

MARIE PAULE JACQUELINE DELAFONTAINE

**VENENO DA SERPENTE *Bothrops lanceolatus*:
CARACTERIZAÇÃO, ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E
MECANISMOS POTENCIAIS ENVOLVIDOS NO ENVENENAMENTO**

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

São Paulo
2016

MARIE PAULE JACQUELINE DELAFONTAINE

**VENENO DA SERPENTE *Bothrops lanceolatus*:
CARACTERIZAÇÃO, ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO E
MECANISMOS POTENCIAIS ENVOLVIDOS NO ENVENENAMENTO**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise V. Tambourgi

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

RESUMO

DELAFONTAINE, M. **Veneno da serpente *Bothrops lanceolatus*: caracterização, ativação do sistema complemento e mecanismos potenciais envolvidos no envenenamento.** 2016, 123 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bothrops lanceolatus, também chamada “Fer-de-Lance”, é uma espécie de serpente endêmica da ilha francesa da Martinica no Caribe. Os envenenamentos por *B. lanceolatus* apresentam um quadro clínico trombótico, acompanhado de inflamação local extensa, envolvendo edema, dor e hemorragia limitada, o que difere da síndrome hemorrágica descrita nos envenenamentos botrópicos do continente Sul-Americano. Vários venenos botrópicos ativam o sistema complemento (C). O objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos da inflamação induzida pelo veneno de *B. lanceolatus*, caracterizando o veneno, suas atividades enzimáticas, suas similaridades antigênicas com outros venenos botrópicos usando soro antibotrópico comercial, e descrevendo sua ação sobre o sistema C, e sua toxicidade para queratinócitos e células endoteliais. Para isso, foram usados métodos como separação eletroforética, zimografia, ensaios enzimáticos colorimétricos e fluorimétricos, ensaios hemolíticos, assim como técnicas imunoquímicas. Confirmou-se que o veneno de *B. lanceolatus* apresenta atividades fosfolipásica, gelatinolítica e fibrinogenolítica. Sua atividade hialuronidásica é particularmente fraca, quando comparada com outros venenos botrópicos. Vários componentes do veneno compartilham similaridades antigênicas com venenos de espécies da América do Sul, uma vez que o soro antibotrópico comercial brasileiro reagiu cruzadamente com o veneno e, também, inibiu suas atividades fosfolipásica, hialuronidásica e citotóxica para queratinócitos. Por outro lado, as proteases do veneno se destacam pela sua especificidade de substrato, como mostrado pelos resultados obtidos com os peptídeos fluorescentes, inibidores específicos e o soro antibotrópico. A citotoxicidade do veneno foi testada em linhagens humanas de queratinócitos (HaCaT) e de células endoteliais vasculares (EAhy926), e comparada à toxicidade do veneno de *B. jararaca*. Enquanto ambos os venenos foram altamente citotóxicos para os queratinócitos, o veneno de *B. lanceolatus* foi 10 vezes menos tóxico do que o veneno de *B. jararaca* em células endoteliais. Observou-se a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas duas linhagens celulares quando expostas aos venenos. No soro humano, o veneno de *B. lanceolatus* ativa a cascata do C pelas vias alternativa, clássica e das lectinas, liberando as anafilatoxinas C4a e C5a, assim como o complexo terminal do C. Ele apresenta também uma ação proteolítica sobre os componentes purificados da cascata C3, C4 e C5, gerando a anafilatoxina C5a ativa. Além disso, ele cliva o inibidor de C1, C1-INH, que é um regulador plasmático essencial das vias clássica e das lectinas do C, e da cascata da coagulação, gerando um único fragmento de tamanho menor, com um potencial de inibição reduzido de 40%. Este conjunto de dados sugerem que o veneno de *B. lanceolatus* exibe uma potente ação pró-inflamatória, pela ativação do sistema complemento, que resulta na produção de grandes quantidades da anafilatoxina C5a e do complexo terminal do C. A discrepância na citotoxicidade dos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca* em células endoteliais vasculares pode refletir a diferença entre as síndromes que eles induzem, respectivamente, trombótica e hemorrágica.

Palavras-chave: *Bothrops lanceolatus*. Veneno de serpente. Sistema Complemento. Inflamação. Anafilatoxinas. Soro antibotrópico

ABSTRACT

DELAFONTAINE, M. ***Bothrops lanceolatus* snake venom: characterization, activation of the complement system and potential mechanisms involved in envenoming.** 2016, 123 p. PhD thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bothrops lanceolatus, commonly named “Fer-de-Lance”, is the endemic snake of the French Caribbean Island of Martinique. Envenomations by *B. lanceolatus* present clinical aspects characterized by a systemic thrombotic syndrome and important local inflammation, involving oedema and pain, but limited haemorrhage; which differs from the haemorrhagic syndrome exhibited in South American bothropic envenomations. Several *Bothrops* venoms can activate complement (C) system, involving their metallo and/or serine proteínases in this process. With the aim to investigate the mechanisms of venom-induced inflammation, we fully characterized *B. lanceolatus* venom and investigated the cross-reactivity of an antiothropic antivenom, the C-cascade activation by the venom and its cytotoxicity on human keratinocytes and vascular cells. We used electrophoretic separation, zymography, colorimetric or fluorimetric (FRET) enzymatic assays, and hemolytic assays, in addition to immunochemical assays to characterize *B. lanceolatus* venom. We confirmed that *B. lanceolatus* venom has phospholipase, gelatinolytic and strong fibrinogenolytic activities. Compared to other bothropic venoms, its hyaluronidase activity was particularly low. Several components of *B. lanceolatus* venom shared antigenic similarities with South American *Bothrops* species, since the therapeutical antiothropic antivenom, raised against Brazilian snakes, cross-reacted with the venom and completely abolished its phospholipase, hyaluronidase and cytotoxic (for keratinocytes) activities. However, the results obtained with fluorescent peptides, specific inhibitors and the antivenom, emphasized the substrate specificity of *B. lanceolatus* venom proteases. The cytotoxicity of the venom was tested on human keratinocytes (HaCaT) and vascular endothelial cells (EAhy926), and compared to *B. jararaca* venom toxicity. Both venoms showed to be cytotoxic on HaCaT cells cultures. However, *B. jararaca* venom was about ten times more cytotoxic for vascular cells than *B. lanceolatus* venom. The patterns of cytokine and chemokine production by the two cell lines exposed to the venoms were highly pro-inflammatory. In human serum, *B. lanceolatus* venom activated the C-cascade by the alternative, classical and lectin pathways, releasing the anaphylatoxins C4a and C5a, and the terminal C complex. It also showed a direct proteolytic activity upon the purified human C-proteins C3, C4, and C5, releasing active C5a. The venom cleaved the inhibitor of the classical and lectin C-pathways and the coagulation cascade, C1-INH, into a smaller compound, reducing its inhibitory potential by 40%. These data indicate that *B. lanceolatus* venom displays important pro-inflammatory properties, as it activates the complement cascade, inducing a strong release of the anaphylatoxin C5a and C-terminal complex. The discrepancy of toxicity on vascular endothelial cells between *B. lanceolatus* venom and *B. jararaca* venom may reflect the difference between the thrombotic and haemorrhagic syndromes, they respectively induce.

Keywords: *Bothrops lanceolatus*. Snake venom. Complement system. Inflammation. Anaphylatoxins. Antiothropic antivenom.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamento por serpentes: uma doença tropical negligenciada

Envenenamento por serpentes tem sido um tema subestimado e negligenciado em saúde pública, sendo responsável por um grande número de vítimas que podem evoluir para morte e tem um grande valor sócio-econômico nas populações mais pobres, habitando zonas rurais e tropicais da África, Ásia, Oceânia e América Latina. Nas nações desenvolvidas, os acidentes com animais peçonhentos ocorrem, habitualmente, no decorrer de atividades recreativas, ao passo que, nos países em vias de desenvolvimento, esta é uma doença laboral, com maior probabilidade de afetar jovens trabalhadores agrícolas, sobretudo homens. Estima-se que ocorram, em média, 421.000 acidentes e 20.000 mortes por ano, resultantes de picadas por serpentes, principalmente no sul e no sudeste asiático e na África subsariana. A escassez e a demora na administração do antiveneno, a precariedade dos serviços de saúde e as dificuldades no transporte das zonas rurais para os centros de saúde são os fatores que mais contribuem para a elevada relação acidente/mortalidade no envenenamento por serpentes (KASTURIRATNE et al., 2008).

Nas Américas do Sul e Central, o gênero *Bothrops* é responsável pela maioria dos acidentes com serpentes (GUTIÉRREZ, 1995). Relativamente aos acidentes com serpentes no Brasil, o primeiro estudo epidemiológico data de 1901, quando Vital Brazil observou mortalidade associada aos acidentes por serpentes no Estado de São Paulo (BRAZIL, 1901). Ele estimou que, em média, ocorriam 20.000 acidentes com serpentes, todos os anos, no país (BRAZIL, 1909); número semelhante ao notificado hoje em dia pelo Ministério de Saúde brasileiro, que variou entre 19.000 e 30.000 nos últimos 5 anos (Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN, Ministério da Saúde, 2015). Pouco tempo depois, deu-se início a um levantamento epidemiológico sistemático com a distribuição de documentos de observação e registro dos acidentes, juntamente com antivenenos. Esta iniciativa foi, então, seguida por outros levantamentos de saúde pública ao longo do século, que permitem agora a determinação de um perfil epidemiológico regular destes acidentes.

Os acidentes são mais frequentes entre os trabalhadores agrícolas do sexo masculino, com idades compreendidas entre 20 e 59 anos. As vítimas são, na maioria, picadas nos membros inferiores (75% dos casos), durante o trabalho, principalmente no período de novembro a abril. A grande maioria dos acidentes com serpentes no Brasil é causada por serpentes do gênero *Bothrops*, principalmente por *Bothrops jararaca* (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; MOTA DA SILVA; BERNARDE; DE ABREU, 2015; SINAN, 2015).

1.2 Quadro clínico

Os venenos de serpentes da família Viperidae, e particularmente do gênero *Bothrops*, causam efeitos locais e sistêmicos marcantes. Dor e hemorragia são imediatos no local da picada, sendo que o edema se inicia alguns minutos após. Edema e dor (causados pela inflamação local), hemorragia, mionecrose, formação de bolhas e dermonecrose são os sintomas locais mais frequentes. Alteração na coagulação sanguínea, hematúria, hemorragia gengival, choque hipovolêmico e oligúria são os sinais sistêmicos do envenenamento. Além disso, infecção local por bactérias presentes na boca da serpente ou na pele dos pacientes, pode agravar o acidente (JORGE et al., 1994; OTERO et al., 2002). Em todos os casos, a severidade dos sinais e sintomas aumenta com o tempo. A severidade do envenenamento causado pela maioria dos Viperídeos depende de muitas variáveis, entre elas: espécie da serpente, toxicidade do veneno e quantidade injetada e estado físico da vítima, como idade, peso corporal, estado prévio de saúde e imunidade específica. A variação intraespecífica (geográfica, sazonal, ontogenética e associada ao sexo) na composição do veneno explica também a variabilidade observada na severidade e padrão do envenenamento por serpentes, além da variação interespecífica (CALVETE et al., 2011; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; LÓPEZ-LOZANO et al., 2011).

As serpentes, *Bothrops lanceolatus* e *Bothrops caribbaeus*, são as espécies endêmicas das ilhas da Martinica e de Santa-Lucia no arquipélago das Antilhas Menores no Caribe, respectivamente. Elas formam um grupo monofilético, próximo do clado das *Bothrops asper* e *Bothrops atrox* (WÜSTER et al., 2002). A picada por estas serpentes induz uma importante inflamação local: edema extenso, dor e hemorragia limitada. Porém, estes envenenamentos apresentam um quadro clínico trombótico, que difere do perfil hemorrágico causado pelas *Bothrops* das Américas do Sul e Central (NUMERIC et al., 2002; THOMAS et al., 2006). Os mecanismos desta patologia ainda não foram totalmente elucidados, uma vez que não existe modelo animal que reproduza as trombozes observadas em humanos (HERRERA et al., 2013; STROKA et al., 2005).

1.3 Composição geral dos venenos botrópicos

As serpentes usam o seu veneno, principalmente, para caçar e não hesitam em empregá-lo de forma defensiva. O veneno de *Bothrops* é produzido numa glândula, ligada por ducto a dentes inoculadores, que permitem a inoculação na vítima; este aparelho de veneno é do tipo solenóglifo (CARDOSO et al., 2003). Depois de ser liberado pelas células secretórias, o veneno pode ser conservado em baixo pH no lúmen glandular e ductos, durante muitos meses, e de forma ativa. O armazenamento do veneno em pH ácido, associado a outros mecanismos moleculares como a glicosilação, contribui para a manutenção das enzimas em estado inativo e só após a sua inoculação, ocorre a ativação espontânea, devido ao pH dos tecidos da presa (7,2-7,4) (MACKESSY ; BAXTER, 2006).

Venenos são misturas complexas e estáveis de componentes orgânicos, peptídicos e não peptídicos como hexoses e lípidios, juntamente com componentes inorgânicos. As proteínas e os peptídeos são os principais componentes dos venenos de *Bothrops*: o teor peptídico total corresponde em média a 90-95% do peso seco do veneno. As massas moleculares variam, em média, entre 10 e 150 kDa e a maioria dos componentes entre 14 e 64 kDa (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008), sendo em grande parte bastante ácida (ANGULO; LOMONTE, 2009). As proteínas isoladas dos venenos de *Bothrops* pertencem a pelo menos oito famílias: metaloproteases, serinoproteases, lectinas do tipo C, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, fragmentos disintegrinas e ricos em cisteína (provenientes de metaloproteases de classe III, descritas no parágrafo 1.4), proteínas ricas em cisteína e fosfolipases A₂ (ANGULO; LOMONTE, 2009; CARDOSO et al., 2010). Alguns dos componentes dos venenos botrópicos são glicosilados, mas o veneno também contém quantidades reduzidas de hidratos de carbono neutro livre, como açúcares neutros (hexoses), metilpentoses, hexosaminas e ácido siálico (ARAGÓN; BOLAÑOS; VARGAS, 1977). Os venenos de *Bothrops* contêm quantidades muito pequenas de lípidios, cujo papel ainda não foi totalmente compreendido. O teor total em lípidios, observado no veneno da *B. jararaca*, corresponde em média a algumas µg por mg de veneno (ANTUNES et al., 2010; TU, 1996). Diversos eletrólitos estão também presentes nos venenos de *Bothrops*: o sódio é o principal cátion no veneno, mas desconhece-se qual é o seu papel; zinco e cálcio estão presentes em muitas metaloproteínas, sendo provável que os seus níveis reflitam o teor de metaloproteínas no veneno. As concentrações de eletrólitos variam de 1 a 20 mg/g no veneno de *B. jararaca* (ANTUNES et al., 2010).

A composição geral dos venenos botrópicos pode variar, uma vez que passam por variações ontogenéticas importantes e podem também ser influenciados pela dieta e

distribuição geográfica. Recentemente, foram analisadas as diferenças na composição do veneno de *B. atrox*, entre serpentes criadas em cativeiro e selvagens: no pool de venenos de serpentes mantidas em cativeiro foi observada uma redução na quantidade de alguns componentes, como fosfolipases A2, metaloproteases de classe I e serino proteases (ANTUNES et al., 2010; FREITAS-DE-SOUZA et al., 2015; FURTADO et al., 2010; LÓPEZ-LOZANO et al., 2002). Além disso, existe uma ampla gama de variações interespecíficas em termos de composição e atividades nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, sendo que Pidde-Queiroz et al. (2008) demonstraram uma variação significativa no potencial letal (de 1 a 11 mg/kg) entre 19 diferentes espécies. O soro antibotrópico, utilizado para a terapia humana, produzido pela imunização de cavalos com um *pool* de venenos de cinco espécies de *Bothrops*, não foi capaz de neutralizar totalmente as atividades tóxicas de todos os venenos botrópicos (PIDDE-QUEIROZ et al., 2008). Como o gênero *Bothrops* é responsável por 90% dos casos de envenenamento por serpentes no Brasil, o conhecimento da variabilidade intraespecífica e interespecífica do veneno de serpentes é extremamente importante para o tratamento das vítimas de picada e para a produção de soros antivenenos específicos (FURTADO et al., 2010; PIDDE-QUEIROZ et al., 2008).

1.4 Principais toxinas dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*

Diversas toxinas contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória local invocada pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. A principal função destas toxinas está diretamente relacionada a imobilização/morte e, ao mesmo tempo, a digestão da presa.

Metaloproteases: As metaloproteinases dos venenos de serpentes (SVMPs) são abundantes nos venenos de *Bothrops*. Representam ~80% da transcrição gênica de *B. alternatus* (CARDOSO et al., 2010); no veneno de *B. lanceolatus*, análises proteômicas detectaram entre 74% e 42,3% de metaloproteases (Tabela 1 e Tabela 2). Tais enzimas são membros da subfamília reprotisina. As SVMPs abrangem um vasto grupo de proteinases dependentes do zinco com composição de domínios variada, mas com sítios de ligação ao zinco altamente conservados. Após diferentes etapas de modificações pós-traducionais, podem ser encontrados vários tipos de SVMPs em venenos de serpentes, originalmente derivados de moléculas precursoras comuns. As SVMPs podem ser divididas em três classes (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). As proteínas da classe P-I apresentam apenas o domínio metaloproteinase, com uma massa molecular de cerca de 24 kDa. Uma metaloprotease da classe PI, de peso molecular 28 kDa, já foi purificada e caracterizada a partir do veneno de *B. lanceolatus* (STROKA et al., 2005). As proteínas da classe P-II (P-IIa a

P-IIe) possuem um domínio metaloproteinase seguido por um domínio tipo disintegrina. São proteínas de tamanho médio, que podem estar presentes como dímeros ou apenas como disintegrinas diméricas. A classe P-III (P-IIIa a P-IIIc) abrange os domínios metaloproteinase, tipo disintegrina e rico em cisteína; a massa molecular das proteínas P-III corresponde, em média, a 55 kDa. Podem estar também presentes como dímeros. O domínio rico em cisteína tem capacidade de interagir com outras proteínas, como colágeno, fator von Willebrand e integrinas, resultando numa atividade biológica particular. A classe P-IV é também chamada de P-IIIId, uma vez que não foi detectado nenhum transcrito para P-IV, sendo possível que a estrutura PIV seja resultante de outra modificação pós-translacional da estrutura canônica de P-III. Nestas proteínas estão presentes, além dos três domínios descritos, dois domínios lectina do tipo C, adicionais, ligados por pontes de dissulfeto, e sua massa molecular é de cerca de 95 kDa (FOX; SERRANO, 2008; MARKLAND; SWENSON, 2013). Estas proteases induzem hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2005), mionecrose local, lesões cutâneas e inflamação. Além disso, degradam os componentes da matriz extracelular e reduzem a regeneração do músculo esquelético afetado. Algumas metaloproteinases também afetam a função plaquetária, através dos seus domínios não catalíticos do tipo disintegrina e rico em cisteína, o que explica, pelo menos em parte, o seu efeito potenciador da hemorragia. Além destes efeitos, degradam fatores de coagulação sanguínea, impedindo uma resposta hemostática normal após danos dos microvasos. Terra et al. (2009) destacaram a relativa abundância de SVMP da classe P-I e menor teor em SVMP da classe P-III no veneno de *B. lanceolatus* (Tabela 1), quando comparado ao veneno de *B. jararaca*, e relacionaram este resultado com as diferentes patologias induzidas pelos dois venenos.

Serinoproteases: As serinoproteases ou serinoendopeptidases são enzimas nas quais um dos aminoácidos do sítio ativo é uma serina, que funciona como o aminoácido nucleofílico. As glândulas de veneno de serpentes sintetizam uma diversidade de serinoproteases ácidas e básicas (serinoproteases do veneno de serpentes - SVSP). Estas proteínases podem ser componentes abundantes: por exemplo, elas representam 5 a 18% das proteínas do veneno da *B. asper* e, entre 14,4% e 27,4%, do veneno de *B. lanceolatus* (ANGULO; BAXTER, 2009; GUTIÉRREZ et al. 2008; TERRA et al., 2009). As SVSPs apresentam a estrutura típica das enzimas do tipo quimotripsina; contêm quantidades variáveis de glicosilação e doze resíduos de cisteína, entre os quais se formam cinco pontes de dissulfeto (ITOH et al., 1987). Apesar de sequências bastante semelhantes, as SVSPs são específicas quanto ao seu substrato. Funcionam com um mecanismo catalítico comum que inclui um resíduo reativo de serina que desempenha um papel-chave de nucleófilo na

formação de um complexo acil-enzima transitório. Este complexo é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo. Os reagentes modificadores da serina, como fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e diisopropilfluorofosfato, podem conseqüentemente influenciar a atividade das SVSPs. A maioria das SVSPs são glicoproteínas com um número variável de pontos de glicosilação; contudo, pouco se sabe sobre o papel desempenhado pela porção carboidrato na estrutura e função dessas toxinas (SERRANO; MAROUN, 2005).

As serinoproteinases são capazes de afetar a coagulação sanguínea. As serinoproteinases básicas costumam apresentar atividade direta na agregação plaquetária, ao passo que as ácidas têm uma variedade de atividades proteolíticas em substratos relacionados a hemostase. Podem atuar nos substratos macromoleculares dos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina e também nas plaquetas, causando desequilíbrio no sistema hemostático da presa. As SVSPs são também inibidas de forma competitiva pela benzamidina e *p*-aminobenzamidina. De forma geral, as SVSPs são insensíveis aos inibidores endógenos de serinoproteinases.

Fosfolipases A₂: As fosfolipases A₂ (FLA₂s) são enzimas que hidrolisam glicerofosfolipídios na posição sn-2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. As FLA₂s de veneno de serpentes são proteínas de 14-18 kDa, que possuem 5 a 8 pontes de dissulfeto, uma díade catalítica His/Asp, no seu sítio ativo, e requerem Ca²⁺ para a atividade enzimática. Estão presentes em diferentes venenos de serpentes e são abundantes na composição do veneno botrópico (KANASHIRO et al., 2002). O veneno de *B. lanceolatus* contém entre 4,5% e 8,6% destas enzimas (Tabela 1 e Tabela 2). Podem ter uma ampla diversidade de efeitos biológicos como: atividades neurotóxica, cardiotoxica, miotóxica, hemolítica, convulsivante, anticoagulante, antiplaquetária, indutora de edema e lesiva aos tecidos. Após a ligação a um receptor alvo, as FLA₂s induzem efeitos farmacológicos por meio de mecanismos que são dependentes ou independentes da sua atividade catalítica (KINI, 2003). Os homólogos das FLA₂, as Lys49-FLA₂s, são altamente miotóxicas e causam extensos danos teciduais, apesar de não exibirem uma atividade catalítica mensurável.

Tabela 1 – Composição protéica dos venenos de *B. jararaca* e de *B. lanceolatus*

Família de proteínas	Porcentagem das proteínas totais (%)	
	<i>B. jararaca</i>	<i>B. lanceolatus</i>
SVMP	42,8%	42,4%
<37 kDa	16,0% **	23,0% **
37-75 kDa	54,0% **	43,0% **
SVSP	22,0%	27,4%
LAAO	9,7%	14,0%
CLP	12,5%	4,5%
FLA₂	8,1%	4,5%

Nota: Abreviaturas (em inglês):

SVMP: metaloproteinase de veneno de serpente

SVSP: serinoprotease de veneno de serpente

LAAO: oxidase L-amino ácida

CLP: proteína parecida a lectinas do tipo C

FLA₂: fosfolipase A2

Proporção das principais famílias de proteínas nos venenos de *B. jararaca* e *B. lanceolatus*, adaptada de Terra et al. (2009). Os venenos foram separados por electroforese. Três regiões foram definidas com base no peso molecular aparente das proteínas (<37 kDa; 37-75 kDa; >75 kDa), recortadas e submetidas á análise por LM/MS/MS. Os resultados representam as porcentagens da somatória das contagens de peptídeos únicos nas três regiões. **: porcentagem de SVMP em duas determinadas regiões.

Tabela 2 – Composição protéica dos venenos de *B. caribbaeus* e de *B. lanceolatus*

Família de proteínas	Porcentagem das proteínas totais (%)	
	<i>B. caribbaeus</i>	<i>B. lanceolatus</i>
SVMP	68,6%	74,3%
PI-SVMP	30,6%	25,8%
PIII-SVMP	38,0%	48,4%
SVSP	4,7%	14,4%
LAAO	8,4%	2,8%
CLP	-	<0,1%
FLA2	12,8%	8,6%

Nota: Abreviaturas (em inglês):

SVMP: metaloproteinase de veneno de serpente

SVSP: serinoprotease de veneno de serpente

LAAO: L-aminoácido oxidases

CLP: lectinas do tipo C

FLA2: fosfolipase A2

- : não detectado

Proporção das principais famílias de proteínas nos venenos de *B. caribbaeus* e *B. lanceolatus*, adaptada de Gutiérrez et al. (2008). Os venenos totais foram separados, por cromatografia em HPLC, e as proteínas coletadas manualmente. Cada fração foi caracterizada por análise da sequência N-terminal. As porcentagens de cada família de proteínas foram estimadas a partir da área dos picos obtidos por HPLC contendo proteínas da família, dividida pela área total dos picos do veneno.

1.5 Inflamação e ativação do sistema de complemento

A inflamação é um processo por meio do qual os tecidos respondem de forma ativa às infecções ou lesões teciduais para restaurar a homeostasia. Para permitir o fornecimento coordenado de componentes do sangue (plasma e leucócitos) ao local do ferimento, os microvasos passam por alterações funcionais logo após o ferimento, seguidas por fagocitose e dor local. Após a vasoconstrição sucessiva de arteríolas e vasodilatação, há um aumento da permeabilidade da microvasculatura, o que resulta no escape de um fluido rico em proteínas para o tecido extravascular, formação de edema, associado a dor (TEIXEIRA et al., 2009).

O edema é um sintoma clínico frequente nas picadas por serpentes (OTERO et al., 2002). Pode resultar em isquemia e compressão neural, causando perda permanente do tecido, incapacidade ou amputação. A terapia por antiveneno não é eficaz na redução do edema; a incubação experimental de antiveneno com veneno antes da injeção, em animais, não neutraliza o edema induzido pelo veneno (GUTIÉRREZ et al., 1986). Tem sido mostrado, que o veneno de *Bothrops* afeta os vasos linfáticos, por ação das FLA₂s miotóxicas que agem na musculatura destes vasos, induzindo contração e dano celular irreversível, e resultando na perturbação do fluxo da linfa. Isto pode desempenhar um papel importante na patogênese do edema local pronunciado, bem como na biodistribuição sistêmica do veneno, representando assim um potencial alvo terapêutico (MORA et al., 2008). Além do edema, há no local da picada, um intenso infiltrado inflamatório constituído primeiramente por neutrófilos polimofonucleares e, após 48 h, por células mononucleares. Estudos mostraram que o veneno de *B. asper* estimula os neutrófilos e as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão como L-selectina, antígeno-1 de função de linfócito (LFA-1), molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1), e molécula-1 de adesão de plaqueta/célula endotelial (PECAM-1) (ZAMUNER et al., 2005). Estas são responsáveis pelos eventos de espraiamento, adesão firme e transmigração associados à locomoção dos neutrófilos através do endotélio, no sentido da área inflamada. A inflamação induzida pelo veneno de *Bothrops* caracteriza-se também por uma indução complexa de mediadores químicos. Foi demonstrada a participação dos mediadores adrenérgicos α -1 e α -2 e dos metabólitos derivados do ácido araquidônico (CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995), bem como das citocinas inflamatórias, tais como interferon- γ (IFN- γ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), leucotrieno B4 (LTB4) e tromboxano A2 (TXA2) (ZAMUNER et al., 2005). O óxido nítrico é também produzido durante a resposta do hospedeiro, contribuindo para o edema e o infiltrado inflamatório, sem se observar um envolvimento significativo nos efeitos patológicos locais induzidos pelo veneno (CHAVES; TEIXEIRA; GUTIÉRREZ, 2006).

O sistema complemento, um importante mecanismo efetor da imunidade humoral com ação tanto na defesa inata como na adaptativa, é formado por um grupo complexo de proteínas do plasma e da membrana celular que participam de processos biologicamente importantes, desde a modulação das respostas inflamatórias locais, à promoção da fagocitose, lise dos agentes patogênicos, até ao reconhecimento do *self* alterado/danificado (CARROLL, 2008; DANILOVA, 2006; NIELSEN; FISCHER; LESLIE, 2000; PANGBURN; FERREIRA; CORTES, 2008). A ativação do sistema complemento é mediada por uma reação em cadeia de proteólise e montagem de complexos de proteínas e é composto por mais de 30 proteínas, que estão envolvidas na ativação e regulação do sistema. A maioria destas proteínas funciona como enzimas, inibidores ou cofatores (SJÖBERG; TROUW; BLOM, 2009; UNSWORTH, 2008).

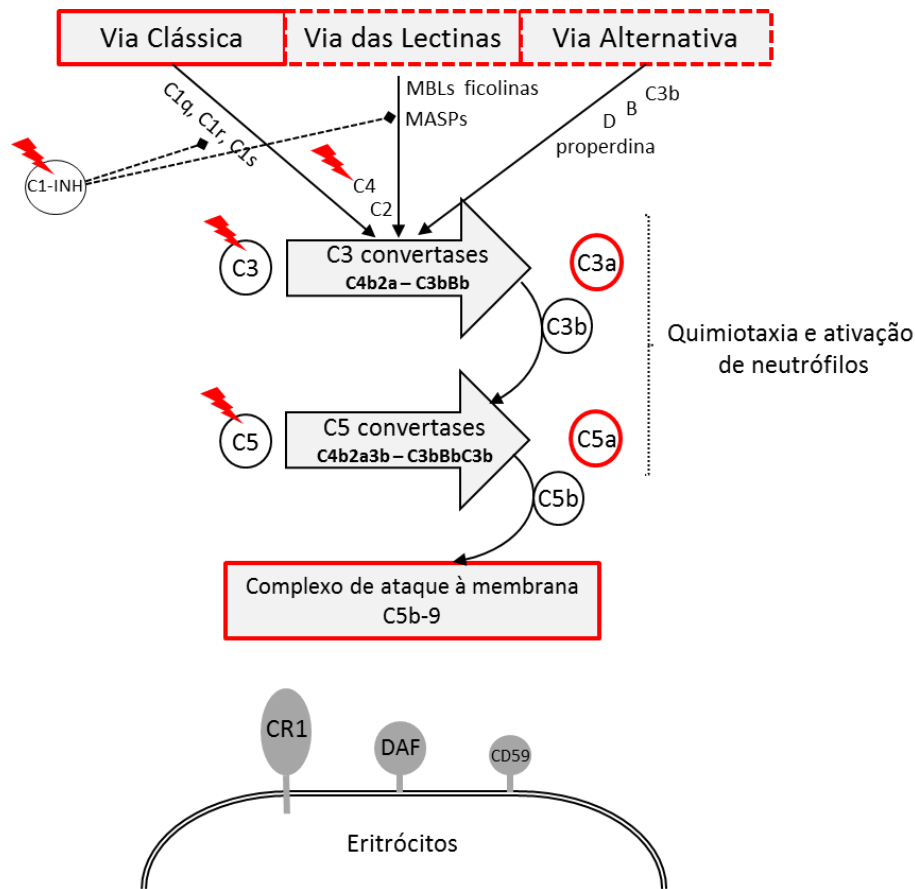
O complemento é constituído por três vias de ativação, ou seja, vias clássica, alternativa e das lectinas, que se fundem no passo de ativação proteolítica de C3, o componente central do sistema. A ativação do complemento pode gerar anafilatoxinas e o complexo de ataque à membrana (MAC). As anafilatoxinas (C3a, C4a, e C5a) são consideradas a ponte entre a imunidade inata e adaptativa e são responsáveis pelo controle da resposta pró-inflamatória local através da vasodilatação e da quimiotaxia e ativação dos leucócitos (BEINROHR et al., 2006; KÖHL, 2006; SJÖBERG; TROUW; BLOM, 2009; UNSWORTH, 2008).

A ativação do sistema complemento é regulada por diversos inibidores, como os reguladores ligados à membrana CR1 (receptor-1 do complemento ou receptor de C3b; CD35), MCP (proteína cofator de membrana; CD46), DAF (fator de aceleração de decaimento; CD55) e CD59, e por proteínas plasmáticas como os fatores I, H, as proteínas relacionadas ao factor H, a proteína ligante de C4 (C4BP), e o inibidor da C1 esterase (C1-INH). CR1, que pode ter de 190 a 285 kDa, liga C3b e C4b, acelera o decaimento das convertases C4b2a e C3bBb; ele atua como cofator do fator I e também ajuda na fagocitose dos imunocomplexos. MCP é amplamente expresso e também se liga a C3b e C4b depositados na membrana, atuando como cofator do fator I. DAF acelera o decaimento das convertases de C3 e C5, via interação com C3b/C4b. O CD59 inibe a formação do complexo C5b-9 na superfície das células. A serino protease, fator I, regula a ativação das três vias do complemento clivando as unidades C4b e C3b das convertases; sua atividade depende de cofatores. O fator H é um importante regulador da via alternativa; ele compete com o fator B pela ligação ao C3b, acelerando, assim, a dissociação da convertase da via alternativa e atua como cofator para o fator I. O C1-INH regula a ativação de C1 e das serinoproteases

associadas à lectina ligadora de manose (MASPs), componentes das vias clássica e das lectinas, respectivamente (BOWEN et al., 2001; KÖHL, 2006; MIWA; SONG, 2001; NORIS; REMUZZI, 2013).

Os venenos de *Bothrops* têm capacidade de ativar a cascata do complemento, gerando grandes quantidades de anafilatoxinas, que podem desempenhar um papel importante no processo inflamatório e na difusão dos componentes do veneno por meio dos seus efeitos vasodilatadores (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010). A análise de venenos de 19 espécies de serpentes do gênero *Bothrops* revelou que estes ativam a via clássica do complemento, sendo que proteases do veneno clivam o inibidor de C1, o que pode perturbar o controle de ativação do complemento. Não foi demonstrada qualquer modificação nos reguladores do complemento ligados à membrana, como DAF, CR1 e CD59. Alguns dos venenos de *Bothrops* foram também capazes de ativar as vias alternativa e das lectinas. C3a, C4a e C5a foram gerados em soros tratados com os venenos, através da ativação e da clivagem direta dos componentes do complemento. Os inibidores de metalo- e/ou serinoproteases foram capazes de prevenir a clivagem de C3 e C4 (PIDDE-QUEIROZ et al., 2010), o que indica que a inibição destes tipos de enzimas, após o envenenamento, pode também reduzir a contribuição da ativação do complemento para a patologia. De fato, as metaloproteinases de classe I, BaP1 e C-SVMP, purificadas a partir dos venenos de *B. asper* e *Bothrops pirajai*, respectivamente, foram capazes de ativar o sistema complemento *in vitro* (FARSKY et al., 2000; PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). A C-SVMP foi capaz de consumir componentes da cascata do complemento *in vitro* e *in vivo*, induziu a clivagem da cadeia α dos componentes C3, C4, e C5, gerando as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a (PIDDE-QUEIROZ et al., 2013). A Figura 1 resume estes resultados.

Figura 1 – Ativação do sistema complemento pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*



Ativação do complemento pelos venenos de *Bothrops*, segundo os resultados publicados por Farsky et al. (2000) e Pidde-Queiroz et al. (2010, 2013). Em vermelho aparecem as vias ativadas, assim como os produtos de ativação gerados. Os componentes clivados são marcados com o símbolo de relâmpago. Todos os venenos de *Bothrops* estudados ativam o complemento pela via clássica, alguns também pelas vias alternativa ou das lectinas (tracejado). Todos clivam os componentes C3, C4 e o inibidor C1-INH. A protease do veneno de *B. pirajai*, C-SVMP, cliva também o C5. A protease de *B. asper*, BaP1, ativa o complemento e induz a migração de leucócitos *in vivo*, via a geração de C5a. Essas atividades resultam na produção dos produtos de ativação da cascata: as anafilatoxinas C3a, C4a e C5a, e do complexo terminal do complemento, que foram observados na incubação de soro com os venenos ou com a C-SVMP. Os reguladores do complemento na superfície dos eritrócitos não são afetados.

1.6 Tratamentos

Antivenenos: Há um século a base da terapia dos envenenamentos por picada de serpentes é a administração parentérica de anticorpos de antivenenos. Tais antivenenos são produzidos por imunização dos animais, com os venenos de uma ou mais espécies, gerando assim antivenenos monoespecíficos ou poliespecíficos, respectivamente. Isto permite a produção de anticorpos capazes de neutralizar os efeitos tóxicos dos venenos como os letal, hemorrágico e causadores de desfibrinação, bem como as atividades da FLA₂ e de enzimas proteolíticas. Por outro lado, a concepção e o uso de antivenenos são dificultados pela ampla variabilidade bioquímica e imunogênica dos venenos de serpentes, envolvendo padrões complexos de variação regional e ontogenética entre espécies e dentro de uma única espécie (ANTUNES et al., 2010; PIDDE-QUEIROZ et al., 2008). Por isso, são utilizados *pools* representativos de venenos na preparação das misturas de imunização, de forma a cobrir o largo espectro de diversidade dos venenos (SEGURA et al., 2010). Por outro lado, graças ao fenômeno da reatividade imunológica cruzada, muitos antivenenos são capazes de neutralizar venenos homólogos e heterólogos de espécies relacionadas (FURTADO et al., 2010). Várias tentativas têm sido feitas para melhorar a capacidade neutralizante dos antivenenos e reduzir a quantidade de anticorpos não relevantes, incluindo o uso de toxinas purificadas e o uso de veículos antigênicos estratégicos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2011). De acordo com a revisão de autoria de Lomonte et al. (2009), que discute a neutralização do veneno da *B. asper*, é descrito que as ações tóxicas sistêmicas são eficientemente neutralizadas pelo antiveneno terapêutico, mas que a neutralização das ações locais lesivas do tecido nos envenenamentos, tal como sucede com muitas outras serpentes *Crotalinae*, continua a ser um problema de saúde pública.

Inibidores sintéticos: As SVMPs estão entre as mais lesivas e as mais abundantes nos venenos botrópicos; a sua inibição pode reduzir a extensão do dano tecidual local induzido pelo veneno. Batimastat, o nome genérico para [4-(N-hidroxiamino)-2-Risobutil-3S-(tienil tiometil)-sucinil]-L-fenilalanina-N-metilamida), é um inibidor sintético de metaloproteínases de matriz, peptidomimético do hidroxamato. Foi demonstrado que é eficaz na inibição da SVMP BaP1 do veneno *Bothrops*, em modelos *in vivo*, no caso da pré-incubação com o veneno ou quando administrado rapidamente após a injeção do veneno (ESCALANTE et al., 2000). As atividades proteolíticas e hemorrágicas das SVMPs podem também ser inibidas por compostos quelantes, como sais de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Estudos prévios mostraram que o CaNa₂EDTA, um agente quelante atualmente utilizado no tratamento da intoxicação por chumbo, é eficaz na inibição das atividades dermonecróticas e

formadoras de edema do veneno de *B. asper* quando pré-incubado com veneno, antes da injeção em animais de experimentação (BORKOW; GUTIÉRREZ; OVADIA, 1997; LEÓN et al., 1998; RUCAVADO et al., 2000).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, analisamos o veneno de *B. lanceolatus*, caracterizando suas atividades enzimáticas, citotóxicas e biológicas, e sua capacidade de ativar o sistema do complemento (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). O veneno exibiu um perfil enzimático parecido com o de outros venenos de *Bothrops* e importantes semelhanças antigênicas entre suas toxinas e as dos venenos de serpentes *Bothrops* brasileiras. As diferenças nas composições protéicas dos venenos de *B. lanceolatus* e *B. jararaca*, especialmente na natureza de metaloproteases, podem explicar os diferentes perfis de citotoxicidade em células endoteliais; enquanto queratinócitos foram igualmente sensíveis aos dois venenos. A produção de citocinas nas células endoteliais e nos queratinócitos expostas ao veneno de *B. lanceolatus* indica uma ação direta e pró-inflamatória sobre estes tipos celulares. Os efeitos locais observados em modelo murino, assim como a ativação da cascata do complemento decorrente da clivagem direta dos componentes desta, por proteases do veneno, confirmam uma potente ação inflamatória. O veneno de *B. lanceolatus* ativa o sistema complemento pelas três vias, clássica, alternativa e das lectinas. Ele possui uma ação proteolítica direta sobre os componentes centrais da cascata, C3, C4 e C5, gerando a anafilatoxina C5a ativa. Quando incubado com soro humano, observou-se a produção de complexo terminal do complemento e da anafilatoxina C5a, ativadores potentes da inflamação, mas também da coagulação. O veneno clivou e diminuiu significativamente a atividade do inibidor de fase solúvel, o C1-INH. Por outro lado, os receptores de anafilatoxinas, C3aR e C5aR, não foram afetados pelo veneno neste modelo celular.

Estes resultados apontam que a ativação do sistema complemento é um importante elemento na inflamação causada pelo veneno de *B. lanceolatus*. É provável que esta ativação desempenhe também um relevante papel na patologia trombótica que caracteriza os envenenamentos por *B. lanceolatus*. A purificação de serinoproteases e metaloproteases, com atividade proteolítica sobre os componentes do complemento, permitirá descrever os mecanismos moleculares da ativação da cascata do complemento pelo veneno.

REFERÊNCIAS*

- AMARA, U.; FLIERL, M. A.; RITTIRSCH, D.; KLOS, A.; CHEN, H.; ACKER, B.; BRÜCKNER, U. B.; NILSSON, B.; GEBHARD, F.; LAMBRIS, J. D.; HUBER-LANG, M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. **J. Immunol.**, v. 185, n. 9, p. 5628-5636, 2010.
- AMARAL, K. F.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A.; BORELLI, P.; GAVINI, G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 5, p. 338-343, 2007.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, p. 949-957, 2009.
- ANTUNES, T. C. ; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI M.; SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 56, p 1443-1458, 2010.
- ARAGÓN, F.; BOLAÑOS, R.; VARGAS, O. Carbohydrates of the venoms of *Bothrops asper* of Costa Rica: Quantitative study. **Rev. Biol. Trop.**, v. 25, n. 2, p. 171-178, 1977.
- BARKER, J. N.; MITRA, R. S.; GRIFFITHS, C. E.; DIXIT, V. M.; NICKOLOFF, B. J. Keratinocytes as initiators of inflammation. **Lancet**, v. 337, n. 8735, p. 211-214, 1991.
- BEINROHR, L.; DOBÓ, J.; ZÁVODSZKY, P.; GÁL, P. C1, MBL-MASPs and C1-inhibitor: novel approaches for targeting complement-mediated inflammation. **Trends Mol. Med.**, v. 14, p. 511-521, 2006.
- BERNARDONI, J. L.; SOUSA, L. F.; WERMELINGER, L. S.; LOPES, A. S.; PREZOTO, B. C.; SERRANO, S. M.; ZINGALI, R. B.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Functional variability of snake venom metalloproteinases: adaptive advantages in targeting different prey and implications for human envenomation. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e109651, 2014.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, 2003.
- BOGARIN, G.; ROMERO, M.; ROJAS, G.; LUTSCH, C.; CASADAMONT, M.; LANG, J.; OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Neutralization, by a monospecific *Bothrops lanceolatus* antivenom, of toxic activities induced by homologous and heterologous *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 37, p. 551-557, 1999.
- BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. **Toxicon**, v. 35, n. 6, p. 865-877, 1997.
- BOSSI, F.; FISCHETTI, F.; PELLIS, V.; BULLA, R.; FERRERO, E.; MOLLNES, T. E.; REGOLI, D.; TEDESCO, F. Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. **J. Immunol.**, v. 173, n. 11, p. 6921-6927, 2004.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração.
 Rio de Janeiro, 2002

BOWEN, B.; HAWK, J. J.; SIBUNKA, S.; HOVICK, S.; WEILER, J. M. A review of the reported defects in the human C1 esterase inhibitor gene producing hereditary angioedema including four new mutations. **Clin. Immunol.**, v. 98, p. 157-163, 2001.

BRAZIL, V. As serpentes venenosas e o tratamento específico do ofidismo. **Imprensa Médica**, v. VII, p. 17-21, 1909.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ophídico. **Rev. Méd. São Paulo.**, v. IV, p. 255-260, 1901.

BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C. Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 88, p. 424-432, 2010.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H.; FURTADO, M. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **J. Proteomics**, n. 74, v. 4, p. 510-527, 2011.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, Jr. V. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier; 2003. 468 p.

CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus*. **BMC Genomics**, v. 605, n. 11, 2010.

CARROLL, M.C. Complement and humoral immunity. **Vaccine**, v. 26, Suppl 8, p. 28-33, 2008.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, p. 31-39, 1995.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C.F.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. **Inflamm. Res.**, v. 55, n. 6, p. 245-253, 2006.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CLISSA, P. B.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D.; MOTA, I.; TAYLOR, M. J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567-1573, 2001.

COULTHARD, L. G.; WOODRUFF, T. M. Is the complement activation product C3a a proinflammatory molecule? Re-evaluating the evidence and the myth. **J. Immunol.**, v. 194, n. 8, p. 3542-3548, 2015.

- DAFFERN, P. J.; PFEIFER, P. H.; EMBER, J. A.; HUGLI, T. E. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. **J. Exp. Med.**, v. 181, n. 6, p. 2119-2127, 1995.
- DANILOVA, N. The evolution of immune mechanisms. **J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.**, v. 306, n. 6, p. 496-520, 2006.
- DAVIES, A.; LACHMANN, P. J. Membrane defence against complement lysis: the structure and biological properties of CD59. **Immunol. Res.**, v. 12, n. 3, p. 258-275, 1993.
- DAVIS, A. E. 3rd. The pathophysiology of hereditary angioedema. **Clin. Immunol.**, v. 114, n. 1, p. 3-9, 2005.
- DAVIS, A. E. 3rd; LU, F.; MEJIA, P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. **Thromb. Haemost.**, v. 104, n. 5, p. 886-893, 2010.
- DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. The humoral immune response induced by snake venom toxins. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 343-357, 2011.
- DÍAZ, C.; VALVERDE, L.; BRENES, O.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 94, n. 3, p. 520-528, 2005.
- EDGELL, C. J.; MCDONALD, C. C.; GRAHAM, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, n. 12, p. 3734-3737, 1983.
- EDLICH, R. F.; FARINHOLT, H. M.; WINTERS, K. L.; BRITT, L. D.; LONG, W. B. 3RD; WERNER, C. L.; GUBLER, K. D. Modern concepts of treatment and prevention of chemical injuries. **J. Long Term Eff. Med. Implants**, v. 15, n. 3, p. 303-318, 2005.
- ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, n. 2, p. 269-274, 2000.
- ESCALANTE, T.; ORTIZ, N.; RUCAVADO, A.; SANCHEZ, E. F.; RICHARDSON, M.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Role of collagens and perlecan in microvascular stability: exploring the mechanism of capillary vessel damage by snake venom metalloproteinases. **PLoS One**, v. 6, n. 12, e28017, 2011.
- FARSKY, S. H. P.; GONÇALVES, L. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORREA, A. P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D. V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system: role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 9, p. 213-221, 2000.
- FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3. Ed. New-York: Cambridge University Press, 1971.
- FORBES, C. D.; PENSKY, J.; RATNOFF, O. D. Inhibition of activated Hageman factor and activated plasma thromboplastin antecedent by purified serum C1 inactivator. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 76, n. 5, p. 809-815, 1970.

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

FURTADO, M. F.; CARDOSO, S. T.; SOARES, O. E.; PEREIRA, A. P.; FERNANDES, D. S.; TAMBOURGI, D. V.; SANT'ANNA, O. A. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. **Toxicon**, v. 55, p. 881-887, 2010.

GALLAGHER, P. G.; BAO, Y.; SERRANO, S. M.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; FOX, J. W. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 429-440, 2003.

GALLAGHER, P.; BAO, Y.; SERRANO, S. M.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D.; GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; ZIGRINO, P.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; NISCHT, R.; MAUCH, C.; MOSKALUK, C.; FOX, J. W. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: *in vitro* and *in vivo* gene expression analysis of the effects of the toxin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 441, n. 1, p. 1-15, 2005.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. **Life Sci.**, v. 80, n. 21, p. 1921-1943, 2007.

GOLDSTEIN, I. J. Studies on the combining sites of concanavalin A. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 55, p. 35-53, 1975.

GUO, R. F.; WARD, P. A. Role of C5a in inflammatory responses. **Annu. Rev. Immunol.**, n. 23, p. 821-852, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; GENÉ, J. A.; CERDAS, L. Comparative study of the edema-forming activity of Costa Rican snake venom and its neutralization by polyvalent anti-venom. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 85, n. 1, p. 171-175, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M. Clinical toxicology of snakebite in Central America. In: J MEIER, J.; WHITE, J. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and Poisons**. Boca Raton (Florida), CRC Press; 1995. Cap. 30, p. 645-665.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; WARRELL, D. A.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. **J. Proteome Res.**, v. 7, n. 10, p. 4396-408, 2008.

HAMILTON, K. K.; HATTORI, R.; ESMON, C. T; SIMS, P. J. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for

assembly of the prothrombinase enzyme complex. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 7, p. 3809-3814, 1990.

HARRIS, C. L.; ABBOTT, R. J.; SMITH, R. A.; MORGAN, B. P.; LEA, S. M. Molecular dissection of interactions between components of the alternative pathway of complement and decay accelerating factor (CD55). **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 2569-2578, 2005.

HERRERA, C.; RUCAVADO, A.; WARRELL, D. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Systemic effects induced by the venom of the snake *Bothrops caribbaeus* in a murine model. **Toxicon**, v. 1, n. 63, p. 19-31, 2013.

HERRERA, C.; ESCALANTE, T.; VOISIN, M. B.; RUCAVADO, A.; MORAZÁN, D.; MACÊDO, J. K.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; NOURSHARGH, S.; GUTIÉRREZ, J. M.; FOX, J. W. Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 4, e0003731, 2015.

HOURCADE, D. E.; MITCHELL, L.; KUTTNER-KONDO, L. A.; ATKINSON, J. P.; MEDOF, M. E. Decay-accelerating factor (DAF), complement receptor 1 (CR1), and factor H dissociate the complement AP C3 convertase (C3bBb) via sites on the type A domain of Bb. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 1107-1112, 2002.

IRIMURA, T.; NICOLSON, G. L. Interaction of pokeweed mitogen with poly(N-acetyllactosamine)-type carbohydrate chains. **Carbohydr. Res.**, v. 120, p. 187-195, 1983.

ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHINA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 7, p. 3132-3135, 1987.

JIMÉNEZ, N.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, n. 10, p. 2421-2428, 2008.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A.; DA SILVA, M. L.; KUSANO, E. J.; DE MENDONÇA, J. S. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans: a prospective study. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 743-748, 1994.

KANASHIRO, M. M.; DE CÁSSIA M ESCOCARD, R.; PETRETSKI, J. H.; PRATES, M. V.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L.; DA SILVA, W. D.; KIPNIS, T. L. Biochemical and biological properties of phospholipases A(2) from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 64, n. 7, p. 1179-1186, 2002.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; DE SILVA, H. J. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **PLoS Med.**, v. 11, n. 5, 2008.

KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum. **J. Biochem.**, v. 94, n. 3, p. 937-947, 1983.

- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.
- KÖHL, J. Self, non-self, and danger: a complementary view. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 586, p. 71-94, 2006.
- KRISINGER, M. J.; GOEBELER, V.; LU, Z.; MEIXNER, S. C.; MYLES, T.; PRYZDIAL, E. L.; CONWAY, E. M. Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. **Blood**, v. 120, n. 8, p. 1717-1725, 2012.
- KULDO, J. M.; OGAWARA, K. I.; WERNER, N.; ASGEIRSDÓTTIR, S. A.; KAMPS, J. A.; KOK, R. J.; MOLEMA, G. Molecular pathways of endothelial cell activation for (targeted) pharmacological intervention of chronic inflammatory diseases. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 3, n. 1, p. 11-39, 2005.
- KUNIYOSHI, A. K.; ROCHA, M.; CAJADO CARVALHO, D.; JULIANO, M. A.; JULIANO NETO, L.; TAMBOURGI, D. V.; PORTARO, F. C. Angiotensin-degrading serine peptidase: a new chymotrypsin-like activity in the venom of *Bothrops jararaca* partially blocked by the commercial antivenom. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 124-131, 2012.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEÓN, G., ESTRADA, R.; CHAVES, F.; ROJAS, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Inhibition by CaNa₂EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 321-331, 1998.
- LIDINGTON, E. A.; MOYES, D. L.; MCCORMACK, A. M.; ROSE, M. L. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. **Transpl. Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 239-246, 1999.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F.; BON, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1069-1081, 1994.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DONATO, J. L.; BON, C. Purification from *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom of a fibrinolytic enzyme with esterolytic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 5, p. 745-758, 1998.
- LÔBO DE ARAÚJO, A.; DE SOUZA, A. O.; DA CRUZ-HÖFLING, M. A.; FLORES, C. A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon**, v. 38, n. 2, p. 209-21, 2000.
- LOMONTE, B.; LEÓN, G.; ANGULO, Y.; RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, V. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 1012-1028, 2009.
- LOPES, D. S.; FAQUIM-MAURO, E.; MAGALHÃES, G. S.; LIMA, I. C.; BALDO, C.; FOX, J. W.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA, P. B. Gene expression of inflammatory

mediators induced by jararhagin on endothelial cells. **Toxicon**, v. 60, n. 6, n. 1, p. 072-1084, 2012.

LÓPEZ-LOZANO, J. L.; DE SOUSA, M. V.; RICART, C. A.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; FLORES SANCHEZ, E.; MUNIZ, E. G.; BÜHRNHEIM, P. F.; MORHY, L. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 997-1006, 2002.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, p. 147-159, 2006.

MALBRANQUE, S.; PIERCECCHI-MARTI, M. D.; THOMAS, L.; BARBEY, C.; COURCIER, D.; BUCHER, B.; RIDARCH, A.; SMADJA, D.; WARRELL, D. A. Case Report: Fatal Diffuse Thrombotic Microangiopathy after a Bite by the “Fer-de-Lance” Pit Viper (*Bothrops lanceolatus*) of Martinique. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, n. 6, p. 856–861, 2008.

MARKLAND, F. S. JR; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, 2013.

MARTEL, C.; COINTE, S.; MAURICE, P.; MATAR, S.; GHITESCU, M.; THÉROUX, P.; BONNEFOY, A. Requirements for membrane attack complex formation and anaphylatoxins binding to collagen-activated platelets. **PLoS One**, v. 6, n. 4, e18812, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em: 21 Abr. 2016.

MIRZA, R. E; KOH, T. J. Contributions of cell subsets to cytokine production during normal and impaired wound healing. **Cytokine**, v. 71, n. 2, p. 409-412, 2015.

MIWA, T.; SONG, W. C. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, n. 3, p. 445-459, 2001.

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

MORA, J.; MORA, R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of *Bothrops asper* Snake Venom on Lymphatic Vessels: Insights into a Hidden Aspect of Envenomation. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 2, n. 10, 2008.

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.

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.

MUTIN, M.; DIGNAT-GEORGE, F.; SAMPOL, J. Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. **Tissue Antigens**, v. 50, n. 5, p. 449-458, 1997.

NIELSEN, C. H.; FISCHER, E. M.; LESLIE, R. G. The role of complement in the acquired immune response. **Immunology**, v. 100, n. 1, p. 4-12, 2000.

NUMERIC, P.; MORAVIE, V.; DIDIER, M.; CHATOT-HENRY, D.; CIRILLE, S.; BUCHER, B.; THOMAS, L. Multiple cerebral infarctions following a snakebite by *Bothrops caribbaeus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 3, p. 287-288, 2002.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation. **Semin. Nephrol.**, v. 33, n. 6, p. 479-492, 2013.

OLIVEIRA, J. C. R.; DE OCA, H. M.; DUARTE, M. M.; DINIZ, C. R.; FORTES-DIAS, C. L. Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. **Toxicon**, 2002, v. 40, n. 3, p. 321-325, 2002.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J.; BEATRIZ MESA, M.; DUQUE, E.; RODRÍGUEZ, O.; LUIS ARANGO, J.; GÓMEZ, F.; TORO, A.; CANO, F.; MARÍA RODRÍGUEZ, L.; CARO, E.; MARTÍNEZ, J.; CORNEJO, W.; MARIANO GÓMEZ, L.; LUIS URIBE, F.; CÁRDENAS, S.; NÚÑEZ, V.; DÍAZ, A. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia: A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 2, p. 1107-1114, 2002.

PAES LEME, A. F.; KITANO, E. S.; FURTADO, M. F.; VALENTE, R. H.; CAMARGO, A. C.; HO, P. L.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Analysis of the subproteomes of proteínases and heparin-binding toxins of eight *Bothrops* venoms. **Proteomics**, v. 9, p. 733-745, 2009.

PANGBURN, M. K.; FERREIRA, V.P.; CORTES, C. Discrimination between host and pathogens by the complement system. **Vaccine**, v. 26, p. 115-121, 2008.

PIDDE-QUEIROZ, G.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C.; FURTADO MDE, F.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

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

PIDDE-QUEIROZ, G.; MAGNOLI, F. C.; PORTARO, F. C.; SERRANO, S. M.; LOPES, A. S.; PAES LEME, A. F.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. P-I snake venom metalloproteínase is able to activate the complement system by direct cleavage of central components of the cascade. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 10, e2519, 2013.

PLATT, J. L.; DALMASSO, A. P.; LINDMAN, B. J.; IHRCKE, N. S.; BACH, F. H. The role of C5a and antibody in the release of heparan sulfate from endothelial cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 21, n. 11, p. 2887-2890, 1991.

PRICE, J. A. 3rd. A colorimetric assay for measuring phospholipase A2 degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 70, n. 3, p. 441-444, 2007.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARRELL, D. A.; DESAKORN, V.; MCMICHAEL, A. J.; WHITE, N. J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 629-637, 1988.

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.**, v. 142, n. 3-4, p. 328-346, 2006.

RÉSIÈRES, D. ; MÉGARBANE, B.; VALENTINO, R.; MEHDAOUI, H.; THOMAS, L. *Bothrops lanceolatus* Bites: Guidelines for Severity Assessment and Emergent Management. **Toxins**, v. 2, p. 163-173, 2012.

RITIS, K.; DOUMAS, M.; MASTELLOS, D.; MICHELI, A.; GIAGLIS, S.; MAGOTTI, P.; RAFAIL, S.; KARTALIS, G.; SIDERAS, P.; LAMBRIS, J. D. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. **J. Immunol.**, v. 177, n. 7, p. 4794-4802, 2006.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; CHAVES, F.; LEÓN, G.; CURY, Y.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteínase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂ EDTA. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, n. 5-6, p. 313-319, 2000.

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

SCHAPIRA, M.; SCOTT, C. F.; COLMAN, R. W. Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma. **J. Clin. Invest.**, v. 69, n. 2, p. 462-468, 1982.

SEGURA, A.; CASTILLO, M. C.; NÚÑEZ, V.; YARLEQUÉ, A.; GONÇALVES, L. R.; VILLALTA, M.; BONILLA, C.; HERRERA, M.; VARGAS, M.; FERNÁNDEZ, M.; YANO, MY.; ARAÚJO, H. P.; BOLLER, M. A.; LEÓN, P.; TINTAYA, B.; SANOMARTINS, I. S.; GÓMEZ, A.; FERNÁNDEZ, G. P.; GEOGHEGAN, P.; HIGASHI, H. G.; LEÓN, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 980-989, 2012.

SERRANO, S. M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteínase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, n. 21, p. 7186-7193, 1995.

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

SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, n. 9, p. 1175-1185, 2006.

SIMS, P. J.; WIEDMER, T. The response of human platelets to activated components of the complement system. **Immunol. Today**, v. 12, n. 9, p. 338-342, 1991.

SJÖBERG, A. P.; TROUW, L. A.; BLOM, A. M. Complement activation and inhibition: a delicate balance. **Trends Immunol.**, v. 30, p. 83-90, 2009.

STROKA, A.; DONATO, J. L.; BON, C.; HYSLOP, S.; DE ARAÚJO, A. L. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 411-420, 2005.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-861, 2005.

TEDESCO, F.; PAUSA, M.; NARDON, E.; INTRONA, M.; MANTOVANI, A.; DOBRINA, A. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 9, p. 1619-1627, 1997.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 988-997, 2009.

TENSEN, C. P.; FLIER, J.; VAN DER RAAIJ-HELMER, E. M.; SAMPAT-SARDJOEPERSAD, S.; VAN DER SCHORS, R. C.; LEURS, R.; SCHEPER, R. J.; BOORSMA, D. M.; WILLEMZE, R. Human IP-9: A keratinocyte-derived high affinity CXC-chemokine ligand for the IP-10/Mig receptor (CXCR3). **J. Invest. Dermatol.**, v. 112, n. 5, p. 716-722, 1999.

TERRA, R. M. S. et al. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 836-844, 2009.

THOMAS, L.; PINTO, A. F.; GUIMARÃES, J. A.; FOX, J. W. Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-lance" *Bothrops lanceolatus* in Martinique despite antivenom treatment: A report of three recent cases. **Toxicon**, v. 48, p. 23-28, 2006.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, v. 24, p. 145-149, 1992.

TSUJI, S.; KAJI, K.; NAGASAWA, S. Decay-accelerating factor on human umbilical vein endothelial cells. Its histamine-induced expression and spontaneous rapid shedding from the cell surface. **J. Immunol.**, v. 152, n. 3, p. 1404-1410, 1994.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 37-62, 1996.

UNSWORTH, D. J. Complement deficiency and disease. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 1, p. 1013-1017, 2008.

VOGT, W.; DAMERAU, B.; LÜHMANN, B.; HESSE, D.; HALLER, Y. Complement activation in human lymph: modulation by the contact activation system and by leukocytes. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 79, n. 4, p. 423-433, 1986.

WANG, R.; QIU, P.; JIANG, W.; CAI, X.; OU, Y.; SU, X.; CAI, J.; CHEN, J.; YIN, W.; YAN G. Recombinant fibrinogenase from *Agkistrodon acutus* venom protects against sepsis via direct degradation of fibrin and TNF- α . **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, n. 5, p. 620-630, 2008.

WIEDMER, T.; ESMON, C. T.; SIMS, P. J. Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase. **Blood**, v. 68, n. 4, p. 875-880, 1986.

WOJTA, J.; HUBER, K.; VALENT, P. New aspects in thrombotic research: complement induced switch in mast cells from a profibrinolytic to a prothrombotic phenotype. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 33, n. 5-6, p. 438-441, 2003.

WU, M. C.; BRENNAN, F. H.; LYNCH, J. P.; MANTOVANI, S.; PHIPPS, S.; WETSEL, R. A.; RUITENBERG, M. J.; TAYLOR, S. M.; WOODRUFF, T. M. The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 110, n. 23, p. 9439-9444, 2013.

WÜSTER, W.; THORPE, R. S.; DA GRAÇA SALOMÃO, M.; THOMAS, L.; PUORTO, G.; THEAKSTON, D. R. G.; WARRELL, D. A. Origin and phylogenetic position of the Lesser Antillean species of *Bothrops* (Serpentes, Viperidae): biogeographical and medical implications. **Bull. Nat. Hist. Mus. Lond. (Zool.)**, v. 68, n. 2, p. 101-106, 2002.

ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; DE FÁTIMA PEREIRA TEIXEIRA, C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids.; and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 806-813, 2005.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; ROCHA, M. M.; FURTADO, M. F.; CAMARGO, A. C.; HO, P. L.; SERRANO, S. M. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **J. Proteome Res.**, v. 9, n. 5, p. 2278-2291, 2010.

ZELANIS, A.; SERRANO, S. M.; REINHOLD, V. N. N-glycome profiling of *Bothrops jararaca* newborn and adult venoms. **J. Proteomics**, v. 75, n. 3, p. 774-782, 2012.