

JOEL JOSÉ MEGALE GABRILI

**Papel do sistema complemento no processo inflamatório causado
pelo veneno da lagarta de *Premolis semirufa***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Profa. Dra. Denise V. Tambourgi

Versão original.

São Paulo

2023

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Megale Gabrili, Joel José

Papel do sistema complemento no processo
inflamatório causado pelo veneno da lagarta de
Premolis semirufa / Joel José Megale Gabrili;
orientador Denise V. Tambourgi. -- São Paulo, 2023.
123 p.

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

1. Premolis semirufa. 2. Pararama. 3. Veneno. 4.
Inflamação. 5. Sistema Complemento. I. V. Tambourgi,
Denise, orientador. II. Título.

RESUMO

A lagarta da mariposa *Premolis semirufa*, comumente chamada de pararama, é encontrada na região amazônica brasileira. O contato acidental com as cerdas da lagarta causa uma sensação de coceira intensa, seguida de sintomas de inflamação aguda. Após múltiplos contatos, estabelece-se uma reação inflamatória crônica (pararamose) semelhante à osteoartrite. Esta é caracterizada pelo espessamento sinovial articular, por deformidades articulares e perda de movimento. Até o momento, ainda não há tratamento específico para a pararamose e o nosso grupo tem estudado a ação deste veneno, com o objetivo de identificar possíveis alvos para o tratamento dessa doença. Neste estudo demonstramos que o veneno da pararama ativa (i) o sistema complemento, com geração de anafilatoxinas e do sTCC; (ii) os leucócitos, com expressão aumentada de C11b, TLR2 e TLR4 em monócitos e C11b, CD14, TLR2 e C5aR em granulócitos, e (iii) induz a secreção de IL-17, TNF- α , CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 e CXCL10 em sangue humano. Também usamos inibidores específicos do complemento para pontos-chave da cascata para determinar mecanisticamente os condutores do processo inflamatório neste modelo. Com a inibição do complemento, no nível de C3, com a compstatina, ou do eixo C5a-C5aR1, com o PMX205, houve uma modulação da ativação dos leucócitos e da secreção de citocinas e quimiocinas. Para avaliar melhor o papel do complemento na inflamação induzida pelo veneno do pararama, células endoteliais foram expostas ao plasma coletado de amostras de sangue tratadas com veneno e como resultado observamos a produção de CXCL8 e CCL2, que foi consideravelmente reduzida pelo uso de inibidores do complemento. Além disso, neutrófilos humanos quando expostos ao plasma coletado de amostras de sangue tratadas com veneno, produziram TNF- α , IL-6, CXCL8, mieloperoxidase e Elastase, sendo que a inibição do complemento, com compstatina e PMX205, resultou em uma redução da geração de todos esses mediadores. Assim, esses resultados mostram a contribuição do sistema complemento para o processo inflamatório induzido pelo veneno da pararama no modelo de sangue total humano e destacam a importância de C3 e do eixo C5a-C5aR1 na inflamação causada por esse veneno e seu possível papel na progressão da pararamose. Sugerem também que a modulação da atividade do sistema complemento, pelo uso de inibidores específicos, possa ser uma potencial terapia complementar para os indivíduos acidentados com a lagarta da *Premolis semirufa*.

Palavras-chave: *Premolis semirufa*. Pararama. Veneno. Inflamação. Sistema Complemento. Neutrófilos

ABSTRACT

The caterpillar of the moth *Premolis semirufa*, commonly known as pararama, is found in the Brazilian Amazon region. Accidental contact with the caterpillar's bristles causes an intense itching sensation, followed by symptoms of acute inflammation. After multiple contacts, a chronic inflammatory reaction (pararamosis) similar to osteoarthritis is established. This is characterized by joint synovial thickening, joint deformities and loss of movement. So far, there is still no specific treatment for pararamosis and our group has studied the action of this venom, with the aim of identifying possible targets for the treatment of this disease. In this study, we demonstrate that pararama venom activates (i) the complement system, generating anaphylatoxins and sTCC; (ii) leukocytes, with increased expression of C11b, TLR2 and TLR4 in monocytes and C11b, CD14, TLR2 and C5aR in granulocytes, and (iii) induces the secretion of IL-17, TNF, CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 and CXCL10 in human blood. We also used specific complement inhibitors for cascade key points to mechanistically determine the drivers of the inflammatory process in this model. By inhibiting the complement system, at the C3 level, with compstatin, or the C5a-C5aR1 axis, with PMX205, there was a modulation of the leukocyte activation and secretion of cytokines and chemokines. To better assess the role of Complement in pararama venom-induced inflammation, endothelial cells were exposed to plasma collected from venom-treated blood samples and as result, we observed the production of CXCL8 and CCL2, which was considerably reduced by the use of complement inhibitors. Furthermore, human neutrophils when exposed to plasma collected from venom-treated blood samples produced TNF, IL-6, CXCL8, myeloperoxidase and Elastase, and the complement inhibition with compstatin or PMX205 resulted in a reduction in the generation of all these mediators. Thus, these results show the contribution of the complement system to the inflammatory process induced by pararama venom in the human whole blood model and highlight the importance of C3 and the C5a-C5aR1 axis in the inflammation caused by this venom and its possible role in the progression of the disease. They also suggest that the modulation of the activity of the complement system, using specific inhibitors, may be a potential complementary therapy for individuals who have had an accident with the caterpillar of *Premolis semirufa*.

Keywords: *Premolis semirufa*. Pararama. Venom. Inflammation. Complement system. Endothelial cells. Neutrophils



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 15 de outubro de 2018.

PARECER 1415/CEPSH

CAAE nº 97565418.2.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1452/18

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**PAPEL DO SISTEMA COMPLEMENTO E DOS NEUTRÓFILOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO CAUSADO PELO VENENO DA LAGARTA DE Premolis semirufa**", dos pesquisadores Profa. Dra. **Denise Vilarinho Tambourgi** e aluno Joel José Megale Gabrili.

Caberá aos pesquisadores, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsb; 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **15/10/2019**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pararamose

A pararamose é uma doença ocupacional de natureza inflamatória causada pelo contato com as cerdas da lagarta ou casulo da mariposa *Premolis semirufa* (COSTA, 1991). *P. semirufa* pertence à ordem Lepidoptera, superfamília Noctuoidea, família Erebiidae, subfamília Arctiinae (SCHMIDT; LAFONTAINE, 2010; VILLAS-BOAS et al., 2018; ZAHIRI et al., 2012). O termo pararamose é utilizado em alusão ao nome popular dado à forma larval desta espécie, “pararama”. Tal lagarta é nativa da região amazônica brasileira e vive em seringueiras (*Hevea* spp), se alimentando de suas folhas (COSTA et al., 1995b). As lagartas, em seu último instar, têm aproximadamente 4,5 cm de comprimento e apresentam uma coloração mesclada de preto, amarelo, vermelho e branco com cerdas castanhas e prateadas de três tamanhos diferentes (pequeno, médio e grande), distribuídas ao longo do corpo. Os casulos são fusiformes, de coloração parda, com um lado achatado pelo qual eles se ligam a uma superfície, como o tronco da seringueira ou a tigela de coleta do látex (Figura 1) (RODRIGUES; MORAES; MÜLLER, 1976; VILLAS-BOAS et al., 2018).

Figura 1 – Lagarta e casulo de *Premolis semirufa*



À esquerda, lagarta de *P. semirufa* e, à direita, o seu casulo. (Foto: Giselle Pidde – Instituto Butantan)

Diferentes tipos de cerdas podem ser também encontradas nos casulos de *P. semirufa* e estas parecem oferecer o mesmo perigo que a própria lagarta; as pequenas cerdas são eretas e

dispostas perpendicularmente sobre a superfície externa, dando ao casulo maior possibilidade de atrito com as mãos do seringueiro (RODRIGUES; MORAES; MÜLLER, 1976; VILLAS-BOAS et al., 2018).

As primeiras manifestações da pararamose foram observadas na década de 40, em trabalhadores dos seringais da Companhia Ford Industrial do Brasil, na região do Tapajós, no estado do Pará. Em 1961, o jornal “Correio da Manhã”, do Rio de Janeiro, publicou que “cerca de 40% dos seringueiros de Belterra sofreram os efeitos da danosa ação da pararama” (DIAS; RODRIGUES, 1997). Em seguida, novas observações, incluindo estudos radiológicos da doença, permitiram uma melhor avaliação clínica dos acidentados e identificação do agente causal (BRAGA DIAS; AZEVEDO, 1973; DIAS; AZEVEDO, 1991). Qualquer região do corpo pode ser afetada: existem relatos de acidentes nos pés, pescoço ou na região abdominal, embora nestes casos sejam somente observadas dermatites, às vezes agravadas pela coceira causada pelo contato com as cerdas. No entanto, como é um acidente tipicamente relacionado ao trabalho, a maioria dos casos são decorrentes do contato da pararama com as mãos (COSTA, 1991; RODRIGUES; MORAES; MÜLLER, 1976).

O contato com as cerdas causa reações imediatas de intenso prurido, seguido de dor, calor e rubor, típicos de um processo inflamatório agudo com duração de 3 a 7 dias (COSTA, 1991). No entanto, após múltiplos acidentes, o processo pode se tornar crônico e os indivíduos podem desenvolver espessamento da membrana sinovial articular, que pode evoluir para deformidades e imobilização da articulação afetada. Este quadro clínico de anquilose é semelhante, em alguns aspectos, ao da artrite reumatoide (AR) (BRAGA DIAS; AZEVEDO, 1973; COSTA et al., 1995b) e da osteoartrite (OA) ((PIDDE et al., 2021; VILLAS-BOAS et al., 2020) (Figura 2).

Nas avaliações radiológicas dos acidentados foram constatadas alterações periarticulares edematosas e fibróticas, não sendo encontradas alterações nas superfícies articulares falangeanas. As análises histopatológicas de camundongos, expostos às cerdas da lagarta da *P. semirufa*, revelaram edema em 2 horas, acompanhado de infiltrado de neutrófilos em 24 e 48 horas. Após quatro dias, foi observada uma substituição do processo inflamatório agudo por uma reação crônica granulomatosa, que persistiu por trinta e nove dias após a exposição às cerdas, com proliferação fibrosante do tecido conjuntivo periférico (BRAGA DIAS; AZEVEDO, 1973). Em experimentos utilizando ratos, a inoculação do extrato das cerdas da lagarta da pararama causou processo inflamatório, caracterizado por um infiltrado de células ao redor do local da inoculação (COSTA et al., 1995a).

Figura 2 – Mão de paciente com pararamose



Foto de trabalhador que teve múltiplos contatos com a lagarta de *P. semirufa*, na década de 1970, cidade de Santarém, estado do Pará, Brasil. O dedo médio mostra o espessamento da falange distal (VILLAS-BOAS et al., 2018).

Por sua importância como doença ocupacional, a “pararamose” foi incluída em 1992, no “Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos” produzido pelo Ministério da Saúde, com a denominação de “Periartrite falangeana por pararama”. Ainda não existe um tratamento específico para esta doença, mas corticoides têm sido utilizados com o objetivo de impedir o desenvolvimento ou amenizar a doença crônica (CARDOSO; HADDAD JR, 2005; VILLAS BOAS et al., 2015).

Sendo a pararamose um problema de saúde pública, cujo tratamento eficaz ainda não foi estabelecido, há alguns anos o nosso grupo iniciou uma série de estudos sobre as características biológicas e a resposta imunológica às cerdas da pararama. Assim, foi mostrado que o extrato das cerdas da lagarta da *Premolis semirufa* possui uma mistura de enzimas que, atuando conjuntamente, podem promover as manifestações clínicas da pararamose (VILLAS-BOAS et al., 2012). Dentre elas, foram identificadas: hialuronidase, que degrada o ácido hialurônico, componente abundante na matriz intercelular da pele, cartilagem e líquido sinovial (LAURENT; FRASER, 1992); gelatinase, responsável por degradar colágenos tipo IV, V, VII e XI que compõe os ossos e cartilagens articulares (REYNOLDS, 1996); serino proteases e metaloproteases que podem estar envolvidas na degradação da cartilagem e componentes de

matriz, como laminina e colágeno IV (BARAMOVA et al., 1990; COSTA et al., 1993). Além disso, foi verificado (VILLAS-BOAS et al., 2012) que inoculações repetidas do extrato das cerdas da pararama, na pata de camundongos, induziram resposta inflamatória local importante com infiltrado neutrofílico e altos títulos de IgG1 no soro dos animais, indicando a predominância de resposta Th2. Autoanticorpos, anti-colágeno tipo II e anti-DNA, encontrados em pacientes com AR (NANDAKUMAR; HOLMDAHL, 2006), não foram detectados nos animais expostos ao extrato das cerdas da lagarta, enfraquecendo assim uma possível correlação entre pararamose e AR (VILLAS-BOAS et al., 2012).

Prosseguindo na avaliação do processo inflamatório local, após injeção de extrato das cerdas da pararama na pata de camundongos, foi detectada a presença de macrófagos e neutrófilos, e um aumento na detecção de citocinas associadas ao sistema imune inato (TNF- α , IL-1 e IL-6), à proliferação de linfócitos T (IL-2), à resposta Th1 (IFN- γ e IL-12), à resposta Th2 (IL-4), antiinflamatória (IL-10) e associada à Th17 (IL-17 e IL-23) (VILLAS-BOAS et al., 2013). Nos linfonodos, nosso grupo ainda observou aumento do número total e absoluto de linfócitos TCD4 e TCD8, assim como de linfócitos B. Ainda, foram encontradas células TCD4 expressando a molécula de adesão CD44, importante na interação com componentes de matriz extracelular e ácido hialurônico (ARUFFO et al., 1990; JALKANEN; JALKANEN, 1992; PURE; CUFF, 2001); células B CD40+ relacionadas à ativação, proliferação, diferenciação, sobrevivência e geração de células B de memória (MIGA et al., 2000; NERON et al., 2006). Células TCD4, produtoras de IL-17, também foram identificadas nos linfonodos, sendo estas associadas à doenças autoimunes como AR, esclerose múltipla e doenças inflamatórias ósseas (FUJINO et al., 2003; NAKAE et al., 2003; TZARTOS et al., 2008). A citocina pró-inflamatória IL-17 é produzida pelos linfócitos T (Th17) (KOLLS; LINDEN, 2004), células NK, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e mastócitos (CUA; TATO, 2010). Ao se ligar ao seu receptor, a IL-17 induz a expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias capazes de recrutar neutrófilos e outras células mielóides (GAFFEN et al., 2006). O extrato de cerdas da pararama promoveu aumento do número de células do linfonodo que expressam o receptor para IL-17 (VILLAS-BOAS et al., 2013), possivelmente contribuindo para a evolução da pararamose.

Além da contribuição dos linfócitos na resposta imune à pararama, foi mostrado (VILLAS BOAS et al., 2015) que o extrato das cerdas de *P. semirufa* também é capaz de ativar o sistema complemento em soro humano, gerando as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, potentes mediadores inflamatórios que atuam na quimiotaxia, geração de radicais de oxigênio citotóxicos (HUGLI, 1986; OTTONELLO et al., 1999) e regulando a fibrose tecidual (ADDIS-

LIESER; KOHL; CHIARAMONTE, 2005; STREY et al., 2003). A ativação do sistema complemento deve ser mais uma peça do grande quebra-cabeça da resposta inflamatória decorrente da pararamose, contribuindo para a cronicidade do processo, indução de fibrose e progressão da doença culminando na perda de função da articulação acometida.

Mais recentemente, foi observado aumento da produção de IL-6, IL-8, MCP-1, prostaglandina E2, metaloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-13) e componentes do sistema complemento (C3, C4 e C5) em cultura de condrócitos humanos tratados com o extrato de cerdas da *P. semirufa* (VILLAS-BOAS et al., 2020). Além disso, foi detectado uma diminuição significativa no agrecano e no colágeno tipo II e aumento da proteína HMGB1, após tratamento com extrato. Este estudo também permitiu identificar, nos condrócitos tratados com o extrato da pararama, importantes vias relacionadas ao processo inflamatório presentes em doenças articulares, como a resposta inflamatória, a quimiotaxia de células imunes e o remodelamento da matriz extracelular (MEC). Além disso, foi realizado uma análise multiômica do veneno da lagarta da *P. semirufa* com o propósito de identificar possíveis moléculas relacionadas à doenças osteoarticulares. A análise dos perfis transcriptômicos e proteômicos da pararama mostraram uma mistura de diferentes classes de toxinas putativas e outras proteínas que podem estar relacionadas às manifestações clínicas da pararamose. Dentre elas, foram identificadas no veneno da pararama, 18 moléculas homólogas às proteínas presentes em grânulos dos neutrófilos (PIDDE et al., 2021).

1.2 Sistema complemento

Descoberto há mais de um século por Jules Bordet, laureado com Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1919, o sistema complemento foi caracterizado por sua capacidade de “complementar” as respostas imunológicas mediadas por anticorpos ou por células e atuar na eliminação de microorganismos e inflamação.

O sistema complemento é composto por mais de 50 proteínas, que são sintetizadas principalmente no fígado, e estão presentes na forma inativa como zimogênios até que sejam ativadas no sítio inflamatório. Desse modo, após o reconhecimento de um determinado alvo, o sistema complemento pode ser ativado por três diferentes vias: alternativa, clássica e das lectinas culminando em uma reação enzimática em cascata (KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2013; MORGAN, 2000; RICKLIN et al., 2010; WALPORT, 2001).

A via alternativa se inicia a partir da clivagem do componente central C3 e deposição de C3(H₂O) sobre a superfície de patógenos ou outros alvos por um processo denominado de *tickover*, mecanismo de auto-ativação responsável pela maioria das atividades do complemento no soro (TACK et al., 1980), ou pela deposição de C3b gerado pelas vias clássica e das lectinas (MULLER-EBERHARD, 1988). O fator B é recrutado e se liga a C3(H₂O) ou a C3b seguido do recrutamento do fator D, que cliva o fator B para formar as duas C3 convertases da via alternativa: C3(H₂O)Bb e C3bBb, que são estabilizadas pela presença da Properdina. A Properdina é uma molécula secretada por neutrófilos, macrófagos e células T ativadas que estabiliza a convertase se ligando ao C3b. Outro mecanismo de ativação da via alternativa foi proposto no qual a properdina reconhece e se liga diretamente à superfície da célula alvo, ativando localmente a via alternativa (KEMPER et al., 2008).

A via clássica é muitas vezes mencionada como dependente de anticorpos, pois pode ser iniciada por imunocomplexos formados por patógenos opsonizados com IgG ou IgM. No entanto, C1q pode iniciar a ativação desta via por sua interação com estruturas presentes em células microbianas e apoptóticas ou por interagir com moléculas da família das pentraxinas como, por exemplo, a proteína C-reativa (PCR). O complexo C1 é composto pelas moléculas C1q, C1r e C1s. A ativação de C1r e C1s ocorre como consequência da ligação da molécula de C1q a imunocomplexos, por exemplo, e desta forma C1s é capaz de clivar C4 e C2 formando a C3 convertase da via clássica, C4bC2a (RICKLIN et al., 2010).

A via das lectinas é ativada pela interação da lectina de ligação a manose (MBL - *Mannose-Binding Lectin*) a resíduos repetitivos de manose presentes na superfície de microrganismos (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006), ou de ficolinas a componentes acetilados, além de outras estruturas (THIEL, 2007). Ambas moléculas são encontradas no soro em complexos com serinoproteases denominadas MASP (*Mannan-binding lectin Associated Serine Protease*). A família MASP consiste nas enzimas MASP-1, 2 e 3 e MASP-19 (*MBL-Associated protein-19* kDa) uma forma truncada do MASP-2 sem atividade enzimática (SWIERZKO et al., 2009). Dessa forma, uma vez que a MBL se liga ao seu alvo, as MASPs são ativadas de maneira similar a C1r e C1s, resultando na clivagem de C4 e C2, e formação da C3 convertase C4bC2a, produto comum a ativação das vias clássica e das lectinas (HARMAT et al., 2004; THIEL et al., 1997).

Independentemente da via do complemento, a ativação culmina na formação das C3 convertases. As C3 convertases formadas na via alternativa (C3bBb) e nas vias clássica e das lectinas (C4bC2a) clivam C3 em dois fragmentos, C3b e C3a. O fragmento C3b age como opsonina facilitando a fagocitose e atua na alça de amplificação da ativação do complemento.

Além disso, tal fragmento pode se complexar à C3 convertase para formar a C5 convertase da via alternativa (C3bBbC3b) ou das vias clássica e das lectinas (C4bC2aC3b). Por sua vez, a C5 convertase é capaz de clivar a molécula de C5 gerando C5b e C5a. C5b é depositado na superfície do patógeno iniciando a formação do complexo de ataque a membrana (MAC; C5b-9), seguido da ligação das moléculas C6, C7, C8 e várias moléculas de C9. O MAC se insere então na membrana da célula alvo formando poros o que resulta em sua lise (KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2013).

Assim, como resultado da ativação do sistema complemento pode ocorrer a eliminação do patógeno através de lise direta orquestrada pelo MAC, opsonização, quimiotaxia e inflamação, além da remoção de debris celulares e de imunocomplexos (KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2013).

Atualmente, a compreensão desse importante mecanismo da imunidade inata foi ampliada e vários estudos demonstraram que o complemento desempenha um papel fundamental na regulação da imunidade inata e adaptativa e que este sistema está também presente no ambiente intracelular de células imunes e mieloides, regulando a imunidade adaptativa e também o metabolismo (ARBORE; KEMPER, 2016; ARBORE; KEMPER; KOLEV, 2017; HEEGER; KEMPER, 2012; KEMPER; ATKINSON, 2007; KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2013; KUNZ; KEMPER, 2021; LISZEWSKI et al., 2013; WEST; AFZALI; KEMPER, 2018).

Assim, há cerca de 10 anos foi mostrado que a ativação intracelular do complemento pode afetar a modulação de uma resposta de células T (HEEGER; KEMPER, 2012; KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2013). Assim, foi mostrado que células T em repouso têm em seu interior moléculas de C3 que são clivadas continuamente pela cathepsina L, levando a geração de C3a que interage com o receptor de C3a (C3aR) expresso nos lisossomos. Tal evento é essencial para a sobrevivência metabólica dessas células na periferia, sendo que se o sistema de ativação intracelular de C3 for inativado, as células T não sobrevivem. Após a ativação do TCR, o sistema intracelular de C3 se transloca rapidamente para a superfície celular, e C3a e C3b sinalizam por meio da interação com C3aR e CD46, respectivamente, de maneira autócrina, desencadeando a produção de IFN- γ e a modulação para Th1 (LISZEWSKI et al., 2013). Após a descoberta do sistema C3 intracelular, foi demonstrado que as células T também abrigam um sistema C5 intracelular necessário para a ativação normal das células T (ARBORE et al., 2016).

Apesar da principal fonte de componentes do sistema complemento sérico ser o fígado, as proteínas, receptores e reguladores do complemento também são produzidos e expressos por populações de células não imunes, incluindo células epiteliais, fibroblastos, adipócitos e

astrócitos, e também por células imunes, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas, granulócitos, células NK e linfócitos B e T. Assim, o sistema de proteínas intracelulares do complemento e sua ativação foi nomeado como “complossomo” (ARBORE; KEMPER; KOLEV, 2017; HEEGER; KEMPER, 2012; KOLEV; KEMPER, 2017; KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2013). A partir da descoberta desse compartimento intracelular de ativação do complemento, muitas questões têm sido levantadas, por exemplo, sobre o papel do complossomo em doenças onde o sistema complemento está envolvido, no entanto, tais mecanismos moleculares ainda não foram definidos (WENZEL; KEMPER; KOHL, 2021).

A ativação do complemento é controlada por vários reguladores solúveis e de membrana, que atuam em diferentes pontos da cascata para manter a integridade do hospedeiro (MORGAN; HARRIS, 1999). Tais mecanismos de regulação são finamente balanceados para que a ativação do complemento ocorra na superfície dos microrganismos, mas que a deposição de suas proteínas nas células e tecidos próprios seja controlada. Quando esses mecanismos reguladores estão em desequilíbrio, o sistema complemento pode causar lesões no tecido hospedeiro, por indução e aumento da inflamação (WALPORT, 2001).

A importância no controle da ativação do sistema complemento é claramente indicada pelo fato de que este sistema inclui quase tantas proteínas reguladoras, quanto outros componentes das vias. Diversas proteínas presentes no soro e nas membranas celulares regulam negativamente a ativação do complemento e, embora algumas dessas proteínas possuam outras funções, a regulação do complemento parece ser o único papel fisiológico de vários desses reguladores. O primeiro regulador plasmático do complemento a ser bem caracterizado foi o inibidor de C1-esterase (C1-INH), purificado parcialmente do plasma normal em 1961 por Lepow e colaboradores (PENSKY; LEVY; LEPOW, 1961). A descoberta, após um ano, que o angioedema hereditário (AEH) era causado pela deficiência de C1-INH, despertou grande interesse na época para o desenvolvimento de tratamentos envolvendo a restauração dos níveis séricos de C1-INH, por infusão de plasma fresco ou concentrado de C1-INH parcialmente purificados, sendo este o primeiro exemplo de terapia utilizando um regulador do complemento (MORGAN; HARRIS, 1999).

O fator acelerador de decaimento (DAF - *Decay-Accelerating Factor*) é uma das proteínas de membrana reguladoras do sistema complemento. Hoffman a descreveu pela primeira vez ao observar que componentes purificados de membranas de eritrócitos, tornavam o alvo resistente a lise mediada pelo complemento (HOFFMANN, 1969a, b). Nicholson-Weller e colegas conseguiram refinar a purificação dessa proteína de 60 kDa que promovia a aceleração da dissociação das C3 convertases, e por isso tal componente foi denominado de 'fator

acelerador de decaimento' (NICHOLSON-WELLER; BURGE; AUSTEN, 1981; NICHOLSON-WELLER et al., 1982).

O fator I (FI) foi, primeiramente, descrito em 1968 e denominado como inativador de C3, por Lachmann e Miiller-Eberhard (LACHMANN; MULLER-EBERHARD, 1968). O cofator plasmático H (FH) foi descrito em 1976 (WHALEY; RUDDY, 1976) e a proteína de ligação de C4b (C4bp) foi isolada primeiramente no soro de camundongos em 1977 (FERREIRA; TAKAHASHI; NUSSENZWEIG, 1977). Após essas descobertas, várias outras proteínas de membrana protetoras contra a ativação do complemento foram descritas, como o receptor 1 de complemento (CR1) (FEARON, 1979), proteína cofator de membrana (MCP – *Membrane Cofactor Protein*), inicialmente chamada de gp45-70 (HOLERS et al., 1985), e o CD59 identificado de forma independente por vários grupos no final da década de 80 (DAVIES et al., 1989; HOLGUIN et al., 1989; MERI et al., 1990; OKADA et al., 1989; SUGITA; NAKANO; TOMITA, 1988; SUGITA et al., 1989).

Os fragmentos C3a, C4a e C5a gerados pela clivagem de moléculas de C3, C4 e C5, respectivamente, exercem importante papel na indução da resposta inflamatória (KLOS et al., 2009). Estes fragmentos, denominados anafilatoxinas, podem atuar na quimiotaxia de neutrófilos e monócitos para o sítio inflamatório, na vasodilatação e contração muscular, na explosão respiratória em neutrófilos, macrófagos e eosinófilos e na liberação de histamina em mastócitos e basófilos. Além disso, as anafilatoxinas são capazes de induzir a produção de citocinas como TNF- α (KOLEV; LE FRIEC; KEMPER, 2013) e podem influenciar na geração de respostas imunes adaptativas (TEMPERO et al., 1997; ULRICH et al., 2000).

A anafilatoxina C3a é uma proteína de 9 kDa que se liga a um receptor acoplado a proteína G de, aproximadamente, 100 kDa chamado C3aR, expresso principalmente na superfície celular. A ligação de C3a ao seu receptor é importante para mediar as respostas inflamatórias a infecções e lesões. O C3a é um poderoso mediador pró-inflamatório que recruta células imunes para os locais de infecção e induz as células imunes a secretarem outros mediadores inflamatórios, por exemplo, citocinas. As concentrações de C3a no plasma são elevadas em doenças inflamatórias (LOHMAN et al., 2017; REID et al., 2013). O C3a também tem atividade antifúngica (SONESSON et al., 2007) e antimicrobiana (PASUPULETI et al., 2007). O aumento substancial da expressão de C3a-C3aR ou de sua ativação sustentada pode desencadear doenças como psoríase ((TAKEMATSU; OHKOHCHI; TAGAMI, 1986), sepse (KILDGAARD et al., 2000), alergia (GERARD; GERARD, 2002), asma (MIZUTANI; NABE; YOSHINO, 2009), diabetes (MAMANE et al., 2006), lesão decorrente de isquemia e reperfusão (PROCTOR et al., 2004), lúpus (JACOB et al., 2010), nefropatia (TANG et al.,

2009), obesidade e disfunção metabólica (LIM et al., 2013) e artrite (HUTAMEKALIN et al., 2010).

Dentre os produtos de ativação do complemento, a anafilotoxina C5a é um dos peptídeos inflamatórios mais potentes, com amplo espectro de funções bem caracterizadas há cerca de 50 anos. Possui forte função quimioatraente para neutrófilos, mas também para monócitos e macrófagos (MARDER et al., 1985). O C5a induz a explosão respiratória em neutrófilos e aumenta a fagocitose e liberação do conteúdo dos seus grânulos (GOLDSTEIN; WEISSMANN, 1974; MOLLNES et al., 2002; SACKS et al., 1978). Também foi descrito como vasodilatador (SCHUMACHER et al., 1991) e está envolvido na modulação da expressão de citocinas em diferentes tipos de células (LAUDES et al., 2002; RIEDEMANN et al., 2002) e aumento na expressão de moléculas de adesão em neutrófilos (GUO et al., 2002).

O C5a se liga e exerce suas funções por meio dos receptores C5aR1/CD88 e C5aR2/C5L2. O C5aR1 pertence à família de receptores acoplados a proteína G. O C5aR2 é semelhante, mas não é acoplado a proteína G e poucas respostas biológicas foram encontradas para a interação C5a-C5aR2. Embora a interação C5a-C5aR1 seja geralmente associada às respostas pró-inflamatórias, o papel do C5aR2 ainda está pouco esclarecido (GERARD; GERARD, 1991; LI et al., 2019). Muitas doenças inflamatórias foram associadas aos efeitos do C5a, entre elas a sepse, lesão pulmonar aguda, lesão de isquemia e reperfusão, ou doenças crônicas como a asma (GUO; WARD, 2005).

O sistema complemento está também envolvido na patogênese e manifestações clínicas de diversas doenças autoimunes sistêmicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (LEFFLER; BENGTSSON; BLOM, 2014), vasculites (CHIMENTI et al., 2015), doença dos anticorpos anti-membrana basal glomerular (MA et al., 2013), síndrome dos anticorpos anti-fosfolípídeos (LIM, 2011), esclerose sistêmica (SENALDI et al., 1989), dermatomiosite (LAHORIA; SELCEN; ENGEL, 2016) e artrite reumatoide (OKROJ et al., 2007).

O grande número de condições patológicas em que o sistema complemento participa tem estimulado o desenvolvimento de intervenções terapêuticas. Desta forma, tal sistema, incluindo as anafilatoxinas e seus receptores, têm sido considerados como alvos terapêuticos promissores em doenças inflamatórias (RICKLIN et al., 2018; WENZEL; KEMPER; KOHL, 2021).

1.3 Inibidores do sistema complemento

A terapia anticomplemento em modelos de doença tem sido amplamente explorada nas últimas décadas, como o uso do fator de veneno de cobra (CVF) em modelos animais (LINTON; MORGAN, 1999), e esforços crescentes estão sendo feitos para produzir inibição seletiva do complemento por meio do emprego de anticorpos monoclonais contra componentes do complemento ou pela administração de inibidores específicos (ZELEK et al., 2019).

A compstatina é um peptídeo cíclico que se liga especificamente ao C3 de primatas humanos e não humanos, atuando como inibidor da interação proteína-proteína e bloqueando o acesso das convertases ao seu substrato C3 (SAHU; KAY; LAMBRIS, 1996). Descoberta em 1996, a compstatina tem passado por diversas adaptações com o intuito de melhorar a sua afinidade e meia vida. Além de inibir as três vias de ativação do complemento no nível de C3, evitando a formação de C3a, C5a e TCC, a compstatina também inibe a amplificação mediada pela via alternativa. Importante destacar que a compstatina e seus análogos de segunda e terceira geração, não previnem a ativação inicial da via alternativa através da hidrólise espontânea de C3 em C3(H₂O), e a deposição de C4b por meio da ativação das vias clássica e da lectina (MASTELLOS et al., 2015). Portanto, o tratamento com compstatina ainda permite a atividade de opsonização residual no soro e a vigilância imunológica mediada por complemento contra patógenos (MASTELLOS et al., 2022).

A compstatina, quando administrada por via intravítrea em primatas não humanos, mostrou uma reversão da formação de drusas pela supressão da ativação do complemento na degeneração macular relacionada à idade (AMD) (CHI et al., 2010). Pegcetacoplan (APL-2 ou EMPAVELI), uma forma de meia-vida longa derivada da compstatina, é a primeira terapia de HPN direcionada a C3 a ser aprovada (em maio de 2021) nos EUA (HILLMEN et al., 2021; HOY, 2021; MULLARD, 2021), e sua avaliação regulatória está atualmente em andamento na União Européia e Austrália (HOY, 2021). Outro derivado da compstatina, AMY-101 (Cp40), está atualmente em ensaios clínicos de fase II em adultos com gengivite (NCT03694444) (HAJISHENGALLIS et al., 2021; HASTURK et al., 2021) e para o tratamento de pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) causada por SARS-CoV-2 (NCT04395456) (MASTAGLIO et al., 2020; RISITANO et al., 2020) e demonstrou boa segurança e tolerabilidade em voluntários humanos em um estudo de fase I (NCT03316521).

O procedimento padrão para tratamento de pacientes com hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) com sintomas clínicos significativos é o uso do anticorpo monoclonal humanizado eculizumab (Soliris), que se liga a C5 e bloqueia a via terminal do complemento

(DMYTRIUK et al., 2008; ROTHER et al., 2007). Este foi o primeiro inibidor do complemento aprovado pela FDA em 2007 (ROTHER et al., 2007). A autorização do eculizumabe impulsionou os estudos para a utilização de inibidores do complemento em outras doenças em que o complemento está envolvido, e outros tratamentos foram aprovados, por exemplo a reposição de C1-INH (Cinryze - 2008, Berinert – 2009 e Ruconest - 2014), para o Angioedema Hereditário (AEH), no qual a deficiência de C1-INH causa desregulação nos sistemas cicina e complemento (MORGAN, 2010; ZELEK et al., 2019). Outros anticorpos anti-C5 também foram desenvolvidos e estão atualmente em ensaios clínicos, como o tesidolumab, também conhecido como LFG316, que está sendo testado para AMD (NCT01527500), HPN (NCT02534909) e panuveíte (NIIPPU - noninfectious intermediate posterior, or panuveitis) (NCT01526889); o ravulizumab, também denominado ALXN1210, encontra-se em fase 3 de ensaios clínicos para HPN (NCT03056040), substituindo o eculizumab no tratamento, com resultados não inferiores ao eculizumab (KULASEKARARAJ et al., 2019).

Avacopan é um inibidor seletivo do C5aR1 que pode ser administrado por via oral. Este foi aprovado em outubro de 2021 para o tratamento de pacientes adultos com vasculite associada a autoanticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (vasculite associada ao ANCA), utilizado em combinação com a terapia padrão (LEE, 2022). O PMX205 é um peptídeo cíclico (c[Arg-Trp-D-Cha-Pro-Orn]-Hca) antagonista do C5aR1 (MARCH et al., 2004), que mostrou resultados interessantes em diversos modelos animais de doenças inflamatórias (JAIN; WOODRUFF; STADNYK, 2013; KUMAR et al., 2018; LEE et al., 2017; STAAB et al., 2014; WOODRUFF et al., 2005). O PMX205 encontra-se atualmente em desenvolvimento clínico pela Alsonex Pharmaceuticals, e já passou pelo ensaio clínico de fase 1, onde foram avaliados segurança, tolerabilidade e farmacocinética em voluntários saudáveis (ACTRN12619001639112) (LI et al., 2020). E recentemente, em fevereiro de 2022, o sutimlimabe, um anticorpo monoclonal humanizado anti-C1s, foi aprovado para o tratamento da anemia hemolítica autoimune denominada doença da aglutinina fria (ROTH et al., 2022)

1.4 Modelos para estudo da função do sistema complemento

O sistema complemento protege o hospedeiro contra a invasão de microorganismos. No entanto, em determinadas situações, ele também pode ser prejudicial para o hospedeiro, se for ativado de uma maneira inadequada ou descontrolada, induzindo uma inflamação indesejável (MOLLNES et al., 2002). Diversos mecanismos pelos quais o sistema complemento ativa as

células sanguíneas estão esclarecidos há décadas, incluindo a ligação de fragmentos resultantes da sua ativação a receptores, e efeitos provocados pelo ataque sublítico do complexo terminal do complemento (KRYCH; ATKINSON; HOLERS, 1992; MORGAN, 1989).

Ativação de granulócitos e monócitos, mediada pelo complemento, causa explosão oxidativa com a liberação de espécies reativas de oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico, histamina, fator ativador de plaquetas, produção de citocinas e quimiocinas, e também alteração na expressão de moléculas de adesão. Porém, todos estes efeitos têm sido investigados *in vitro* com a utilização de células isoladas e, para estudar o papel do sistema complemento na complexa rede inflamatória, é necessário que todos os mediadores solúveis e ancorados a membranas celulares, estejam presentes e capazes de interagir simultaneamente (MOLLNES et al., 2002). Um modelo capaz de permitir a análise dessa rede complexa de interações é o de sangue total humano. No entanto, uma das limitações para o seu uso era realacionada ao anticoagulante. Quelantes de cálcio, como citrato e EDTA, inibem a ativação do sistema complemento, bem como uma série de processos biológicos (MOLLNES et al., 2002). A heparina inibe a ativação do sistema complemento, quando utilizada em altas concentrações, sendo que em baixas concentrações, aumenta a sua ativação (KEIL et al., 1995; LOGUE, 1977), e também, apresenta efeitos diretos sobre os leucócitos (VIDEM, 1996).

Estudos realizados por Mollnes e colaboradores (2002) demonstraram que a lepirudina, um anticoagulante análogo da hirudina, não interfere na ativação do sistema complemento, o que possibilita a sua utilização para estudar o papel do sistema complemento na inflamação. A única limitação deste anticoagulante é o seu efeito sobre a trombina, uma vez que a trombina pode agir como um mediador inflamatório, pela ativação de seu receptor, o que leva a liberação de aminas vasoativas nos mastócitos (CIRINO et al., 1996). Como a adição de anticoagulantes em modelos de sangue total é imprescindível, não é possível contornar este impasse completamente. Portanto, a utilização de lepirudina tornou-se a melhor alternativa para estudar a ativação do sistema complemento (MOLLNES et al., 2002).

Recentemente, foi estabelecido um novo modelo *ex-vivo* de sangue total humano que utiliza como anticoagulante o peptídeo inibidor da polimerização da fibrina Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) (NILSSON et al., 2021). O GPRP sintético, que foi descrito pela primeira vez em 1978 (LAUDANO; DOOLITTLE, 1978), atua como um inibidor competitivo que evita a interação dos monômeros de fibrina, bloqueando assim a polimerização da fibrina em protofibrilas (CHERNYSH et al., 2012). O GPRP utilizado a 8 mg/mL bloqueia completamente a polimerização da fibrina no sangue total e pode evitar a coagulação por até oito horas (NILSSON et al., 2021). O tempo ideal para análise da ativação do complemento nestes

sistemas (lepirudina e GPRP) é de aproximadamente 30 min, mas os experimentos podem durar até 6 horas sem que ocorram alterações significativas nos gases sanguíneos ou no metabolismo (MOLLNES et al., 2022). Este modelo de sangue total com GPRP foi utilizado com sucesso, para estudar o papel do sistema complemento na inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops jararaca* (LEONEL et al., 2022).

Desde que o modelo *ex-vivo* de sangue total humano utilizando lepirudina foi descrito, em 2002, diversos grupos na área iniciaram estudos com este modelo e inibidores específicos da cascata do complemento. Muitos estudos realizados antes desse modelo, utilizavam a inativação do soro pelo calor, a 56 °C durante 30 minutos, que Bordet utilizou para distinguir o complemento (termolábil) dos anticorpos (termoestáveis) há mais de 100 anos, como uma forma de “inibir” o sistema, e avaliar o papel do complemento nos seus estudos, mas é necessário muito cuidado ao interpretar os dados desses soros inativados, pois este procedimento não é absolutamente específico para a atividade do complemento (BARRATT-DUE et al., 2010).

Poucos anos antes da descoberta do modelo de sangue total usando lepirudina, o mesmo grupo observou que a utilização do C1-INH, em um modelo *ex vivo* de perfusão de rins de porco usando sangue total humano anticoagulado com heparina, reduziu a resposta inflamatória e prolongou a sobrevida renal, enquanto os rins do grupo controle demonstraram rejeição hiperaguda em poucos minutos (FIANE et al., 1999b). Para avaliar se o sistema complemento era o responsável pelos efeitos favoráveis obtidos com o C1-INH, uma vez que esse inibidor também inibe outros sistemas, como o caliceína-cinina impedindo a liberação de bradicinina, os pesquisadores utilizaram um inibidor específico para C3, a compstatina, no mesmo modelo de xenotransplante. Desta forma, observaram que a ativação de C3 e C5 era totalmente bloqueada e que isso modulava a ativação de leucócitos e plaquetas, o que levou os rins tratados com compstatina a sobreviverem durante as 6 horas de observação do estudo, confirmando que a ativação do complemento era responsável pela reação hiperaguda (FIANE et al., 1999a).

Após estabelecer um modelo que pode ser facilmente utilizado para estudar qualquer potencial ativador do complemento, sem qualquer interferência direta de anticoagulantes, e que também permite investigar a conversa cruzada (*crossstalk*) de toda a rede inflamatória do sangue, diversos inibidores do complemento têm sido avaliados. Dentre os inibidores testados, podemos destacar o anti-C2 (inibição das vias clássicas e das lectinas), anti-fator D (inibição da via alternativa), compstatina (inibidor da clivagem de C3 pela C3 convertase), eculizumabe um anticorpo monoclonal anti-C5 (inibe a clivagem de C5 pela C5 convertase), PMX53 e PMX205 (antagonistas específicos de C5aR1). Isso possibilitou o estudo do mecanismo de ativação do

complemento e o papel das suas diversas moléculas na indução da resposta inflamatória secundária, incluindo citocinas e espécies reativas de oxigênio (BREKKE et al., 2007; EGGE et al., 2014; LEONEL et al., 2022; LUCHINI et al., 2019; MANZONI-DE-ALMEIDA et al., 2018; MOLLNES et al., 2022; PROCTOR et al., 2006; SILVA DE FRANÇA et al., 2021; WOLF-GROSSE et al., 2017).

Vale ressaltar a importância de trabalhar em modelos holísticos ao estudar o papel do complemento na resposta inflamatória em geral. Tais modelos permitem que o sistema complemento seja ativado em condições experimentais, possibilitando a interação mútua com outros sistemas moleculares e celulares presentes no sangue, além da utilização de inibidores específicos de pontos chave da cascata do complemento. Assim, a investigação cuidadosa dos mecanismos básicos de ativação do complemento é crucial para o desenho de estudos adicionais no campo da inibição terapêutica do complemento (MOLLNES et al., 2022).

1.5 Granulócitos polimorfonucleares: neutrófilos

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares caracterizados como componente essencial do sistema imune inato e responsáveis pelo início e manutenção da resposta inflamatória. São células com alta atividade antimicrobiana, mas tal atividade pode ser tóxica, e quando não controlada, pode resultar em danos ao tecido (CASTANHEIRA; KUBES, 2019; NÉMETH; SPERANDIO; MÓCSAI, 2020; SOEHNLEIN et al., 2017). Em humanos, cerca de 50-70% dos leucócitos circulantes são neutrófilos que apresentam um diâmetro de 10-15 μm , com núcleo segmentado e citoplasma enriquecido com grânulos e vesículas secretórias (BAINTON, 1999; BORREGAARD, 2010; EDWARDS, 1994; HIDALGO et al., 2019).

Os diversos subconjuntos de grânulos contidos nos neutrófilos são um importante reservatório de proteínas antimicrobianas, proteases, e também, uma ampla variedade de receptores ligados a membrana, com especificidade para moléculas de adesão endotelial, mediadores inflamatórios solúveis, proteínas da matriz extracelular e produtos bacterianos (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003).

Os grânulos começam a ser formados nos estágios iniciais de desenvolvimento dessas células, na fase de promielócitos. Esses grânulos precoces foram originalmente definidos pela presença abundante de mieloperoxidase (MPO) e denominados como grânulos peroxidase positivos, mas também conhecidos como grânulos primários ou azurófilos devido a sua afinidade com o corante básico Azure A. Os grânulos formados após terminada a produção de MPO, que ocorre na fase de transição de promielócito para mielócito, são denominados

grânulos peroxidase negativos e podem ser subdivididos em (i) grânulos específicos (secundários), presentes em mielócitos e metamielócitos, que contêm muita lactoferrina e pouca gelatinase no seu interior, e (ii) grânulos de gelatinase (terciários) que são formados na fase de bastonetes e neutrófilos segmentados, e que são caracterizados por conter baixo teor de lactoferrina e alto teor de gelatinase (BAINTON; FARQUHAR, 1966; BAINOTON; ULLYOT; FARQUHAR, 1971; BORREGAARD et al., 1995; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; KJELDEN et al., 1993; KJELDEN et al., 1992).

Dentre os diversos componentes presentes nos seus grânulos, podemos destacar a mieloperoxidase, que é liberada nos fagossomos ou espaço extracelular em neutrófilos ativados. A MPO reage com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado pelo sistema NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato) oxidase aumentando o seu potencial tóxico. O sistema H_2O_2 -MPO pode induzir a formação de ácido hipocloroso (HOCl) ou outros produtos de cloração, radicais de tirosina e intermediários reativos do nitrogênio, por meio da oxidação de cloreto, tirosina e nitrito, respectivamente (AGNER, 1943; KLEBANOFF, 1999, 2005), e todos esses produtos podem atacar as membranas dos microorganismos diretamente. Também destacamos a Elastase de neutrófilos (NE – *Neutrophil Elastase*), uma serino protease com atividade microbicida, que tem como substrato uma variedade de componentes da matriz extracelular, como a elastina, fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e vitronectina. Tal enzima pode ativar plaquetas, macrófagos, linfócitos e células endoteliais. A atividade da Elastase normalmente é restrita ao fagossomo ou ao ambiente imediato da célula, e para que esse controle ocorra, há a atuação de vários inibidores nos tecidos e plasma, como a α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina, α 1-antiquimotripsina e a proteína inibidora de protease secretada por leucócitos (SLPI - *secretory leukoproteinase inhibitor*). Acredita-se que a atividade desregulada da Elastase é um fator importante para a inflamação e lesão das vias aéreas em doenças pulmonares crônicas, especialmente enfisema pulmonar em indivíduos com deficiência de α 1-antitripsina (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003; JANOFF, 1985; KROTOVA et al., 2020; OWEN; CAMPBELL, 1999; SINHA et al., 1987; WITKO-SARSAT et al., 2000).

Além dos grânulos, os neutrófilos também possuem vesículas secretoras que aparecem na fase final de desenvolvimento, em neutrófilos segmentados. Pelo fato de proteínas plasmáticas serem encontradas no interior dessas vesículas, é sugerido que elas são formadas por meio de endocitose. Uma ampla variedade de estímulos inflamatórios pode mobilizar as vesículas secretoras e elas são responsáveis por um estoque de receptores associados a membrana, muito importantes nas fases iniciais da resposta inflamatória mediada pelos

neutrófilos (BORREGAARD et al., 1992; SENGELOV; KJELDTSEN; BORREGAARD, 1993). As membranas das vesículas contêm alta expressão do receptor 1 do complemento 1 (CR1) (SENGELOV et al., 1994b), Mac-1/CR3 (SENGELOV et al., 1993), receptores para peptídeos formilados (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina / fMLP) (SENGELOV et al., 1994a), os receptores CD14 e FcγIII CD16 (DETMERS et al., 1995), e também a leucolisina, uma metaloproteinase de matriz (MMP) do tipo membrana (MT6-MMP), também denominada MMP-25 (KANG et al., 2001).

Os neutrófilos utilizam ao menos três mecanismos efetores: fagocitose, desgranulação e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs – *Neutrophil Extracellular Trap*). A fagocitose é um processo que envolve a ingestão de um microorganismo pelo neutrófilo, formação do fagossomo, onde está concentrada a atividade microbicida para limitar o dano celular colateral. Dentre os fagócitos, os neutrófilos são as células com maior capacidade de matar os microorganismos fagocitados e raramente são utilizados como reservatórios após a fagocitose. A desgranulação dos neutrófilos tem semelhanças com a fusão que ocorre entre os grânulos e a membrana fagossômica, mas tal processo ocorre na membrana plasmática, liberando proteínas solúveis no espaço extracelular. Os neutrófilos ativados produzem fibras extracelulares, ou NETs, tal evento é desencadeado por receptores imunes inatos e mediadores intracelulares, como as espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas pela NADPH oxidase ou pelas mitocôndrias, que ativam a mieloperoxidase (MPO), elastase de neutrófilos (NE) e proteína-arginina deiminase tipo 4 (PAD4) para descondensar a cromatina. As NETs são estruturas compostas por grânulos e constituintes nucleares que desarmam e matam bactérias extracelularmente, mas evidências crescentes sugerem outras funções na coagulação, no câncer e na autoimunidade (BRINKMANN et al., 2004; BURN et al., 2021; LACY, 2006; LACY; EITZEN, 2008; PAPAYANNOPOULOS, 2018; SEGAL, 2005; WINTERBOURN; KETTLE; HAMPTON, 2016).

Diversos produtos podem ativar os neutrófilos por interação com receptores presentes em sua superfície, dentre eles os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*) e os receptores acoplados a proteína G (GPCR - *G-protein-coupled receptors*). O C5aR1 (CD88) é um GPCR expresso nos neutrófilos e a ligação de C5a ao seu receptor pode desencadear a quimiotaxia, liberação das enzimas granulares, a produção do ânion superóxido e aumento da expressão e atividade de CR3 e CR1 nessas células. Estudos indicam que o eixo C5a-C5aR1 é importante no início da inflamação e influxo de neutrófilos na sinóvia de pacientes com artrite reumatóide (AR) e artrite psoriásica (AP), também pode compor uma alça de amplificação para a ativação dos neutrófilos mediada por anticorpos contra

o citoplasma de neutrófilos (ANCA - *Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies*), e está também envolvido na formação das NETs, uma vez que foi demonstrado que a sinalização C5a-C5aR1 induz a formação dessas estruturas, e isso está envolvido na imunopatologia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19 – *coronavirus disease 2019*) (CHEN et al., 2022; FATTAHI et al., 2015; GERARD; GERARD, 1991; HORNUM et al., 2017; RUOCCO et al., 2022; SCHREIBER et al., 2009; SILVA et al., 2022).

A ativação desregulada de neutrófilos também contribui na patogênese de outras doenças, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (RENNARD et al., 2015), bronquiectasia (STOCKLEY et al., 2013), esclerose múltipla (NAEGELE et al., 2012), câncer (VEGLIA et al., 2019), lúpus eritematoso sistêmico (LES) (FRESNEDA ALARCON; MCLAREN; WRIGHT, 2021), artrite reumatoide (CARMONA-RIVERA et al., 2020; FRESNEDA ALARCON; MCLAREN; WRIGHT, 2021; ROSAS; CORREA; HENRIQUES, 2017; WRIGHT; MOOTS; EDWARDS, 2014; ZHANG et al., 2019) e osteoartrite (HSUEH et al., 2021; WANG et al., 2021; WILKINSON et al., 2022).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos que o veneno do pararama ativa: (i) o sistema complemento, com geração de anafilatoxinas e do sTCC; (ii) os leucócitos, com expressão aumentada de C11b, TLR2 e TLR4 em monócitos e C11b, CD14, TLR2 e C5aR em granulócitos, e (iii) induz a secreção de IL-17, TNF- α , CXCL8, CCL5, CXCL9, CCL2 e CXCL10 em sangue total humano. Também usamos inibidores específicos do complemento para pontos-chave da cascata do sistema para determinar mecanisticamente os condutores do processo inflamatório neste modelo. Com a inibição do sistema complemento no nível de C3, usando compstatina, ou inibindo o eixo C5a-C5aR1, com PMX205, houve uma modulação da ativação de leucócitos e da secreção de citocinas e quimiocinas. Para avaliar melhor o papel do complemento na inflamação induzida pelo veneno da pararama, incubamos células endoteliais com o plasma coletado de amostras de sangue tratadas com veneno e como resultado observamos a secreção de CXCL8 e CCL2 no sobrenadante das culturas, que foi consideravelmente reduzida na presença de inibidores do complemento. Além disso, isolamos neutrófilos humanos e incubamos com extrato e observamos a produção de CXCL8, TNF- α e NETs (MPO-DNA). Também incubamos os neutrófilos com plasma coletado de amostras de sangue tratadas com veneno e observamos a produção de TNF- α , IL-6, CXCL8, MPO e Elastase, e a inibição do complemento com compstatina e PMX205 resultou em uma redução da geração de todos esses mediadores. Assim, esses resultados mostram a contribuição do sistema complemento para o processo inflamatório induzido pelo veneno da pararama no modelo de sangue total humano e destacam a importância de C3 e do eixo C5a-C5aR1 na inflamação causada por esse veneno e seu possível papel na progressão da pararamose. Sugerem também que a modulação da atividade do sistema complemento, pelo uso de inibidores específicos, possa ser uma potencial terapia complementar para os indivíduos acidentados com a lagarta da *Premolis semirufa*.

REFERÊNCIAS

- ABE, T. et al., Local complement-targeted intervention in periodontitis: proof-of-concept using a C5a receptor (CD88) antagonist. **J. Immunol.**, v. 189, n. 11, p. 5442-5448, 2012.
- ADDIS-LIESER, E.; KOHL, J.; CHIARAMONTE, M. G., Opposing regulatory roles of complement factor 5 in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **J. Immunol.**, v. 175, n. 3, p. 1894-1902, 2005.
- AGNER, K., Verdoperoxidase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 3, n., p. 137-148, 1943.
- ALAAEDDINE, N. et al., Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and role in cartilage degradation. **Arthritis. Rheum.**, v. 44, n. 7, p. 1633-1643, 2001.
- ARBORE, G.; KEMPER, C., A novel "complement-metabolism-inflammasome axis" as a key regulator of immune cell effector function. **Eur. J. Immunol.**, v. 46, n. 7, p. 1563-1573, 2016.
- ARBORE, G.; KEMPER, C.; KOLEV, M., Intracellular complement - the complosome - in immune cell regulation. **Mol. Immunol.**, v. 89, n., p. 2-9, 2017.
- ARBORE, G. et al., T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4(+) T cells. **Science**, v. 352, n. 6292, p. 1424-1436, 2016.
- ARNAOUT, M. A., Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. **Blood**, v. 75, n. 5, p. 1037-1050, 1990.
- ARUFFO, A. et al., CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1303-1313, 1990.
- BAINTON, D. F., Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. **J. Immunol. Methods**, v. 232, n. 1-2, p. 153-168, 1999.
- BAINTON, D. F.; FARQUHAR, M. G., Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes. **J. Cell Biol.**, v. 28, n. 2, p. 277-301, 1966.
- BAINTON, D. F.; ULLYOT, J. L.; FARQUHAR, M. G., The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. **J. Exp. Med.**, v. 134, n. 4, p. 907-934, 1971.
- BARAMOVA, E. N. et al., Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. **Matrix**, v. 10, n. 2, p. 91-7, 1990.
- BARRATT-DUE, A. et al., Selective inhibition of TNF-alpha or IL-1 beta does not affect E. coli-induced inflammation in human whole blood. **Mol. Immunol.**, v. 47, n. 9, p. 1774-1782, 2010.
- BEUTLER, B. A., TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399-1407, 2009.
- BORREGAARD, N., Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.
- BORREGAARD, N. et al., Stimulus-dependent secretion of plasma proteins from human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 90, n. 1, p. 86-96, 1992.

BORREGAARD, N. et al., Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. **Blood**, v. 85, n. 3, p. 812-817, 1995.

BORZI, R. M.; PULSATELLI, L.; MELICONI, R., Production of the chemokine RANTES by articular chondrocytes and its role in cartilage degradation: Comment on the article by Alaaeddine et al. **J. Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 1, p. 278-278, 2003.

BOSMANN, M. et al., Evidence for anti-inflammatory effects of C5a on the innate IL-17A/IL-23 axis. **FASEB J.**, v. 26, n. 4, p. 1640-1651, 2012.

BRAGA DIAS, L.; AZEVEDO, M. C. D., Pararama, a disease caused by moth larvae: experimental findings. **Bol. Ofi. San. Pan. (OSP)**, v. 7, n., p. 9-14, 1973.

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

BRINKMANN, V. et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004.

BUCHANAN, J. T. et al., DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. **Curr Biol.**, v. 16, n. 4, p. 396-400, 2006.

BURKE-GAFFNEY, A.; HELLEWELL, P. G., Regulation of ICAM-1 by dexamethasone in a human vascular endothelial cell line EAhy926. **Am J Physiol**, v. 270, n. 2 Pt 1, p. 552-561, 1996.

BURN, G. L. et al., The Neutrophil. **Immunity**, v. 54, n. 7, p. 1377-1391, 2021.

BURNS, E. et al., Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to Porphyromonas gingivalis: activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. **J. Immunol.**, v. 177, n. 12, p. 8296-8300, 2006.

BUTLER, D. et al., Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 6, n. 4, p. 225-230, 1995.

CARDOSO, A. E. C.; HADDAD JR, V., Accidents caused by lepidopterans (moth larvae and adult): study on the epidemiological, clinical and therapeutic aspects Acidentes por Lepidópteros (larvas e adultos de mariposas): estudo dos aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, n. 6, p. 573-8, 2005.

CARMONA-RIVERA, C. et al., Neutrophil extracellular traps mediate articular cartilage damage and enhance cartilage component immunogenicity in rheumatoid arthritis. **JCI Insight**, v. 5, n. 13, p. 1-14, 2020.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P., Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2178-2185, 2019.

CHANEY, S. et al., The Involvement of Neutrophils in the Pathophysiology and Treatment of Osteoarthritis. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1-15, 2022.

CHEN, Y. et al., Complement C5a induces the generation of neutrophil extracellular traps by inhibiting mitochondrial STAT3 to promote the development of arterial thrombosis. **Thromb. J.**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2022.

CHERNYSH, I. N. et al., Fibrin clots are equilibrium polymers that can be remodeled without proteolytic digestion. **Sci. Rep.**, v. 2, n., p. 1-6, 2012.

CHI, Z.-L. et al., *Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration*, in *Inflammation and retinal disease: complement biology and pathology*. 2010, Springer. p. 127-135.

CHIKANZA, I.; KINGSLEY, G.; PANAYI, G., Peripheral blood and synovial fluid monocyte expression of interleukin 1 alpha and 1 beta during active rheumatoid arthritis. **Int. J. Rheumatol.**, v. 22, n. 4, p. 600-606, 1995.

CHIMENTI, M. S. et al., Vasculitides and the complement system: a comprehensive review. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v. 49, n. 3, p. 333-346, 2015.

CHIN, J. E. et al., Role of cytokines in inflammatory synovitis. The coordinate regulation of intercellular adhesion molecule 1 and HLA class I and class II antigens in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.**, v. 33, n. 12, p. 1776-1786, 1990.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S., Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.

CIRINO, G. et al., Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. **JEM**, v. 183, n. 3, p. 821-827, 1996.

CLARKE, J., NETs directly injure cartilage in RA. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 16, n. 8, p. 1, 2020.

COSTA, R. M., *Artropatia da pararamose: epidemiologia, clínica e modelos experimentais*. 1991, Escola Paulista de Medicina.

COSTA, R. M. et al., "Pararamose": an occupational arthritis caused by lepidoptera (*Premolis semirufa*). An epidemiological study. **Rev. Paul. Med.**, v. 111, n. 6, p. 462-465, 1993.

COSTA, R. M. et al., Experimental arthritis induced by bristles from a "Lepidoptera", "*Premolis Semirufa*": estudo hispatológico em ratos. **Rev. bras. reumatol.**, n., p. 61-64, 1995a.

COSTA, R. M. et al., Activity of bristles from an Amazonian lepidoptera, "*Premolis semirufa*", on the human complement system. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 35, n., p. 143-146, 1995b.

CUA, D. J.; TATO, C. M., Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 7, p. 479-489, 2010.

DAVIES, A. et al., CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. **J. Exp. Med.**, v. 170, n. 3, p. 637-654, 1989.

DE MORAES, C. et al., rACLF, a recombinant snake venom metalloprotease, activates endothelial cells in vitro. **JVATITD**, v. 14, n., p. 113-127, 2008.

DELAFONTAINE, M. et al., Enzymatic and Pro-Inflammatory Activities of Bothrops lanceolatus Venom: Relevance for Envenomation. **Toxins**, v. 9, n. 8, 2017.

DETMERS, P. A. et al., Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. **J. Immunol.**, v. 155, n. 4, p. 2085-2095, 1995.

DIAS, L.; AZEVEDO, M., *Pararama: doença dos seringais*, in *Doenças infecciosas e parasitárias*, R. VERONESI, Editor. 1991, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. p. 988-989.

DIAS, L. B.; RODRIGUES, M., *Pararamose*, in *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. 1997. p. 833-6.

DMYTRIJUK, A. et al., FDA report: eculizumab (Soliris®) for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Oncologist**, v. 13, n. 9, p. 993-1000, 2008.

DOBRINA, A. et al., Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. **Blood**, v. 99, n. 1, p. 185-192, 2002.

DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W., Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **Tissue Antigens**, v. 68, n. 3, p. 193-209, 2006.

EDWARDS, S., The developmet and structure of mature neutrophils. **Biochem. Physiol. Neutrophil**, n., p. 33-76, 1994.

EGGE, K. H. et al., Post challenge inhibition of C3 and CD14 attenuates Escherichia coli-induced inflammation in human whole blood. **Innate Immun.**, v. 20, n. 1, p. 68-77, 2014.

FATTAHI, F. et al., Organ distribution of histones after intravenous infusion of FITC histones or after sepsis. **Immunol. Res.**, v. 61, n. 3, p. 177-186, 2015.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N., Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FEARON, D. T., Regulation of the amplification C3 convertase of human complement by an inhibitory protein isolated from human erythrocyte membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, n. 11, p. 5867-5871, 1979.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N., Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 14, n., p. 397-440, 1996.

FERREIRA, A.; TAKAHASHI, M.; NUSSENZWEIG, V., Purificaiton and characterization of mouse serum protein with specific binding affinity for C4 (Ss protein). **J. Exp. Med.**, v. 146, n. 4, p. 1001-1008, 1977.

FIANE, A. E. et al., Compstatin, a peptide inhibitor of C3, prolongs survival of ex vivo perfused pig xenografts. **Xenotransplantation**, v. 6, n. 1, p. 52-65, 1999a.

FIANE, A. E. et al., C1-inhibitor attenuates hyperacute rejection and inhibits complement, leukocyte and platelet activation in an ex vivo pig-to-human perfusion model. **Immunopharmacology**, v. 42, n. 1-3, p. 231-243, 1999b.

FIORAVANTI, A. et al., Could myeloperoxidase represent a useful biomarker for erosive osteoarthritis of the hand? **Scand. J. Rheumatol.**, v. 47, n. 6, p. 515-517, 2018.

-
- FOREMAN, K. E. et al., C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 94, n. 3, p. 1147-1155, 1994.
- FOSSIEZ, F. et al., T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 6, p. 2593-2603, 1996.
- FRESNEDA ALARCON, M.; MCLAREN, Z.; WRIGHT, H. L., Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. **Front. Immunol.**, v. 12, n., p. 1-22, 2021.
- FUJINO, S. et al., Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 52, n. 1, p. 65-70, 2003.
- GAFFEN, S. L. et al., The IL-17 cytokine family. **Vitam. Horm.**, v. 74, n., p. 255-282, 2006.
- GERARD, N. P.; GERARD, C., The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. **Nature**, v. 349, n. 6310, p. 614-617, 1991.
- GERARD, N. P.; GERARD, C., Complement in allergy and asthma. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, n. 6, p. 705-708, 2002.
- GIRISH, S.; CHANDANWALE, A.; SHYAM, A., Myeloperoxidase as a potential biomarker in different stages of knee osteoarthritis. **Int. J. Pharm. Sci. Res.**, v. 3, n. 11, p. 4477-4481, 2012.
- GOLDSTEIN, I. M.; WEISSMANN, G., Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes. **J. Immunol.**, v. 113, n. 5, p. 1583-1588, 1974.
- GUERNE, P.; CARSON, D.; LOTZ, M., IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. **J. Immunol.**, v. 144, n. 2, p. 499-505, 1990.
- GUO, R. F. et al., Altered neutrophil trafficking during sepsis. **J. Immunol.**, v. 169, n. 1, p. 307-314, 2002.
- GUO, R. F.; WARD, P. A., Role of C5a in inflammatory responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, n., p. 821-852, 2005.
- HAJISHENGALLIS, G. et al., C3-targeted therapy in periodontal disease: moving closer to the clinic. **Trends Immunol.**, v. 42, n. 10, p. 856-864, 2021.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMBRIS, J. D., More than complementing Tolls: complement–Toll-like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. **Immunol. Rev.**, v. 274, n. 1, p. 233-244, 2016.
- HAN, L. et al., TNF- α and TNF- β polymorphisms are associated with susceptibility to osteoarthritis in a Korean population. **Korean J. Pathol.**, v. 46, n. 1, p. 30, 2012.
- HARADEN, C. A. et al., Synovial fluid biomarkers associated with osteoarthritis severity reflect macrophage and neutrophil related inflammation. **Arthritis Res. Ther.**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2019.
- HARMAT, V. et al., The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 342, n. 5, p. 1533-1546, 2004.

HASTURK, H. et al., Phase IIa clinical trial of complement C3 inhibitor AMY-101 in adults with periodontal inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 131, n. 23, p. 1-12, 2021.

HATTORI, R. et al., Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 15, p. 9053-9060, 1989.

HAWORTH, C. et al., Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α . **Eur. J. Immunol.**, v. 21, n. 10, p. 2575-2579, 1991.

HEEGER, P. S.; KEMPER, C., Novel roles of complement in T effector cell regulation. **Immunobiology**, v. 217, n. 2, p. 216-224, 2012.

HIDALGO, A. et al., The Neutrophil Life Cycle. **Trends Immunol.**, v. 40, n. 7, p. 584-597, 2019.

HILBERT, N. et al., Cartilage degradation by stimulated human neutrophils: elastase is mainly responsible for cartilage damage. **Bioorg. Chem.**, v. 30, n. 2, p. 119-132, 2002.

HILLMEN, P. et al., Pegcetacoplan versus eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **N. Engl. J. Med.**, v. 384, n. 11, p. 1028-1037, 2021.

HOFFMANN, E. M., Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. I. Extraction from human erythrocyte stromata. **Immunochemistry**, v. 6, n. 3, p. 391-403, 1969a.

HOFFMANN, E. M., Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. II. Studies on the site and mechanism of action. **Immunochemistry**, v. 6, n. 3, p. 405-419, 1969b.

HOLERS, V. M. et al., Human C3b- and C4b-regulatory proteins: a new multi-gene family. **Immunol. Today**, v. 6, n. 6, p. 188-192, 1985.

HOLGUIN, M. H. et al., Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **J. Clin. Invest.**, v. 84, n. 1, p. 7-17, 1989.

HONORATI, M. C. et al., Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 10, p. 799-807, 2002.

HORNUM, L. et al., C5a and C5aR are elevated in joints of rheumatoid and psoriatic arthritis patients, and C5aR blockade attenuates leukocyte migration to synovial fluid. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. 1-19, 2017.

HOSSEINNEJAD, A. et al., DNase I functional microgels for neutrophil extracellular trap disruption. **Biomater. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 85-99, 2021.

HOUSSIAU, F. A., Cytokines in rheumatoid arthritis. **Clin. Rheumatol.**, v. 14 Suppl 2, n., p. 10-13, 1995.

HOY, S. M., Pegcetacoplan: First Approval. **Drugs**, v. 81, n. 12, p. 1423-1430, 2021.

HSUEH, M. F. et al., Synergistic Roles of Macrophages and Neutrophils in Osteoarthritis Progression. **Arthritis Rheumatol.**, v. 73, n. 1, p. 89-99, 2021.

-
- HUGLI, T. E., Biochemistry and biology of anaphylatoxins. **Complement**, v. 3, n. 3, p. 111-127, 1986.
- HUTAMEKALIN, P. et al., Effect of the C3a-receptor antagonist SB 290157 on anti-OVA polyclonal antibody-induced arthritis. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 112, n. 1, p. 56-63, 2010.
- JACOB, A. et al., C3aR inhibition reduces neurodegeneration in experimental lupus. **Lupus**, v. 19, n. 1, p. 73-82, 2010.
- JAIN, U.; WOODRUFF, T. M.; STADNYK, A. W., The C5a receptor antagonist PMX205 ameliorates experimentally induced colitis associated with increased IL-4 and IL-10. **Br. J. Pharmacol.**, v. 168, n. 2, p. 488-501, 2013.
- JALKANEN, S.; JALKANEN, M., Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. **J. Cell Biol.**, v. 116, n. 3, p. 817-825, 1992.
- JANOFF, A., Elastase in tissue injury. **Annu. Rev. Med.**, v. 36, n., p. 207-216, 1985.
- JOHN, T. et al., Impact of the complement cascade on posttraumatic cartilage inflammation and degradation. **Histol. Histopathol.**, v. 22, n. 7, p. 781-90, 2007.
- KANG, T. et al., Subcellular distribution and cytokine- and chemokine-regulated secretion of leukolysin/MT6-MMP/MMP-25 in neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 24, p. 21960-21968, 2001.
- KAPOOR, M. et al., Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2011.
- KEIL, L. B. et al., Biphasic response of complement to heparin: fluid-phase generation of neoantigens in human serum and in a reconstituted alternative pathway amplification cycle. **Am. J. Hematol.**, v. 50, n. 4, p. 254-262, 1995.
- KEISER, H. et al., Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases--a model of joint injury. II. Degradation of isolated bovine nasal cartilage proteoglycan. **J. Clin. Invest.**, v. 57, n. 3, p. 625-632, 1976.
- KEMPER, C.; ATKINSON, J. P., T-cell regulation: with complements from innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 9-18, 2007.
- KEMPER, C. et al., The complement protein properdin binds apoptotic T cells and promotes complement activation and phagocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, n. 26, p. 9023-9028, 2008.
- KHANDPUR, R. et al., NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. **Sci. Transl. Med.**, v. 5, n. 178, p. 1-10, 2013.
- KILDGAARD, J. et al., Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock. **J. Immunol.**, v. 165, n. 10, p. 5406-5409, 2000.
- KILGORE, K. S. et al., Sublytic concentrations of the membrane attack complex of complement induce endothelial interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 through nuclear factor-kappa B activation. **Am. J. Pathol.**, v. 150, n. 6, p. 2019, 1997.

KILGORE, K. S. et al., Enhancement by the complement membrane attack complex of tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell expression of E-selectin and ICAM-1. **J. Immunol.**, v. 155, n. 3, p. 1434-1441, 1995.

KILGORE, K. S.; WARD, P. A.; WARREN, J. S., Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: the roles of P-selectin and platelet activating factor. **Inflammation**, v. 22, n. 6, p. 583-598, 1998.

KJELDSEN, L. et al., Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: identification of a distinct gelatinase-containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation. **Blood**, v. 82, n. 10, p. 3183-3191, 1993.

KJELDSEN, L. et al., Subcellular localization and release of human neutrophil gelatinase, confirming the existence of separate gelatinase-containing granules. **Biochem. J.**, v. 287 (Pt 2), n. Pt 2, p. 603-610, 1992.

KLEBANOFF, S. J., Myeloperoxidase. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v. 111, n. 5, p. 383-389, 1999.

KLEBANOFF, S. J., Myeloperoxidase: friend and foe. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KLOS, A. et al., The role of the anaphylatoxins in health and disease. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 14, p. 2753-2766, 2009.

KOLEV, M.; KEMPER, C., Keeping It All Going-Complement Meets Metabolism. **Front. Immunol.**, v. 8, n., p. 1-18, 2017.

KOLEV, M.; LE FRIEC, G.; KEMPER, C., The role of complement in CD4(+) T cell homeostasis and effector functions. **Semin. Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 12-19, 2013.

KOLLS, J. K.; LINDEN, A., Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.

KROTOVA, K. et al., Neutrophil elastase promotes macrophage cell adhesion and cytokine production through the integrin-Src kinases pathway. **Sci. Rep.**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2020.

KRYCH, M.; ATKINSON, J. P.; HOLERS, V. M., Complement receptors. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 8-13, 1992.

KULASEKARARAJ, A. G. et al., Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. **Blood**, v. 133, n. 6, p. 540-549, 2019.

KUMAR, V. et al., Development and validation of a LC-MS/MS assay for pharmacokinetic studies of complement C5a receptor antagonists PMX53 and PMX205 in mice. **Sci. Rep.**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

KUNZ, N.; KEMPER, C., Complement Has Brains—Do Intracellular Complement and Immunometabolism Cooperate in Tissue Homeostasis and Behavior? **Front. Immunol.**, v. 12, n., p. 1-21, 2021.

LACHMANN, P. J.; MULLER-EBERHARD, H. J., The demonstration in human serum of "conglutinin-activating factor" and its effect on the third component of complement. **J. Immunol.**, v. 100, n. 4, p. 691-698, 1968.

LACY, P., Mechanisms of degranulation in neutrophils. **Allergy Asthma Clin. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 98-108, 2006.

LACY, P.; EITZEN, G., Control of granule exocytosis in neutrophils. **Front. Biosci.**, v. 13, n., p. 5559-5570, 2008.

LAHORIA, R.; SELCEN, D.; ENGEL, A. G., Microvascular alterations and the role of complement in dermatomyositis. **Brain**, v. 139, n. 7, p. 1891-1903, 2016.

LAMERS, C. et al., Compstatins: the dawn of clinical C3-targeted complement inhibition. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 43, n. 8, p. 629-640, 2022.

LAPPEGARD, K. T. et al., Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 37, p. 15861-15866, 2009.

LAU, C. et al., CD14 and complement crosstalk and largely mediate the transcriptional response to Escherichia coli in human whole blood as revealed by DNA microarray. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. 1-19, 2015.

LAUDANO, A. P.; DOOLITTLE, R. F., Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 75, n. 7, p. 3085-3089, 1978.

LAUDES, I. J. et al., Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. **J. Immunol.**, v. 169, n. 10, p. 5962-5970, 2002.

LAURENT, T. C.; FRASER, J. R., Hyaluronan. **FASEB J**, v. 6, n. 7, p. 2397-404, 1992.

LEE, A., Avacopan: First Approval. **Drugs**, v. 82, n. 1, p. 79-85, 2022.

LEE, J. D. et al., Pharmacological inhibition of complement C5a-C5a1 receptor signalling ameliorates disease pathology in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 174, n. 8, p. 689-699, 2017.

LEFFLER, J.; BENGTTSSON, A. A.; BLOM, A. M., The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 73, n. 9, p. 1601-1606, 2014.

LEONEL, T. B. et al., Bothrops jararaca Snake Venom Inflammation Induced in Human Whole Blood: Role of the Complement System. **Front. Immunol.**, v. 13, n., p. 1-16, 2022.

LI, X. X. et al., The Complement Receptor C5aR2: A Powerful Modulator of Innate and Adaptive Immunity. **J. Immunol.**, v. 202, n. 12, p. 3339-3348, 2019.

LI, X. X. et al., Pharmacological characterisation of small molecule C5aR1 inhibitors in human cells reveals biased activities for signalling and function. **Biochem. Pharmacol.**, v. 180, n., p. 1-14, 2020.

LIANG, S. et al., The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of Porphyromonas gingivalis and is required for induction of periodontal bone loss. **J. Immunol.**, v. 186, n. 2, p. 869-877, 2011.

LIM, J. et al., C5aR and C3aR antagonists each inhibit diet-induced obesity, metabolic dysfunction, and adipocyte and macrophage signaling. **The FASEB Journal**, v. 27, n. 2, p. 822-831, 2013.

-
- LIM, W., Complement and the antiphospholipid syndrome. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 18, n. 5, p. 361-365, 2011.
- LINTON, S. M.; MORGAN, B. P., Complement activation and inhibition in experimental models of arthritis. **Mol. Immunol.**, v. 36, n. 13-14, p. 905-14, 1999.
- LISZEWSKI, M. K. et al., Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1143-1157, 2013.
- LOESER, R. F. et al., Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. **Arthritis Rheum.**, v. 64, n. 6, p. 1697, 2012.
- LOGUE, G. L., Effect of heparin on complement activation and lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red cells. **Blood**, v. 50, n. 2, p. 239-47, 1977.
- LOHMAN, R. J. et al., Exploiting a novel conformational switch to control innate immunity mediated by complement protein C3a. **Nat. Commun.**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2017.
- LOTZ, M.; TERKELTAUB, R.; VILLIGER, P. M., Cartilage and joint inflammation. Regulation of IL-8 expression by human articular chondrocytes. **J. Immunol.**, v. 148, n. 2, p. 466-473, 1992.
- LUBBERTS, E. et al., IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis. **J. Immunol.**, v. 167, n. 2, p. 1004-1013, 2001.
- LUCHINI, L. S. G. et al., Complement System Inhibition Modulates the Pro-Inflammatory Effects of a Snake Venom Metalloproteinase. **Front. Immunol.**, v. 10, n., p. 1-11, 2019.
- MAI, J. et al., An evolving new paradigm: endothelial cells–conditional innate immune cells. **J. Hematol. Oncol.**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2013.
- MAMANE, Y. et al., mTOR, translation initiation and cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 48, p. 6416-22, 2006.
- MANUKYAN, G. et al., Phenotypic and functional characterisation of synovial fluid-derived neutrophils in knee osteoarthritis and knee infection. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 31, n. 1, p. 72-82, 2022.
- MANZONI-DE-ALMEIDA, D. et al., Loxosceles venom Sphingomyelinase D activates human blood leukocytes: Role of the complement system. **Mol. Immunol.**, v. 94, n., p. 45-53, 2018.
- MARCH, D. R. et al., Potent cyclic antagonists of the complement C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Relationships between structures and activity. **Mol. Pharmacol.**, v. 65, n. 4, p. 868-879, 2004.
- MARDER, S. R. et al., Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. **J. Immunol.**, v. 134, n. 5, p. 3325-3331, 1985.
- MASTAGLIO, S. et al., The first case of COVID-19 treated with the complement C3 inhibitor AMY-101. **Clin. Immunol.**, v. 215, n., p. 1-4, 2020.
- MASTELLOS, D. C. et al., From discovery to approval: A brief history of the compstatin family of complement C3 inhibitors. **Clin. Immunol.**, v. 235, n., p. 1-5, 2022.

-
- MASTELLOS, D. C. et al., Compstatin: a C3-targeted complement inhibitor reaching its prime for bedside intervention. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 45, n. 4, p. 423-440, 2015.
- MERI, S. et al., Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. **Immunology**, v. 71, n. 1, p. 1-9, 1990.
- MIGA, A. et al., The role of CD40-CD154 interactions in the regulation of cell mediated immunity. **Immunol. Invest.**, v. 29, n. 2, p. 111-114, 2000.
- MIMPEN, J. Y. et al., Interleukin-17A causes osteoarthritis-like transcriptional changes in human osteoarthritis-derived chondrocytes and synovial fibroblasts in vitro. **Front. Immunol.**, v. 12, n., 2021.
- MIZUTANI, N.; NABE, T.; YOSHINO, S., Complement C3a regulates late asthmatic response and airway hyperresponsiveness in mice. **J. Immunol.**, v. 183, n. 6, p. 4039-4046, 2009.
- MOHAMED, S. A. et al., IL-17 in primary knee osteoarthritis and its relation with severity of the disease. **Int. J. Clin. Rheumatol.**, v. 13, n., p. 364-369, 2018.
- 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.
- MOLLNES, T. E. et al., Application of the C3 inhibitor compstatin in a human whole blood model designed for complement research - 20 years of experience and future perspectives. **Semin. Immunol.**, v. 59, n., p. 1-11, 2022.
- MORGAN, B. P., Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. **Biochem. J.**, v. 264, n. 1, p. 1-14, 1989.
- MORGAN, B. P., The complement system: an overview. **Methods Mol. Biol.**, v. 150, n., p. 1-13, 2000.
- MORGAN, B. P., Hereditary angioedema--therapies old and new. **N. Engl. J. Med.**, v. 363, n. 6, p. 581-583, 2010.
- MORGAN, B. P.; HARRIS, C. L., *Complement regulatory proteins*. 1999.
- MORRISSEY, J. H., Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal Biochem.**, v. 117, n. 2, p. 307-310, 1981.
- MOSMANN, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MULLARD, A., First approval of a complement C3 inhibitor opens up autoimmune and inflammatory opportunities. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 20, n. 7, p. 496-496, 2021.
- MULLER-EBERHARD, H. J., Molecular organization and function of the complement system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 57, n., p. 321-347, 1988.
- MURPHY, H. et al., Superoxide responses of endothelial cells to C5a and TNF-alpha: divergent signal transduction pathways. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 263, n. 1, p. L51-L59, 1992.
- NAEGELE, M. et al., Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. **J. Neuroimmunol.**, v. 242, n. 1-2, p. 60-71, 2012.

NAKAE, S. et al., Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 171, n. 11, p. 6173-6177, 2003.

NANDAKUMAR, K. S.; HOLMDAHL, R., Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. **Arthritis. Res. Ther.**, v. 8, n. 6, p. 1-11, 2006.

NASCIMENTO-SILVA, V. et al., A pro-inflammatory profile of endothelial cell in *Lonomia obliqua* envenomation. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 50-60, 2012.

NAWROTH, P. P. et al., Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. **J. Exp. Med.**, v. 163, n. 6, p. 1363-1375, 1986.

NÉMETH, T.; SPERANDIO, M.; MÓCSAI, A., **Nat. Rev. Drug Discov.** v. 19, n. 4, p. 253-275, 2020.

NERON, S. et al., B cell proliferation following CD40 stimulation results in the expression and activation of Src protein tyrosine kinase. **Int. Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 375-387, 2006.

NI, F. et al., Correlation between osteoarthritis and monocyte chemotactic protein-1 expression: a meta-analysis. **J. Orthop.**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2020.

NICHOLSON-WELLER, A.; BURGE, J.; AUSTEN, K. F., Purification from guinea pig erythrocyte stroma of a decay-accelerating factor for the classical C3 convertase, C4b,2a. **J. Immunol.**, v. 127, n. 5, p. 2035-2039, 1981.

NICHOLSON-WELLER, A. et al., Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. **J. Immunol.**, v. 129, n. 1, p. 184-189, 1982.

NILSSON, P. H. et al., A Conformational Change of Complement C5 Is Required for Thrombin-Mediated Cleavage, Revealed by a Novel Ex Vivo Human Whole Blood Model Preserving Full Thrombin Activity. **J. Immunol.**, v. 207, n. 6, p. 1641-1651, 2021.

NYMO, S. et al., Cholesterol crystal-induced endothelial cell activation is complement-dependent and mediated by TNF. **Immunobiology**, v. 219, n. 10, p. 786-92, 2014.

OKADA, N. et al., Monoclonal antibodies capable of causing hemolysis of neuraminidase-treated human erythrocytes by homologous complement. **J. Immunol.**, v. 143, n. 7, p. 2262-2266, 1989.

OKROJ, M. et al., Rheumatoid arthritis and the complement system. **Ann. Med.**, v. 39, n. 7, p. 517-530, 2007.

ORTIZ-ESPINOSA, S. et al., Complement C5a induces the formation of neutrophil extracellular traps by myeloid-derived suppressor cells to promote metastasis. **Cancer Lett.**, v. 529, n., p. 70-84, 2022.

OTTONELLO, L. et al., rC5a directs the in vitro migration of human memory and naive tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. **J. Immunol.**, v. 162, n. 11, p. 6510-6517, 1999.

OWEN, C. A.; CAMPBELL, E. J., The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 65, n. 2, p. 137-150, 1999.

PAPAYANNOPOULOS, V., Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 18, n. 2, p. 134-147, 2018.

-
- PASUPULETI, M. et al., Preservation of antimicrobial properties of complement peptide C3a, from invertebrates to humans. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 4, p. 2520-2528, 2007.
- PATE, M. et al., Endothelial cell biology: role in the inflammatory response. **Adv. Clin. Chem.**, v. 52, n., p. 109-130, 2010.
- PENSKY, J.; LEVY, L. R.; LEPOW, I. H., Partial purification of a serum inhibitor of C'1-esterase. **J. Biol. Chem.**, v. 236, n., p. 1674-1679, 1961.
- PIDDE, G. et al., Integrative multiomics analysis of Premolis semirufa caterpillar venom in the search for molecules leading to a joint disease. **Sci. Rep.**, v. 11, n., p. 1-15, 2021.
- PROCTOR, L. M. et al., Comparative anti-inflammatory activities of antagonists to C3a and C5a receptors in a rat model of intestinal ischaemia/reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 4, p. 756-764, 2004.
- PROCTOR, L. M. et al., Transdermal pharmacology of small molecule cyclic C5a antagonists. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 586, n., p. 329-345, 2006.
- PURE, E.; CUFF, C. A., A crucial role for CD44 in inflammation. **Trends Mol. Med.**, v. 7, n. 5, p. 213-221, 2001.
- REID, R. C. et al., Downsizing a human inflammatory protein to a small molecule with equal potency and functionality. **Nat. Commun.**, v. 4, n., p. 1-9, 2013.
- RENNARD, S. I. et al., CXCR2 Antagonist MK-7123. A Phase 2 Proof-of-Concept Trial for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 191, n. 9, p. 1001-1011, 2015.
- REYNOLDS, J. J., Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. **Oral Dis**, v. 2, n. 1, p. 70-6, 1996.
- RICKLIN, D. et al., Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 785-797, 2010.
- RICKLIN, D. et al., The renaissance of complement therapeutics. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 14, n. 1, p. 26-47, 2018.
- RIEDEMANN, N. C. et al., Expression and function of the C5a receptor in rat alveolar epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 4, p. 1919-1925, 2002.
- RISITANO, A. M. et al., Complement as a target in COVID-19? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 20, n. 6, p. 343-344, 2020.
- RODRIGUES, M. G.; MORAES, V. H. D. F.; MÜLLER, M. W., *Efeitos danosos da lagarta "Pararama" (Premolis semirufa) a seringueiros no Estado do Pará.* 1976, FCAP.
- ROSAS, C.; CORREA, L. B.; HENRIQUES, M. D. G., Neutrophils in rheumatoid arthritis: a target for discovering new therapies based on natural products. n., p. 89-118, 2017.
- ROTH, A. et al., Sutimlimab in patients with cold agglutinin disease: results of the randomized placebo-controlled phase 3 CADENZA trial. **Blood**, v. 140, n. 9, p. 980-991, 2022.

ROTHER, R. P. et al., Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 11, p. 1256-1264, 2007.

RUOCCO, A. et al., The role of C5a-C5aR1 axis in bone pathophysiology: A mini-review. **Front. Cell. Dev. Biol.**, v. 10, n., p. 1-10, 2022.

SACKS, T. et al., Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. An in vitro model of immune vascular damage. **J. Clin. Invest.**, v. 61, n. 5, p. 1161-1167, 1978.

SAHU, A.; KAY, B. K.; LAMBRIS, J. D., Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. **J. Immunol.**, v. 157, n. 2, p. 884-91, 1996.

SAXNE, T. et al., Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. **Arthritis Rheum.**, v. 31, n. 8, p. 1041-1045, 1988.

SCHMIDT, B. C.; LAFONTAINE, J. D., *Annotated check list of the Noctuoidea (Insecta, Lepidoptera) of North America north of Mexico*. Vol. 40. 2010: PenSoft Publishers LTD.

SCHNEIDER, A. H. et al., Neutrophil extracellular traps mediate joint hyperalgesia induced by immune inflammation. **Rheumatology**, v. 60, n. 7, p. 3461-3473, 2021.

SCHREIBER, A. et al., C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, n. 2, p. 289-298, 2009.

SCHUMACHER, W. A. et al., The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo. **Agents Actions**, v. 34, n. 3-4, p. 345-349, 1991.

SEGAL, A. W., How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, n., p. 1-25, 2005.

SENALDI, G. et al., Activation of the complement system in systemic sclerosis. Relationship to clinical severity. **Arthritis Rheum.**, v. 32, n. 10, p. 1262-1267, 1989.

SENGELOV, H. et al., Subcellular localization and translocation of the receptor for N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. **Biochem. J.**, v. 299 (Pt 2), n. Pt 2, p. 473-479, 1994a.

SENGELOV, H.; KJELDSEN, L.; BORREGAARD, N., Control of exocytosis in early neutrophil activation. **J. Immunol.**, v. 150, n. 4, p. 1535-1543, 1993.

SENGELOV, H. et al., Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, v. 92, n. 3, p. 1467-1476, 1993.

SENGELOV, H. et al., Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 153, n. 2, p. 804-810, 1994b.

SHINGU, M. et al., The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 94, n. 1, p. 145-149, 1993.

SILVA, B. M. et al., Targeting C5aR1 signaling reduced neutrophil extracellular traps and ameliorates COVID-19 pathology. **bioRxiv**, n., p. 1-58, 2022.

SILVA DE FRANÇA, F. et al., C5a-C5aR1 axis activation drives envenomation immunopathology by the snake *naja annulifera*. **Front. Immunol.**, v. 12, n., p. 1138, 2021.

SINHA, S. et al., Primary structure of human neutrophil elastase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, n. 8, p. 2228-2232, 1987.

SOEHNLEIN, O. et al., Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 248-261, 2017.

SONESSON, A. et al., Antifungal activity of C3a and C3a-derived peptides against *Candida*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1768, n. 2, p. 346-353, 2007.

STAAB, E. B. et al., Treatment with the C5a receptor/CD88 antagonist PMX205 reduces inflammation in a murine model of allergic asthma. **Int. Immunopharmacol.**, v. 21, n. 2, p. 293-300, 2014.

STANKOVIC, A. et al., Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity. **Bratisl. Lek. Listy**, v. 110, n. 10, p. 641-646, 2009.

STANNUS, O. et al., Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 11, p. 1441-1447, 2010.

STEINBECK, M. J. et al., Myeloperoxidase and chlorinated peptides in osteoarthritis: potential biomarkers of the disease. **J Orthop Res**, v. 25, n. 9, p. 1128-35, 2007.

STOCKLEY, R. et al., Phase II study of a neutrophil elastase inhibitor (AZD9668) in patients with bronchiectasis. **Respir. Med.**, v. 107, n. 4, p. 524-533, 2013.

STREY, C. W. et al., The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 6, p. 913-923, 2003.

SUGITA, Y.; NAKANO, Y.; TOMITA, M., Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. **J. Biochem.**, v. 104, n. 4, p. 633-637, 1988.

SUGITA, Y. et al., Molecular cloning and characterization of MACIF, an inhibitor of membrane channel formation of complement. **J. Biochem.**, v. 106, n. 4, p. 555-557, 1989.

SUR CHOWDHURY, C. et al., Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. **Arthritis Res. Ther.**, v. 16, n. 3, p. 2-14, 2014.

SWIERZKO, A. et al., Mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2) in a large cohort of neonates and its clinical associations. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 8-9, p. 1696-1701, 2009.

TACK, B. F. et al., Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 10, p. 5764-5768, 1980.

TAKEMATSU, H.; OHKOHCHI, K.; TAGAMI, H., Demonstration of anaphylatoxins C3a, C4a and C5a in the scales of psoriasis and inflammatory pustular dermatoses. **Br. J. Dermatol.**, v. 114, n. 1, p. 1-6, 1986.

-
- TALBOT, J. et al., CCR2 expression in neutrophils plays a critical role in their migration into the joints in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol.**, v. 67, n. 7, p. 1751-1759, 2015.
- TAMBOURGI, D. V. et al., Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 251, n. 1, p. 366-373, 1998.
- 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. **J. Immunol.**, v. 155, n. 9, p. 4459-4466, 1995.
- TANG, Z. et al., C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, n. 3, p. 593-603, 2009.
- TEMPERO, R. M. et al., Molecular adjuvant effects of a conformationally biased agonist of human C5a anaphylatoxin. **J. Immunol.**, v. 158, n. 3, p. 1377-1382, 1997.
- THIEL, S., Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. **Mol. Immunol.**, v. 44, n. 16, p. 3875-3888, 2007.
- THIEL, S. et al., A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 506-510, 1997.
- TILL, G. O., Therapeutic Interventions in the complement System. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 125, n. 5, p. 708, 2001.
- TREPELS, T.; ZEIHNER, A. M.; FICHTLSCHERER, S., The endothelium and inflammation. **Endothelium**, v. 13, n. 6, p. 423-429, 2006.
- TZARTOS, J. S. et al., Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **Am. J. Pathol.**, v. 172, n. 1, p. 146-155, 2008.
- ULRICH, J. T. et al., Induction of an antigen-specific CTL response by a conformationally biased agonist of human C5a anaphylatoxin as a molecular adjuvant. **J. Immunol.**, v. 164, n. 10, p. 5492-5498, 2000.
- VEGLIA, F. et al., Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. **Nature**, v. 569, n. 7754, p. 73-78, 2019.
- VIDEM, V., Heparin in clinical doses 'primes' granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. **Scand. J. Immunol.**, v. 43, n. 4, p. 385-390, 1996.
- VILLAS-BOAS, I. M. et al., *Envenomation by caterpillars*, in *Clinical Toxicology*, P. Gopalakrishnakone, et al., Editors. 2018, Springer: Dordrecht. p. 429-449.
- 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 Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 2, p. e1531, 2012.

-
- VILLAS-BOAS, I. M. et al., Characterization of phenotypes of immune cells and cytokines associated with chronic exposure to *Premolis semirufa* caterpillar bristles extract. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e71938, 2013.
- VILLAS-BOAS, I. M. et al., Human Chondrocyte Activation by Toxins From *Premolis semirufa*, an Amazon Rainforest Moth Caterpillar: Identifying an Osteoarthritis Signature. **Front. Immunol.**, v. 11, n., p. 2191, 2020.
- VILLAS BOAS, I. M. et al., A serine protease isolated from the bristles of the Amazonic caterpillar, *Premolis semirufa*, is a potent complement system activator. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0118615, 2015.
- WALPORT, M. J., Complement. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001.
- WANG, G. et al., Neutrophil Elastase Induces Chondrocyte Apoptosis and Facilitates the Occurrence of Osteoarthritis via Caspase Signaling Pathway. **Front. Pharmacol.**, v. 12, n., p. 1-13, 2021.
- WANG, Q. et al., Identification of a central role for complement in osteoarthritis. **Nat. Med.**, v. 17, n. 12, p. 1674-1679, 2011.
- WENZEL, U.; KEMPER, C.; KOHL, J., Canonical and non-canonical functions of the complement system in health and disease. **Br J. Pharmacol.**, v. 178, n. 14, p. 2751-2753, 2021.
- WEST, E. E.; AFZALI, B.; KEMPER, C., Unexpected Roles for Intracellular Complement in the Regulation of Th1 Responses. **Adv. Immunol.**, v. 138, n., p. 35-70, 2018.
- WHALEY, K.; RUDDY, S., Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. **J. Exp. Med.**, v. 144, n. 5, p. 1147-1163, 1976.
- WILKINSON, D. J. et al., Matrix metalloproteinase-13 is fully activated by neutrophil elastase and inactivates its serpin inhibitor, alpha-1 antitrypsin: Implications for osteoarthritis. **FEBS J.**, v. 289, n. 1, p. 121-139, 2022.
- WILTON, M. et al., Secreted Phosphatase and Deoxyribonuclease Are Required by *Pseudomonas aeruginosa* To Defend against Neutrophil Extracellular Traps. **Infect. Immun.**, v. 86, n. 9, p. 1-12, 2018.
- WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B., Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 85, n., p. 765-792, 2016.
- WITKO-SARSAT, V. et al., Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest.**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.
- WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł. A.; SZUKIEWICZ, D., The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, n., 2014.
- WOLF-GROSSE, S. et al., Iron oxide nanoparticles induce cytokine secretion in a complement-dependent manner in a human whole blood model. **Int. J. Nanomedicine**, v. 12, n., p. 3927-3940, 2017.
- WOODRUFF, T. M. et al., Increased potency of a novel complement factor 5a receptor antagonist in a rat model of inflammatory bowel disease. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 314, n. 2, p. 811-817, 2005.

WRIGHT, H. L. et al., Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation Through Production of Chemokines, Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps. **Front. Immunol.**, v. 11, n., p. 1-20, 2020.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; EDWARDS, S. W., The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 10, n. 10, p. 593-601, 2014.

XIAO, S.; XU, C.; JARVIS, J. N., C1q-bearing immune complexes induce IL-8 secretion in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) through protein tyrosine kinase- and mitogen-activated protein kinase-dependent mechanisms: evidence that the 126 kD phagocytic C1q receptor mediates immune complex activation of HUVEC. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 125, n. 3, p. 360-367, 2001.

YANG, Y.-H. et al., The interaction between circulating complement proteins and cutaneous microvascular endothelial cells in the development of childhood Henoch-Schönlein purpura. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120411, 2015.

YOUSEFI, S. et al., Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death Differ.**, v. 16, n. 11, p. 1438-1444, 2009.

YUAN, W. H. et al., Screening of osteoarthritis diagnostic markers based on immune-related genes and immune infiltration. **Sci. Rep.**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

ZAHIRI, R. et al., Molecular phylogenetics of Erebidae (Lepidoptera, noctuoidea). **Syst. Entomol.**, v. 37, n. 1, p. 102-124, 2012.

ZELEK, W. M. et al., Compendium of current complement therapeutics. **Mol. Immunol.**, v. 114, n., p. 341-352, 2019.

ZHANG, L. et al., Contribution of neutrophils in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J. Biomed. Res.**, v. 34, n. 2, p. 86-93, 2019.

ZHANG, X. et al., Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement in vivo. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 228-236, 2007.

ZIOLKOWSKA, M. et al., High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. **J. Immunol.**, v. 164, n. 5, p. 2832-2838, 2000.

APÊNDICE A

GABRILI, J. J. M., et al. Complement system inhibition modulates the inflammation induced by the venom of *Premolis semirufa*, an amazon rainforest moth caterpillar. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 2022.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Complement System Inhibition Modulates the Inflammation Induced by the Venom of *Premolis semirufa*, an Amazon Rainforest Moth Caterpillar

Joel J. M. Gabrili¹, Isadora Maria Villas-Boas¹, Giselle Pidde¹, Carla Cristina Squaiella-Baptistão¹ ,
Trent M. Woodruff² and Denise V. Tambourgi^{1,*} 

¹ Immunochemistry Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, Brazil

² School of Biomedical Sciences, University of Queensland, Brisbane, QLD 4072, Australia

* Correspondence: denise.tambourgi@butantan.gov.br



Citation: Gabrili, J.J.M.; Villas-Boas, I.M.; Pidde, G.; Squaiella-Baptistão, C.C.; Woodruff, T.M.; Tambourgi, D.V. Complement System Inhibition Modulates the Inflammation Induced by the Venom of *Premolis semirufa*, an Amazon Rainforest Moth Caterpillar. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13333. <https://doi.org/10.3390/ijms232113333>

Academic Editors: R. Manjunatha Kini and Yuri N. Ulkin

Received: 2 September 2022

Accepted: 27 October 2022

Published: 1 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The caterpillar of the *Premolis semirufa* moth, commonly called Pararama, is found in the Brazilian Amazon region. Contact with the hairs can cause a chronic inflammatory reaction, termed “pararamosis”. To date, there is still no specific treatment for pararamosis. In this study, we used a whole human blood model to evaluate the involvement of the complement in the proinflammatory effects of *P. semirufa* hair extract, as well as the anti-inflammatory potential of complement inhibitors in this process. After treatment of blood samples with the *P. semirufa* hair extract, there was a significant increase in the generation of soluble terminal complement complex (sTCC) and anaphylatoxins (C3a, C4a, and C5a), as well as the production of the cytokines TNF- α and IL-17 and the chemokines IL-8, RANTES, MIG, MCP-1, and IP-10. The inhibition of C3 with compstatin significantly decreased IL-17, IL-8, RANTES, and MCP-1 production. However, the use of the C5aR1 antagonist PMX205 promoted a reduction in the production of IL-8 and RANTES. Moreover, compstatin decreased CD11b, C5aR1, and TLR2 expression induced by *P. semirufa* hair extract in granulocytes and CD11b, TLR4, and TLR2 in monocytes. When we incubated vascular endothelial cells with extract-treated human plasma, there was an increase in IL-8 and MCP-1 production, and compstatin was able to decrease the production of these chemokines. C5aR1 antagonism also decreased the production of MCP-1 in endothelial cells. Thus, these results indicate that the extract of the Pararama bristles activates the complement system and that this action contributes to the production of cytokines and chemokines, modulation of the expression of surface markers in leukocytes, and activation of endothelial cells.

Keywords: envenomation; *Premolis semirufa*; pararamosis; inflammation; complement system

1. Introduction

Pararamosis is an occupational disease of an inflammatory nature caused by contact with the hairs of the caterpillar or cocoon of the *Premolis semirufa* moth [1]. The term pararamosis is used in reference to the popular name given to the larval form of this moth, “Pararama”. This caterpillar is native to the Amazonian region and lives on rubber trees (*Hevea* spp), feeding on its leaves. The highest frequency of accidents occurs when rubber extractors collect latex and get in contact with caterpillar hairs containing the venom [1–3].

Contact with the caterpillar hairs through the skin causes immediate reactions of intense itching, followed by pain, heat, and redness, typical of an acute inflammatory process lasting 3 to 7 days [1]. However, in some injured individuals, the process can become chronic with synovial membrane thickening, which can evolve to deformities and immobilization of the affected joint, configuring the clinical picture of ankylosis, similar, in some aspects, to rheumatoid arthritis (RA) [2,3] and osteoarthritis (OA) [4,5]. There is still no specific treatment for this disease, but corticosteroids have been used to prevent the development or alleviate chronic disease [6,7].

ANEXO A

Trabalho publicado em colaboração durante o doutorado - 2018



viruses



Article

Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System

Danielle B. L. Oliveira ^{1,†}, Giuliana S. Durigon ^{2,†}, Érica A. Mendes ^{1,†}, Jason T. Ladner ^{3,4,†}, Robert Andreato-Santos ^{1,†}, Danielle B. Araujo ¹, Viviane F. Botosso ⁵, Nicholas D. Paola ¹, Daniel F. L. Neto ¹, Marielton P. Cunha ¹, Carla T. Braconi ¹, Rúbens P. S. Alves ¹, Monica R. Jesus ¹, Lennon R. Pereira ¹, Stella R. Melo ¹, Flávio S. Mesquita ¹, Vanessa B. Silveira ¹, Luciano M. Thomazelli ¹, Silvana R. Favoretto ⁶, Franciane B. Almonfrey ², Regina C. R. M. Abdulkader ², Joel M. Gabrili ^{5,7}, Denise V. Tambourgi ⁵, Sérgio F. Oliveira ⁸, Karla Prieto ^{3,9}, Michael R. Wiley ^{3,9}, Luis C. S. Ferreira ¹, Marcos V. Silva ¹⁰, Gustavo F. Palacios ^{3,†}, Paolo M. A. Zanotto ^{1,†} and Edison L. Durigo ^{1,*,†}

- ¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil; danilbruna@gmail.com (D.B.L.O.); ericaarmendes@gmail.com (É.A.M.); robert_andreato@hotmail.com (R.A.-S.); daniellebastos@yahoo.com.br (D.B.A.); nicholasdipaola@gmail.com (N.D.P.); danielviro@gmail.com (D.F.L.N.); marieltondospassos@gmail.com (M.P.C.); cabraconi@gmail.com (C.T.B.); rubens.bmc@gmail.com (R.P.S.A.); modrigues4@gmail.com (M.R.J.); lennon_rp@hotmail.com (L.R.P.); stellmelo@gmail.com (S.R.M.); flavio.mesquita@usp.br (F.S.M.); vanessa.silveirabio@gmail.com (V.B.S.); lucmt@usp.br (L.M.T.); lcsf@usp.br (L.C.S.F.); pzanotto@usp.br (P.M.A.Z.)
 - ² Medical School Clinic Hospital, University of São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil; giuliana.durigon@gmail.com (G.S.D.); fran_almonfrey@hotmail.com (F.B.A.); kader@usp.br (R.C.R.M.A.)
 - ³ Center for Genome Sciences, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, MD 21702, USA; jtladner@gmail.com (J.T.L.); karla.prieto.ctr@mail.mil (K.P.); michael.r.wiley19.ctr@mail.mil (M.R.W.); gustavo.f.palacios.ctr@mail.mil (G.F.P.)
 - ⁴ The Pathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011-4073, USA
 - ⁵ Virology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil; viviane.botosso@butantan.gov.br (V.F.B.); joel.megalegabrili@gmail.com (J.M.G.); denise.tambourgi@butantan.gov.br (D.V.T.)
 - ⁶ Pasteur Institute, State Health Department, São Paulo, SP 1103-000, Brazil; srfavoretto@usp.br
 - ⁷ Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil
 - ⁸ Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil; sfolivei@gmail.com
 - ⁹ Department of Environmental, Agricultural and Occupational Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-4388, USA
 - ¹⁰ Institute of Infectology Emílio Ribas e Pontifícia Universidade Católica (PUC-SP), São Paulo, SP 01246-900, Brazil; mvsilva@pucsp.br
- * Correspondence: eldurigo@usp.br
† These authors contributed equally for the paper.
‡ These authors contributed equally for the paper.

Received: 22 August 2018; Accepted: 20 October 2018; Published: 7 November 2018



Abstract: We followed the presence of Zika virus (ZIKV) in four healthy adults (two men and two women), for periods ranging from 78 to 298 days post symptom onset. The patients were evaluated regarding the presence of the virus in different body fluids (blood, saliva, urine and semen), development of immune responses (including antibodies, cytokines and chemokines), and virus genetic variation within samples collected from semen and urine during the infection course. The analysis was focused primarily on the two male patients who shed the virus for up to 158 days after the initial symptoms. ZIKV particles were detected in the spermatozoa cytoplasm and

ANEXO B

Trabalho publicado em colaboração durante o doutorado - 2021

Archives of Toxicology (2021) 95:1129–1138
https://doi.org/10.1007/s00204-020-02959-0

BIOLOGICS



Bothrops lanceolatus snake (*Fer-de-lance*) venom triggers inflammatory mediators' storm in human blood

Felipe Silva de França¹ · Joel José Megale Gabrili¹ · Laurence Mathieu² · François Burgher² · Joël Blomet² · Denise V. Tambourgi¹

Received: 30 September 2020 / Accepted: 26 November 2020 / Published online: 4 January 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

Systemic increased inflammatory mediators' levels are a hallmark in a plethora of pathological conditions, including thrombotic diseases as the envenomation by *Bothrops lanceolatus* snake. Multiple organ infarctions, which are not prevented by anticoagulant therapy, are the main cause of death on this envenomation. However, the potential mechanisms involved in these systemic reactions are underexplored. This study aimed to explore the potential systemic events which could contribute to thrombotic reactions on the envenomation by *B. lanceolatus* in an ex vivo human whole-blood model. *B. lanceolatus* venom elicited an inflammatory reaction, which was characterized by a strong complement activation, since we detected high C3a, C4a and C5a anaphylatoxins levels. Besides, the venom promoted soluble Terminal Complement Complex (sTCC) assembly. Complement activation was accompanied by intense lipid mediators' release, which included LTB₄, PGE₂ and TXB₂. In addition, in the blood exposed to *B. lanceolatus* venom, we detected IL-1 β , IL-6 and TNF- α interleukins production. Chemokines, including CCL2, CCL5 and CXCL8 were upregulated in the venom presence. These outcomes show that *B. lanceolatus* venom causes a strong inflammatory reaction in the blood favoring a potential setting to thrombi formation. Thus, inhibiting inflammatory mediators or their receptors may help in the envenomed patients' management.

Keywords *Bothrops lanceolatus* venom · Systemic inflammation · Complement activation · Lipid mediators · Interleukins · Chemokines

Introduction

Uncontrolled systemic inflammatory reactions are observed in a plethora of pathological conditions (Okin and Medzhitov. 2012; Manthiram et al. 2017; Netea et al. 2017; Branchford and Carpenter 2018). These reactions affect a broad range of cells and tissues promoting damage and organ dysfunction, which can evolve to multi-organ failure and death, as observed in sepsis and traumatic conditions (van der Poll et al. 2017; Huber-Lang et al. 2018; Karasu et al. 2019; Schattner et al. 2020). Among the key events of these reactions, there is an increase on circulating inflammatory mediators' levels, which in turn can act on leukocytes, platelets

and endothelial cells triggering thromboinflammatory reactions. These events can evolve to disseminate intravascular coagulation (DIC) leading to multiple thrombi formation (Beristain-Covarrubias et al. 2019; Branchford and Carpenter, 2018; Eriksson et al. 2019; Schattner et al. 2020).

Thrombosis is a common consequence of infectious (Smeeth et al. 2006; Dalager-Pedersen et al. 2014; Kaplan et al. 2015; Cohoon et al. 2018; Beristain-Covarrubias et al. 2019;) and inflammatory diseases (Afeltra et al. 2005; Sarabi et al. 2005; Andrade et al. 2018) and generally it is linked to clinical illness worsening (Afeltra et al. 2005; Sarabi et al. 2005; Kaplan et al. 2015; Andrade et al. 2018; Beristain-Covarrubias et al. 2019). In addition, anticoagulant therapy fails to control these reactions (Kaplan et al. 2015; Andrade et al. 2018; Beristain-Covarrubias et al. 2019) as observed on envenomation by *Bothrops lanceolatus* snake (Estrade et al. 1989; Thomas et al. 1995).

B. lanceolatus (*Fer-de-lance*) is a medically important snake endemic in Martinique Island that causes around 30 accidents annually (Resiere et al. 2010). These accidents

✉ Denise V. Tambourgi
denise.tambourgi@butantan.gov.br

¹ Immunochemistry Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, Brazil

² Prevor Laboratory, 95760 Valmondois, France

ANEXO C

Trabalho publicado em colaboração durante o doutorado - 2022



Bothrops jararaca Snake Venom Inflammation Induced in Human Whole Blood: Role of the Complement System

Thyago Bispo Leonel¹, Joel José Megale Gabrili¹, Carla Cristina Squaiella-Baptistão¹, Trent M. Woodruff², John D. Lambris³ and Denise V. Tambourgi^{1*}

¹ Immunochemistry Laboratory, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, ² School of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, The University of Queensland, St Lucia, QLD, Australia, ³ Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Francesco Tedesco,
Italian Aurological Institute (IRCCS),
Italy

Reviewed by:

Paulo A. Melo,
Federal University of Rio de Janeiro,
Brazil

Peter A. Ward,
University of Michigan, United States

*Correspondence:

Denise V. Tambourgi
denise.tambourgi@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: 27 February 2022

Accepted: 21 March 2022

Published: 02 June 2022

Citation:

Leonel TB, Gabrili JJM,
Squaiella-Baptistão CC, Woodruff TM,
Lambris JD and Tambourgi DV (2022)
Bothrops jararaca Snake Venom
Inflammation Induced in Human
Whole Blood: Role of the
Complement System.
Front. Immunol. 13:885223.
doi: 10.3389/fimmu.2022.885223

The clinical manifestations of envenomation by *Bothrops* species are complex and characterized by prominent local effects that can progress to tissue loss, physical disability, or amputation. Systemic signs can also occur, such as hemorrhage, coagulopathy, shock, and acute kidney failure. The rapid development of local clinical manifestations is accompanied by the presence of mediators of the inflammatory process originating from tissues damaged by the bothropic venom. Considering the important role that the complement system plays in the inflammatory response, in this study, we analyzed the action of *Bothrops jararaca* snake venom on the complement system and cell surface receptors involved in innate immunity using an *ex vivo* human whole blood model. *B. jararaca* venom was able to induce activation of the complement system in the human whole blood model and promoted a significant increase in the production of anaphylatoxins C3a/C3a-desArg, C4a/C4a-desArg, C5a/C5a-desArg and sTCC. In leukocytes, the venom of *B. jararaca* reduced the expression of CD11b, CD14 and C5aR1. Inhibition of the C3 component by Cp40, an inhibitor of C3, resulted in a reduction of C3a/C3a-desArg, C5a/C5a-desArg and sTCC to basal levels in samples stimulated with the venom. Exposure to *B. jararaca* venom induced the production of inflammatory cytokines and chemokines such as TNF- α , IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and MIG/CXCL9 in the human whole blood model. Treatment with Cp40 promoted a significant reduction in the production of TNF- α , IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2. C5aR1 inhibition with PMX205 also promoted a reduction of TNF- α and IL-8/CXCL8 to basal levels in the samples stimulated with venom. In conclusion, the data presented here suggest that the activation of the complement system promoted by the venom of the snake *B. jararaca* in the human whole blood model significantly contributes to the inflammatory process. The control of several inflammatory parameters using Cp40, an inhibitor of the C3 component, and PMX205, a C5aR1 antagonist, indicates that complement inhibition may represent a potential therapeutic tool in *B. jararaca* envenoming.

Keywords: human whole blood, inflammation, complement system and inhibitors, *Bothrops jararaca*, snake venom