDMAN et al., 2015; JANG et al., 2020; RUCKER & DHAMOON, 2020). Além disso, a ativação da 5-LOX, pela FLAP, leva a geração de LTA₄ o qual é hidrolisado pela hidrolase do LTA₄ culminando na geração

de LTB₄ (MANCINI et al., 1992; MEHTA et al., 1986; YOKOMIZO, 2015). Assim, a ação isolada ou em conjunto destes mediadores promoveu vasodilatação, bem como potencializou o aumento da permeabilidade, fatores que levaram ao escape intenso de fluidos após a injeção de veneno, sendo estas alterações locais factíveis de acontecerem em nível sistêmico, já que a ativação do C5aR1 pelo C5a em sangue total humano causou os mesmos eventos.

Além das disfunções endoteliais locais, o veneno da *N. annulifera* causa infiltração intensa de neutrófilos no sítio de inoculação do veneno como detectado pela análise histopatológica dos tecidos dos animais, evento inflamatório que pode ter relação com a geração de várias moléculas altamente quimiotáticas para neutrófilos detectadas no sangue total humano e no tecido subcutâneo de camundongos.

O veneno da *N. annulifera* causou aumento nos níveis teciduais de LTB₄ e CXCL1 (KC), os quais são fatores quimiotáticos para neutrófilos (EMBER et al., 1994; MARLEAU et al., 1999), e junto a isso foi detectado elevação nos níveis teciduais de MPO, enzima indicadora da presença e ativação de neutrófilos (JORCH & KUBES et al., 2017; ROSALES, 2018; ZOCCAL et al., 2016, 2018). A interrupção da ativação do C5aR1 reduziu drasticamente a produção de tais fatores quimiotáticos, evento que foi associado à diminuição intensa nos níveis teciduais de MPO.

Desta forma, estes resultados demonstram que o C5a agindo sozinho ou via produção de LTB₄ e CXCL1, causa infiltração e ativação de neutrófilos nos tecidos inoculados com veneno, podendo a tríade C5a-C5aR1-neutrófilos ser um importante condutor de alterações patológicas do envenenamento, dado que o C5a sozinho (SKENDROS et al., 2020) ou via indução da produção das quimiocinas CXCL1/CXCL8 (LÓPEZ-COTARELO et al., 2017) estimula a NETose nestas células, evento inflamatório que pode potencializar os efeitos deletérios diretos do veneno, bem como dos mediadores inflamatórios induzidos pelo mesmo.

É importante ressaltar que foi detectado níveis altos de MPO no tecido subcutâneo dos animais injetados com o veneno da *N. annulifera*, e tal enzima é um dos indicadores de NETose (COLÓN et al., 2019). Assim, considerando que a inoculação de veneno nas patas causou necrose muscular e *in vitro* distúrbios de coagulação, sendo tais alterações induzidas ou potencializadas pelas NETs (COLÓN et al., 2019; SKENDROS et al., 2020), estudos que elucidem a influência das NETs nestes e outros eventos patológicos do envenenamento serão necessários.

A inoculação, por via i.p., da dose subletal do veneno da *N. annulifera* induziu complementopatias sistêmicas relacionadas às rotas intrínsecas de ativação do complemento, que foram acompanhadas de aumento na porcentagem de neutrófilos e redução na porcentagem de linfócitos circulantes, regulação positiva da produção da quimiocina CCL2, bem como geração sistêmica de IL-6, todos estes eventos caracterizando um quadro de envenenamento experimental moderado. Neste contexto de envenenamento, o eixo C5a-C5aR1 mostrou-se responsável por todas as alterações provocadas pelo veneno, já que a interrupção da sinalização de tal eixo protegeu os animais de todos os eventos inflamatórios incitados pela dose subletal de veneno.

A dose subletal do veneno causou um quadro de envenenamento experimental moderado, e nenhuma alteração estrutural nos tecidos dos animais submetidos a tal protocolo foi detectada, o que não exclui que as ações do C5a sozinho, ou em conjunto com neutrófilos, CCL2 e IL-6 levem os animais a distúrbios de natureza funcional. Neste sentido, a ativação do C5aR1 poderia contribuir para desbalanços funcionais nos animais envenenados com a dose subletal, já que a sinalização por este receptor causa hipotensão (PROCTOR et al., 2006), alterações eletrofisiológicas, acidose metabólica (DENK et al., 2017; KARASU et al., 2019, dor (SHUTOV et al., 2018) e distúrbios hemostáticos (KAMBAS et al., 2008; KESHARI et al., 2017; SKJEFLO et al., 2017). A presença destes tipos de alterações deve ser acessada em estudos futuros para melhor compreensão dos efeitos patogênicos do eixo C5a-C5aR1 no contexto do envenenamento moderado.

A injeção i.p. de 1DL₅₀ do veneno da *N. annulifera* foi capaz de promover uma série de eventos inflamatórios sistêmicos intensos, quando comparados aos induzidos pela dose subletal, assim configurando o modelo de envenenamento grave/severo.

No contexto do envenenamento experimental grave detectou-se leucocitose, aumento nas porcentagens de neutrófilos e monócitos, e redução nas porcentagens de linfócitos circulantes. Todas estas mudanças foram completamente dependentes do eixo C5a-C5aR1, uma vez que o tratamento com o PMX205 protegeu os animais de tais alterações.

Considerando os achados referentes as alterações leucocitárias, tanto no contexto de envenenamento experimental moderado como no grave, postulamos que a geração sistêmica de C5a nos animais envenenados causa redução nos níveis fisiológicos de leucócitos marginantes, bem como é percebida pela medula óssea dos

animais envenenados, levando ao aumento no número total de leucócitos, bem como nas porcentagens de neutrófilos e monócitos circulantes. Além disso, considera-se que além de agir sozinho (KAJITA & HUGLI, 1990), o C5a via indução de LTB₄, CXCL1/8 (JAGELS & HUGLI, 1992) e PGE₂ (ULICH et al., 1986) no envenenamento pela *N. annulifera*, também influencia as alterações hematológicas detectadas nos diferentes quadros de envenenamento.

Como demonstrado, o eixo C5a-C5aR1 é responsável por vários eventos envolvendo neutrófilos no envenenamento pela *N. annulifera*, fato que reforça a ideia de que tais células devam, de alguma forma, influenciar a patogênese do envenenamento, fazendo-se necessárias maiores investigações sobre os efeitos do veneno e complemento sobre estes leucócitos.

Além das alterações leucocitárias causadas pela injeção de IDL₅₀, o veneno da *N. annulifera* foi capaz de causar danos intensos nos pulmões dos animais, sendo tais alterações uma das possíveis causas de morte dos camundongos, bem como de humanos envenenados, já que é relatado que os acidentados com esta serpente evoluem para morte por parada respiratória (ALVES, 1960; BLAYLOCK, 1982; CLINICAL TOXINOLOGY RESOURCERS, 2020; ENGELBRECHT, 2012; STROVER, 1961; WESTRIN e RAHMEL, 2011; WHO, 2010b). Embora existam tais relatos, as reais alterações envolvidas na morte dos indivíduos envenenados pela *N. annulifera* permanecem obscuras, seja por falta de achados clínico laboratoriais de pacientes e experimentais, bem como pela existência de um conceito na área de toxicologia de que os envenenamentos por serpentes da família Elapidae são caracterizados apenas por sintomas neurotóxicos, o que inclui a parada respiratória por ação de neurotoxinas (WHITE, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010b).

Entre as causas de falência respiratória, existe a SDRA, a qual se origina em decorrência de LPA prévia. A SDRA ocorre em cerca de 10% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva em todo o mundo, sendo a mesma responsável por 40% das mortes de tais pacientes (BOSMANN & WARD, 2014; MATTHAY et al., 2019).

A LPA pode ser incitada via estímulos diretos e indiretos aos pulmões, de diferentes origens, o que inclui reações inflamatórias, pneumonias infecciosas (virais, bacterianas e fúngicas), sepse, aspiração de suco gástrico, politraumatismos, lesões de isquemia e reperfusão, choque hemorrágico e inalação de poluentes aéreos e fumaça de cigarro (BOSMANN et al., 2013; BOSMANN & WARD, 2014; CARDINAL-

FERNANDEZ et al., 2016; MATTHAY et al., 2019; RUSSKAMMP et al., 2015). Estes insultos podem causar distúrbios no epitélio e endotélio alveolar, fatores que vão refletir em dois tipos de alterações, a pneumonia, e o dano alveolar difuso (DAD), sendo o DAD altamente relacionado com o desenvolvimento e prognóstico ruim da SDRA (CARDINAL-FERNÁNDEZ et al., 2016; MATTHAY et al., 2019; RIOS et al., 2017; THILLE et al., 2013).

A pneumonia é caracterizada por migração intensa de neutrófilos para os espaços alveolares e bronquíolos (MATTHAY et al., 2019; THILLE et al., 2013), enquanto o DAD apresenta edema alveolar rico em proteínas, deposição de fibrina (membrana hialina), colapso e espessamento intenso da parede alveolar (atelectasia) e presença esparsa de leucócitos. Ainda, no tocante ao DAD, tal alteração patológica está altamente correlacionada com a severidade, bem como com a alta mortalidade de indivíduos que desenvolvem SDRA (CARDINAL-FERNÁNDEZ et al., 2016; HUGHES & BEASLEY, 2017; MATTHAY et al., 2019; RIOS et al., 2017; THILLE et al., 2013).

A injeção de $1DL_{50}$ do veneno da *N. annulifera* em camundongos causou LPA caracterizada por DAD intenso, totalmente dependente da ativação do eixo C5a-C5aR1. Considerando que o bloqueio deste eixo protegeu os animais de desenvolver este tipo de lesão, postulamos que a falência respiratória no envenenamento experimental por esta espécie de *Naja* é decorrente de LPA e consequente desenvolvimento de SDRA. Além disso, sugere-se que o mesmo possa acontecer em humanos envenenados, já que todos os mediadores inflamatórios gerados no sangue humano exposto ao veneno em nossos experimentos, tem seus níveis plasmáticos e pulmonares elevados em indivíduos que desenvolvem a SDRA em diferentes condições clínicas, bem como em diferentes modelos experimentais de LPA/SDRA (BOSMANN et al., 2013; BOSMANN & WARD, 2014; BUTT et al., 2016; CROSS & MATTHAY, 2011; FRINK et al., 2001; HAN & MALLAMPALLI, 2015; KESHARI et al., 2017; LIN et al., 2010; MALAVIYA et al., 2017; PROCTOR et al., 2006; RUSSKAMP et al., 2015; WARE et al., 2010).

Curiosamente, detectamos que no contexto experimental letal, a interrupção da sinalização do eixo C5a-C5aR1 pelo PMX205 não reduziu os níveis de interleucinas circulantes, demonstrando desta forma que, majoritariamente, eventos inflamatórios intrapulmonares são os responsáveis pela LPA neste contexto, uma vez que o próprio C5a recombinante purificado é capaz de induzir elevação nos níveis

intrapulmonares de interleucinas e quimiocinas, disfunções endoteliais responsáveis por edema, migração de neutrófilos, sendo todos estes eventos dependentes do C5aR1 e neutrófilos, já que animais *knockout* de tal receptor e camundongos depletados de neutrófilos com anticorpos anti-Ly-6G são protegidos da LPA. Além do que, o bloqueio de eventos moleculares intracelulares disparados pela ligação do C5a ao C5aR1, tais como, ativação de PI-3K e ERK1/2, bem como a sinalização via CCR5, protege os animais da LPA induzida pelo C5a (RUSSKAMP et al., 2015).

Uma das causas do colabamento alveolar é a redução na produção de surfactantes pulmonares (MATTHAY et al., 2019). Os surfactantes pulmonares geralmente são produzidos por células epiteliais alveolares do tipo II (AT-II) (MATTHAY et al., 2019) e compostos de moléculas de diferentes naturezas bioquímicas (LOUREIRO et al., 2020); entre tais moléculas existe a proteína surfactante A (SP-A), a qual tem seus níveis alveolares altamente reduzidos em indivíduos com pneumonia e fibrose pulmonar idiopática, sendo esta redução correlacionada positivamente com a piora no quadro clínico de tais pacientes (BAUGHMAN et al., 1993; GUNTHER et al., 1996; McCORMACK et al., 1995). Embora não tenhamos evidências sobre interferência na atividade das células AT-II, é possível que a redução na produção de surfactantes pulmonares, mais especificamente a SP-A seja um dos motivos envolvidos no DAD.

Foi relatado que macacos envenenados com o herbicida Paraquat apresentam LPA acompanhada de redução na SP-A alveolar, evento totalmente dependente da anafilatoxina C5a, já que o tratamento com o anticorpo monoclonal neutralizante da mesma, o IFX-I, protege os animais do colabamento, e aumenta a expressão no tecido pulmonar deste surfactante (SUN et al., 2018). Além disso, sabendo-se que o C5a se mostrou pró-apoptótico para células da medula da adrenal em ratos submetidos a sepse por CLP, fato que culminou na inibição total da liberação de noradrenalina e dopamina (FLIERL et al., 2008), é possível que o mesmo ocorra nas células AT-II dos animais submetidos ao envenenamento, inibindo a síntese de surfactantes levando ao consequente colabamento dos alvéolos. Considerando tais hipóteses, estudos para investigar os efeitos do veneno da *N. annulifera* junto com a anafilatoxina C5a sobre a biologia das células AT-II devem ser conduzidos.

Embora não tenhamos acessado o papel dos neutrófilos no DAD induzido pelo eixo C5a-C5aR1, estudos apontam que a ativação destas células via C5aR1 e C5aR2 causa NETose a qual é responsável pela lesão pulmonar em modelo de LPA

induzida por C5a, uma vez que anticorpos neutralizantes de histonas, principalmente H4, nesse modelo inibe o edema pulmonar, infiltração de neutrófilos, produção de quimiocinas e interleucinas, bem como a morte das células AT-II (BOSMANN et al., 2013). Desta forma, a influência dos neutrófilos sobre o desenvolvimento do DAD deverá ser acessada posteriormente.

O envenenamento experimental letal elicitou a produção exacerbada de IL-6, CCL2 e TNF- α , que não foi reduzida frente a interrupção da sinalização do C5aR1 pelo PMX205, diferente do observado no contexto subletal, sendo assim possível que mecanismos moleculares adicionais possam entrar em ação no contexto do envenenamento grave frente ao bloqueio da sinalização do C5aR1. Considerando a potencialização na produção das interleucinas detectadas, é possível que o eixo C5a-C5aR1 no envenenamento grave apresente propriedades tanto estimulantes, como supressoras, uma vez que estudos têm revelado efeitos inibitórios desta anafilatoxina em células dendríticas no modelo experimental de asma induzida por acaro de pó doméstico e por ovoalbumina (OVA). Em tais células a ativação do C5aR1 suprime a expressão de CD40 e IL-13, bem como inibe a capacidade destas células de induzir a proliferação de células T (ANTONIOU et al., 2020).

Os animais tratados com o antagonista, no envenenamento letal, apresentaram produção sistêmica de IL-10, a qual pode estar correlacionada com a inibição do DAD, uma vez que a LPA induzida por LPS (INOUE, 2000) e hiperóxia (LI et al., 2014) é mitigada frente ao tratamento com esta interleucina.

A IL-10 é uma interleucina conhecida por suas propriedades imunossupressoras/anti-inflamatórias (COUPER et al., 2008); no entanto, no contexto da liberação de interleucinas estimuladas pelo envenenamento experimental grave, parece não influenciar tal evento inflamatório, fato que sugere que o bloqueio do C5aR1 pode potencializar a atividade de outros receptores inflamatórios neste contexto. Curiosamente, tem sido apresentado que a ativação do C3aR em modelos de lesão renal induzida por *Escherichia coli* uropatogênica resulta na liberação de níveis elevados de IL-10 (WU et al., 2019). Adicionalmente, a ativação do C3aR potencializa a produção de mediadores inflamatórios disparada por receptores para DAMPs, MAMPs (ASGARI et al., 2013; FISCHER et al., 1999; TAKABAYASHI et al., 1996) e possivelmente para o C5a.

No modelo *ex vivo* de sangue total humano, a condição de 100 μ g de veneno/mL, quantidade que se próxima da DL₅₀, resulta na geração exacerbada de C3a,

a qual foi quatro vezes maior, se comparada com a dose de 50 µg/mL, quantidade de veneno que se aproxima da dose subletal. Assim, considerando que várias células expressam o C3aR nos diferentes tecidos (AMES et al., 1996; LAUMONIER et al., 2017) e que a meia vida do C3a *in vivo* é de 60 minutos (KIRSCHFINK & MOLLNES, 2003), é possível considerar que a potencialização na produção de interleucinas frente ao bloqueio do C5aR1, nos animais submetidos ao envenenamento grave, ocorra por meio da ativação do eixo C3a-C3aR. Este sozinho ou via indução das interleucinas, bem como via degranulação sistêmica de mastócitos, poderia causar desequilíbrios vasculares levando a hiper/hipotensão, aumento intenso da permeabilidade vascular, e choque, fatores que contribuiriam para morte dos animais. Além do que, o veneno da *N. annulifera* causa elevação nos níveis de sTCC e, considerando que via geração de PAF e Bradicinina, esse complexo causa aumento da permeabilidade vascular, e múltiplos edemas (BOSSI et al., 2014), junto com o C3a, poderia também contribuir para a morte dos animais.

É importante ressaltar, que embora a literatura aponte para a parada respiratória como causa de morte dos indivíduos envenenados, frente aos resultados obtidos neste estudo, fica claro que esta não é a principal patologia envolvida na morte dos animais envenenados. A proteção dos animais do desenvolvimento da LPA, induzida pela ativação do eixo C5a-C5aR1, não previne a morte, dado que é reforçado pela falha da ventilação mecânica em proteger os humanos envenenados de tal desfecho (ALVES et al., 1960; BLAYLOCK et al., 1982; HARPER & FRY, 2020; STROVER et al., 1961). Isto sugere que o óbito no envenenamento por esta serpente aconteça como decorrência do desenvolvimento de outras patologias além da LPA, o que provavelmente inclui as disfunções endoteliais que podem evoluir para choque, bem como reações tromboinflamatórias, já que o veneno no sangue total e em modelo murino estimulou vários eventos característicos destas reações.

Nas últimas décadas vários grupos de pesquisa têm descrito que produtos oriundos da ativação do complemento, como as anafilatoxinas e sTCC, bem como eventos moleculares envolvidos na geração de tais produtos, são decisivos no desenvolvimento e desfecho de várias condições patológicas, transformando desta forma o sistema complemento em um alvo terapêutico atraente para tais condições. Dada a importância destes estudos, só no ano de 2019, 30 moléculas inibidoras de diferentes componentes do complemento estavam sob ensaios clínicos de fase I, II e/ou

III. Entre tais moléculas, o anticorpo monoclonal humanizado Eculizumab, que bloqueia a ativação do componente C5, se destaca.

O Eculizumab é utilizado na clínica para tratar algumas doenças autoinflamatórias (hemoglobinúria paroxística noturna e síndrome hemolítica urêmica atípica) e autoimune (miastenia grave) (MASTELLOS et al., 2019). Assim, considerando que a imunopatologia do envenenamento pela *N. annulifera* é mediada pela anafilatoxina C5a, a prevenção da geração da mesma com tal anticorpo poderia ser considerada como alternativa terapêutica complementar para os indivíduos envenenados, já que é um medicamento bem caracterizado e que apresenta muitos benefícios clínicos.

O PMX205, antagonista peptídico do C5aR1 utilizado neste estudo, é um agente terapêutico em potencial, devido as suas características. Esta molécula é um análogo do peptídeo PMX53 que apresenta substituição de um resíduo de fenilalanina por uma molécula de hidrocinato, fator que aumenta a lipofilicidade deste antagonista, bem como a sua biodisponibilidade e eficácia (KUMAR et al., 2020). Tais propriedades o tornam uma ferramenta farmacológica de estudo e agente terapêutico em modelos experimentais de doenças que têm a inflamação envolvida em seu desenvolvimento e/ou agravamento, incluindo esclerose lateral amiotrófica (LEE et al., 2017), colite (JAIN et al., 2010), meningite meningocócica (MUENSTERMANN et al., 2019), doença de Alzheimer (FONSECA et al., 2009) e periodontite (BREIVIK et al., 2011). Com base nestas características, o PMX205 foi recentemente submetido a ensaio clínico de fase I para uso em doenças neuroinflamatórias (KUMAR et al., 2020), representando assim uma outra possível alternativa terapêutica para controlar as reações inflamatórias danosas do envenenamento pela *N. annulifera*.

Ao final deste capítulo fica claro que o envenenamento pela *N. annulifera* é caracterizado por reações inflamatórias locais, sistêmicas e pulmonares exacerbadas, mediadas pela ativação do complemento, mais especificamente pelo eixo C5a-C5aR1, que via indução, e até mesmo modulação de eventos inflamatórios, contribui para os efeitos deletérios do envenenamento (**Fig. 27**).

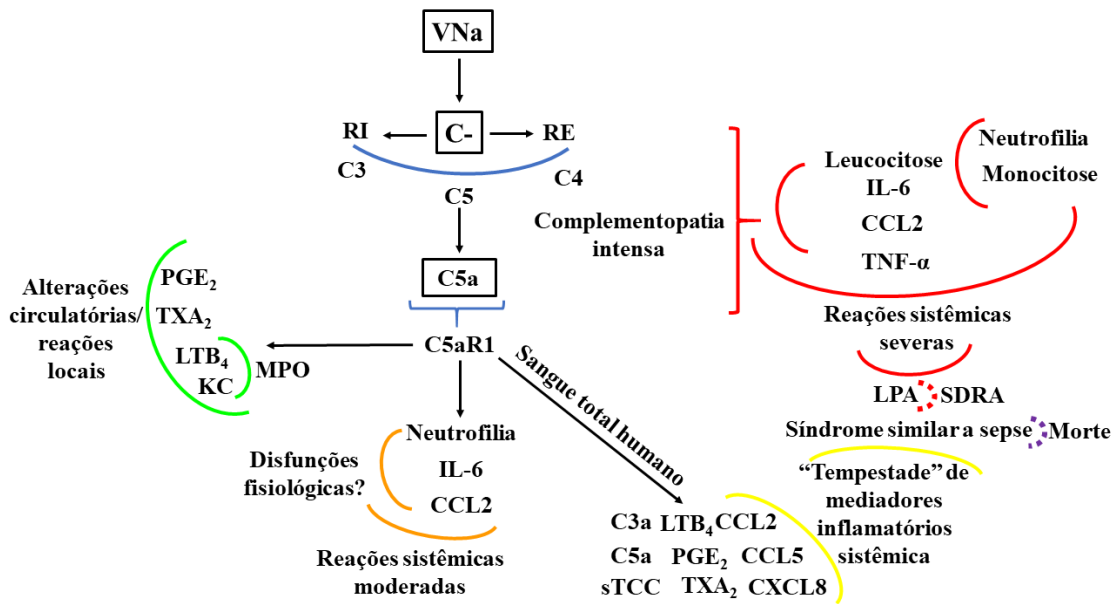


Figura 27 – Representação esquemática da influência da ativação do sistema complemento na imunopatologia do envenenamento por *N. annulifera*. VNa: veneno da serpente *N. annulifera*; linha azul: rotas e componentes do complemento ativados pelo VNa; chave azul: interação entre agonista e receptor; linhas verdes: reações locais; linhas laranjas: Reações sistêmicas em animais inoculados com a dose subletal do VNa; linhas amarelas: reações inflamatórias em amostras de sangue humano expostas ao VNa; linhas vermelhas: reações sistêmicas induzidas pela inoculação da dose letal do VNa; linha vermelha pontilhada: consequência da LPA; linha roxa pontilhada: consequência da síndrome similar a sepsis; C-: Sistema complemento; RI: rotas intrínsecas de ativação do C-; RE: rotas extrínsecas de ativação do C-; PGE₂: Prostaglandina E2; TXA₂: Tromboxano A2; LTB₄: Leucotrieno B4; KC (do inglês: *Keratinocytes-derived chemokine*): Quimiocina derivada de queratinócitos; MPO: Mieloperoxidase; LPA: Lesão Pulmonar Aguda; SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo.

2.6 CONCLUSÃO

O veneno da serpente *N. annulifera* apresenta componentes capazes de ativar o sistema complemento humano *in vitro* levando a geração de anafilatoxinas e formação de sTCC. Parte desta ativação é mediada pela atividade proteolítica de SVMPs e SVSPs detectadas no veneno.

Em modelo *ex vivo* de sangue total humano o veneno da *N. annulifera* causa ativação do complemento por rotas extrínsecas, mediadas por SVMPs, e geração de LTB₄, PGE₂, TXB₂, CCL2, CCL5 e CXCL8, eventos inflamatórios influenciados pela sinalização do eixo C5a-C5aR1.

No sítio de inoculação do veneno ocorre geração da anafilatoxina C5a, que se liga ao C5aR1 levando a produção de LTB₄, PGE₂ e TXA₂, os quais induzem disfunções endoteliais culminando na formação de edema intenso. Ainda, o C5a via indução da quimiocina CXCL1 e LTB₄ causa intensa infiltração e ativação de neutrófilos na região da inoculação do veneno.

Animais submetidos ao envenenamento sistêmico moderado apresentam complementopatia dos fatores das rotas intrínsecas de ativação do complemento. Além disso, estes animais desenvolvem neutrofilia e aumento nos níveis sistêmicos de IL-6 e CCL2, todos totalmente dependentes do eixo C5a-C5aR1.

Camundongos submetidos ao envenenamento sistêmico grave, apresentam complementopatia intensa dos fatores da via alternativa da ativação do complemento, a qual é acompanhada de leucocitose com neutrofilia e monocitose, elevação robusta nos níveis de IL-6, CCL2 e TNF- α , e desenvolvimento de LPA exacerbada. A ativação do eixo C5a-C5aR1 controla todos os eventos inflamatórios destes animais, uma vez que o bloqueio da sinalização de tal eixo modulou tais eventos.

2.7 CONCLUSÕES GERAIS

O veneno da serpente *N. annulifera* apresenta em sua composição proteínas com potencial pró-inflamatório, que via geração de DAMPs e ativação do sistema complemento promovem reações inflamatórias locais, sistêmicas e pulmonares, as quais podem contribuir para os efeitos deletérios do envenenamento.

REFERÊNCIAS

ABDOU, R. H.; IBRAHIM, A. E. Effects of Egyptian Cobra (*Naja haje*) venom on postmortem changes and some biochemical parameters in rats. **International Journal of Scientific Research**, 2015. v. 4, n. 1, p. 186-190.

AÇIKALIN, A.; GÖKEL, Y. Serum IL-6, TNF- α levels in snakebite cases occurring in Southern Turkey. *Emergency Medicine Journal*, 2011. v. 28, n. 3, p. 208-211.

ADAMIKI, M. et al. Novel evidence that an alternative complement cascade pathway is involved in optimal mobilization of hematopoietic system/progenitor cells in NLRP3 inflammasome-dependent manner. **Leukemia**, v. 33, n.12, p. 2967-2970. 2019.

ADERKA, D. Role of tumor necrosis factor in the pathogenesis of intravascular coagulopathy of sepsis: potential new therapeutic implications. **Israel Journal of Medical Sciences**, 1991. v. 27, n. 1, p. 52-60.

ALBRECHT, E. A. et al. C5a induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. **American Journal of Pathology**, 2004. v. 164, n. 3, p. 849-859.

ALVES, R. Some case histories of snake bites in Southern Rhodesia. **Journal of the Herpetological Association of Rhodesia**, 1960. v. 9, n. 10, p. 15-17.

AKAHOSHI, M. et al. Mast cell chymase reduces the toxic of gila monster venom, scorpion venom, and vasoactive intestinal polypeptide in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 10, p. 4180-4191. 2011.

AMARA, U. et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. **The Journal of Immunology**, 2010. v. 185, n. 9, p. 5628-5636.

AMES, R. S. et al. Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, 1996. v. 271, v. 34, p. 20231-20234.

AMES, R. S. et al. Identification of a selective nonpeptide antagonist of the anaphylatoxin C3a receptor that demonstrates anti-inflammatory activity in animal models. **The Journal of Immunology**, 2001. v. 166, n. 10, p. 6341-6348.

AMORIM, F. G. et al. New insights on Moojase, a Thrombin-like serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxins (Basel)**, v.10, n. 12, p. 1-19. (2018).

ANDERSEN, S. K. et al. The roles of insulin and hyperglycemia in sepsis pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, 2004. v. 75, n. 3, p. 413-421.

ANDERSON, E. et al. Human mast cell tryptase is a potential treatment for snakebite envenoming across multiple snake species. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1532, p. 1-14. 2018.

ANTONIOU, K. et al. Allergen-induced C5a/C5aR11 axis activation in pulmonary CD11b⁺ cDCs promotes pulmonary tolerance through downregulation of CD40. *Cells*, v. 9, n. 2, p. 1-26. 2020.

ARACHICHE, A. et al. Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by α -thrombin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013. v. 288, n. 45, p. 32553-32562.

ARBORE, G. et al. T helper 1 immunity requires complement driven NLRP3 inflammasome activity in CD4⁺ T cells. *Science*, v. 352, p. 1-26. 2016.

ARCE-BEJARANO, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Intravascular hemolysis by the Venom of the eastern coral snake, *Micrurus fulvius*, in a mouse model: identification of directly hemolytic phospholipase A2. *Toxicon*, v. 90, p. 26-35. 2014.

ASADOLLAHI, K.; BEECHING, N. J.; GILL, G. V. Leukocytosis as a predictor for non-infective mortality and morbidity. *QMJ*, 2010. v. 103, n. 5, p. 285-292.

ASGARI, E. et al. C3a drives IL-1 β secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood*, v. 122, n. 20, p. 3473-3481. 2013.

ASWAD, M. et al. CCL5 promotes resolution-phase macrophage reprogramming in concert with the atypical chemokine receptor D6 and apoptotic polymorphonuclear cells. *The Journal of Immunology*, 2017. v. 199, n. 4, p. 1393-1404.

AUDOLY, L. P. et al. Identification of specific EP receptors responsible for the hemodynamic effects of PGE₂. *The American Journal of Physiology*, 1999. v. 277, n. 3, p. 924-930.

BAELDER, R. et al. Pharmacological targeting of anaphylatoxin receptors during the effector phase of allergic asthma suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation. *The Journal of Immunology*, 2005. v. 174, n. 2, p. 783-789.

BALDO, C. et al. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and *in situ* hydrolysis. *Plos Tropical Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, p. 1-10. 2010.

BAJIC, G. et al. Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *The EMBO Journal*, 2015. v. 34, n. 22, p. 2735-2758.

BARRAVIERA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. 1^a Ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas, 1999a.

BARRAVIERA, B. **Ofídios, estudo clínico dos acidentes**. 1^a Ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas, 1999b.

BARROS DOS REIS, M. **Investigação sobre as alterações cardíacas que ocorrem no envenenamento pela peçonha do escorpião *Tityus serrulatus***. 2020. 100 f. Tese

(Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2020.

BARROS DOS REIS, M. et al. Interleukin-1 receptor-induced nitric oxide production in the pancreas controls hyperglycemia caused by scorpion envenomation. **Toxins (Basel)**, v. 12, n. 13. 2020.

BARROS, S. F. et al. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 7, p. 339-346. 1998.

BAAS, I. et al. Complement C3 inhibition by compstatin Cp40 prevents intra- and extravascular hemolysis of red blood cells. **Haematologica**, v. 105, n. 2, p. 1-4. 2020.

BATH, M. K.; GOWDA, T. V. Isolation and characterization of a lethal phospholipase A2 (NN-IVb1-PLA2) from the Indian Cobra (*Naja naja naja*) venom. **Biochemistry International**, v. 25, n. 6, p. 1023-1034. 1991.

BAUGHMAN, R. P. et al. Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 147, n. 3, p. 653-657. 1993.

BERTHÉ, R. A. et al. Spitting cobras adjust their venom distribution to target distance. **Journal Comparative Physiology**, 2009. v. 195, n. 8, p. 753-757.

BESTER, J.; PRETORIUS, E. Effects of IL-1 β , IL-6 and IL-8 on erythrocytes, platelets, and clot viscoelasticity. **Scientific Reports Nature**, v. 26, n. 6, p. 1-10. 2016.

BISWAS, P. et al. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. **Blood**, v. 91, n. 1, p. 258-265. 1998.

BITENCOURT, C. S. et al. Hyaluronidase-Loaded PLGA microparticles as a new strategy for the treatment of pulmonary fibrosis. **Tissue Engineering**, v. 21, n. 1/2, p. 246-256. 2015.

BLAYLOCK, R. S. The treatment of snakebite in Zimbabwe. **Central African Journal of Medicine**, 1982. v. 28, n. 10, p. 237-246.

BOHLSON, S. et al. Complement nomenclature- deconvoluted. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 10, p. 1-6. 2019.

BOSMANN, M. et al. Extracellular histones are essential effectors of C5aR and C5L2-mediated tissue damage and inflammation in acute lung injury. **The FASEB Journal**, 2013. v. 27, n. 12, p. 5010-5020.

BOSMANN, M.; WARD, P. A. Protein-based therapies for acute lung injury: targeting neutrophil extracellular traps. **Expert Opinion Therapeutic Targets**, v. 18, n. 6, p. 703-714. 2014.

BOSSI, F. et al. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. **The Journal of Immunology**, 2014. v. 173, n. 11, p. 6921-6927.

BOSTANCI, N. et al. Gingival exudate dynamics implicate inhibition of the alternative complement pathway in the protective action of the inhibitor Cp40 in non-human primate periodontitis. **Journal of Proteome Research**, 2018. v. 17, n. 9, p. 3153-3175.

BOULAY, F. et al. Expression cloning of a receptor for C5a anaphylatoxin on differentiated HL-60 cells. **Biochemistry**, v. 30, n. 12, p. 2993-2999. 1991.

BRAZIL, O. V. Coral snake venom: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 3, p. 119-126. 1987.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Bioquimie**, v. 82, n. 9, p. 851-859. 2000.

BREIVIK, T. et al. Oral treatment with complement factor C5a receptor (CD88) antagonists inhibit experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, 2011. v. 46, n. 6, p. 643-647.

BREKKE, O. L. et al. The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in Escherichia coli- induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. **Journal of Leukocyte Biology**, 2007. v. 81, n. 6, p. 1404-1413.

BREEN, K. A. et al. Complement activation in patients with isolated antiphospholipid antibodies or primary antiphospholipid syndrome. **Blood Coagulation, Fibrinolysis and Cellular Haemostasis**, v. 107, n. 3, p. 423-429. 2012.

BROADLEY, D. G.; WÜSTER, W. A review of the southern African “non spitting” cobras (Serpentes: Elapidae: *Naja*). **African Journal of Herpetology**, 2004. v. 53, n. 2, p. 101-122.

BROWN, G. D. Dectin 1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 1, p. 33-43. 2006.

BULT, H. et al. Formation of prostanoids during intravascular complement activation in the rabbit. **British Journal of Pharmacology**, 1985. v. 84, n. 2, p. 329-336.

BURDON, D. et al. The role of tumor necrosis factor in the development of multiple organ failure in a murine model. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 6. 2000.

BURK, A. M. et al. Early complementopathy after multiple injuries in humans. **Shock**, v. 34, n. 4, p. 348-354. 2012.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ Structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 23, n. 1, p. 1-22. 2009a.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 23, n. 1, p. 1-22. 2009b.

BUTT, Y.; KURDOWSKA, A. Acute lung injury: A clinical and molecular. Review. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 140, n. 4, p. 345-350. 2016.

CABTREE, T. D. et al. Cohort study of fever and leukocytosis as diagnostic and prognostic indicators in infected surgical patients. **World Journal of Surgery**, 2001. v. 25, n. 6, p. 739-744.

CALABRESE, L. H.; ROSE-JOHN, S.; IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. **Reviews Nature Rheumatology**, v. 10, p. 720-727. 2014.

CAMASCHELLA, C. Iron-deficiency anemia. **The new England Journal of Medicine**, 2015. v. 372, n. 19, p. 1832-1843.

CANAVESE, M.; ALTRUDA, F.; SILENGO, L. Therapeutic efficacy and immunological response of CCL5 antagonists in models of contact skin reaction. **PLOS One**, v. 15, n. 5, p. 1-11. 2010.

CARDINAL-FERNÁNDEZ, P. et al. The presence of diffuse alveolar damage on open lung biopsy is associated with mortality in patients with acute respiratory distress syndrome: A systemic review and meta-analysis. **Chest**, v. 149, n. 5, p. 1155-1564. 2016.

CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais peçonhentos no Brasil**. 2^a ed. São Paulo: Editora Sarvier, 2009.

CASSAIS-E-SILVA, L. L.; TEIXEIRA, C. Neurogenic mediators contribute to local edema induced by *Micrurus lemniscatus* venom. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 21, n. 11, p. 1-12. 2017.

CEBINELLI, G. C. M. **Papel dos monócitos inflamatórios na sepse**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia básica e aplicada) - Imunologia básica e aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CENTER FOR RESEARCH IN INFLAMMATORY DISEASES

<<http://www.crid.fmrp.usp.br/institucional/>>

Acesso em 10 de março de 2021.

CERO, C. et al. The TLQP-21 peptide activates the G-protein coupled receptor C3aR via a folding upon binding mechanism. **Science Structure**, v. 22, n. 12, p. 1744-1753. 2014.

CHABOT-RICHARDS, D. S.; GEORGE, T. I. Leukocytosis. **International Journal of Laboratory Hematology**, 2014. v. 36, n. 3, p. 279-288.

CHACUR, M. et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v. 41, n. 6, p. 667-678. 2003.

CHAO, T. H. et al. Role of the second extracellular loop of human C3a receptor in agonist binding and receptor function. **The Journal of Biological Chemistry**, 1999. v. 274, n. 14, p. 9721-9728.

CHAUAN, A. K.; MOORE, T. L. T cell activation by terminal complex of complement and immune complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, 2011. p. 38627-38637.

CHEN, J. Y.; CORTES, C.; FERREIRA, V. P. Properdin: a multifaceted molecule involved in inflammation and diseases. **Molecular Immunology**, v. 102, p. 58-72. 2018.

CHEN, Y. J. et al. Involvement of p38 MAPK- and JNK-modulated expression of Bcl-2 and Bax in *Naja nigricollis* CMS-9 induced apoptosis of human leukemia K562 cells. **Toxicon**, v. 55, p. 1306-1316. 2010.

CHER, C. D. N. et al. Pulmonary inflammation and edema induced by Phospholipase A₂: Global gene analysis on aquaporins and Na⁺/K⁺-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003. v. 278, n. 33, p. 31352-31360.

CHIEN, K. Y. et al. Two distinct types of cardiotoxin as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with zwitterionic phospholipid dispersions. **The Journal of Biological Chemistry**, 1994. v. 269, n. 20, p. 14473-14483.

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.

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.

CHIPPAUX, J. P. Role of antivenoms in the treatment of snake envenomation. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine**, v. 197, n. 5, p. 993-1006. 2013.

CHIPPAUX, J. P.; MASSOUGBODJI, A.; HABIB, A. G.; The WHO strategy for prevention and control of snakebite envenoming a Sub-Saharan Africa plan. **Journal Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, p. 1-6. 2019.

CHOVAIA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation and defense of homeostasis. **Molecular Cell Review**, v. 54, n. 2, p. 281-288. 2014.

CHWETZOFF, S. et al. Evidence that the anti-coagulant and lethal properties of a basic phospholipase A2 from snake venom are unrelated. **FEBS Lett**, 1989a. v. 8, n. 248, p. 1-4.

CHWETZOFF, S. et al. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence,

and biological properties. **The Journal of Biological Chemistry**, 1989b. v. 264, n. 22, p. 13289-13297.

CIRINO, G. et al. A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. **European Journal of Pharmacology**, 1989. v. 166, p. 505- 510.

CLINICAL TOXINOLOGY RESOURCES

<<http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?fuseaction=main.snakes.display&id=SN0231>> Acesso em 10 de março de 2021.

CLISSA, P. B. et al. Importance of jararhagin desintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 591-596. 2006.

COLOM, B. et al. Leukotriene B₄-neutrophil elastase axis drives neutrophil reverse transendothelial cell migration in vivo. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 1075-1086. 2015.

COLÓN, D. F. et al. Q. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate infant sepsis. **Critical Care (England, London)**, v. 23, n. 1, p. 1-13. 2019.

CORTES, C.; FERREIRA, V. P.; PANGBURN, M. K. Native properdin binds to *Chlamydia pneumoniae* and promotes complement activation. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 724-731. 2011.

COSTA DE ALMEIDA, C. M. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 293-301. 2008.

COULTHARD, L. G.; WOODRUFF, T. M. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. **The Journal of Immunology**, v. 194, p. 3541-3548. 2015.

COULTHARD, L. G.; HAWKSWORTH, O. A.; WOODRUFF, T. M. Chapter 36-C3aR. The complement facts book. 2^a ed. Editora Academic Press, 2018.

CRESCENTE, M. et al. Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). **British Journal of Pharmacology**, 2019. v. 176, n. 8, p. 988-999.

CROFT, M.; SIEGEL, R. M. Beyond TNF: TNF superfamily cytokines as target for the treatment of rheumatic diseases. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 13, n. 4, p. 271-233. 2017.

CROKER, D. E. et al. Discovery of functionally selective C5aR2 ligands: novel modulators of C5a signaling. **Immunology and Cell Biology**, 2016. v. 94, n. 8, p. 787-795.

CROSS, L. J. M.; MATTHAY, M. A. Biomarkers in acute lung injury: insights into the pathogenesis of acute lung injury. **Critical Care Clinics**, v. 27, n. 2, p. 355-37. 2011.

- CRUZ-TOPETTE, D.; CIDLOWSKI, J. A. One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, p. 20-32. 2014.
- DAFFERN, P. J. et al. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. **The Journal of Experimental Medicine**, 1995. v. 181, n. 6, 2119-2127.
- DANIEL, C. et al. Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 15, n. 9, p. 559-575. 2019.
- DE ALMEIDA, C. M. C. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 293-301. 2008.
- DELAFONTAINE, M. et al. Venom from *Bothrops lanceolatus*, a snake species native to Martinique, potently activates the complement system. **Journal of Immunology Research**, 2018. P. 1-11.
- DE TONI, L. G. B. et al. Inflammatory mediators involved in the paw edema and hyperalgesia induced by Batroxase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* venom. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 199-207. 2015.
- DELVES, P. J. et al. Fundamentos de Imunologia, 13^a Ed. São Paulo: Grupo Gen: Guanabara Koogan, 2018.
- DENK, S. et al. Complement C5a functions as a master switch for the balance in neutrophils exerting fundamental immunometabolic effects. **The Journal of Immunology**, 2017. v. 198, n. 12, p. 4846-4854.
- DHAR, D. Compartment syndrome following snake bite. **Oman Medical Journal**, 2015. v. 30, n. 2, p. 1-3.
- DI GENNARO, A. et al. Leukotriene B₄- induced changes in vascular permeability are mediated by neutrophil release of heparin-binding protein (HBP/CAP37/azurocidin). **The FASEB Journal**, 2009. v. 23, n. 6, p. 1750-1757.
- DOBÓ, J. et al. Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. **Molecular Immunology**, v. 61, n. 2, p. 68-79. 2014.
- DOBÓ, J. et al. MASP-3 is the exclusive pro-factor D activator in resting blood: the lectin and the alternative complement pathways are fundamentally linked. **Scientific Reports**, v. 6, n. 3, p. 1-12. 2016.
- DOS SANTOS, A. P. C. **Participação da via de sinalização da β -arrestina na produção de óxido nítrico induzido pelo *shear stress***. 2014. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ELSNER, J. et al. C3a activates respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes via pertussis toxin-sensitive G-proteins. **Blood**, v. 83, n. 11, p. 3324-3331. 1994,

EGGERTSEN, G.; LIND, P.; SJÖQUIST, J. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the Indian cobra (*Naja naja siamensis*). **Molecular Immunology**, v. 18, n.2, p. 125-133. 1981.

EKDAHL, K. N. et al. Is generation of C3(H₂O) necessary for activation of the alternative pathway in real life. **Molecular Immunology**, v. 114, p. 353-361. 2019.

EMBER, J. A. et al. Induction of Interleukin-8 synthesis from monocytes by human C5a anaphylatoxin. **American Journal of Pathology**, 1994. v. 144, n.2, p. 393-403.

ENGELBRECHT, A. Management of common animal bites in the emergency centre: The most common animal bites to present in emergencies are dog and snake bites. **Continuing Medical Education**, v. 30, n. 11, p. 401-406. 2012.

ERIKSSON, O. et al. The human platelet as an innate immune cell: interactions between activated platelets and the complement system. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 1590, p. 1-16. 2019.

EWING, C. B. The action of rattlesnake venom upon the bactericidal power of the blood serum. **The New England Journal of Medicine**, 1894. v. 130, p. 487-490.

FALCÃO, D. A. et al. Deficiency of the human complement regulatory protein factor H associated with low levels of component C9. **Clinical Immunology**, v. 68, n. 4, p. 445-455. 2008.

FARSKY, S.H.P. et al. *Bothrops asper* snake venom and metalloproteinase Bap-1 activate the complement system. Role in leukocyte recruitment. **Mediators Inflammation**, v. 9, p. 213-221., 2000.

FARZAN, M. et al. Sulfated tyrosines contribute to the formation of the C5a docking site of the human C5a anaphylatoxin receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, 2001. v. 193, n. 9, p. 1059-1066.

FERRAZ, C. R. et al. Multifunctional toxins in snake venoms and therapeutic implications: from pain to hemorrhage and necrosis. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 7, p. 1-19. 2019.

FINNEY, P.J. **Probit Analysis**. 3 rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333.

FISCHER, W. H.; JAGELS, M. A.; HUGLI, T. E. Regulation of IL-6 synthesis in human peripheral blood mononuclear cells by C3a and C3a desArg. **The Journal of Immunology**, 1999. v. 162, n. 1, p. 453-459.

FLEXNER, S.; NOGUSHI, H. Snake venom on relation to hemolysis, bacteriolysis and toxicity. **Journal of Experimental Medicine**, 1902. v. 6, p. 277-301.

- FLIERL, M. A. et al. The complement anaphylatoxin C5a induces apoptosis in adrenomedullary cells during experimental sepsis. **PLOS One**, v. 3, n. 7, p. 1-7.2008.
- FONSECA, M. I. et al. Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. **The Journal of Immunology**, 2009. v. 183, n. 2, p. 1375-1383.
- FREELEY, S.; KEMPER, C.; LE FRIEC, G. The ins and outs of complement-driven immune responses. **Immunological Reviews**, v. 274, n. 1, p. 16-32. 2016.
- FREITAS-DE-SOUSA, L. et al. Insights into the mechanisms involved in strong hemorrhage and dermonecrosis induced by Atroxlysin-Ia, a PI-Class Snake Venom Metalloproteinase. **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 8, p. 1- 20. (2017).
- FRIEDMAN, E. A. et al. Understanding the role of prostaglandin E₂ in regulating human platelet activity in health and disease. **Thrombosis Research**, v. 136, n. 3, p. 493-503. 2015.
- FRINK, M. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 influences trauma-hemorrhage-induced distal organ damage via regulation of keratinocyte-derived chemokine production. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and comparative physiology**, 2006. v. 292, n. 3, p. 1110-1116.
- FROMELL, K. et al. Assessment of the role of C3(H₂O) in the alternative pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1-13. 2020.
- FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature**, v. 2, p. 346-353. 2000.
- FUKOA, Y. et al. Generation of anaphylatoxins by human β -Tryptase from C3, C4 and C5. **The Journal of Immunology**, 2008. v. 180, n. 9, p. 6307-6316.
- FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 8, n. 15, p. 551-567. 2016.
- GAINARU, G. et al. Increase in inflammatory and CD14^{dim}/CD16^{pos}/CD45^{pos} patrolling monocytes in sepsis: correlation with final outcome. **Critical Care (London, England)**, v. 21, n. 1, p. 1-9. 2019.
- GALLAGHER, P. et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in pro-inflammatory pathogenesis: in vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Archives of biochemistry and biophysics**, 2005. n. 441, v. 1, p. 1-15.
- GANTER, M. T. et al. Role of the alternative pathway activation in the early complement activation following major trauma. **Shock**, v. 28, n. 1, p. 29-34. 2007.
- GAO, J. et al. Sulfation of tyrosine 174 in the human C3a receptor is essential for binding of C3a anaphylatoxin. **The Journal of Biological Chemistry**, 2003. v. 278, n. 36, p. 37902-37908.

GARRED, P.; GENSTER, N.; PILELY, K.; BAYARRI-OLMOS, R.; ROSBJERG, A.; MA, Y. J.; SKJOEDT, M. O. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. **Immunological Reviews**. 2016. v. 274, n. 1, p. 74–97.

GERARD, N. P.; GERARD, C. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. **Nature**, v. 349, p. 614-617. 1991.

GIANNOTTI, K. C. et al. A Lys49 phospholipase A2, isolated from *Bothrops asper* venom, induces lipid droplet formation in macrophages which depends on distinct signaling pathways and the C-terminal region. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14. 2013.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase by plant-derived bioactive components and polysaccharides. **Biochemistry**, v. 70, n. 8, p. 1145-1150. 2005.

GOLD, B. S.; DART, R. C.; BARISH, R. A. Bites of venomous snakes. **The New England Journal of Medicine**, 2002. n. 5, p. 347-356.

GOLDSMITH, Z. G.; DHANASEKARAN, D. N. G protein regulation of MAPK networks. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3122-3142. 2007.

GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. Toxinology: Snake Venoms. 1^a Ed. Suíça: Editora Springer. 2017.

GORELIK, A. et al. Serping1/C1 inhibitor affects cortical development in a cell autonomous and non-cell autonomous manner. **Frontiers in Cellular Neurosciences**, v. 11, p. 1-14. 2017.

GUGLIETTA, S. et al. Coagulation induced by C3aR-dependent NETosis drives protumorigenic neutrophils during small intestinal tumorigenesis. **Nature Communications**, v. 21, p. 1-14. 2016.

GULATI, G. et al. International normalized ratio versus plasma levels of coagulation factors in patients on vitamin K antagonist therapy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 4, p. 490-494. 2011.

GULBINS, E. et al. Effects of rC5a on the circulation of normal and split hydronephrotic rat kidneys. **The American Journal of Physiology**, 1993. v. 265, n. 1, p. 96-103.

GÜNTER, A. et al. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 1996. v. 153, n. 1, p. 176-184.

GUO, R. F. et al. In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, 2006. v. 80, n. 6, p. 1575-1583.

GUSTAVSEN, A. et al. Combined inhibition of complement and CD14 attenuates bacteria-induced inflammation in human whole blood more efficiently than

antagonizing the toll-like receptor 4-MD2 complex. **The Journal of Infectious Diseases**, 2016. v. 214, n. 1, p. 140-150.

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

GUTIÉRREZ, J. M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones em américa latina. **Revista de Biología Tropical**, v. 50, n. 2, p. 377-394. 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **Plos Medicine**, v. 3, n. 6, p. 727-731. 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. **Bull World Health Organ**, v. 92, n. 7, p. 526-532. 2014.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. **Nature Reviews. Diseases Primers**, v. 3, p. 1-21. 2017.

HALILU, S. et al. Snakebite burden in Sub-Saharan Africa: estimates from 41 countries. **Toxicon**, v. 159, p. 1-4. 2019.

HAN, S.; MALLAMPALLI, R. K. The acute respiratory distress syndrome: from mechanisms to translation. **Journal of Immunology**, 2015. v. 194, n. 3, p. 885-860.

HARPER, C.; FRY, B. G. Anaphylaxis and the venomous keeper: What do you know. <<http://www.venomousreptiles.org/articles/97>> Acesso em 10 de março de 2021.

HARRISON, R. A. The properdin pathway: an “alternative activation pathway” or a “critical amplification loop” for C3 and C5 activation? **Seminars in Immunopathology**, v. 40, p. 15-35. 2018.

HAWKSWORTH, O. A. et al. New concepts on the therapeutic control of complement anaphylatoxin receptors. **Molecular Immunology**, v. 89, p. 36–43. 2017.

HENRIKSEN, M. L. et al. Characterization of the interaction between collectin 11 (CL-11, CL-K1) and nucleic acids. **Molecular Immunology**, v. 56, n. 4, p. 757–767. 2013.

HÉJA, D. et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. **PNAS**, v. 109, n. 26, p. 10498–10503. 2012.

HERRMANN, J. B. et al. Complement C5a receptor 1 exacerbates the pathophysiology of *N. meningitidis* sepsis and is a potential target for disease treatment. **mBio**, 2018. v. 9, n. 1, p. 1-17.

HERRERA, C. et al. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII metalloproteinases: Clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. **Plos Tropical Neglected Diseases**, v. 9, n. 4. p. 1-20. 2015.

HEUS, F. et al. An efficient analytical platform for on-line microfluidic profiling of neuroactive snake venoms towards nicotinic receptor affinity. **Toxicon**, v. 61, p. 112-124. 2013.

HIGGINBOTTOM, A. et al. Comparative agonist/antagonist responses in mutant human C5a receptors define the ligand binding site. **The Journal of Biological Chemistry**, 2005. v. 280, n. 8, p. 17831-17840.

HOILAND, I. I. et al. Complement activation assessed by the plasma terminal complement complex and future risk of venous thromboembolism. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2019. v. 17, n. 6, p. 934-943.

HOTTZ, E. D. et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. **Blood**, v. 136, n. 11, p. 1330-1341. 2020.

HRISTOVSKA, A. M. et al. Prostaglandin E2 induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase. **Hypertension**, v. 50, n. 3, p. 525-530. 2007.

HUBER-LANG, M. et al. Generation of C5a by phagocytic cells. **American Journal of Pathology**, 2002. v. 161, n. 5, p. 1849-1859.

HUGHES, K. T.; BEASLEY, M. B. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 141, n. 7, p. 916-922. 2017.

HUGHES, C. E.; NIBBIS, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **The FEBS Journal**, 2018. v. 285, n. 16, p. 2944-2971.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 a keystone cytokine in health and disease. **Reviews Nature Immunology**, v. 16, n. 5, p. 448-457. 2015.

HÜTTENRAUCH, F.; POLLOK-KOPP, B.; OPPERMAN, M. G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers. **The Journal of Biological Chemistry**, 2005. v. 280, n. 45, p. 37503-37515.

IPPEL, J. H. et al. Structure of the tyrosine sulfated C5a receptor N terminus in complex with chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Biological Chemistry**, 2009. v. 284, n. 18, p. 12363-12372.

INOUE, G. Effect of interleukin-10 (IL-10) on experimental LPS-induced acute lung injury. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2000. v. 6, n. 1, p. 51-60.

IRMSCHER, S. et al. Kallikrein cleaves C3 and activates complement. **Journal of**

Innate Immunity, 2018. v. 10, n. 2, p. 94-105.

JACOB, A. et al. C5a/CD88 signaling alters blood-brain barrier integrity in lupus through nuclear factor- κ B. **Journal of Neurochemistry**, 2011. v. 119, n. 5, p. 1041-1051.

JAGELS, M. A.; HUGLI, T. E. Neutrophils chemotactic factors promote leukocytosis. A common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. **The Journal of Immunology**, 1992, v. 148, p. 1119-1128.

JAGELS, M. A.; DAFFERN, P. J.; HUGLI, T. E. C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. **Immunopharmacology**, v. 46, n. 3, p. 209-222. 2000.

JAIN, U.; WOODRUFF, T. M.; STADNYK, A. W. The C5a receptor antagonist PMX205 ameliorates experimentally induced colitis associated with increases IL-4 e IL-10. **British Journal of Pharmacology**, 2012, v. 168, p. 488-501.

JANG, Y.; KIM, M.; HWANG, S. W. Molecular mechanisms underlying the actions of arachidonic acid-derived prostaglandins on peripheral nociception. **Journal of Neuroinflammation**, 2020. v. 17, n. 1, p. 1-27.

JI, M.; LU, Y.; ZHAO, C.; GAO, W.; HE, F.; ZHANG, J.; ZHAO, D.; QIU, W.; WANG, Y. C5a induces the synthesis of IL-6 and TNF- α in rat through MAPK signaling pathways. **Plos One**, v. 11, n. 9, p. 1-11. 2016

JIANG, D. et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. **Nature Medicine**, v. 11, n. 11, p. 1173-1179. 2005.

JIMENEZ, M. F. et al. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. **Archives of surgery**, v. 132, n. 12, p. 1263-1269. 1997.

JOINER, K. A.; HAWIGER, A.; GELFAND, J. A. A study of optimal conditions for an assay of the human alternative complement pathway. **American Journal Clinical of Pathology**, 1983. v. 79, n. 1, p. 65-72.

JONES, S. A.; JENKINS, B. J. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature Reviews*. **Immunology**, v. 18, n. 12, p. 773-789. 2018.

JORCH, S. K.; KUBES, P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. **Nature Reviews. Medicine**, v. 23, n. 3, p. 279-287. 2017.

JOUBERT, F. J. The amino acid sequences of three toxins (CM-10, CM-12 and CM-14) from *Naja haje annulifera* (Egyptian Cobra) venom. **Snake Venom Toxins**, v. 356, n. 1, p. 53-72. 1975a.

JOUBERT, F. J. The amino acid sequences of toxin V^{II}2, a cytotoxin homologue from banded egyptian cobra (*Naja haje annulifera*) venom. **Snake Venom Toxins**, v. 356, n. 1, p. 1893- 1900. 1975b.

JOUBERT, F. J. The purification and amino acid sequence of toxin CM-13b from *Naja haje annulifera* (Egyptian Cobra) venom. **Snake Venom Toxins**, v. 356, n. 1, p. 1901-1908. 1975c.

JOUBERT, F. J. The amino acid sequences of three toxins (CM-8, CM-11 and CM-13a) from *Naja haje annulifera* (Egyptian Cobra) venom. **European Journal of Biochemistry**, 1976. v. 64, n. 1, p. 219- 232.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **The FEBS Journal**, v. 228, n. 23, p. 4544-4576. 2011.

KANSE, S. M. et al. Factor VII-activating protease is activated in multiple trauma patients and generates anaphylatoxin C5a. **The Journal of Immunology**, 2012. v. 188, n. 6, p. 188-186.

KAJITA, T.; HUGLI, T. E. C5a-induced neutrophilia. A primary humoral mechanism for recruitment of neutrophils. **American Journal of Pathology**, 1990. v. 137, n. 2, p. 467-477.

KALLIOLAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 1, p. 49-62. 2016.

KAMBAS, K. et al. C5a and TNF- α up-regulate the expression of tissue factor in intra-alveolar neutrophils of patients with acute respiratory distress syndrome. **Journal of Immunology**, 2008. v. 180, n. 11, p. 7368-7375.

KARASU, E. et al. Targeting complement pathways in polytrauma- and sepsis-induced multiple-organ dysfunction. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-14. 2019.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **Plos Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591-1604. 2008.

KATKAR, G. D. et al. NETosis and lack of DNase activity are key factors in *Echis carinatus* venom-induced tissue destruction. **Nature Communications**, v. 7, n. 11361, p. 1-13.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, n. 1, p. 7-12. 2005.

KEMPER, C. et al. The complement protein properdin binds to apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9023-9028. 2008.

KERKOVITS, N. M. et al. Anaphylatoxin C3a induces vasoconstriction and hypertension mediated by thromboxane A₂ in mice. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, 2019. v. 33, n, 1.

KESHARI, R. S. et al. Inhibition of complement C5 protects against organ failure and reduces mortality in a baboon model of Escherichia coli sepsis. **PNAS**, v. 134, n. 31, p. 6630-6399. 2017.

KIM, S. Y.; SON, M. et al. High-Mobility Group Box 1-Induced Complement Activation Causes Sterile Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 705, p. 1-15. 2018.

KIM, H.; CONWAY, E. M. Platelets and complement crosstalk in early atherogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 6, p. 1-11. 2019.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBOURNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

KLERX, J. P. et al. Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. **Journal of Immunological Methods**, 1983. v. 14, n. 62, p. 215-220.

KIBAYASHI, K. et al. Thromboxane A₂ exacerbates acute lung injury via promoting edema formation. **Scientific Reports Nature**, v. 26, n. 6, p. 1-12.

KIRSCHFINK, M.; MOLLNES, T. E. Modern complement analysis. **Clinical and Diagnostic Immunology**, v. 10, n. 6, p. 982-989. 2003.

KOEN, T. L.; WILLIAMS, D. Snake antivenoms in southern Africa. **More About Rural Health**, v. 29, n. 2, p. 75-79. 2011.

KOGA, M. M. et al. Boosting adaptive immunity: a new role for PAFR antagonists. **Scientific Reports**, v. 6, n. 39146, p. 1-9. 2016.

KOLAR, S. L. et al. Group B Streptococcus evades host immunity by degrading hyaluronan. **Cell Host Microbe**, v. 18, n. 6, p. 694-704. 2015.

KONSHINA, A. G. et al. Snake cytotoxins bind to membranes via interactions with phosphatidylserine head groups of lipids. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. 1-13. 2011.

KOLEV, M. et al. Complement regulates nutrient influx and metabolic reprogramming during Th1 cell responses. **Immunity**, v. 42, n. 6, p. 1033-1047. 2015.

KOTIMAA, J. P. et al. Functional assessment of mouse complement pathway activities and quantification of C3b/C3c/iC3b in an experimental model of mouse renal ischemia/reperfusion injury. **Journal of Immunological Methods**, 2015. v. 419, p. 25-34.

KRISHNAN, V. et al. The crystal structure of Cobra Venom Factor, a cofactor for C3- and C5-convertase CVFBb. **Cell Press**, v. 17, n. 15, p. 611-619. 2009.

- KUMAR, V. et al. Preclinical pharmacokinetics of complement C5a Receptor antagonists PMX53 and PMX205 in mice. **ACS Omega**, v. 5, n. 5, p. 2345-2354. 2020.
- KYEREMANTENG, K. et al. Compartment syndrome as a result of systemic capillary leak syndrome. **Case Reports in Critical Care**. p. 1-4. 2016.
- LACHMANN, P. J. The amplification loop of the complement pathways. **Advances in Immunology**, v. 104, p. 115-149. 2009.
- LACKNER, I. et al. Complement activation and organ damage after trauma-differential immune response based on surgical treatment strategy. **Frontiers in Immunology**, v. 31, n. 11, p. 1-14. 2020.
- LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680. 1980.
- LAING, G. D. et al. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **European Journal of Immunology**, 2003. v. 33, n. 12, p. 3458-3463.
- LANGHORN, R. et al. Myocardial injury in dogs with snake envenomation and its relation to systemic inflammation. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 2013. p. 1006-1010.
- LAUDISI, F. et al. Cutting edge: The NLRP3 inflammasome links complement-mediated inflammation and IL-1 β release. **The Journal of Immunology**, 2013. v. 191, n. 8, p. 1006-1010.
- LAUMONNIER, Y.; KARSTEN, C. M.; KÖHL, J. Novel insights into the expression pattern of anaphylatoxin receptor in mice and man. **Molecular Immunology**, v. 89, p. 44-58. 2017.
- LAURIDSEN, L. P.; LAUSTSEN, A. H.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Exploring the venom of the forest cobra snake: Toxicovenomics and antivenom profiling of *Naja melanoleuca*. **Journal of Proteomic Research**, 2017. v. 150, p. 98-108.
- LAUSTSEN, A. H. et al. Snake venomomics of monocled cobra (*Naja kaouthia*) and investigation of human IgG response against venom toxins. **Toxicon**, v. 99, p. 23-35. 2015.
- LEE, E. K. S. et al. Leukotriene B₄- mediated neutrophil recruitment causes pulmonary capillaritis during lethal fungal sepsis. **Cell Host & Microbe**, v. 23, n. 1, p. 121-133. 2018.
- LEE, J. D. et al. Pharmacological inhibition of complement C5a-C5a₁ receptor signalling ameliorates disease pathology in the hSOD1^{G93A} mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **British Journal of Pharmacology**, 2017. v. 174, n. 8, p. 689-699.

LEE, J. D.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M. Is the C3a receptor antagonist a useful pharmacological tool? **British Journal of Pharmacology**, 2020. v. 177, n. 24, p. 5677-5678.

LEIGUEZ, E. et al. A group IIA-secreted phospholipase A2 from snake venom induces lipid body formation in macrophages: the roles of intracellular phospholipases A2 and distinct signaling pathways. **Journal of Leukocyte Biology**, 2011. v. 90, n. 1, p. 155-166.

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.

LENDAK, D. et al. Complement component consumption in sepsis correlates better with hemostatic system parameters than with inflammatory biomarkers. **Thrombosis Research**, 2018, n. 170, p. 126-132.

LEY, K. et al. Neutrophils: new insights and open questions. **Science Immunology Review**, v. 3, n. 30, p. 1-14. 2018.

LI, H-D. et al. Exogenous interleukin-10 attenuates hyperoxia-induced acute lung injury. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 3, p. 331-340. 2015.

LI, X. X. et al. The complement receptor C5aR2: A powerful modulator of innate and adaptive immunity. **The Journal of Immunology**, 2019. v. 202, n. 12, p. 3339-3348.

LI, X. X.; CLARK, R. J.; WOODRUFF, T. M. C5aR2 activation broadly modulates the signaling and functions of primary human macrophages. **The Journal of Immunology**, 2020. v. 204, n. 5, p. 1102-1112.

LI, Y. et al. Early complementopathy predicts the outcomes of patients with trauma. **Trauma Surgery & Acute Care Open**, v. 4, n. 1, p. 1-6. 2019.

LIBERALE, L. et al. Interleukin-1 β mediates arterial thrombus formation via NET-associated tissue factor. **Journal of Clinical Medicine**, 2019. v. 8, n. 12, p. 1-15.

LIN, W. C. et al. Prediction of outcome in patients with acute respiratory distress syndrome by bronchoalveolar lavage inflammatory mediators. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 1, p. 57-65. 2010.

LIU, C. C. et al. Analysis of the efficacy of Taiwanese freeze-dried neurotoxic antivenom against *Naja kaouthia*, *Naja siamensis* and *Ophiophagus hannah* through proteomics and animal model approaches. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1-20. 2017.

LIZEWSKI, M. K. et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. **Immunity**, v. 39, n. 6, p.1143-1157. 2013.

- LO, M. W.; WOODRUFF, T. M. Review: Complement: Bridging the innate and adaptive immune systems in sterile inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, 2020. p. 1-13.
- LOBETTI, R. G.; JOUBERT, K. Retrospective study of snake envenomation in 155 dogs from the onderstepoort area of south Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, 2004. v. 75, n. 4, p. 169-172.
- LOHMAN, R. J. Exploiting a novel conformational switch to control innate immunity mediated by complement protein C3a. **Nature Communications**, v. 24, n.8, p. 1-15. 2017.
- LOOS, M.; CLAS, F.; FISCHER, W. Interaction of purified lipoteichoic acid with classical complement pathway. **Infection and Immunity**, 1986. v. 53, n.3, p. 595-599.
- LOPES, D. S. et al. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 42-49. 2009.
- LÓPEZ-COTARELO, P. et al. Beyond Chemoattraction: Multifunctionality of chemokine receptor in leukocytes. **Trends in Immunology Cell Press**, v. 38, n. 12, p. 927-941. 2017.
- LOUREIRO, L. C. et al. Pulmonary surfactant phosphatidylcholines induce immunological adaptation of alveolar macrophages. **Molecular Immunology**, v. 30, n. 122, p. 163-172. 2020.
- LUCAS, S. The pharmacology of indomethacin. **Headache: The Journal of Head and Face Pain**, v. 56, n. 2, p. 436-446. 2016.
- LUCHINI, L. S. G. et al. Complement system inhibition modulates the pro-inflammatory effects of a snake venom metalloproteinase. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1137, p. 1-11. 2019.
- LV, D. et al. CCL5 as a potential immunotherapeutic target in triple-negative breast cancer. **Nature Cellular & Molecular Immunology**, v. 10, n. 4, p. 303-310. 2013.
- LYNCH, D. T.; HALL, J.; FOUCHAR, H. How investigate monocytosis. **International Journal of Laboratory Hematology**, 2018. v. 40, n. 2 p. 107-114.
- MA, W. T.; GAO, F.; GU, K.; CHEN, D. K. The role of monocyte and macrophages in autoimmune diseases: a comprehensive review. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-24. 2019.
- MA, Y. et al. Antitumor activity of mannan-binding protein in vivo as revealed by a virus expression system: mannan-binding protein dependent cell-mediated cytotoxicity. **PNAS**, v. 96, n. 2, p. 371-375. 1999.
- MACHLUS, K. R. et al. CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 921-926. 2016.

- MAKRIS, G. et al. The hyaluronate lyase of *Staphylococcus aureus*- A virulence factor? **Microbiology**, v. 150, n. 6, p. 205-213. 2004.
- MALAVIYA, R.; LASKIN, J. D.; LASKIN, D. L. Anti-TNF- α in inflammatory lung diseases. **Pharmacology and therapeutics**, v.180, p. 90-98. 2017.
- MANCINI, J. A. et al. 5-Lipoxygenase-activating protein is the target of a novel hybrid of two classes of leukotriene biosynthesis inhibitors. **Molecular Pharmacology**, v. 41, n.2, p. 267-272. 1992.
- MARKIEWISKI, M. M.; DE ANGELIS, R. A.; LAMBRIS, J. D. Complexity of complement activation in sepsis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2008. v. 12, n. 6, p. 2245-2254.
- MARKIEWISKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **The American Journal of Pathology**, 2007. v. 171, n. 3, p. 715-727.
- MARLEAU, S. et al. Role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit. **The Journal of Immunology**, 1999. v. 163, n. 6, p. 3449-3458.
- MATHIEU, M. C. et al. The C3a receptor antagonist SB290157 has agonistic activity. **Immunology Letters**, v. 100, n. 2, p. 139-145. 2005.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 7, n. 1, p. 146-156. 2000.
- MATSUMOTO, H. et al. The clinical importance of a cytokine network in the acute phase of sepsis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11. 2018.
- MATTHAAY, M. A. et al. Acute respiratory distress syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 1-22. 2019.
- MAZHARIAN, A. et al. Protease-activating receptor-4 induces full platelet spreading on a fibrinogen matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca²⁺ mobilization. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007. v. 282, n. 8, p. 5478-5487.
- MCCORMACK, F. X. Surfactant protein A predicts survival in idiopathic pulmonary fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 1995. v. 152, n. 2, p. 751-759.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 428-435. 2008.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New advances of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776. 2010.

- MEGALE, A. 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. 38, p. 1-11. 2019.
- MEHTA, P. et al. Leukotrienes potentiate the effects of epinephrine and thrombin on human platelet aggregation. **Thrombosis Research**, v. 41, n. 5, p. 731-738. 1986.
- MENALDO, D. L. et al. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from *Bothrops atrox* venom. **Molecular Immunology**, v. 85, p. 238-247. 2017.
- MONK, P. N. et al. Function, structure, and therapeutic potential of complement C5a receptors. **British Journal of Pharmacology**, 2007. v. 152, n. 4, p. 429-448.
- MOUCLIS, V. D.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ catalysis and lipid mediator lipidomics. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular and cell biology of lipids**, v. 1864, n. 6, p. 766-771. 2019.
- MÉNDEZ, I et al. Comparative study of the cytolytic activity of snake venoms African spitting cobras (*Naja* spp., Elapidae) and its neutralization by a polyspecific antivenom. **Toxicon**, v. 58, n. 7, p. 558- 564. 2011.
- METZ, M. et al. Mast cell enhance resistance to snake and honeybee venoms. **Science**, v. 28, n. 313, p. 526-530.
- MICHAILIDOU, I. et al. Systemic inhibition of the membrane attack complex impedes neuroinflammation in chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 6, n. 1, p. 2-17.
- MIKOLAJCZYK, T. P. et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. **The FASEB Journal**, 2016. v. 30, n. 5, p. 1987-1999.
- MITRAKUL, C. et a. Clinical features of neurotoxic snake bite and response to antivenom in 47 children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1984. v. 33, n. 6, p. 1256-1266.
- MIYABE, Y. et al. Complement C5a receptor is the key initiator of neutrophil adhesion igniting immune complex-induced arthritis. **Science Immunology**, v. 2, n. 7, p. 1-14. 2017.
- MODI, S. Study of complement activation, C3 and interleukin-6 levels in burn patients and their role as prognostic markers. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 2014. v. 32, n. 2, p. 137-142.
- MOLLNES, T. E. et al. Essential role of the C5a receptor in *E. coli*-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. **Blood**, v. 100, n. 5, p. 1869-1877. 2002.

- MONZAVI, S. M. et al. Analysis of effectiveness of Iranian snake antivenom on viper venom induced effects including analysis of immunologic biomarkers in the *Echis carinatus sochureki* envenomed victims. **Toxicon**, v. 158, p. 38-46. 2019.
- MORA-OBANDO, D. et al. Role of enzymatic activity in muscle damage and cytotoxicity induced by *Bothrops asper* Asp49 phospholipase A₂ myotoxins: are there additional effector mechanisms involved? **PeerJ Life & Environment**, v. 16, n. 2, p. 1-16. 2014.
- MOREIRA, V. et al. A phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in culture: expression of cyclooxygenase-2 and PGE₂ biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 288-296. 2011.
- MOREIRA, V. et al. A catalytically inactive snake venom Lys49 phospholipase A₂ homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signaling pathway in macrophages. **European Journal of Pharmacology**, 2013. v. 708, n. 3, p. 68-79.
- MORGAN, E. L. The role of prostaglandins in C3a-mediated suppression of human in vitro polyclonal antibody responses. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 44, n. 1, p. 1-11. 1987.
- MORGAN, B. P. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. **Immunobiology**, v. 221, n. 6, p. 1-5. 2015.
- MORGAN, B. P. et al. Terminal complexes of the complement system: new structural insights and their relevance to function. **Immunological Reviews**, v. 274, p. 141-151. 2016.
- MORGAN, B. P.; BOYD, C.; BUBECK, D. Molecular cell biology of complement membrane attack. **Seminars in cell & developmental biology**. v. 172, p. 124-132. 2017.
- MORGANROTH, M. L. et al. Eicosanoid are involved in the permeability changes but not the pulmonary hypertension after systemic activation of complement. **Laboratory Investigation**, 1988. v. 58, n. 3, p. 316-323.
- MORIKIS, D.; LAMBRIS, J. D. **Structural biology of the complement system**. New York: Taylor and Francis Group, 2005.
- MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal Biochemical**, v. 117, n. 2, p. 307-310. 1980.
- MORTENSEN, S. A. et al. Endogenous natural complement inhibitor regulates cardiac development. **The Journal of Immunology**, 2017. v. 198, n. 8, p. 3118-3126.
- MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinase: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**, 1996. v. 26, n. 9, p. 2000-2005.

- MUENSTERMANN, M. et al. Distinct roles of the anaphylatoxin receptors C3aR, C5aR1 and C5aR2 in experimental meningococcal infections. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 677-694.
- MULLIGAN, M. S. et al. Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. **The Journal of Clinical Investigation**, 1996. v. 98, n. 2, p. 503-512.
- MÜLLER-EBERHARD, H. J.; FJELLSTROM, K. E. Isolation of the anti-complementary protein from cobra venom and its mode action on C3. **Journal of Immunology**, 1972. v. 6, n. 107, p. 1666-1672.
- MUNAWAR, A.; ALI, S. A.; AKREM, A.; BETZEL, C. Snake venom peptides: Tools of biodiscovery. **Toxins (Basel) Review**, v. 14, n. 10, p. 1-29. 2018.
- MUÑOZ, L. E. et al. Neutrophil extracellular traps initiate gallstone formation. **Immunity**, v. 5, n. 3, p. 443-450. 2019.
- MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NABIZADEH, J. A. et al. The complement C3a receptor contributes to melanoma tumorigenesis by inhibiting neutrophil and CD4+ T cell responses. **The Journal of Immunology**, 2016. v. 196, n. 11, p. 4783-4792.
- NAGEL, S. S. et al. Hemostatic analysis of dogs naturally envenomed by the African Puffadder (*Bitis arietans*) and Snouted Cobra (*Naja annulifera*). **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 2014. v. 24, n. 6, p. 662-671.
- NAKAGAWA, H. et al. Inverse correlation between serum interleukin-6 and iron levels among Japanese adults: a cross-sectional study. **BCM Hematology**, v. 14, n. 1, p. 14-16. 2014.
- NAKAMURA, Y. et al. Snake venom rhodocytin induces plasma extravasation via toxin-mediated interactions between platelets and mast cells. **Scientific Reports-Nature**, v. 4, n. 1, p. 1-15. 2019
- NASCIMENTO, N. G. et al. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343-352. 2010.
- NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **The Journal of Clinical Investigation**, 2004. v. 113, n. 9, p. 1271-1276.
- NIYONZIMA, N. et al. The intracellular C5 system is critical to DAMP sensing and cellular responses in human monocytes. **The Journal of Immunology**, 2017. v. 198, n. 1, p. 75-78.

- NOGUCHI-SASAKI, M. et al. Treatment with anti-IL-6 receptor antibody prevented increase in serum hepcidin levels and improved anemia in mice inoculated with IL-6 producing lung carcinoma cells. **BCM Cancer**, v. 16, n. 270, p. 1-11. 2016.
- NOAH, W. P.; MEDZHITOV, R. Role of the inflammasome in defense against venoms. **PNAS**, v. 110, n. 5, p. 1809-1814. 2013.
- OHNO, M. et al. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. **Molecular Immunology**, v. 37, n. 8, p. 407-412. 2000.
- OLIVO, R. A. et al. Role Cyclooxygenases in oedema-forming activity of Bothropic venom. **Toxicon**, v. 49, n.5, p. 670-677. 2006.
- OKIN, D.; MEDZHITOV R. Evolution of inflammatory diseases. **Current Biology-Cell Press**, v. 22, n. 17, p. 733-740. 2012.
- OAK, N. R.; ABRAMS, R. A. Compartment Syndrome of the Hand. **Orthopedic Clinics of North America**, n. 47, p. 609–616. 2016.
- OPPERMANN, M.; GÖTZE, O. Plasma clearance of the human C5a anaphylatoxin by binding to leukocyte C5a receptors. **Immunology**, v. 82, n. 4, p. 516-521. 1994.
- OSAKA, M. et al. Critical role of the C5a-activated neutrophils in high-fat diet-induced vascular inflammation. **Scientific Reports Nature**, v. 19, n. 6, p. 1-11.
- OSIPOV, A. L. et al. The first representative of glycosylated three-fingered toxins: Cytotoxin from *Naja kaouthia* venom. **The FEBS Journal**, 2004. v. 271, n. 10, p. 2018-2027.
- OSIPOV, A. L. et al. *Naja melanoleuca* cobra venom contains two forms of complement-depleting factor (CVF). **Toxicon**, v. 46, n.4, p. 394-403. 2005.
- OSTHOFF, G. Differing stabilities of snake venom cardiotoxins in acidic aqueous acetronile. **International Journal Biochemistry**, 1990. v. 22, n. 1. p. 7-9.
- OVSTEBO, R. et al. Microparticle-associated tissue factor activity is reduced by inhibition of complement protein 5 in *Neisseria meningitidis*-exposed whole blood. **Innate Immunity**, v. 20, n. 5, p. 552-560. 2014.
- PALANIYAR, N. et al. Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. **The Journal of Biological Chemistry**. 2004. v. 279, n. 31, p. 32728–32736.
- PAN, H. et al. Anaphylatoxin C5a contributes to the pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity. **American Journal of Physiology, Renal Physiology**, 2009. v. 296, n. 3, p. 496-504.
- PEASE, J. E.; BARKER, M. D. N-linked glycosylation of the C5a receptor. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 31, n. 4, p. 719-726. 1993.

PEERSCHKE, E. I. B.; GHEBREHIWET, B. cC1qR and gC1qR/p33: Observations in cancer. **Molecular Immunology**, v. 61, n. 2, p. 100-109. 2014.

PERIANAYAGAM, M. C. et al. C5a delays apoptosis of human neutrophils by a phosphatidylinositol 3-kinase-signaling pathway. **Kidney International**, v. 61, n. 2, p. 456-463. 2002.

PERIANAYAGAM, M. C. et al. CREB transcription factor modulates Bcl2 transcription in response to C5a in HL-60-derived neutrophils. **European Journal of Clinical Investigation**, 2006. v. 36, n. 5, p. 353-361.

PERKINS, S. J. et al. Structural homologies of component C5 of human complement with components C3 and C4 by neutron scattering. **Biochemistry**, 1989. v. 29, n. 5, p. 175-180.

PETERSEN, S. V. et al. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. **Journal of Immunological Methods**, 2001, v. 257, n. 2, p. 107-116.

PETRAS, D. et al. Snake venomomics of African spitting cobras: toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the pan-African echitab-plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. **Journal of Proteome Research**, 2010. v. 10, n. 3, p. 1266-1280.

PETRICEVICH, V. L. et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1253-1266. 2000.

PFIZER. Burden of disease: Chronic inflammation and inflammatory disease. <https://pfe-pfizercom-prod.s3.amazonaws.com/health/VOM_Chronic_Inflammation_and_Inflammatory_Diseases.pdf> Acesso em 18 de março de 2021.

PHILLIPS, M. A. et al. No evidence for proteolytic venom resistance in southern African ground squirrels. **Toxicon**, v. 60, n. 5, p. 760-763. 2012.

PICARIELLO, C. et al. The impact of hypertension on patients with acute coronary syndrome. **International Journal of Hypertension**, 2011. v. 2011, p. 1-7.

PIDDE-QUEIROZ, G. et al. Human complement activation and anaphylatoxins generation induced by snake venom toxins from *Bothrops* genus. **Molecular Immunology**. v. 47, n. 16, p. 2537-2544. 2010.

PIDDE-QUEIROZ, G. et al. P-I snake venom metalloproteinase is able to activate the complement system by direct cleavage of central components of the cascade. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 1-11. 2013.

PIROLLA, R. A. S. et al. Evaluation of snake venom phospholipase A₂: hydrolysis of non- natural esters. **Journal Brazilian Chemistry Society**, 2011. v. 22, n. 2, p. 300-307.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PROCTOR, L. M. et al. Complement inhibitors attenuate lung injury following administration of cobra venom factor to rats. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 8, p. 1224-1232. 2006.

PROUDFOOT, A. E. I.; UGUCCIONI, M. Modulation of chemokine responses: synergy and cooperativity. **Frontiers in Immunology**, v. 17, n. 7, p. 1-6. 2016.

PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. The hyaluronidase activities of some southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629-637. 1988.

PÜSCHEL, G. P. et al. Increase in prostanoid formation in rat liver macrophages (Kupffer cells) by human anaphylatoxin C3a. **Hepatology**, v. 18, n. 6, p. 1516-1521. 1993.

QU, H. et al. New analogs of the clinical complement inhibitor compstatin with subnanomolar affinity and enhanced pharmacokinetic properties. **Immunobiology**, v. 218, n. 4, p. 496-505. 2012.

RAMOS-CERILLO, B. et al. Characterization of a new polyvalent antivenom (Antivipmyn® Africa) against African vipers e elapids. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 881-888. 2008.

REBER, L. L.; HERNANDEZ, J. D.; GALLI, S. J. The pathophysiology of anaphylaxis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2017. v. 140, n. 2, p. 335-348.

REHANA, S.; KINI, R. M. Molecular isoforms of cobra venom factor- like proteins in the venom of *Austrelaps superbis*. **Toxicon**, v. 50, n. 1, p. 32-52. 2007.

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

REMICK, D. G. et al. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2751-2757. 2005.

REN, J. et al. Complement depletion deteriorates clinical outcomes of severe abdominal sepsis: A conspirator of infection and coagulation in crime? **PLOS One**, v. 7, n. 10, p. 1-9. 2012.

REYES, R. V. et al. Modelagem por homologia de estrutura tridimensional da enzima fosfolipase A₂ pancreáticas citossol cálcio-dependente em *Rattus novergicus*. **Revista Colombiana de Química**, v. 39, n. 2. 2010.

- RICKLIN, D. et al. Complement a key for immune surveillance and homeostasis. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 785-797. 2010.
- RIEDMAN, N. C. et al. A. Increased C5a receptor expression in sepsis. **The Journal of Clinical Investigation**, 2002. v. 110, n. 1, p. 101-108.
- RIEDEMANN, N. C. et al. A. Regulatory role of C5a in LPS-induced-IL-6 production by neutrophils during sepsis. **The FASEB Journal**, 2004. v. 18, n. 2, p. 1-16.
- RIGONI, M. et al. Snake presynaptic neurotoxins with phospholipase A2 activity induce punctate swellings of neurites and exocytosis of synaptic vesicles. **Journal of Cell Science**, 2004. v. 15, n. 117, p. 3561-3570.
- RINCON, M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Cell Press**, v. 33, n. 11, p. 571-577. 2012.
- RIOS, F.; ISCAR, T.; CARDINAL-FERNÁNDEZ, P. What every intensivist should know about acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 354- 363. 2017.
- RISITANO, A. M. et al. Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 123, n. 13, p. 2094-2101. 2014.
- RITTIRSCH, D. et al. Functional roles for C5a receptors in sepsis. **Nature Medicine**, v. 14, n. 5, p. 551-557. 2008.
- ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F. D. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 2, p. 410-418. 2007.
- ROCK, K. L. et al. The sterile inflammatory response. **Annual Review of Immunology-National Institute of Health**, v. 28, p. 321-342. 2010.
- ROSALES, C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1-17. 2018.
- ROUMENINA, L. T. et al. Interaction of the globular domain of human C1q with *Salmonella typhimurim* lipopolysaccharide. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1784, n. 9, p. 1271-1276. 2008.
- ROWLEY, J. A. et al. Potent thiophene antagonists of human complement C3a receptor with anti-inflammatory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2020. v. 63, n. 2, p. 529-541.
- 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*. **Mediators Inflammation**, v. 11, n. 2, p. 121-128. 2002.

RUCAVADO, A. et al. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. **Toxins**, v. 24, n. 8, p. 1-14. 2016.

RUCKER, D; DHAMOON, A. S. **Physiology, Thromboxane A2**. Flórida: Disponível em StatPearls [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817>]. 2020.

RUPRECHT, T. A. et al. Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. **The Journal of Immunology**, 2006. v. 178, n. 3, p. 1861-1869.

RUSSKAMP, N. F. et al. Experimental design of complement component 5a-induced acute lung injury (C5a-ALI): a role of CC-chemokine receptor type 5 during immune activation by anaphylatoxin. **The FASEB Journal**, 2015. v. 27, n. 12, p. 3762-3772.

SADIK, C. et al. Neutrophils orchestrate their own recruitment in murine arthritis through C5aR1 and FcγR signaling. **PNAS**, v. 109, n. 46, p. 3177-3185. 2012.

SAHA, K. et al. Neutralization of *Naja kaouthia* venom induced toxicity and stress by *Vitex negundo*-Gold nanoparticle (VN-GNP) in experimental animal model. **Journal of Toxins**, 2015. v. 2, n. 1, p. 1-8.

SANZ, L. et al. Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. **Toxicon**, v. 66, p.39-45. 2019.

SANZ, L. et al. New insights into the phylogeographic distribution of the 3FTx/PLA₂ venom dichotomy across genus *Micrurus* in South America. **Journal of Proteomics**, v. 66, p.90-101. 2019.

SAUTER, R. J. et al. Functional relevance of the anaphylatoxin receptor C3aR for platelet function and arterial thrombus formation marks an intersection point between innate immunity and thrombosis. **Circulation**, 2018. v. 138, n. 16, p. 1720-1735.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. New developments in C5a receptor signaling. **Cell Health and Cytoskeleton**, v. 1, n. 4, p. 73-82. 2012

SARTIM, M. A. et al. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIII^d metalloprotease isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, activates coagulation factors II e X and induces tissue factor up regulation in leukocytes. **Archives of Toxicology**, 2015. p. 1-18.

SARTIM, M. A. et al. Crotoxin-induced mice impairment: Role of nicotinic acetylcholine receptors and COX-Derived prostanoids. **Biomolecules**, v. 10, n. 5, p. 1-25. 2020.

SATYAM, A. et al. Intracellular activation of complement 3 is responsible for intestinal tissue damage during mesenteric ischemia. **The Journal of Immunology**, 2017. v. 198, n. 2, p. 788-797.

SCALLAN, J.; HUXLEY, V. H.; KORTJUIS, R. J. Capillary fluid exchange: Regulation, functions, and pathology. <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53447/>>
Morgan & Claypool Publishers. 2010.

SCHELLER, J. et al The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin 6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 878-888. 2011.

SCHMID, E. et al. Neutrophil chemotactic activity and C5a following systemic activation of complement in rats. **Inflammation**, v. 21, n. 3, p. 325-333.1997.

SCHNEIDER, L. A. et al. Molecular mechanism of mast cell mediated defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. **The Journal of Experimental Medicine**, 2007. v. 204, n. 11, p. 2629-2639.

SCHOERGENHOFER, C. et al. Inhibition of Protease-Activated Receptor (PAR1) reduces activation of the endothelium human endotoxemia. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2018. v. 118, n. 7, p. 1176-1184.

SCHRAUFSTATTER, I. U. et al. Complement C3a and C5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells. **The Journal of Immunology**, 2002. v. 169, n. 4, p. 2102-2110.

SCHUBART, A. et al. Small-molecule factor B inhibitor for the treatment of complement-mediated diseases. **PNAS**, v. 116, n. 6, p. 7926-7931. 2019.

SCHWARTZ, L. B. et al. Generation of C3a anaphylatoxin from human C3 by human mast cell tryptase. **The Journal of Immunology**, 1983. v. 130, n. 4, p. 1891-1895.

SCOLA, A. M. et al. The human complement fragment receptor, C5L2, is a recycling decoy receptor. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 6, p. 1149-1162. 2009.

SEBIA-AMRANE, F.; LARABA-DJEBARI, F. Pharmaco-modulations of induced edema and vascular permeability changes by *Vipera lebetina* venom: inflammatory mechanisms. **Inflammation**, v. 36, n.2, p. 434-443. 2013.

SERHAN, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? **The American Journal of Pathology**, 2010. v. 177, n. 4, p. 1576-1591.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature Review. Immunology**, v. 11, n. 11. 2011.

SHUETTPELZ, L. G.; LINK, D. C. Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. 204, p. 1-9. 2013.

SHUTOV, L. P. et al. The complement system component 5a produces thermal hyperalgesia via macrophage-to-nociceptor signaling that requires NGF and TRVP1. **Neurobiology of Disease**, v. 36, n. 18, p. 5055-5070. 2016.

SILASI-MANSAT, R. et al. Complement inhibition decreases the procoagulant response and confers organ protection in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 1002-1010. 2010.

SILASI-MANSAT, R. et al. Complement inhibition decreases early fibrogenic events in the lung of septic baboons. **Journal of cellular and molecular medicine**, 2015. v. 19, n. 11, p. 2549-2563.

SKENDROS, P. et al. Complement, and tissue-factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. **Clinical Trial**, v. 130, n. 11, p. 6151-6157. 2020.

SKJEFLO, E. W. et al. *Staphylococcus aureus*-induced complement activation promotes tissue factor-mediated coagulation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2017. v. 16, n. 5, p. 905-918.

SLOWINSKI, J. B.; KNIGHT, A.; ROONEY, A. P. Inferring species trees from genes trees: a phylogenetic analysis of the Elapidae (Serpentes) based on the amino acid sequences of venoms proteins. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 8, n. 3, p. 349-362. 1997.

Snakebite envenoming: a strategy for prevention and control. **World Health Organization**; 2019.

SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews. Diseases Primers**, v. 4, p. 1-23. 2018.

SPATARO, A. C.; BOSMANN, H. N. Mechanism of action of disodium cromoglycate- mast cell calcium ion influx after a histamine- releasing stimulus. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, n. 5, p. 505-510. 1976.

SPTIZER, D. et al. Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. **The Journal of Immunology**, 2007. v. 179, n. 4, p. 2600-2608.

SOARES, S. G.; OLIVEIRA, L. L. Venom-Sweet-Venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein and Peptides Letters**, v. 16, p. 913-919.

STEFANSSON, S.; KINI, R. M.; EVANS, H. J. The basic PLA₂ from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism. **Biochemistry**, v. 21, p. 7742-7746. 1990.

STEPHENS, J. W. W.; MYERS, W. The action of cobra poison on the blood: a contribution to the study of passive immunity. **Journal of Pathology and Bacteriology**, 1898. n. 5, p. 279-301.

STONE, S. F. et al. A. Immune response, to snake envenoming and treatment with antivenom: Complement activation, cytokine production and mast cell degranulation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 1-9. 2013.

- STROVER, H. M. Snakebite and its treatment. **Central African Journal of Medicine**, 1961. v. 7, n. 3, p. 84-87.
- SUN, S. et al. Treatment of Paraquat-induced lung injury with an anti-C5a antibody: potential clinical application. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 5, p. 419-425. 2018.
- TAKABAYASHI, T. et al. A new biologic role for C3a and C3a desArg: regulation of TNF-alpha and IL-1 beta synthesis. **The Journal of Immunology**, 1996. v. 156, n. 9, p. 3455-3460.
- TAKABAYASHI, T. et al. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. **Science Surgery**, v. 135, n. 5, p. 544-554. 2004.
- TAKACS, Z.; WILHELMSSEN, K. C.; SOROTA, S. Cobra (*Naja* spp) nicotinic acetylcholine receptor exhibits resistance to Erabu sea snake (*Laticauda semifasciata*) short-chain α - neurotoxin. **Journal of Molecular Evolution**, 2004. v. 58, n. 5, p. 516-526.
- TAKAHASHI, H.; HAYASHI, K. Purification and characterization of anticomplement factor (COBRA VENOM FACTOR) from the *Naja naja atra* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.701, p. 102-110. 1982.
- TAKEDA, S. ADAM and ADAMTS Family Proteins and Snake Venom Metalloproteinases: A Structural Overview. **Toxins (Basel) Review**, v. 8, n. 5, p. 1- 35. (2016).
- TAKAFUJI, S. et al. Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a. **International Archives Allergy and Immunology**, v. 1, n. 1, p. 27-29. 1994.
- TAMBOURGI, D. V. et al. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. **British Journal of Pharmacology**. 1994. v. 112, n. 3, p. 723-727.
- TAMBOURGI, D. V. et al. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **The Journal of Immunology**, 1995.v. 155, n. 9, p. 4459-4466.
- TAMBOURGI, D. V. et al. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, n. 1, p. 366-373. 1998.
- TAMBOURGI, D. V. et al. *Loxosceles intermedia* spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis. **Blood**, v. 95, n, 2, p. 683-691. 2000.
- TAMBOURGI, D. V. et al. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 93-101. 2002.

TAMBOURGI, D. V. et al. *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. **The Journal of Investigative Dermatology**, 2005. v. 124, n. 4, p. 725-731.

TAMBOURGI, D. V. et al. Sphingomyelinase D induce direct association of C1q to the erythrocytes membrane causing complement mediated autologous haemolysis. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 4, p. 576-582. 2007.

TAMBOURGI, D. V. Envenenamento por serpentes: doença negligenciada afetando países em desenvolvimento In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 62., 2010, Natal. **Anais**. Rio Grande do Norte.

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

TAN, N. H.; TAN, C. S. A comparative study of cobra (*Naja*) venom enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 90, n. 4, p. 745-750. 1988.

TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus *Micrurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 3, p. 471-474. 1992.

TANAKA, G. D. et al. Diversity of *Micrurus* snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1-12. 2010.

TANAKA, G. D. **Caracterização imunoquímica dos venenos de serpentes do gênero *Micrurus* de importância médica**. 2011. 121 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Interunidades IPT/USP/IBU, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TANAKA, G. D. et al. *Micrurus* snake venoms activate human complement system and generate anaphylatoxins. **BioMed Central**, v. 13, n. 4, p. 1-7. 2012.

TANG, P.; WANG, J. M. Chemokines: the past, the present and the future. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 4, p. 295-298. 2018.

TANJONI, I. et al. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to alpha2beta1 integrin and collagen. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1093-1099. 2010.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by platelet-activating viperid snake venoms: perspectives on thromboinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1-13. 2019.

TEIXEIRA DE ALMEIDA, M. et al. Inflammatory reaction induced by two metalloproteinases isolated from *Bothrops atrox* venom and by fragments generated from hydrolysis of basement membrane components. **Toxins**, v.12, n. 2, p. 1-19. 2020.

TENG, C. M.; CHEN, Y. H.; OUYANG, C. Biphasic effect on platelet aggregation by Phospholipase A purified from *Vipera russellii* snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 772, n. 3, p. 393-402. 1984.

THE REPTILE DATABASE

<<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>>

Acesso em 05 de março de 2021a.

THE REPTILE DATABASE

<http://www.reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Elapidae&submit=Search>

Acesso em 05 de março de 2021b.

THE REPTILE DATABASE

<http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Elapidae&submit=Search>

Acesso em 05 de março de 2021c.

THILLE, A. W. et al. Comparison of the Berlin definition for acute respiratory distress syndrome with autopsy. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2013. v. 187, n. 7, p. 761-767.

THOMAS, A. M. et al. Complement C5 and TLR molecule CD14 mediate heme-induced thromboinflammation in human blood. **The Journal of Immunology**, 2019. v. 203, n. 6, p. 1571-1578.

TILL, G. O. et al. Intravascular activation of complement and acute lung injury: Dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites. **The Journal of Clinical Investigation**, 1982. v. 69, n. 5, p. 1126-1135.

TILL, G. O. et al. Activation of C5 by Cobra Venom Factor is required in neutrophil-mediated lung injury in the rat. **The American Journal of Pathology**, 1987. v. 129, n. 1, p.44-53.

TOHAMY, A. A. et al. Biological effects of *Naja haje* crude venom on the hepatic and renal tissues of mice. **Journal of King Saud University-Science**, 2014. v. 26, p. 205-212.

TONSING, L. et al. The binding of snake venom cardiotoxins to heart cell membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 732, p. 282- 288. 1983.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRANTAFILOU, K. et al. The complement membrane attack complex triggers intracellular Ca²⁺ fluxes leading to NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Cell Science**, 2013. v. 126, n. 13, p. 2903-2913.

- TYTGAT, J. et al. New polypeptide components purified from mamba venom. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 491, n. 3, p.217-221. 2001.
- ULICH, T. R. et al. In vivo induction of neutrophilia, lymphopenia, and diminution of neutrophil adhesion by stable analogs of prostaglandins E1, E2, and F2 alpha. **American Journal of Pathology**, 1986. v. 124, n. 1, p. 53-58.
- ULICH, T. R. et al. Kinetics and mechanisms of recombinant human interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha induced changes in circulating numbers of neutrophils and lymphocytes. **The Journal of Immunology**, 1987. v. 139, n. 10, p. 3406-3415.
- ULICH, T. R.; DEL CASTILLO, J.; SOUZA, L. Kinetics and mechanisms of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor-induced neutrophilia. **American Journal of Pathology**, 1988. v. 133, n. 3, p. 630-638.
- ULICH, T. R.; DEL CASTILLO, J.; GUO, K. Z. In vivo hematologic effects of recombinant interleukin-6 on hematopoiesis and circulating numbers of RBCs and WBCs. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 108-110. 1989.
- VADAS, P. et al. The pro-inflammatory effect of intra-articular injection soluble human and venom phospholipase A₂. **American Journal of Pathology**, 1989. v. 134, n. 4, p. 807-811.
- van-den-BERG, C. W.; AERTS, P. C.; DIJK, H. V. *In vivo* anti-complement activities of the cobra venom factors from *Naja naja* and *Naja haje*. **Journal of Immunological Methods**, 1991. v. 136, n. 2, p. 287-294.
- van-den-BERG, C. W. et al. Mechanism of neutrophil dysfunction: neutrophil serine protease cleaves and inactivates the C5a receptor. **The Journal of Immunology**, 2014. v. 192, n. 4, p. 1787-1795.
- van der POLL, T. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews. Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407-420. 2017.
- Van GRIENSVEN, M. et al. Protective effects of the complement inhibitor Compstatin Cp40 in hemorrhagic shock. **Shock**, v. 51, n. 1, p. 78-87. 2019.
- VILLAS-BOAS, I. M. et al. *Premolis semirufa* (Walker, 1856) envenomation, disease affecting rubber tappers of the amazon: Searching for caterpillar-bristles toxic components. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. 1-10. 2012.
- VOGEL, C-W.; MÜLLER- ERBEHARD, H. J. The cobra venom factor dependent C3 convertase of human complement. **The Journal of Biological Chemistry**, 1982. v. 257, n. 14, p. 8292-8299.
- VOGEL, C-W.; MÜLLER- ERBEHARD, H. J. Cobra venom factor: structural homology with the third component of human complement. **The Journal of Immunology**, 1984. v. 133, n. 6, p. 3235-3241.

VOGEL, C. W.; FRITZINGER, D. C. Cobra Venom Factor: Structure, function and humanization for therapeutic complement depletion. **Toxicon**, v. 56, p. 1198-1222. 010.

VOGT, W. Complement activation by myeloperoxidase products released from stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Immunobiology**, v. 195, n. 3, p. 334-346. 1996.

VOGT, W. Cleavage of the fifth component of complement and generation of a functionally active C5b6-like complex by human leukocyte elastase. **Immunobiology**, v. 201, n. 4, p. 470-477. 2000.

von-ZABERN, I.; PRZYKLENK, H.; VOGT, W. Chain structure of cobra venom factor from *Naja naja* and *Naja haje* venom. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1982. v. 15, n. 4, p. 357-362.

von-ZABERN, I. et al. Comparison of *Naja n. naja* and *Naja h. haje* Cobra-Venom factors: Correlation between binding affinity for the fifth component of complement and mediation of its cleavage. **Immunobiology**, v. 157, n.4-5, p. 499-514. 1980.

WANDERLEY, C. W. S. et al. *Bothrops jararacussu* snake venom induces local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134-174. 2014.

WANG, J. P.; TENG, C. M. Roles of mast cells and PMN leukocytes in cardiotoxin-induced rat paw edema. **European Journal of Pharmacology**, 1988. v. 161, p. 9-18.

WANG, H. B.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement-activation fragment C4a mediates effector functions by binding as untethered agonist to protease-activated receptors 1 and 4. **PNAS**, v. 114, n. 41, p. 10948-10953. 2017.

WALLACH, V.; WUSTER, W.; BROADLEY, D. G.; In praise of subgenera: taxonomic status of cobras of the genus *Naja* Laurenti (Serpentes: Elapidae). **Zootaxa**, v. 2236, p. 26-36. 2009.

WARREL, D. A. et al. Necrosis, haemorrhage and complement depletion following bites by the spitting cobra (*Naja nigricollis*). **The Quartely Journal of Medicine**, 1976. v. 45, n. 1, p. 1-22.

WEISE, K. H. K. et al. The purification of toxins V^{II}1 and V^{II}2, two cytotoxin homologues from banded egyptian cobra (*Naja haje annulifera*) venom, and the complete amino acid sequence of toxin V^{II}1. **Snake Venom Toxins**, v. 354, n. 10-11, p. 1317- 1326. 1973.

WESTRIN, L.; VON RAHMEL, P. The Snouted Cobra, *Naja annulifera*, Peters 1854. **Berus Magazine**, n. 6. 2011.

WHITE, J. Elapidae snakebite in Africa and Asia. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CORALSNAKES, 34., 2016, Goiás. **Anais**. Goiania.

WILMER, W. A. et al. Receptor for the anaphylatoxin C5a (CD88) on human mesangial cells. **The Journal of Immunology**, 1988. v. 160, n. 11, p. 5646-5652.

WOODRUFF, T. M. et al. Antiarthritic activity of an orally active C5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. **Journal of Arthritis and Rheumatology**, 2002. v. 46, n. 9, p. 2476-2485.

WOODRUFF, T. M. et al. Increased potency of a novel complement factor 5a receptor antagonist in a rat model of inflammatory bowel disease. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapeutic**, 2005. v. 314, p. 811-817.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the management of snake-bites**. World Health Organization Regional Office for South- East Asia, 2010a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in África**. Brazaville: World Health Organization Regional Office for Africa, 2010b.

WU, M. C. et al. The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 110, n. 23, p. 9439-9444. 2013.

WU, K. Y. The C3a/C3aR axis mediates anti-inflammatory activity and protects against uropathogenic E. coli-induced kidney injury in mice. **Kidney International**, v. 96, n. 3, p. 612-627.

WU, W. B.; HUANG, T. F. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherents junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 288, n. 1, p. 143-157. 2003.

WU, M. C. L. et al. Absence of the C5a receptor C5aR2 worsens ischemic tissue injury by increasing C5aR1-mediated neutrophil infiltration. **The Journal of Immunology**, 2020. v. 205, n. 10, p. 2834-2839.

YAMAKAWA, M.; NOZAKI, M.; HOKAMA, Z. Fractionation of Sakishima Habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal hemorrhagic, and edema forming activities of fractions. **In Animal plant and microbial toxins**. 1976.

YAMAMOTO, C. et al. *Trimeresurus flavoviridis* (Habu Snake) Venom induces human erythrocytes lysis through enzymatic lipolysis, complement activation and decrease membrane expression of CD55 and CD59. **Pharmacology and Toxicology**, v. 89, p. 188-194. 2001.

YAMAMOTO, C. et al. Flavoxobin, a serine protease from *Trimeresurus flavoviridis* (Habu Snake) venom, independently cleaves Arg726-Ser727 of Human C3 and acts as a novel, heterologous C3 convertase. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 111-117. 2002

YAMASHITA, K. M. et al. *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. **Plos Tropical Neglected Diseases**, v. 8, n. 5, p. 1- 12. 2014.

YAO, X. L. et al. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of Phospholipase A₂ activity. **The Journal of Biological Chemistry**, 1999. v. 274, n. 24, p. 17202- 17208.

YEE, J. S. P. et al. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. **Biochimie**, v. 86, n. 2, p. 137-149. 2003.

YEN, J. et al. NETosing neutrophils activate complement both on their own NETs and bacteria *via* alternative and non-alternative pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 137, p. 1-17. 2016.

YOKOMIZO, T. Two distinct leukotriene B₄ receptors, BLT₁ and BLT₂. **The Journal of Biochemistry**, 2014. v. 157, n. 2, p. 65-71.

YOSHIMURA, Y. et al. ONO-6818, a novel, potent neutrophil Elastase inhibitor, reduces inflammatory mediators during simulated extracorporeal circulation. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 76, n. 4, p. 1234-1239. 2003.

YU, H. et al. Interleukin-8 regulates endothelial permeability by down-regulation of tight junction but not dependent on integrins induced focal adhesions. **International Journal of Biological Sciences**, 2013. v. 9, n. 9, p. 966-979.

ZANG, Y.; WISNER, A.; XIONG, Y.; BON, C. A novel Plasminogen activator from snake venom: purification, characterization, and molecular cloning. **The Journal of biological chemistry**, 1995. v. 270, n.17, p. 10246-10255.

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

ZENG, L. et al. Molecular cloning and characterization of a complement-depleting factor from king cobra, *Ophiophagus Hannah*. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 290-301. 2012.

ZHANG, Y. et al. Characterization of murine vasopressor and vasodepressor prostaglandin E (2) receptors. **Hypertension**, v. 35, n. 5, p. 1129-1134. 2000.

ZHANG, X. Y. et al. Anaphylatoxin C5a induces inflammation and reduces insulin sensitivity by activating TLR4/NF-κB/PI3K signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 955-964. 2018.

ZINGARELLI, B. et al. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute hypovolemic hemorrhagic shock in rats. **The American Journal of Physiology**, 1994. v. 266, p. 1-4.

ZOCCAL, K. F. et al. *Tityus serrulatus* venom and toxins Ts1, Ts2 and Ts6 induce macrophage activation and production of immune mediators. **Toxicon**, v. 7, n. 8, p. 1101-1108. 2011.

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, p. 1-10. 2013.

ZOCCAL, K. F. et al. TLR-2, TLR-4 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.

ZOCCAL, K. F. **A peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* é reconhecida por receptores de reconhecimento padrão e induz ativação celular e inflamação.** 2015. 115 f. Tese (Doutorado Direto em Biociências Aplicada a Farmácia) - Biociências Aplicada a Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ZOCCAL K. F. et al. PPAR- γ activation by *Tityus serrulatus* venom regulates lipid body formation and lipid mediator production. **Toxicon**, v. 93, p. 90-97. 2015.

ZOCCAL K. F. et al. Opposing roles of LTB₄ and PGE₂ in regulating the inflammasome-dependent scorpion venom-induced mortality. **Nature Communications**, v. 7, n. 10760. 2016.

ZOCCAL, K. F. et al. CD36 shunts eicosanoid metabolism to repress CD14 licensed interleukin-1 β release and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v.9, n. 890, p. 1-16. 2018a.

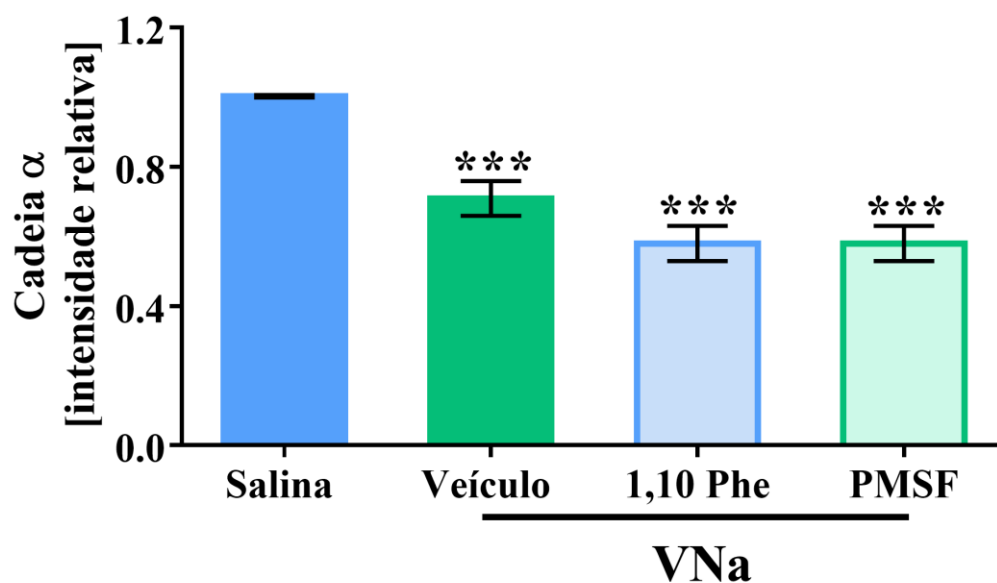
ZOCCAL, K. F. et al. LTB₄ and PGE₂ modulate the release of MIP-1 α and IL-1 β by cells stimulated with Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 150, p. 289-296. 2018b.

ZOCCAL, K. F. et al. EP80317 Restrains inflammation and mortality caused by scorpion envenomation in mice. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 171, p. 1-6. 2019.

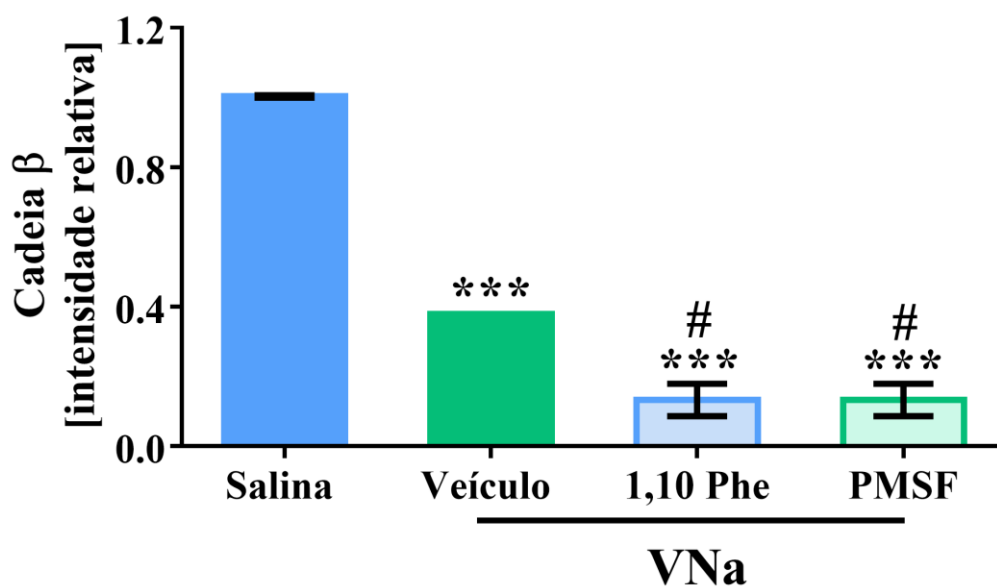
ZULIANI, J. P. et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 335-346. 2005.

APÊNDICE A

a



b



APÊNDICE A. Amostras de C5 humano purificado (2,5 μ g) foram tratadas com salina ou veneno (2,5 μ g) e incubadas durante 30 minutos a 37° sob agitação constante. Paralelamente, em algumas destas misturas foram adicionados 20 mM dos inibidores 1,10 Phe ou PMSF. As reações foram interrompidas pela adição de 15 mM de EDTA, as misturas submetidas à eletroforese em SDS-PAGE a 10%, e as reações reveladas por impregnação por prata. A intensidade das bandas foi determinada no Gel Logic 100 Imaging System Kodak.

APÊNDICE B

SILVA DE FRANÇA, F., et al. *Naja annulifera* snake: New insights into the venom components and pathogenesis of envenomation. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-27, 2019.

RESEARCH ARTICLE

Naja annulifera Snake: New insights into the venom components and pathogenesis of envenomation

Felipe Silva-de-França¹, Isadora Maria Villas-Boas¹, Solange Maria de Toledo Serrano², Bruno Cogliati³, Sonia Aparecida de Andrade Chudzinski², Priscila Hess Lopes¹, Eduardo Shigueo Kitano², Cinthya Kimori Okamoto¹, Denise V. Tambourgi^{1*}

1 Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, **2** Special Laboratory of Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, **3** Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

* denise.tambourgi@butantan.gov.br



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Silva-de-França F, Villas-Boas IM, Serrano SMdT, Cogliati B, Chudzinski SAdA, Lopes PH, et al. (2019) *Naja annulifera* Snake: New insights into the venom components and pathogenesis of envenomation. *PLoS Negl Trop Dis* 13(1): e0007017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007017>

Editor: Nicholas R. Casewell, Liverpool School of Tropical Medicine, UNITED KINGDOM

Received: May 24, 2018

Accepted: November 23, 2018

Published: January 18, 2019

Copyright: © 2019 Silva-de-França et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This study was supported by research grants from FAPESP (2013/07467-1 - Center of Toxins Immune-Response and Cell Signalling - CeTICS), CNPq (301358/2017-6) and CAPES.

Background

Naja annulifera is a medically important venomous snake occurring in some of the countries in Sub-Saharan Africa. Accidental bites result in severe coagulation disturbances, systemic inflammation and heart damage, as reported in dogs, and death, by respiratory arrest, in humans. Despite the medical importance of *N. annulifera*, little is known about its venom composition and the pathogenesis of envenomation. In this paper, the toxic, inflammatory and immunogenic properties of *N. annulifera* venom were analyzed.

Methodology/Principal findings

Venom proteomic analysis identified 79 different proteins, including Three Finger Toxins, Cysteine Rich Secretory Proteins, Metalloproteinases, Phospholipases A₂ (PLA₂), Hyaluronidase, L-amino-acid oxidase, Cobra Venom Factor and Serine Proteinase. The presence of PLA₂, hyaluronidase, fibrinolytic and anticoagulant activities was detected using functional assays. The venom was cytotoxic to human keratinocytes. In an experimental murine model of envenomation, it was found that the venom induced local changes, such as swelling, which was controlled by anti-inflammatory drugs. Moreover, the venom caused death, which was preceded by systemic inflammation and pulmonary hemorrhage. The venom was shown to be immunogenic, inducing a strong humoral immune response, with the production of antibodies able to recognize venom components with high molecular weight and to neutralize its lethal activity.

Conclusions/Significance

The results obtained in this study demonstrate that *N. annulifera* venom contains toxins able to induce local and systemic inflammation, which can contribute to lung damage and death. Moreover, the venom is immunogenic, an important feature that must be considered during the production of a therapeutic anti-*N. annulifera* antivenom.

APÊNDICE C

SILVA DE FRANÇA, F., et al. C5a-C5aR1 axis activation drives envenomation immunopathology by the snake *Naja annulifera*. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. 652242, p. 1-16, 2021.



C5a-C5aR1 Axis Activation Drives Envenomation Immunopathology by the Snake *Naja annulifera*

Felipe Silva de França¹, Isadora Maria Villas-Boas¹, Bruno Cogliati², Trent M. Woodruff³, Edimara da Silva Reis⁴, John D. Lambris⁴ and Denise V. Tambourg^{1*}

¹Immunochimistry Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, ²Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Neuroinflammation Laboratory, School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, St Lucia, QLD, Australia, ⁴Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Wuelton Monteiro,
Fundação de Medicina Tropical
Doutor Heitor Vieira Dourado
(FMT-HVD), Brazil

Reviewed by:

Luiz Gustavo Gardinassi,
Universidade Federal de Goiás
(PTSP – UFG), Brazil
Lillemor Skattum,
Lund University, Sweden

*Correspondence:

Denise V. Tambourg
denise.tambourg@butantan.gov.br
orcid.org/0000-0003-1896-9074

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 12 January 2021

Accepted: 22 March 2021

Published: 15 April 2021

Citation:

Silva de França F, Villas-Boas IM,
Cogliati B, Woodruff TM, Reis EdS,
Lambris JD and Tambourg DV (2021)
C5a-C5aR1 Axis Activation Drives
Envenomation Immunopathology by
the Snake *Naja annulifera*.
Front. Immunol. 12:652242.
doi: 10.3389/fimmu.2021.652242


Systemic complement activation drives a plethora of pathological conditions, but its role in snake envenoming remains obscure. Here, we explored complement's contribution to the physiopathogenesis of *Naja annulifera* envenomation. We found that *N. annulifera* venom promoted the generation of C3a, C4a, C5a, and the soluble Terminal Complement Complex (sTCC) mediated by the action of snake venom metalloproteinases. *N. annulifera* venom also induced the release of lipid mediators and chemokines in a human whole-blood model. This release was complement-mediated, since C3/C3b and C5a Receptor 1 (C5aR1) inhibition mitigated the effects. In an experimental BALB/c mouse model of envenomation, *N. annulifera* venom promoted lipid mediator and chemokine production, neutrophil influx, and swelling at the injection site in a C5a-C5aR1 axis-dependent manner. *N. annulifera* venom induced systemic complementopathy and increased interleukin and chemokine production, leukocytosis, and acute lung injury (ALI). Inhibition of C5aR1 with the cyclic peptide antagonist PMX205 rescued mice from these systemic reactions and abrogated ALI development. These data reveal hitherto unrecognized roles for complement in envenomation physiopathogenesis, making complement an interesting therapeutic target in envenomation by *N. annulifera* and possibly by other snake venoms.

Keywords: *Naja* snake venom, envenomation, complement system, C5a-C5aR1, complement inhibitors

INTRODUCTION

Complement activation is a crucial event influencing the development of innate and adaptive immune responses (1, 2). Once microbial associated molecular patterns (MAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) have been detected, complement can become activated through three intrinsic pathways, the alternative (AP), lectin (LP), and classical (CP) pathways, or through extrinsic pathways involving coagulation proteases, cathepsins, elastase, or snake venom metalloproteases and serine proteases (2, 3). All of these pathways converge at central events that culminate in the cleavage of C3, C4, and/or C5, leading to the generation of opsonins (C3b and C4b) and anaphylatoxins (C3a, C4a, and C5a) and assembly of the terminal complement complex (TCC;

ANEXO A

 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 12 de fevereiro de 2015</p> <p>Marcelo Marcos Morales Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010</p>	<p>Processo: 010035/2015-0 Validade: 12/02/2015 a 12/02/2017 Instituição: INSTITUTO BUTANTAN CNPJ: 618.213.440/0001-56 Pesquisador: Denise Vilarinho Tambourgi CPF: 050.043.288-03 RG: 76676948 - SSP / SP</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 0265499880393732 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	---

ANEXO B



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
 Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
 Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
 ceuab@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização imunológica e biológica do veneno de serpentes *Naja annulifera* Peters (1854)", protocolo nº 1092/13, sob a responsabilidade de Denise Vilarinho Tambourgi e Felipe Silva de França - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/5/2013.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
07/2013 - 02/2014 Laboratório de Imunogenética	12 camundongos H ₁₂₉ Ssem - 18 x 22g (M); 126 camundongos Balb/c Ssem - 18 x 22g (M); 1 coelho NZW 3kg (M); Sangue de ovelha obtido da Fazenda São Joaquim

São Paulo, 10 de maio de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
 Coordenador da CEUAIB



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
 Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
 Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
 ceuab@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo de componentes e eventos envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*", protocolo nº 1262/14, sob a responsabilidade de Denise Vilarinho Tambourgi e Felipe Silva de França - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/11/2014.

This is to certify that the proposal "Study of components and events involved in the pathogenesis of poisoning by snake *Naja annulifera*", protocol nº 1262/14, under the responsibility of Denise Vilarinho Tambourgi and Felipe Silva de França - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/19/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
11/2014 - 12/2016 Laboratório de Imunogenética	183 Camundongos Balb/c 18-22g (M); *6 Camundongos High III 22g (M) - *Procedentes do Laboratório de Imunogenética

São Paulo, 28 de novembro de 2014

Dra. Wajia H. K. Cabrera
 Coordenadora da CEUAIB

ANEXO C

Av Vitor Brasil 1500 - Casa 02
05503-900 São Paulo SP
F +55 11 3729-0138
ceuaib@butantan.gov.br
www.butantan.gov.br



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo de componentes e eventos envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*", protocolo nº 1262/14, sob a responsabilidade de Denise Vilarinho Tambourgi e Felipe Silva de França - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 15/2/2016.

This is to certify that the proposal "Study of components and events involved in the pathogenesis of poisoning by snake *Naja annulifera*", protocol nº 1262/14, under the responsibility of Denise Vilarinho Tambourgi and Felipe Silva de França - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 2/15/2016. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
15/2014 - 12/2019 Laboratório de Imunoquímica	50 Camundongo Balb/c 18-22g (M)	Adicional de animais

São Paulo, 16 de fevereiro de 2017

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

Av Vitor Brasil 1500 - Casa 02
05503-900 São Paulo SP
F +55 11 3729-0138
ceuaib@butantan.gov.br
www.butantan.gov.br



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB)
INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo de componentes e eventos envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*", protocolo nº 1262/14, sob a responsabilidade de Denise Vilarinho Tambourgi e Felipe Silva de França - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 22/3/2017.

This is to certify that the proposal "Study of components and events involved in the pathogenesis of poisoning by snake *Naja annulifera*", protocol nº 1262/14, under the responsibility of Denise Vilarinho Tambourgi and Felipe Silva de França - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 3/22/2017. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
11/2014 - 12/2019 Laboratório de Imunoquímica	120 Camundongo Balb/c 18-22g (M)	Aditivo de animais

São Paulo, 24 de março de 2017

Dr. José Ricardo Jensen
Coordenador da CEUAIB

ANEXO D



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone: (55) (011) 3091-7733 - e-mail: icb@icb.usp.br



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" - Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comitê de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 3091-1723 - e-mail: ceua@icb.usp.br

CERTIFICADO

São Paulo, 25 de junho de 2018.

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 57 nas fls. 19do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Denise Vilarinho Tambourg, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Estudo de componentes e eventos envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*" do qual participam o(s) aluno(s) Felipe Silva de França, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 01.08.2014, com validade de 4 anos.

São Paulo, 04 de agosto de 2014.

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

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

Of.Circ.CEUA.001.2018

Prezado(a) Professor(a),

Lembramos que a validade do protocolo nº 57/2014, referente ao projeto intitulado "Estudo de componentes e eventos envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera*", para o uso de animais em experimentação sob sua responsabilidade, aprovado por esta comissão em 01/08/2014, encerra-se em 01/08/2018.

Desta forma, se o projeto não foi concluído, deverá ser encaminhada até o vencimento uma solicitação de prorrogação do mesmo, conforme modelo constante na página da internet: www2.icb.usp.br/ich/ceua

Ressaltamos ainda, a necessidade de enviar a esta CEUA o relatório parcial/final, conforme modelo constante na página da internet citada acima, tanto se o projeto estiver encerrado quanto se houver a necessidade de fazer a renovação do certificado.

Contando com a sua atenção e providências, despeço-me.

Cordialmente,

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da CEUA - ICB/USP

Sr.(a)
Prof(a) Dr.(a) Denise Vilarinho Tambourg
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

ANEXO E



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEUA.083.2018

São Paulo, 02 de agosto de 2018.

Prezado(a) Professor(a),


Informo que o projeto intitulado "*Estudo de componentes e eventos envolvidos na patogênese do envenenamento pela serpente *Naja annulifera**", registrado sob o protocolo nº **057/2014** e aprovado em 01/08/2014, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 01/08/2022**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Mus musculus	Balb/c	Macho	18-22 g	213

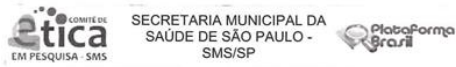
Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,


Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Denise Vilarinho Tambourgi**
Departamento de **Imunologia**
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

ANEXO F



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO IMUNOQUÍMICA E BIOLÓGICA DO VENENO DA SERPENTE *Naja annulifera* Peters (1854)

Pesquisador: Felipe Silva de França

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 11395213.5.0000.0006

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: Instituto Butantan

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 296.732

Data da Relatoria: 06/06/2013

Apresentação do Projeto:

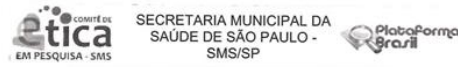
O pesquisador apresenta que de acordo com a Organização Mundial da Saúde os envenenamentos decorrentes das picadas por serpentes são um problema de saúde pública em áreas rurais de países tropicais e subtropicais da África, América Latina, Ásia e Oceania. As picadas por serpentes venenosas são uma causa considerável de morbidade e mortalidade em todo o mundo e de acordo com as estimativas o maior número de acidentes ocorre no sul da Ásia, sudeste da Ásia e África Sub-Saariana. Dentre as espécies de importância médica tem-se *Naja annulifera*. *N. annulifera* pertence a família Elapidae e ocorre na região da África Sub-Saariana. Os acidentes com *N. annulifera* são de grande importância devido a sua gravidade. Mesmo estes acidentes apresentando gravidade, pouco se sabe a respeito da composição e modo de ação do veneno de *N. annulifera*, tornando-se justificáveis trabalhos que avaliem estes aspectos. Dentre os objetivos deste trabalho, o autor aponta: Caracterização proteica (dosagem proteica, perfil eletroforético, perfil de glicosilação, presença de CVF), atividades tóxicas (hialuronidásica, PLA2 e proteolítica e dematogênica), ação sobre o sistema complemento, imunogenicidade e letalidade. Para tal o pesquisador irá isolar o veneno da serpente, e esta amostra será submetida a análise por métodos bioquímicos como dosagem proteica, eletroforese em gel de poliacrilamida, Western Blot, zimografia, entre outros. Os testes de atividade edematogênica, imunogenicidade e letalidade

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 1º andar
Bairro: CENTRO
UF: SP
Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

Email: smcccp@gmail.com

Página 01 de 04



Continuação do Parecer: 296.732

serão realizados em modelo animal, sendo que este Comitê de Ética não analisará o uso de modelo animal, sendo necessário um parecer de uma Comissão de Ética no Uso de Animais. Para os ensaios de atividade hemolítica serão utilizadas amostras de sangue humano coletadas de 10 sujeitos da pesquisa, que consentam em participar. Tais amostras serão coletadas no Hospital Vital Brasil (25 mL de cada sujeito) por técnico capacitado após aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e anuência do sujeito. O projeto está muito bem embasado e descrito, e o seu desenho experimental está claramente desenhado.

Objetivo da Pesquisa:

O trabalho possui como objetivo principal caracterizar os componentes do veneno de *N. annulifera* e avaliar as propriedades tóxicas e imunogênicas do mesmo. Os objetivos secundários são:

Caracterizar as proteínas do veneno;

Avaliar algumas propriedades tóxicas do veneno (Fosfolipásica, Hialuronidásica, roteolítica, Edematogênica e Letal);

Analisar a capacidade do veneno em ativar o sistema complemento;

Avaliar a imunogenicidade do veneno em modelos animais;

Avaliar a ação neutralizante de soro antiveneno anti *N. annulifera*.

Os objetivos estão claramente definidos e poderão ser facilmente alcançados com a metodologia proposta que está detalhadamente descrita no projeto.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O autor deixa bastante evidente que este projeto trará grande contribuição à sua área de estudo, que possui alta relevância. Visto que os 10 sujeitos de pesquisa apenas doarão amostras de sangue que serão utilizadas em ensaios in vitro, os riscos aos sujeitos são mínimos e estão claramente descritos no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Desse modo, o autor evidencia que o risco ao sujeito é mínimo e muito menor que o benefício da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é proposto por um aluno do Instituto Butantan. O mesmo pretende coletar amostras de sangue de 10 sujeitos de pesquisa no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan para ser usado em parte de ensaios in vitro da pesquisa. A pesquisa é de extrema relevância, e sua aplicação está referencialmente bem embasada. Vale ressaltar que a análise deste Comitê se restringe aos aspectos éticos da participação dos sujeitos de pesquisa, não versando sobre o uso de modelo animal.

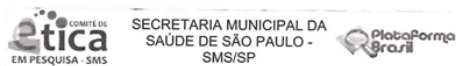
Endereço: Rua General Jardim, 36 - 1º andar
Bairro: CENTRO
UF: SP
Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

Email: smcccp@gmail.com

Página 02 de 04

ANEXO G



Continuação do Parecer: 296.732

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A autorização para realização da pesquisa foi adequadamente apresentada, a Folha de Rosto está corretamente preenchida, foram identificadas instituição proponente e coparticipante, o currículo do pesquisador responsável está de acordo com a proposta da pesquisa, cronograma e orçamento detalhado estão adequados, a fonte financiadora foi devidamente informada (Instituto Butantã).

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) - considerado adequado após retificações.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

O sujeito de pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

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

Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 196/96 item IX. 2. e). De acordo com a Res. CNS 196, IX.2.c, o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação.

Endereço: Rua General Jardim, 35 - 1º andar
Bairro: CENTRO CEP: 01.223-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2454 E-mail: smscop@gmail.com

Página 03 de 04



Continuação do Parecer: 296.732

Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

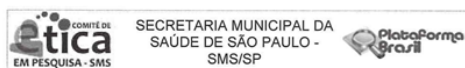
SAO PAULO, 07 de Junho de 2013

Assinador por:
SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador)

Endereço: Rua General Jardim, 35 - 1º andar
Bairro: CENTRO CEP: 01.223-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2454 E-mail: smscop@gmail.com

Página 04 de 04

ANEXO H



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE COMPONENTES E EVENTOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DO ENVENENAMENTO PELA SERPENTE Naja annulifera

Pesquisador: Felipe Silva de França

Área Temática:

Versão: 5

CIAAE: 11336213.5.0000.0096

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: Instituto Butantan

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 856.897

Data da Relatoria: 05/11/2014

Apresentação do Projeto:

projeto já analisado e aprovado por este CEP em 07/06/13 - parecer nº 296.732.

Objetivo da Pesquisa:

projeto já analisado e aprovado por este CEP em 07/06/13 - parecer nº 296.732.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

projeto já analisado e aprovado por este CEP em 07/06/13 - parecer nº 296.732.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto já analisado e aprovado por este CEP em 07/06/13 - parecer nº 296.732.

Esta avaliação ética refere-se à emenda enviada pelo pesquisador que solicita inclusão do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) como instituição co-participante.

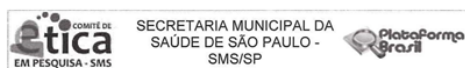
Do ponto de vista ético, esta emenda não muda a essência do estudo que continua a mesma, estando de acordo com a Res 644/12 e suas complementares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

-

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 1º andar
Bairro: CENTRO CEP: 01.223-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2454 E-mail: smscep@gmail.com

Página 01 de 02



Continuação do Parecer: 856.897

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências ou inadequações

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 04 de Novembro de 2014

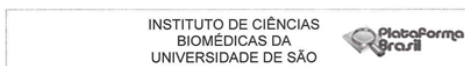
Assinado por:

SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador)

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 1º andar
Bairro: CENTRO CEP: 01.223-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2454 E-mail: smscep@gmail.com

Página 02 de 02

ANEXO I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE COMPONENTES E EVENTOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DO ENVENENAMENTO PELA SERPENTE Naja annulifera

Pesquisador: Felipe Silva de França

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11395213.5.3001.5467

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: Instituto Butantan

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 974.312

Data da Relatoria: 06/03/2015

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: ESTUDO DE COMPONENTES E EVENTOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DO ENVENENAMENTO PELA SERPENTE Naja annulifera

Pesquisador: Felipe Silva de França

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Objetivo da Pesquisa:

Inclusão do Instituto de Ciências Biomédicas como Instituição co-participante por, o aluno estar matriculado no mestrado dessa instituição.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O CEP/ICB/USP acata o parecer do CEP Butantã

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP/ICB/USP acata o parecer do CEP Butantã

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

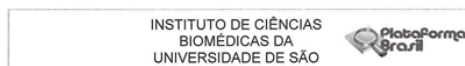
O CEP/ICB/USP acata o parecer do CEP Butantã

Recomendações:

O CEP/ICB/USP acata o parecer do CEP Butantã

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 Fax: (11)3091-8405 E-mail: cep@icb.usp.br

Página 01 de 01



Continuação do Parecer: 974.312

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP/ICB/USP acata o parecer do CEP Butantã

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, 19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

Em não havendo um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante site do ICB.

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

SAO PAULO, 05 de Março de 2015

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 Fax: (11)3091-8405 E-mail: cep@icb.usp.br

Página 02 de 02