

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

## 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 LTB<sub>4</sub> 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- $\alpha$ . 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 LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, 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 LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>, 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 (PLA2s), 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 LTB<sub>4</sub> 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- $\alpha$ . 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 LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, 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 LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub>, 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 ALI. 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

## 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 (FLA<sub>2</sub>), 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 A<sub>2</sub>:** um grupo de enzimas de relevância nos envenenamentos e em processos fisiológicos e patológicos são as FLA<sub>2</sub>. As FLA<sub>2</sub> 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 FLA<sub>2</sub> são divididas em 16 grupos distintos, que podem ser agrupados em seis classes principais, e, dentre estas tem-se a classe das FLA<sub>2</sub> secretadas (sFLA<sub>2</sub>s), 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 FLA<sub>2</sub> 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 FLA<sub>2</sub> 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 ( $\beta$ -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 serina<sup>195</sup>, altamente reativo estabilizado por um resíduo de histidina<sup>57</sup>, e um resíduo de ácido aspártico<sup>102</sup> (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 ( $\alpha$ -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- $\alpha$ ) de membrana (MOURA-DA-SILVA et al., 1996), induzir a produção local das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, hemorragia e dermonecrose. Neste modelo, a dermonecrose foi totalmente dependente dos receptores para TNF- $\alpha$  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 dermonecrótica.

Alguns estudos mostraram que mastócitos atuam de forma protetora no envenenamento por *Atractaspis engadensis* e toxinas isoladas deste veneno, as sarafotoxinas. Assim, camundongos *Kit<sup>W-sh</sup>/Kit<sup>W-sh</sup>*, 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 $\beta$  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 FLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes apresentam similaridade estrutural com FLA<sub>2</sub> inflamatórias de mamíferos (LEIGUEZ et al., 2014). Estas FLA<sub>2</sub> 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 FLA<sub>2</sub> de venenos ofídicos são capazes de agir sobre neutrófilos e macrófagos disparando cascatas de sinalização intracelular envolvendo uma série de moléculas, incluindo FLA<sub>2</sub> celulares, tais como cFLA<sub>2</sub>

(Fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica) e iFLA<sub>2</sub> (Fosfolipase A<sub>2</sub> independente de Ca<sup>2+</sup>), e Ca<sup>2+</sup>, 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 PGD<sub>2</sub> (Prostaglandina D<sub>2</sub>), PGE<sub>2</sub>, PGJ<sub>2</sub>, 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 FLA<sub>2</sub> 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 FLA<sub>2</sub>, 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 FLA<sub>2</sub>.

As FLA<sub>2</sub> 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 FLA<sub>2</sub> 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 PGE<sub>2</sub> 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- $\alpha$  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 FLA<sub>2</sub> 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 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, INF- $\gamma$  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 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, INF- $\gamma$ , 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*.

## 1.6 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, FLA<sub>2</sub> 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- $\alpha$ .

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<sub>6r</sub>2s<sub>2</sub>) (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  $\beta$ -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,  $\alpha$  e  $\beta$ , e assim como o C4, apresenta um domínio tioéster 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 tioéster, 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 (NH<sub>2</sub>) 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 Mg<sup>2+</sup>. 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(H<sub>2</sub>O), que apresenta propriedades C3b like, uma vez que interage com o FB e forma uma C3 convertase semelhante à da via alternativa (C3(H<sub>2</sub>O)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(H<sub>2</sub>O) 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,  $\alpha$  e  $\beta$ . 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,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (MORIKIS & LAMBRIS, 2005). Inicialmente, a cadeia  $\beta$  do C8 se liga ao C7, que juntamente com a cadeia  $\alpha$ , 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  $\gamma$  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  $\beta$ -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  $\beta$ -hexosaminidase (FUKOIA et al., 2008). Além disso, estudos detectaram que o C3a gerado pela ação da  $\beta$ -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 ( $\text{Cl}^-$ ) e Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  (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 a., 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<sup>o</sup> 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, interessante, 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 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  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 $\beta$  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 $\beta$ .

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 $\beta$  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  $\alpha$  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 $\beta$ 2 (do inglês: *Phospholipase C  $\beta$ 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 $\kappa$ 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 LTB<sub>4</sub> (LEE et al., 2018; MARLEAU et al., 1999; SADIK et al., 2012). Se ativados, em conjunto ou isoladamente, os eixos C5a-C5aR1 e LTB<sub>4</sub>-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  $\beta$ -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). LTB<sub>4</sub> 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 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p40) e TNF- $\alpha$ , 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<sub>L</sub> (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<sup>+</sup> 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- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), 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 $\beta$  foram aumentados. A adição de MCC950 e Z-YVAD-FMK, respectivamente, inibidores de NLRP3 e caspase 1, suprimiu a produção de IFN- $\gamma$  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 $\beta$ .

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 $\beta$ . 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 do inflamassoma de NLRP3 e secreção de IL-1 $\beta$ , 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 $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$ -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- $\beta$ , 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 Ca<sub>2+</sub>- dependent lectin receptor*) e STING (do inglês, *cytosolic DNA Sensor Stimulator of Interferon Genes*) promove aumento nos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$ , 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- $\beta$ , 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 efectoras 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- $\beta$  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,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  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- $\alpha$ ,  $LTB_4$  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  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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 metaloproteinases, 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.

## 2.6 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 LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, 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 LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub>, os quais induzem disfunções endoteliais culminando na formação de edema intenso. Ainda, o C5a via indução da quimiocina CXCL1 e LTB<sub>4</sub> 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- $\alpha$ , 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- $\alpha$  levels in snakebite cases occurring in Southern Turkey. **Emergency Medicine Journal**, 2011. v. 28, n. 3, p. 208-211.

ADAMIAKI, 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<sup>+</sup> 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  $\alpha$ -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<sup>+</sup> 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 $\beta$  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 PGE<sub>2</sub>. *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<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas, 1999a.

BARRAVIERA, B. **Ofídios, estudo clínico dos acidentes**. 1<sup>a</sup> 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 $\beta$ , 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 A<sub>2</sub> Structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 23, n. 1, p. 1-22. 2009a.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A<sub>2</sub> 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<sup>a</sup> 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 A<sub>2</sub>: Global gene analysis on aquaporins and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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 A<sub>2</sub>-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 B<sub>4</sub>-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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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 B<sub>4</sub>- 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  $\beta$ -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(H<sub>2</sub>O) 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 E<sub>2</sub> 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(H<sub>2</sub>O) 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  $\beta$ -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<sup>dim</sup>/CD16<sup>pos</sup>/CD45<sup>pos</sup> 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<sup>a</sup> 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- $\kappa$ 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.; ZHAOA, C.; GAO, W.; HE, F.; ZHANG, J.; ZHAO, D.; QIU, W.; WANG, Y. C5a induces the synthesis of IL-6 and TNF- $\alpha$  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<sup>II</sup>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- $\alpha$  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 A<sub>2</sub> 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<sup>a</sup> 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 A<sub>2</sub> 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 T<sub>4</sub>. **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 $\beta$  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 B<sub>4</sub>- 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-C5a<sub>1</sub> receptor signalling ameliorates disease pathology in the hSOD1<sup>G93A</sup> 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 $\beta$  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.; FOUCAR, 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- $\alpha$  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 Ca<sup>2+</sup> 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 A<sub>2</sub> 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 A<sub>2</sub> myotoxins: are there additional effector mechanisms involved? **PeerJ Life & Environment**, v. 16, n. 2, p. 1-16. 2014.
- MOREIRA, V. et al. A phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom activates neutrophils in culture: expression of cyclooxygenase-2 and PGE<sub>2</sub> biosynthesis. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 288-296. 2011.
- MOREIRA, V. et al. A catalytically inactive snake venom Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> 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- $\alpha$  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**. 8ª 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 hypoferremia 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](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 A<sub>2</sub>: 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<sup>a</sup> 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 A<sub>2</sub> 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/PLA<sub>2</sub> 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<sup>d</sup> 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 PLA<sub>2</sub> 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  $\alpha$ - 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 jarrahagin 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](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](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.; STAEHELIN, 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 Ca<sup>2+</sup> 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 A<sub>2</sub>. **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 inactivate 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<sup>II</sup>1 and V<sup>II</sup>2, two cytotoxin homologues from banded egyptian cobra (*Naja haje annulifera*) venom, and the complete amino acid sequence of toxin V<sup>II</sup>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 A<sub>2</sub> 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 B<sub>4</sub> receptors, BLT<sub>1</sub> and BLT<sub>2</sub>. **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- $\gamma$  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 LTB<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> 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 $\beta$  release and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v.9, n. 890, p. 1-16. 2018a.

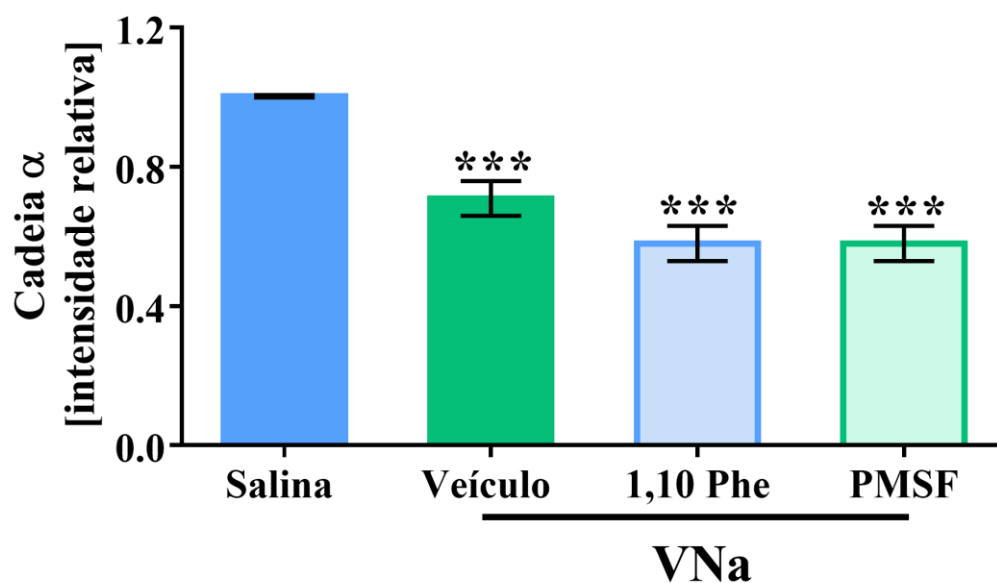
ZOCCAL, K. F. et al. LTB<sub>4</sub> and PGE<sub>2</sub> modulate the release of MIP-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by cells stimulated with Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 150, p. 289-296. 2018b.

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.

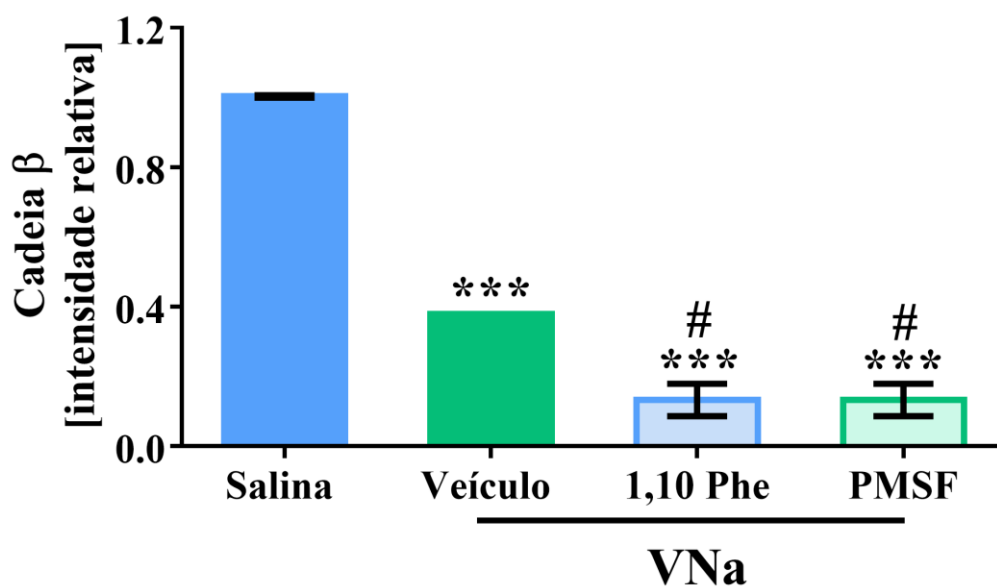
ZULIANI, J. P. et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, n. 3, p. 335-346. 2005.

## APÊNDICE A

**a**



**b**



**APÊNDICE A.** Amostras de C5 humano purificado (2,5 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, 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-França<sup>1</sup>, Isadora Maria Villas-Boas<sup>1</sup>, Solange Maria de Toledo Serrano<sup>2</sup>, Bruno Cogliati<sup>3</sup>, Sonia Aparecida de Andrade Chudzinski<sup>2</sup>, Priscila Hess Lopes<sup>1</sup>, Eduardo Shigueo Kitano<sup>2</sup>, Cinthya Kimori Okamoto<sup>1</sup>, Denise V. Tambourgi<sup>1\*</sup>

**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](mailto: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 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), Hyaluronidase, L-amino-acid oxidase, Cobra Venom Factor and Serine Proteinase. The presence of PLA<sub>2</sub>, 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 França<sup>1</sup>, Isadora Maria Villas-Boas<sup>1</sup>, Bruno Cogliati<sup>2</sup>, Trent M. Woodruff<sup>3</sup>, Edimara da Silva Reis<sup>4</sup>, John D. Lambris<sup>4</sup> and Denise V. Tambourg<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Immunochimistry Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup>Neuroinflammation Laboratory, School of Biomedical Sciences, The University of Queensland, St Lucia, QLD, Australia, <sup>4</sup>Department 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><b>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</b></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 <a href="http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/">http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/</a> 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  
ceuaib@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 <sub>129</sub> 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  
ceuaib@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](mailto:icb@icb.usp.br)



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" - Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB II - 05508-000  
Comitê de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 3091-1723 - e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@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](http://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.

Constando 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:** smcccep@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.

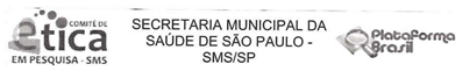
**Endereço:** Rua General Jardim, 36 - 1º andar  
**Bairro:** CENTRO  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3397-2464

**CEP:** 01.223-010

**Email:** smcccep@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 Município: SAO PAULO CEP: 01.223-010  
UF: SP  
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.

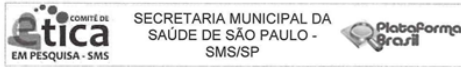
SAO PAULO, 07 de Junho de 2013

Assinador por:  
SIMONE MONGELLI DE FANTINI  
(Coordenador)

Endereço: Rua General Jardim, 35 - 1º andar  
Bairro: CENTRO Município: SAO PAULO CEP: 01.223-010  
UF: SP  
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.

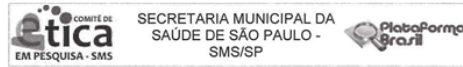
Do ponto de vista ético, esta emenda não muda a essência do estudo que continua a mesma, estando de acordo com a Res 644/12 e suas complementares.

#### 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

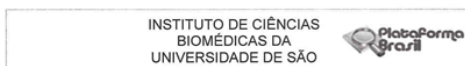
Assinado por:

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:

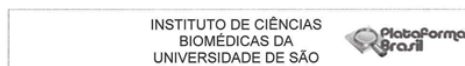
O CEP/ICB/USP acata o parecer do CEP Butantã

### 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