



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA**



**IMPACTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ, INIBIDORES TECIDUAIS
E MEDIADORES IMUNOLÓGICOS SOLÚVEIS CIRCULANTES NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO DE PACIENTES VÍTIMAS DE ACIDENTE BOTRÓPICO NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

CRISTIANO OLIVEIRA DA SILVA

Manaus – AM

2024

CRISTIANO OLIVEIRA DA SILVA

**IMPACTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ, INIBIDORES TECIDUAIS
E MEDIADORES IMUNOLÓGICOS SOLÚVEIS CIRCULANTES NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO DE PACIENTES VÍTIMAS DE ACIDENTE BOTRÓPICO NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da Universidade
Federal do Amazonas como pré-requisito para
obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Linha de Pesquisa: Imunologia das Doenças Humanas e Animais

Manaus – AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586i Silva, Cristiano Oliveira da
Impacto das Metaloproteinases de Matriz, Inibidores Teciduais e
Mediadores Imunológicos Solúveis Circulantes no Processo
Inflamatório de Pacientes Vítimas de Acidente Botrópico na
Amazônia Brasileira / Cristiano Oliveira da Silva . 2024
141 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Allyson Guimarães da Costa
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Bothrops atrox; . 2. Inflamação. 3. Citocinas. 4. Mmmps. 5.
Timps. I. Costa, Allyson Guimarães da. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

CRISTIANO OLIVEIRA DA SILVA

**IMPACTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ, INIBIDORES TECIDUAIS
E MEDIADORES IMUNOLÓGICOS SOLÚVEIS CIRCULANTES NO PROCESSO
INFLAMATÓRIO DE PACIENTES VÍTIMAS DE ACIDENTE BOTRÓPICO NA
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa – Presidente
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria – Membro Titular Interno
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Marco Aurélio Sartim – Membro Titular Externo
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Profa. Dra. Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett – Membro Titular Externo
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)

Dra. Mariana Brasil de Andrade Figueira – Membro Titular Externo
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

DEDICATÓRIA

“Ao meu amor da minha vida, meu amor e maior apoiador, por acreditar em mim quando eu duvidei, por sua paciência infinita e por estar ao meu lado em cada passo dessa jornada”.

“E aos amigos que se tornaram fortaleza, dedico esta tese com toda a minha gratidão e carinho. Sem vocês, este sonho não seria possível.”

“Ao Santo Daime, fonte de luz, cura e sabedoria, dedicado esta jornada acadêmica. Foi na força das suas levezas que encontrarei inspiração, equilíbrio e resiliência para superar os desafios do caminho. Que este trabalho seja também um reflexo da transformação e da conexão espiritual que o Daime proporciona”.

"A vocês, que estiveram ao meu lado nos dias mais longos e celebraram comigo cada pequena conquista, meu parceiro e meus amigos, esta tese é também sua."

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expressarei minha profunda gratidão ao meu orientador, Professor Allyson Guimarães, por sua orientação, paciência e apoio ao longo de toda esta jornada. Sua expertise, dedicação e encorajamento foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial ao Professor Marco Aurélio, cuja ajuda foi determinante para que eu pudesse ingressar neste doutorado. Sem seu apoio e confiança, esta etapa tão significativa da minha vida acadêmica não teria nem sequer começado.

À minha colega e amiga Juliana, minha gratidão pela parceria, pelos momentos de aprendizado compartilhado e pelo suporte constante. Sua colaboração foi essencial em muitos momentos desafiadores desta pesquisa.

Ao apoio do Grupo Amazon InterScience, pelo auxílio e revisões durante as reuniões científicas.

Agradecer às instituições que tornaram este projeto possível, especialmente à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio acadêmico e científico. À Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), pelo suporte técnico-científico, atendimento dos pacientes, obtenção das amostras e logística dos ensaios; e a Fundação HEMOAM, pelo acesso e infraestrutura que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Minha gratidão também à FIOCRUZ-Minas e a todos os colaboradores envolvidos nesta parceria, em especial o Grupo Integrado de Pesquisa em Biomarcadores (GIPB), na pessoa do Dr. Olindo Assis e Andréa Teixeira. Sua contribuição foi indispensável para a realização dos ensaios, gerando resultados que puderam enriquecer esta pesquisa, ampliando horizontes e promovendo avanços inovadores.

Por fim, agradeço às agências de fomento FAPEAM e CAPES, cujo suporte financeiro possibilitou a realização deste trabalho, além da bolsa de doutorado. Seu investimento na ciência e no desenvolvimento acadêmico é essencial para o avanço do conhecimento e a formação de pesquisadores de comprometimento com a sociedade.

A todos vocês, meu mais sincero obrigado por contribuir para a concretização deste projeto.

DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida por meio dos auxílios dos Programas de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), por meio das resoluções de nº 002/2008, 007/2018 e 005/2019 (Programa PRÓ-ESTADO), que financiaram indiretamente esta pesquisa.

EPÍGRAFE

"Mãe Divina, luz que guia, amor que cura. Na tua força, encontro o caminho, na tua sabedoria, a inspiração para seguir."
— Inspirado na música "Mãe Divina", Chandra Lacombe.

RESUMO

A serpente *Bothrops atrox* (*B. atrox*) é responsável por grande parte das notificações de acidentes ofídicos na região norte do Brasil. A reação inflamatória desencadeada pelo veneno é responsável pelos sinais clínicos, com efeitos locais e sistêmicos observados nos pacientes. O remodelamento da matriz extracelular (MEC) nesses acidentes é regulado por enzimas como as metaloproteinases de matriz (MMPs), podendo ser influenciado pelo processo inflamatório. Nesse estudo, avaliamos pela primeira vez o envolvimento das MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10), TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF-alfa, IL-10, IL-2 e IL-4) em pacientes vítimas de acidente ofídico botrópico. Realizamos um estudo observacional, longitudinal e prospectivo de pacientes que sofreram envenenamento botrópico e procuraram atendimento na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). A população de estudo (N=30) foi dividida em 2 grupos de acordo com os sinais e sintomas apresentados (leve e grave). A coleta de amostras de sangue periférico foi realizada em três momentos: antes da soroterapia (T0), 24h e 48h e após a soroterapia (T1 e T2). O estudo contou com um grupo controle (N=20), composto por indivíduos que não sofreram acidente ofídico. A quantificação das moléculas citadas foi feita através da técnica de Luminex. Nossos resultados apontam que, nos pacientes, há uma resposta inflamatória complexa, com alterações hematológicas, como a leucocitose neutrofilica a esquerda, que refletem a gravidade do quadro clínico. O aumento das citocinas IL-6 e IL-10 em comparação ao grupo controle, aliado à diminuição dos níveis de IL-1 β , TNF, IL-2 e IL-4, sugere um perfil imunológico específico diante o envenenamento. A correlação entre os níveis de citocinas e metaloproteinases de matriz (MMPs) sugere que a resposta inflamatória inicial é uniforme entre os pacientes, independentemente da gravidade do envenenamento, mas que a MMP-10 pode servir como um biomarcador promissor para quadros graves. A elevação dos TIMPs indica uma resposta regulatória do organismo, enquanto a redução progressiva de MMPs e TIMPs, principalmente TIMP-1 no grupo Grave, aponta para uma adaptação fisiológica que estabiliza a inflamação e promove a recuperação tecidual. Esses achados ressaltam a importância do monitoramento de MMPs e TIMPs como biomarcadores de prognóstico e a necessidade de estratégias terapêuticas que considerem a complexidade da resposta imunológica, contribuindo para um manejo clínico mais eficaz.

Palavras-chave: *Bothrops atrox*; inflamação; citocinas; MMPs; TIMPs

ABSTRACT

The snake *Bothrops atrox* (*B. atrox*) is responsible for most reports of snakebite accidents in northern Brazil. The inflammatory reaction triggered by the venom is responsible for the clinical signs, with local and systemic effects observed in patients, in addition to their classification as mild, moderate and severe. The remodeling of the extracellular matrix (ECM) in these accidents is regulated by proteolytic enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs), and may be influenced by the inflammatory process. In this study, we evaluated for the first time the involvement of metalloproteinases (MMP1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10), TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 and TIMP-4) and inflammatory mediators (IL-1b, IL-6, TNF-alpha, IL-10, IL-2 and IL-4) in patients who are victims of *Bothrops* snakebite accidents. This is an observational, longitudinal, and prospective study of patients who suffered *Bothrops* envenomation and sought care at the Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). The study population was divided into 2 groups according to the signs and symptoms presented (mild and severe). Peripheral blood samples were collected at three time points: before serotherapy (T0), during (24h), and after serotherapy (48h). The study included a control group composed of individuals who had not suffered a previous snakebite. The quantification of the molecules was performed using the Luminex technique. Our results indicate that, in patients, there is a complex inflammatory response, with hematological changes that reflect the severity of the clinical picture. The correlation between cytokines and matrix metalloproteinases (MMPs) suggests a uniform initial inflammatory response, highlighting MMP-1 as a biomarker for severe cases. The elevation of inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) indicates a regulatory response of the organism, while the progressive reduction of MMPs and TIMPs points to a physiological adaptation that stabilizes inflammation and promotes tissue recovery. These findings highlight the importance of monitoring MMPs and TIMPs as prognostic biomarkers and the need for therapeutic strategies that consider the complexity of the immune response, contributing to a more effective clinical management.

Keywords: *Bothrops atrox*; inflammation; cytokines; MMPs; TIMPs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Acidentes por animais peçonhentos.....	19
Figura 2: <i>Bothrops atrox</i> : Serpente com o maior número de acidentes registrados na reunião Norte.....	20
Figura 3. Sazonalidade dos acidentes ofídicos registrados no Estado do Amazonas de 2007 a 2012.....	20
Figura 4. Número de óbitos provenientes de acidentes ofídicos no Brasil de 1979 a 2017.....	21
Figura 5: Principais enzimas presentes em Viperídeos e suas funções.....	24
Figura 6. Resumo esquemático da resposta inflamatória local e sistêmica ao envenenamento por <i>B. atrox</i>	26
Figura 7. Resumo gráfico das preferências e especificidades na Inibição.....	35
Figura 8. Fluxograma de Estudo.....	42
Figura 9. Representação da metodologia utilizando o sistema Luminex.....	44
Figura 10: Concentração de citocinas na admissão (T0) nos grupos Leve, Grave e HD.....	47
Figura 11: Concentração de Metaloproteinases (MMP's) e Inibidores de Metaloproteinases (TIMP's) na admissão (T0) nos grupos Leve, Grave e HD.....	49
Figura 12: Análise da dinâmica de produção citocinas solúveis durante a evolução clínica dos pacientes.....	50
Figura 13: Análise da dinâmica de produção de Metaloproteinases (MMP's) e Inibidores de Metaloproteinases (TIMP's) durante a evolução clínica dos pacientes.....	51
Figura 14. Análise não convencional para assinatura de principais produtores em pacientes Grave antes da soroterapia.....	52

Figura 15. Rede entre moléculas imunológicas mostra interações entre os grupos durante o acompanhamento do estudo.....	53
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela-1-	Classificação	das	MMP31			
Tabela-2-	Classificação	quanto à	gravidade e	soroterapia	recomendada38	
Tabela-3-	Citocinas	e	suas	funções	biológicas40	
Tabela-4-	Caracterização	sociodemográfica	da	população	de	estudo46
Tabela-5-	Dados de hemograma de pacientes com acidente botrópico estratificados em grupo Leve e Grave, antes e após soroterapia, em conjunto com o grupo controle (HD).....					47	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
MMP's	Metaloproteinases
ANOVA	Análise de variância unidirecional
ASC	Proteína associada a apoptose do tipo speck
BaV	Peçonha bruta de <i>Bothrops atrox</i>
CBA	Cytometric Bead Array
BjV:	Peçonha bruta de <i>Bothrops Jararaca</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CXCL	Cisteínas N-terminais das quimiocinas
DAMPs	Padrão molecular associado ao dano
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HPX	Hemopexina
IL	Interleucina
INF	Interferon
LTB	Leucotrieno B4
LAAOs	L-aminoácido oxidases
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz

MT-MMP	Metaloproteinase de matriz do tipo membrana
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
ng	Nanograma
nm	Nanomolar
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PLA2s	Fosfolipases A2
PRO-MMP	Metaloproteinase de matriz imatura
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SVMPs	Metaloproteases de veneno de cobra
SVMMP	Metaloproteinase da matriz de veneno de cobra
SeMMP	Metaloproteinase de matriz sérica
SVSPs	Serinoproteases de veneno de cobra
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TLRs	Receptores do tipo toll
TNF	Fator de necrose tumoral
UFAM	Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Epidemiologia.....	18
2.2. Tratamento.....	21
2.3. Processo inflamatório no envenenamento botrópico.....	22
2.4. Envenenamento.....	25
2.5. Metaloproteínas associadas a veneno de serpente (SVMPs).....	26
2.6. Metaloproteínas de matriz e Inibidores (MMPs/TIMPs).....	29
2.7. Moléculas imunológicas solúveis (citocinas).....	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1. População de Estudo e Elegibilidade.....	39
4.1.1. Critério de Inclusão.....	40
4.1.2. Critério de não Inclusão.....	42
4.2. Coleta de Dados e Amostras.....	42
4.3. Obtenção das Amostras de soro.....	42
4.4. Armazenamento.....	42
4.5. Quantificação de MMP's, TIMP's e Citocinas.....	43
4.6. Aspectos Éticos.....	44
4.7. Análises Estatísticas.....	44

5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	53
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	62
8. CONCLUSÃO.....	62
9. REFERÊNCIAS.....	63
10. PRODUTO DA TESE.....	80
11. ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

Em diversas regiões brasileiras, envenenamentos por serpentes são um problema de saúde pública, devido à grande incidência anual e pelos casos de morte ou amputações associadas ao envenenamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A região norte do Brasil possui o maior índice de acidentes causados por envenenamento ofídico no país, tendo a espécie *Bothrops atrox* como a principal responsável (SINAN, 2019). O acidente botrópico leva a um quadro clínico inflamatório, variando desde hemorragias locais à efeitos sistêmicos, de acordo com a gravidade do envenenamento. (LARRÉCHÉ et al., 2021a).

As manifestações clínicas incluem dor, edema no local da picada, extravasamento de sangue, processos hemorrágicos, necrose e formação de bolhas (flictenas), decorrentes do processo inflamatório, variando de acordo com a classificação do acidente. (MONTEIRO et al., 2020a; MORETTO DEL-REI et al., 2019). Por sua vez, as manifestações sistêmicas consistem em principalmente dificuldade na coagulação, insuficiência renal aguda e sangramentos (GIMENES et al., 2021).

Os efeitos fisiopatológicos são de grande interesse, pois a resposta inflamatória observada após envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* leva à ativação do sistema imune inato, com participação das células locais e recrutamento de outras células como leucócitos, além da produção de mediadores inflamatórios e citocinas (ECHEVERRÍA et al., 2018; IBIAPINA et al., 2019a). Estudos vêm demonstrando que a peçonha de *Bothrops atrox* apresenta efeitos locais mais intensos comparados a outras espécies, devido ao grande processo inflamatório gerado no local da picada (MOREIRA et al., 2012).

Desde a primeira descoberta de proteinases dependentes de zinco no veneno de viperídeos, os pesquisadores estudam a estrutura e a função dessas proteinases, para entender seu papel no envenenamento. (TAKAHASHI; OHSAKA, 1970). Metaloproteases é a principal família de proteínas em venenos de víbora, presente em todas as espécies de víboras incluídas, na qual as quantidades máximas presentes são de 85% para *Bothrops atrox* (TASOULIS; ISBISTER, 2017).

À medida que os estudos avançavam, as metaloproteinases de veneno de cobra (SVMPs), como esse grupo de proteinases é agora chamado, foram posteriormente categorizadas nas classes PI, PIIa, PIIb, PIIIa, PIIIb e PIV (FOX; SERRANO, 2005; HITE et al., 1994). Funcionalmente, as SVMPs exibem uma ampla gama de atividades biológicas,

muitas das quais são tóxicas, e esse escopo de atividades reflete a multiplicidade de produtos derivados das quatro classes de SVMPs (FOX; SERRANO, 2005).

No entanto, há outro grupo de metaloproteinasas que não pertencem às SVMPs, As metaloproteinasas de matriz (MMPs), também conhecidas como matrixinas, que hidrolisam proteínas da matriz extracelular (MEC) (LEVIN et al., 2017a). MMPs são uma família de endopeptidases de degradação de MEC dependentes de zinco, que compartilham domínios funcionais comuns, mecanismos de ativação e coletivamente têm a capacidade de degradar todos os tipos de proteínas de MEC (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKLER, 1993a). Além de desempenhar um papel central no turnover das macromoléculas da MEC, essas enzimas podem ativar ou degradar proteoliticamente uma variedade de substratos não matriciais, incluindo moléculas sinalizadoras como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002a).

Cada MMP influencia as propriedades da MEC de maneira diferente, gerando características químicas, biomecânicas e morfológicas distintas da MEC, onde efeitos produzidos por uma MMP específica através da degradação seletiva da MEC influenciará exclusivamente o comportamento celular, incluindo migração, morfologia, perfil de expressão gênica e ativação de cascatas intracelulares (BRINCKERHOFF; MATRISIAN, 2002b). As MMPs ativadas são reguladas por seus inibidores endógenos conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMP), onde o domínio N-terminal é suficiente para a inibição de MMPs. Todos os TIMPs inibem a atividade das MMPs de maneira não seletiva (BODE, 2003a; HUANG et al., 1996).

Na literatura, as alterações na homeostase causadas pelo envenenamento botrópico devido a ação das SVMPs já é descrita em diversos estudos, por sua vez as MMPs não tiveram atenção científica, há poucas informações de correlação de quadro clínico com os níveis dessas metaloproteinasas ou sua dosagem em acidentes causados pela espécie *Bothrops atrox*.

Os acidentes causados por *Bothrops atrox* são um problema de saúde pública, e as informações presentes na literatura não são suficientes para esclarecer a atividade das MMPs e seu impacto na inflamação desencadeada após o envenenamento botrópico. Portanto, buscamos avaliar estes mediadores endógenos e sua ação, contribuindo assim para melhor compreensão e elucidação do processo de resposta imune que ocorre nestes pacientes.

O tratamento com o soro antiofídico não inibe totalmente os efeitos locais e sistêmicos, sendo amplo o desafio para a comunidade científica, especialmente na hemorragia local, devido à composição enzimática do veneno. O soro antiofídico botrópico (SAB) não é capaz de reverter a hemorragia local da picada, mesmo quando empregado em grandes quantidades (GUTIÉRREZ et al., 2018a).

É de conhecimento que o desenvolvimento da reação inflamatória é acentuado devido a composição enzimática da peçonha de serpentes, isto é, a peçonha da serpente é responsável pelo efeito promovido principalmente por neutrófilos e fagócitos, pela produção de espécies reativas de oxigênio levando à grandes lesões celulares (GUTIÉRREZ et al., 2018a).

Mesmo com buscas minuciosas, existem poucos trabalhos descritos na literatura sobre o envenenamento causado pela serpente *Bothrops atrox*, e se há alguma relação da gravidade do quadro clínico com uma possível alteração dos níveis séricos de metaloproteases após o acidente.

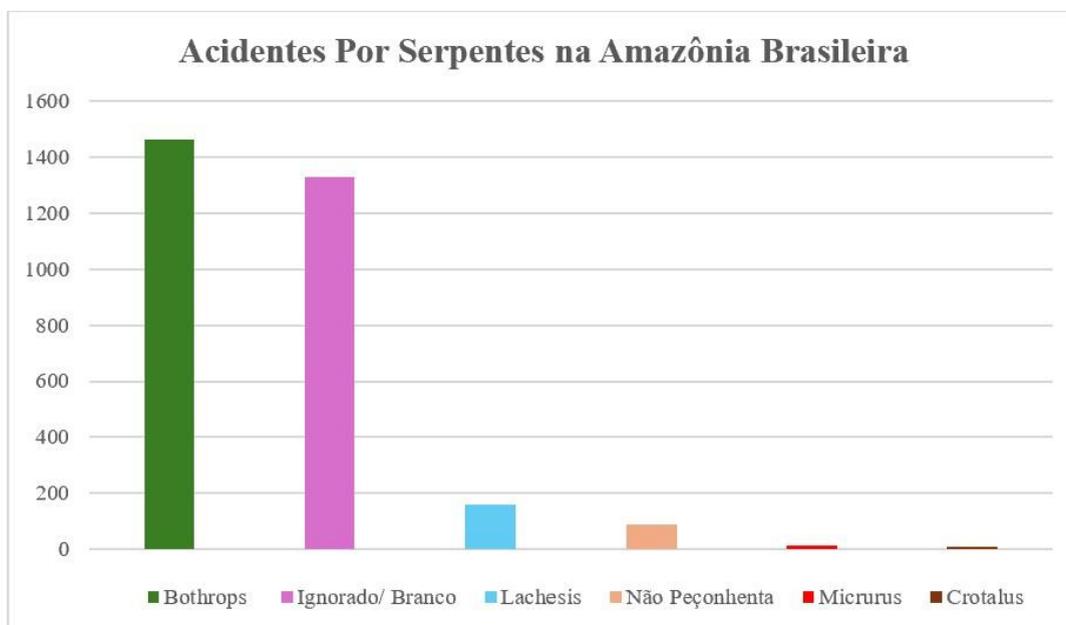
Vários estudos buscam compreender os mecanismos envolvidos no controle da inflamação e homeostase, bem como no desenvolvimento do quadro clínico grave por envenenamento botrópico, mesmo após a administração do soro antiofídico, buscando identificar marcadores de prognóstico de evolução e complicações. Nesse contexto, o estudo das MMPs e TIMPs nos diferentes quadros clínicos do acidente ofídico, em conjunto com citocinas é de grande importância para o entendimento da fisiopatologia causada pelo processo inflamatório e se novos alvos terapêuticos podem ser identificados para um melhor tratamento adjuvante, além de uma melhor elucidação da resposta imune deste processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia

Os envenenamentos por animais peçonhentos, especialmente os acidentes por serpentes, foram abrangidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na classificação das doenças tropicais negligenciadas. Estes estão relacionados em grande parte com indivíduos de baixa renda, residentes em zonas rurais, sendo um problema de saúde pública. Devido ao grande número de casos, estes acidentes foram inseridos na Lista de Notificação Compulsória do Brasil, onde todos os casos de acidentes ofídicos devem ser notificados imediatamente após a confirmação (TOXICOLOGIA, 2022).

No ano de 2023, o SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) registrou aproximadamente, no estado do Amazonas o SINAN registrou aproximadamente 3.195 notificações de acidentes ofídicos, dos quais 1.463 foram ocasionadas por serpentes do gênero *Bothrops*, seguido de *Lachesis*, com 160 casos, *Micrurus* com 12 casos e *Crotalus* com 11 casos (Figura 1). (SINAN, 2023).



Figura

1: Acidentes por animais peçonhentos. Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Amazonas Fonte: Adaptado de: (SINAN, 2023)

Na Amazônia Brasileira, o gênero *Bothrops* (**Figura 2**) ocasionou aproximadamente 59% dos acidentes ofídicos notificados.



Figura 2: *Bothrops atrox*: Serpente com o maior número de acidentes registrados na reunião Norte. Foto: Paulo Bernarde. Fonte: Adaptado de: (PEREIRA DA SILVA et al., 2017)

As notificações demonstram uma incidência crescente de acidentes ofídicos após a segunda metade da década de 1980, predominantes em adultos (20 - 39 anos; 38%), no sexo masculino (78,9%) e nos residentes em áreas rurais (85,6%) (FEITOSA et al., 2015b). Levando em consideração que a maior incidência dos acidentes com serpentes na região amazônica correlaciona-se com o período de chuvas mais elevado, sendo nos meses de dezembro a junho, com taxa de letalidade de 0,6% (**Figura 3**) (FEITOSA, ESAÚ L. ET AL., 2015).

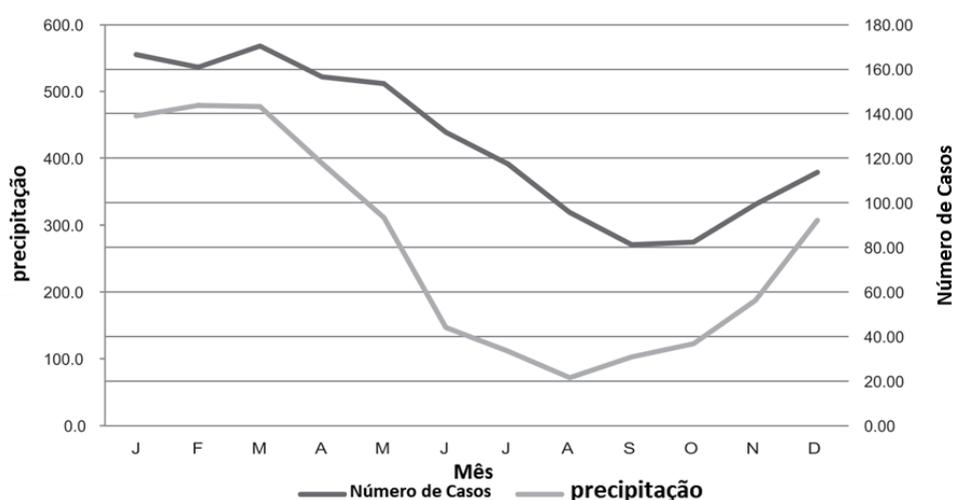


Figura 3: Sazonalidade dos acidentes ofídicos registrados no Estado do Amazonas de 2007 a 2012. Fonte: Adaptado de (FEITOSA, ESAÚ L. ET AL., 2015).

2.2. Tratamento

No ano de 1898, Vital Brazil identificou que a eficácia dos soros antiofídicos estava relacionada à especificidade do veneno utilizado na produção do antídoto e de acordo com o gênero das serpentes. Inicialmente, a eficácia foi constatada a partir da imunização cães inoculados com veneno de cascavel e jararaca (BOCHNER, 2013). A administração de soro antiofídico é reconhecida pela OMS como o único tratamento recomendado em caso de acidentes (CHIPPAUX, 2010).

É importante destacar que houve uma crise do soro no Brasil a partir da década de 1970 até o ano de 1986 (MÉTODOS; BIBLIOMÉTRICOS, 2011). A falta generalizada na disponibilização se deu devido à oferta ser regulada pelo mercado. Isso significa que as empresas privadas que forneciam os soros controlavam a oferta que era adquirida pela Central de Medicamentos do Ministério da Saúde. Em 1983, a crise avançou com a saída de um dos

laboratórios produtores por causa de problemas na produção, o que ocasionou a paralisação de grande parte da produção. Após a morte do filho de um diplomata, no ano de 1986, institucionalizou-se a “crise do soro” no Brasil (**Figura 4**) (MORAES; REICHENHEIM, 2002).

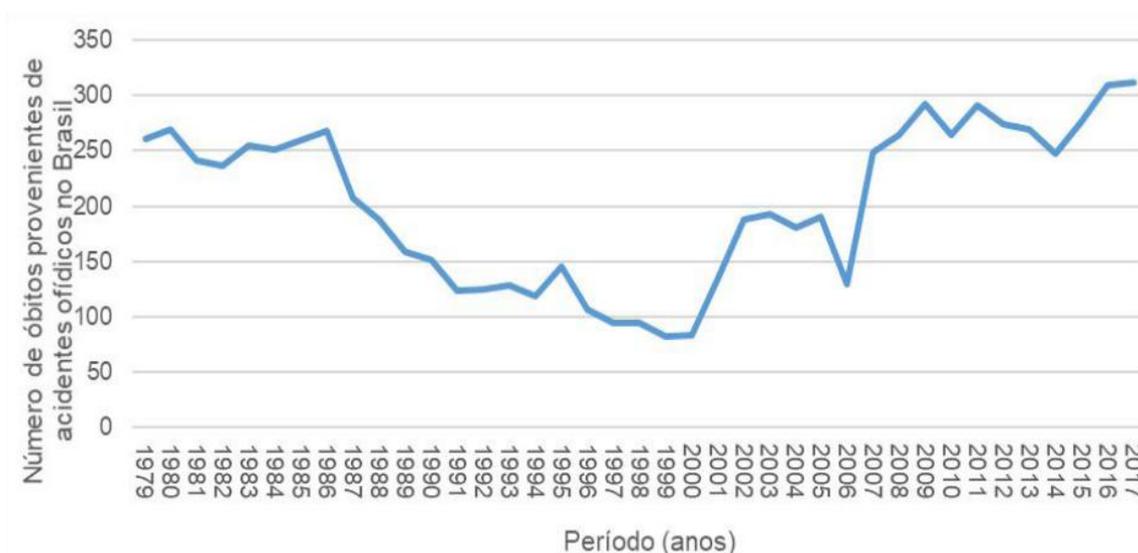


Figura 4: Número de óbitos provenientes de acidentes ofídicos no Brasil de 1979 a 2017 Fonte: VAZ; BRAZIL; PAIXÃO, 2020).

Há mais de um século, o Butantan produz diversos tipos de soros contra toxinas de animais peçonhentos e microrganismos. Sua produção envolve a imunização de cavalos com antígenos produzidos a partir de venenos, toxinas ou vírus, a obtenção de diferentes tipos de plasma, que são submetidos a processamento industrial de purificação e formulação, resultando em produtos de alta qualidade, segurança e eficácia. Os soros do Butantan são frações de imunoglobulinas purificadas e específicas, com apresentação na forma líquida, em frascos-ampola de 5, 10 ou 20 mililitros (dependendo do tipo de soro) e que devem ser conservados em geladeira até o seu uso (BUTANTAN, 2018).

Sabe-se que a maioria dos efeitos sistêmicos do envenenamento são revertidos após a administração precoce da soroterapia em dose terapêutica adequada. No entanto, o tratamento dos efeitos locais continua sendo um grande desafio para a ciência, principalmente a hemorragia local, devido à composição enzimática do veneno. O soro antiofídico contra envenenamento por serpentes *Bothrops atrox* não é capaz de reverter a hemorragia local, mesmo quando utilizado em grandes quantidades (GUTIÉRREZ et al., 2018).

A administração do soro antiofídico pode prevenir a morte, mas não evita danos teciduais locais e incapacidades resultantes. A baixa inibição dos efeitos locais, pela demora no recebimento do soro ou pela baixa eficácia, é a principal causa de amputações, podendo levar a graves impactos negativos sociais, econômicos e de saúde, visto que a maioria das vítimas vive em áreas rurais (GUTIÉRREZ et al., 2013). O soro antiofídico, no entanto, apresenta algumas limitações como dificuldade de acesso para sua entrega em algumas regiões, risco de reações imunológicas (incluindo doença do soro), alto custo e eficácia limitada na melhora do dano tecidual local (DE SILVA, H. ASITA; RYAN; DE SILVA, 2016; SCESKE; RUITENBERG; BISSUMBHAR, 2015).

2.3. Processo inflamatório no envenenamento botrópico

A peçonha do gênero *Bothrops* é composta por moléculas em sua grande maioria de caráter imunogênico, isto é, capazes de induzirem uma resposta imune. Essa resposta é amplamente variada, dada a grande complexidade das toxinas, e é responsável pela estimulação de uma resposta inata e adaptativa, com o objetivo de neutralizar e eliminar as toxinas (LEON et al., 2011). O processo inflamatório é um mecanismo fisiológico de defesa da imunidade inata que visa uma resposta inespecífica à agentes estranhos. O processo caracteriza-se pelo direcionamento de leucócitos e moléculas do plasma para locais de infecção ou da lesão tecidual (ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, 2015).

A inflamação gerada pela ação das toxinas de serpentes é iniciada pela capacidade de leucócitos locais e circulantes em reconhecerem diretamente os componentes da peçonha, além de produtos da degradação de componentes teciduais. Essa estimulação é responsável pela produção de mediadores inflamatórios presentes no plasma (sistema complemento) e produzidos por células (citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos), culminando em um infiltrado inflamatório de células e resultando em um edema proeminente e a geração de dor, acompanhado de hemorragia e mionecrose (BURIN et al., 2018; LEON et al., 2011). Dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, estudos em modelos animais mostraram que a peçonha de *Bothrops atrox* apresenta efeitos locais mais intensos comparados a outras espécies (LARRÉCHÉ et al., 2021b; SILVA et al., 2004a)

Os eventos inflamatórios causados pela peçonha de *Bothrops atrox* e seus componentes isolados são caracterizados pela migração de neutrófilos, monócitos e

macrófagos e síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas (IL-12p70, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e INF- γ), quimiocinas (CXCL-8, CXCL-1 e CXCL-2), mediadores lipídicos (PGE2, LTB4 e CysLeucotrienos) e componentes do sistema complemento (C1q, C3a, C4a e C5a) (IBIAPINA et al., 2019a; MENALDO et al., 2017; MOREIRA et al., 2012).

A reação inflamatória exacerbada induzida pela peçonha de serpentes está diretamente associada à um caráter degenerativo, isto é, são responsáveis por um efeito adverso causado principalmente por neutrófilos e fagócitos pela produção de espécies reativas de oxigênio gerando lesões celulares (GUTIÉRREZ et al., 2018a). Associados aos efeitos nocivos das toxinas, esses efeitos deletérios da inflamação podem contribuir para complicações locais em pacientes como necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (ALVES et al., 2018; OLIVEIRA SS., 2017; SACHETT et al., 2017).

Ibiapina e colaboradores observaram que pacientes que sofreram acidente por serpentes da espécie *Bothrops atrox* tem um aumento plasmático dos mediadores inflamatórios CXCL-8, CCL-5, CXCL-9, CCL-2, CXCL10, IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10, além da diminuição de C3a, C4a e C5a. Esses pacientes também apresentaram valores aumentados de CXCL-8, CCL-2, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-5, além da elevação de C3a, C4a e C5a no exsudato das bolhas presentes no local da picada, quando comparados aos valores plasmáticos. Os autores ainda evidenciaram que níveis aumentados de IL-6, TNF- α e IL-1 β estavam associados à gravidade do envenenamento (IBIAPINA et al., 2019a).

Em um estudo posterior, também com vítimas de acidente por *Bothrops atrox*, foi observado que antes da administração da soroterapia, é possível ver um padrão de resposta semelhante entre os pacientes leves e graves, com um aumento de monócitos inflamatórios, linfócitos T, células NKT e B, juntamente com as quimiocinas CCL2, CXCL9, CCL5 e CXCL10, e as citocinas IL-1 e IL-10. Após a administração do soro, observou-se a participação dos monócitos patrulhadores e da IL-10 em pacientes leves. Por outro lado, em pacientes graves, a quimiocina CCL2 apresentou altas concentrações a nível local e sistêmico (**Figura 5**) (COELHO et al., 2023a).+

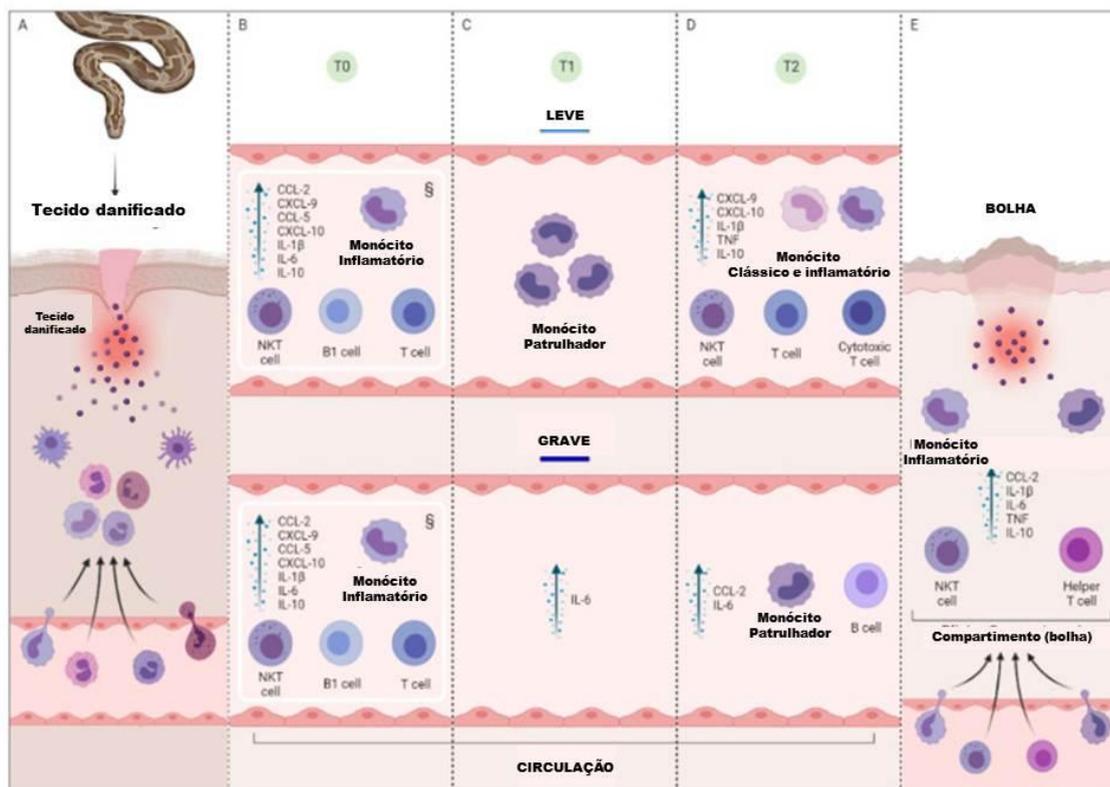


Figura 5. Resumo esquemático da resposta inflamatória local e sistêmica ao envenenamento por *B. atrox*. Fonte: (COELHO et al., 2023b)

A CCL2 é um dos principais quimioatraentes de monócitos e foi previamente descrito como um potencial biomarcador de complicações teciduais graves e complicações sistêmicas como insuficiência renal aguda. O processo inflamatório nesta complicação está relacionado a um efeito citotóxico direto de toxinas nos rins, ou pela produção de mediadores inflamatórios e consequente acúmulo leucocitário no local (ALVES et al., 2018; JÚNIOR et al., 2019; MEANS et al., 2017; RODRIGUES SGRIGNOLLI et al., 2011a).

A lesão renal aguda induzida por veneno é uma complicação frequente da picada de serpente botrópica, acarretando morbidade e mortalidade relevantes, tendo algumas quimiocinas como CCL-2 e CXCL-8, sendo alvos de estudo para biomarcadores, onde estudos revelam que estas quimiocinas podem desempenhar um papel biológico nessa complicação (NEVES et al., 2022a; RODRIGUES SGRIGNOLLI et al., 2011b; SOARES et al., 2022).

Além dos rins, alterações morfológicas e funcionais pulmonares com a presença de infiltrados leucocitários também foram evidenciadas (DA SILVA SOUZA et al., 2018; SILVEIRA et al., 2004). Nesse sentido, o processo inflamatório sistêmico induzido pela

peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* é responsável pela ativação do eixo inflamação/coagulação, sendo o processo inflamatório responsável pela expressão do fator tecidual, molécula causadora da ativação da via extrínseca da cascata de coagulação (CEZARETTE; SARTIM; SAMPAIO, 2020; OLIVEIRA SS et al., 2017; SARTIM et al., 2017).

2.4. Envenenamento

A peçonha da serpente consiste em mais de 20 substâncias diferentes, cujos efeitos ainda não foram completamente estudados. A fração proteica (enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas) compreende 90-95% de seu peso (RODRIGUES SGRIGNOLLI et al., 2011b). O veneno botrópico, apesar da variabilidade de sua composição entre espécies de diferentes regiões e dentro de uma mesma espécie, dependendo da idade da serpente, em geral, apresenta um mecanismo caracterizado por ação proteolítica, coagulante e hemorrágica, levando a manifestações características locais e sistêmicas (RODRIGUES SGRIGNOLLI et al., 2011b) (**Figura 6**).

A ação de proteases, hialuronidases, fosfolipases e mediadores inflamatórios leva à lesão tecidual local, com início precoce de dor, edema, sangramento e lesões bolhosas, que podem complicar com abscessos e necrose tecidual. Dentre as manifestações sistêmicas, os eventos hemorrágicos (epistaxe, gengivorragia, hematúria, hemoptise, sangramento do sistema nervoso central) estão associados a distúrbios da coagulação secundários à ativação do fator X e a uma ação semelhante à da trombina, levando ao consumo do fator de coagulação, como ocorre durante o processo de coagulação intravascular (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; SANTOS et al., 2014a).

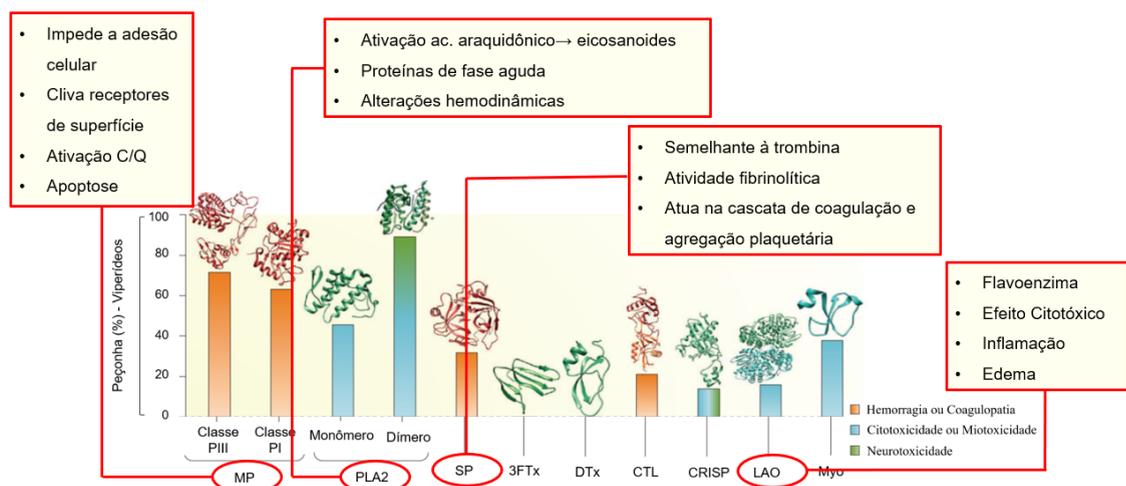


Figura 6: Níveis de toxinas no veneno de viperídeos e elapídeos. O gráfico destaca os intervalos de níveis de proteína (expressos como % do proteoma total do veneno) e a distribuição distinta das famílias de toxinas mais abundantes em diferentes venenos de espécies de cobras das famílias Viperidae (subfamílias Viperinae e Crotalinae) e Elapidae (subfamílias Elapinae e Hydrophiinae). As barras são codificadas por cores de acordo com as atividades biológicas mais relevantes da família de toxinas correspondente. Os gradientes de cor indicam a dependência da concentração do efeito biológico (mesma cor) ou efeitos diferentes (várias cores; ou seja, algumas toxinas podem exercer um efeito em doses baixas e outro efeito em doses altas). As estruturas cristalográficas ou de ressonância magnética nuclear de alguns membros de cada família de proteínas também são mostradas. Fonte: Adaptado de (GUTIÉRREZ et al., 2017)

2.5. Metaloproteínas associadas a veneno de serpente (SVMPs)

Os sintomas do envenenamento são decorrentes da ação individual ou sinérgica de diferentes toxinas que compõem o veneno de serpentes, como as Fosfolipases A2 (PLA 2s), Metaloproteínas (SVMPs), Serinoproteínas (SVSPs), L-aminoácido oxidases (LAAOs), entre outros (DOLEY; KINI, 2009; VONK et al., 2011). Metaloproteínas de veneno de serpentes são particularmente importantes para a adaptação destes animais aos diferentes ambientes. No veneno da maioria das espécies de serpentes víboras, as SVMPs são o componente mais abundante (CALVETE et al., 2009; SOUSA et al., 2013).

Os mecanismos evolutivos permitiram a diversidade estrutural e funcional de SVMPs em venenos de víboras, fazendo as SVMPs serem capazes de interagirem com diferentes substratos que controlam a hemostasia ou tecidos relevantes relacionados a funções fisiológicas essenciais em presas e predadores (BERNARDONI et al., 2014a; MOURA-DASILVA; BUTERA; TANJONI, 2007a).

O efeito mais evidente das SVMPs é a hemorragia, como resultado de uma ruptura combinada da integridade dos vasos capilares e comprometimento do sistema de coagulação sanguínea, resultando no consumo de fatores plasmáticos de coagulação (MOURA-DASILVA; BUTERA; TANJONI, 2007b). Os mecanismos de ação de distintas SVMPs envolvem diferentes alvos como, por exemplo, ativação do Fator X da coagulação, atividade fibrinogênio, entre outros (KAMIGUTI et al., 1994; SIIGUR et al., 2001). SVMPs interagindo com alvos hemostáticos distintos podem ser encontrados no mesmo *pool* de veneno de uma única espécie e, juntas, essas diferentes enzimas interferem em todo o sistema hemostático, subjogando presas geralmente por choque (BERNARDONI et al., 2014b; ESCALANTE et al., 2011a).

A diversidade estrutural de SVMPs é bem conhecida e três classes (PI, P-II e P-III), subdivididas em pelo menos 11 subclasses, foram descritas com base em sua estrutura de domínio (FOX; SERRANO, 2008a). O mecanismo envolvido na ativação das SVMPs (etapa da biossíntese envolvendo a remoção do pró-domínio) ainda é pouco estudado. Além disso, um eventual papel desempenhado pelo pró-domínio livre (ou seus fragmentos) na atividade enzimática após a secreção é elusivo. Além dos pré e pró-domínios, um domínio catalítico está presente nas classes PI, P-II e P-III no terminal C do pró-domínio e é o único domínio presente nas classes maduras PI SVMPs. As classes P-II e P-III SVMP diferem da primeira pela presença de domínios não catalíticos incluídos no C-terminal do domínio catalítico: o domínio desintegrina na classe P-II e domínios *desintegrin-like*, ricos em cisteína na classe P-III (FOX; SERRANO, 2008b).

A ativação das SVMPs é regulada pela hidrólise de seus pró-domínios, como ocorre com as MMPs e as proteínas desintegrinas e metaloproteinases (ADAM). Pró-domínios de SVMPs incluem um domínio conservado (PKM C GVT), também encontrado em precursores de ADAM e MMP (STÖCKER et al., 2008a). Neste domínio, um resíduo de cisteína livre é um fator chave para manter a latência da enzima por meio de um mecanismo de troca de cisteína. Este processo controla o estado de ativação das enzimas bloqueando o sítio catalítico (estado inativado) antes do processamento proteolítico do pró-domínio (estado ativo) (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKLER, 1993b; STÖCKER et al., 2008b).

As classes PI e PIII são amplamente expressas em venenos de víbora e bem caracterizadas por sua ação pró-inflamatória, que está frequentemente associada à sua atividade catalítica ou à ativação de células inflamatórias como macrófagos que liberam mediadores pró-inflamatórios (BARAMOVA et al., 1989a; COSTA et al., 2002; SILVA et al., 2004b). Devido à sua atividade catalítica, as SVMPs também podem ter ação sobre pró-metaloproteinases e pró-citocinas endógenas, como pró-MMPs e pró-TNF- α , que, após clivagem por SVMPs, são liberados em sua forma ativa, entanto, a atividade pró-inflamatória dessas enzimas não se deve apenas à presença da atividade catalítica, mas também à sua ação nos receptores celulares através dos domínios *desintegrin-like* e/ou ricos em cisteína, que podem induzir o recrutamento de leucócitos e a síntese de citocinas (CLISSA et al., 2001; MOURA-DA-SILVA, ANA MARIA et al., 1996).

Em modelos experimentais, o veneno de *B. atrox* apresenta atividade pró-inflamatória e é capaz de causar o aumento da permeabilidade vascular e importante influxo de leucócitos para o local da lesão, caracterizado pela presença de células polimorfonucleares e

mononucleares, bem como pela liberação do eicosanóides PGE 2 e LTB 4, e as citocinas TNF- α e IL-6 (MOREIRA et al., 2012). Um pool de proteinases de baixa massa molecular foi capaz de induzir a formação de edema e infiltrado leucocitário (RODRIGUES, 2004). Considerando as toxinas isoladas, a Batroxase, uma SVMP da classe PI isolada do veneno de *Bothrops atrox*, foi capaz de induzir a migração de leucócitos, bem como a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6 e PGE 2, envolvidos nesses eventos (MENALDO et al., 2017).

A capacidade das SVMPs de degradar diversos componentes da Matriz Extracelular (MEC) foi investigada em testes in vitro, onde os padrões de degradação dos componentes da MEC foram observados ao longo de vários intervalos de tempo em que foram incubados com essas enzimas. Esses estudos revelaram uma variedade de informações valiosas, indicando que as SVMPs têm uma ampla gama de atividades sobre substratos importantes da MEC, como laminina, nidogênio/entactina, colágeno tipo IV e fibronectina (BARAMOVA et al., 1989b, 1990; BJARNASON; HAMILTON; FOX, 1988; MACÊDO; FOX, 2014). Além disso, foi demonstrado que as SVMPs também são capazes de hidrolisar proteoglicanos in vitro, como o proteoglicano de sulfato de heparano e o agrecano (ESCALANTE et al., 2011b; TORTORELLA et al., 1998).

A miotoxina III (MT-III) e uma metaloproteinase hemorrágica tipo PI (BaP1), isoladas do veneno da serpente *Bitis asperas*, são capazes de induzir alterações significativas nos tecidos e causar aumentos notáveis nos níveis de interleucina (IL)-1beta, IL-6 e uma série de MMPs, com destaque para a gelatinase MMP-9 (RUCAVADO et al., 2002a).

Enquanto o domínio catalítico de ambas as SVMPs e MMPs compartilham semelhanças na estrutura que permite a atividade enzimática de clivagem de proteínas, os domínios não catalíticos que envolvem essas enzimas são diferentes. Esses domínios não catalíticos desempenham papéis cruciais na especificidade do substrato, na regulação da atividade enzimática e nas interações com outros componentes da matriz extracelular e tecidos circundantes (GOMIS-RÜTH, 2003; TAKEDA, 2016). Além das diferenças em seus domínios não catalíticos, seus pesos moleculares são muito diferentes, como as SVMPs da classe P-II e P-III possuem peso de 30-50 e 50-90 kDa respectivamente, enquanto a MMP-9 (Gelatinase-B, Colagenase Tipo IV) mais próximas estruturalmente e de origem genética possui 92KDa (CORDEIRO, 2015; CUI; HU; KHALIL, 2017).

2.6. Metaloproteinases de matriz e Inibidores (MMPs/TIMPs)

Um estudo investigou transcriptomas de 58 espécies de cobras avançadas e descobriu que uma enzima diferente, metaloproteinase de matriz, é na verdade o componente dominante do veneno em três tribos de cobras de presas traseiras. As MMPs provavelmente desempenham uma função semelhante às SVMPs no fenótipo proteolítico do veneno. Um novo subtipo de MMP altamente expresso, denominado svMMP, foi descoberto e se originou independentemente em pelo menos três ocasiões de um MMP-9 endógeno (MOURA-DASILVA et al., 2011)

Os svMMPs perderam domínios não catalíticos auxiliares presentes em seus ancestrais, seguindo um caminho evolutivo em direção a uma estrutura simplificada. Os resultados sugerem que características fenotípicas relevantes podem ser otimizadas por meio da seleção natural em genes não homólogos, produzindo componentes bioquímicos alternativos (BAYONA-SERRANO et al., 2020).

O primeiro membro da família das metaloproteinases, a colagenase, foi descoberto por Gross e em 1962 na cauda do girino em metamorfose, sendo a enzima crucial para a reabsorção normal do tecido conjuntivo da cauda que acompanha a maturação do sapo. Desde essa descoberta inicial, várias metaloendopeptidases de matriz foram descritas (GROSS; LAPIERE, 1962).

Cerca de 24 MMPs foram identificadas em humanos (**Tabela 01**), e apesar de sua alta homologia estrutural e sobreposição na especificidade do substrato, a noção comum é que não há redundância funcional entre eles, que por sua vez cada MMP influencia as propriedades da MEC de maneira diferente, gerando características químicas, biomecânicas e morfológicas distintas na MEC (LEVIN et al., 2017b). A MEC é uma rede proteica complexa, que dá suporte estrutural a várias células e atua como reservatório de uma variedade de proteínas, incluindo citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de sinalização, todas as quais medeiam o comportamento celular na saúde e na doença (LEVIN et al., 2017c).

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco pertencentes à superfamília das metzincinas e estão envolvidas na degradação e remodelação de componentes da MEC, como fibronectina, laminina, colágenos, elastina e glicoproteínas da membrana basal. As MMPs desempenham papéis importantes em processos fisiológicos, como cicatrização de feridas, angiogênese, desenvolvimento embrionário, plasticidade sináptica, polaridade celular, migração celular e proliferação (KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1999).

Tabela 01: Classificação das MMPs, classes, processo fisiológico e condição patológica

MMP	Classe	Condição patológica	Processo fisiológico	Referências
1	Colagenases intersticial	Resposta imune; cicatrização de feridas	Distúrbio fibrotico; citocinas inflamatórias, aterosclerose vascular; câncer	(AYUK; ABRAHAMSE; HOURELD, 2016a; CHUNG et al., 2004)
2	Gelatinase A	Angiogênese	Doenças crônicas venosas; citocinas inflamatórias; infecções virais; aterosclerose vascular; câncer	(BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005a; KOYAMA et al., 2000a; MOROZEVICH et al., 2009)
3	Estromelisin 1	Remodelação tecidual	Doenças crônicas venosas; distúrbio fibrotico; doenças hepáticas; osteoartrite; aterosclerose vascular; câncer	(EGUCHI et al., 2008; LI et al., 2014; SI-TAYEB et al., 2006)
7	Matrilisinas	Apoptose celular	Citocinas inflamatórias; aterosclerose vascular; câncer	(ACIOGLU et al., 2010; JIANG; XIE; LIU, 2016; PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004)
8	Colagenases de neutrofilos	Cicatrização de feridas	Citocinas inflamatórias; doenças pulmonares	(AYUK; ABRAHAMSE; HOURELD, 2016b; NAGASE; FUSHIMI, 2008a; NWOMEH et al., 1998)
9	Gelatinase B	Apoptose celular	Doenças crônicas venosas; doenças hepáticas; doenças pulmonares; osteoartrite; aterosclerose vascular; câncer	(AYUK; ABRAHAMSE; HOURELD, 2016c; BJÖRKLUND; KOIVUNEN, 2005b; DETWILLER et al., 2013; KOYAMA et al., 2000b; OLSZEWSKA et al., 2016)
10	Estromelisin 2	Apoptose celular; remodelação tecidual; cicatrização de feridas	Doenças crônicas venosas; infecções virais; câncer	(HIRAKAWA et al., 2013; ROHANI et al., 2015; SOKAI et al., 2015)
11	Estromelisin 3	Cicatrização de feridas	Doenças neurológicas; câncer	(LI et al., 2015; LIN et al., 2015; ZHANG et al., 2016)
12	Metaloelastase de macrófagos	Resposta imune	Doenças pulmonares; infecções virais; câncer	(CHELLUBOINA et al., 2015; KIM et al., 2013; LI et al., 2009; MARCHANT et al., 2014)
13	Colagenases	Resposta imune; remodelação tecidual	Citocinas inflamatórias; doenças pulmonares; osteoartrite; infecções virais; câncer	(DALVIE et al., 2008; KIM et al., 2013; MASHIMO et al., 2015; NAGASE; FUSHIMI, 2008b)
14	Tipo membrana 1 (MT-MMP)	Apoptose celular; resposta imune; remodelação tecidual	Aterosclerose vascular; câncer	(JOHNSON et al., 2014; OHUCHI et al., 1997; RADICHEV et al., 2010)
15	Tipo membrana 2 (MT-MMP)	Apoptose celular	Câncer	(SUN; LI, 2004; ZHANG et al., 2009)
16	Tipo membrana 3	Angiogênese	Câncer+	(HADCHOUEL et al., 2008;

	(MT-MMP)			LIU et al., 2012; TATTI et al., 2015)
17	Tipo membrana4 (MT-MMP)	Resposta imune	Câncer	(PUENTE et al., 1996; SOHAIL et al., 2008)
18	Colagenases	Crescimento axonal		(NAGASE; FUSHIMI, 2008c; TOMLINSON et al., 2008; TONGE et al., 2013)
19	Estromelisina-4	Cicatrização de feridas; angiogênese	Doenças hepáticas; doenças pulmonares; doenças neurológicas; osteoartrite	(BRAUER et al., 2011; JARA et al., 2015; JIROUSKOVA et al., 2012; SADOWSKI et al., 2005)
20	Esmaltenisina humana	Formação do esmalte dentário		(BARRON et al., 2001; STRACKE et al., 2000)
21	Xenopus-MMP	Embriogenese	Cancer	(AHOKAS et al., 2003; SUOMELA et al., 2009; ZHAO et al., 2014)
22	MMP de galinha	Remodelação tecidual	Cancer	(GURURAJAN et al., 1998)
23	Arranjo de cisteína (CA) - MMP	Apoptose celular, reprodução/menstruação	Cancer	(HEGEDÜS et al., 2008; VELASCO et al., 1999)
24	Tipo membrana 5 (MT-MMP)	Resposta imune	Doenças neurológicas; cancer	(FOLGUERAS et al., 2009; KOMORI et al., 2004; LLANO et al., 1999; PORLAN et al., 2014)
25	Tipo membrana 6 (MT-MMP)	Apoptose celular; resposta imune	Doenças pulmonares; cancer;	(FORTIN et al., 2010; VELASCO et al., 2000)
26	Matrisilina	Remodelação tecidual	Doenças crônicas venosas; cancer	(GUTSCHALK et al., 2013; URÍA; LÓPEZ-OTÍN, 2000)
27	Estromelisina-5	Embriogenese; reprodução/menstruação	Cancer	(BAR-OR, 2003; COMINELLI et al., 2014; KÖHRMANN et al., 2009)
28	Epilisina	Embriogenese; remodelação tecidual	Asteroclerose vascular; cancer	(LOHI et al., 2001; MA et al., 2013; PADMAVATI et al., 2013)

O pró-domínio contém um resíduo de aminoácido de cisteína tiol que interage com o zinco ligado por três histidinas no domínio de ligação do zinco, e essa interação mantém o estado inativo das MMPs (ProMMPs). A clivagem proteolítica do pró-domínio ou modificação do grupo cisteína tiol ativa as MMPs. Além disso, espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ativar MMPs através da oxidação de grupos cisteína tiol do pró-domínio durante a inflamação (FINNISON et al., 2013a; VELASCO-LOYDEN; ARRIBAS; LÓPEZ-CASILLAS, 2004a).

Além de degradar as proteínas da MEC, as MMPs processam muitos fatores biológicos proeminentes e moléculas não pertencentes à MEC, influenciando diretamente a homeostase tecidual. Como enzimas proteolíticas, as MMPs são rigidamente reguladas em vários níveis, desde a expressão gênica até a ativação de zimogênio e inibição endógena (GAFFNEY et al., 2015).

A disponibilidade de TGF- β também pode ser afetada por MMPs indiretamente, Uma vez que o TGF- β ativo participa de muitos processos biológicos importantes, como a embriogênese e a cicatrização de feridas, sua desregulação está correlacionada com numerosos estados patológicos (FINNISON et al., 2013b; VELASCO-LOYDEN; ARRIBAS; LÓPEZ-CASILLAS, 2004b).

Os níveis séricos de MMP-1 possuem uma correlação positiva com os níveis séricos de IL2, que é uma citocina TH1, enquanto uma correlação negativa é observada entre os níveis de MMP1 e IL4 e IL 10, que são citocinas TH2, sugerindo que, na homeostase fisiológica normal, a MMP-1 aumenta na resposta imune mediada por células e que sua atividade diminui durante a resposta humoral (AYUK; ABRAHAMSE; HOURELD, 2016a; CHUNG et al., 2004)

O equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias controla a expressão e secreção de MMP-2/-9, sendo demonstrado em alguns estudos que essas MMPs possuem um papel importante na neuroinflamação que também é a potencializada devido a expressão de mediadores inflamatórios (HANNOCKS et al., 2019a). Citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-6) e metaloproteinasas de matriz (MMP2 e MMP9) são reguladas positivamente através da ativação de STAT3 (LIANG et al., 2018; OH et al., 2008).

Tanto a MMP-1 quanto a MMP-7 facilitam a migração epitelial em diferentes tecidos, reduzindo a afinidade da integrina $\alpha 2$ e $\beta 1$, mas controlam a atividade desse receptor de matriz por mecanismos fundamentalmente diferentes, porém a MMP-1 influencia a sinalização de fora para dentro alterando o ligante, a MMP-7 afeta a sinalização de dentro para fora controlando a ativação de integrinas, auxiliando assim a migração celular (HANNOCKS et al., 2019b).

Foi sugerido que as MMP-9 são o produto predominantemente codificado nos transcriptomas de vários gêneros de serpentes, indicando que as MMPs são componentes importantes desses venenos e podem exercer um papel significativo na atividade proteolítica e hemorrágica dessas serpentes (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2015). No entanto, um

grande estudo com diversas espécies de serpentes demonstrou a não identificação de MMP-9 na composição do veneno de 3 espécies do gênero *Bothrops* (*jararaca*, *cotiara* e *fonsecai*) (GOMIS-R`TH et al., 1997).

As MMPs provavelmente participam da resposta inflamatória, remodelando a matriz extracelular e promovendo eventos associados ao influxo de células inflamatórias, liberação de fatores de crescimento incorporados na matriz e início da regeneração tecidual. (RUCAVADO et al., 2002a).

É interessante notar que a seMMP-9 é uma MMP-9 clássica de vertebrados, enquanto a svMMP-A é uma semMMP-9 sem o domínio hemopexina e a svMMP-B tem um arranjo mais compacto, semelhante ao observado na MMP-7 (Matrilysin). No entanto, o mais importante é que a semMMP-9 é geralmente expressa em níveis baixos nas glândulas de veneno e outros tecidos de muitas espécies de serpentes em toda a filogenia, enquanto as svMMPs são altamente expressas nas glândulas de veneno de três gêneros dentro de Xenodontinae (*Tachymenini*, *Xenodontini* e *Conophiini*). As svMMPs não são detectadas, ou são detectadas apenas como um constituinte menor, em outros tecidos além da glândula de veneno dos mesmos indivíduos positivos para svMMP. Além disso, elas não são detectadas nas glândulas de veneno de espécies fora desses três grupos, mesmo naquelas com alto teor de seMMP-9 (BAYONA-SERRANO et al., 2020).

Inibidores teciduais de metaloproteinases desempenham papéis importantes na regulação das atividades de MMPs ou matrixinas (WOESSNER, 1991). Geralmente, as MMPs ativadas são reguladas por quatro TIMPs que se ligam ao domínio catalítico de maneira não covalente 1:1. Que eventuais desequilíbrios entre MMPs e TIMPs podem levar à inflamação e ativa uma resposta imune. O domínio catalítico compreende a ligação ao zinco com três resíduos de histidina e um sítio ativo com um resíduo de ácido glutâmico. O domínio catalítico determina a especificidade do substrato das MMPs. O domínio HPX está envolvido na ligação do substrato e modula a atividade das MMPs. TIMP-1 e TIMP-2 se ligam ao domínio de diversas MMPs (BODE, 2003b)(DENARDO; RUFFELL, 2019).

Esses inibidores interagem com as MMPs, principalmente por meio de seus terminais N, para inibir sua atividade proteolítica, isso limita a degradação excessiva da matriz extracelular e mantém o equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas na matriz, o que é fundamental para a homeostase dos tecidos, no entanto, sobre condições patológicas, como inflamação crônica ou câncer, pode ocorrer um desequilíbrio nessa regulação (MOORE; CROCKER, 2012).

O aumento na expressão de MMPs leva a um aumento na degradação da matriz, e isso pode resultar na depleção de TIMPs disponíveis para inibir as MMPs (MOORE; CROCKER, 2012). Além disso, os terminais C dos TIMPs também desempenham um papel importante, interagindo com os receptores de superfície celular. Essa interação pode iniciar cascatas de sinalização intracelular que afetam o comportamento celular. A perda da sinalização mediada por TIMP devido à depleção de TIMPs disponíveis pode ter implicações significativas na patologia da doença. Isso pode contribuir para a progressão de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e distúrbios inflamatórios, uma vez que a degradação descontrolada da matriz extracelular pode promover a invasão de células, metástase, remodelação vascular anormal e inflamação crônica (GOMIS-R"TH et al., 1997).

Apesar das diferenças funcionais e estruturais entre as MMPs, cada um dos quatro TIMPs conhecidos (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) possui a capacidade de inibir várias MMPs, embora haja algumas preferências e especificidades na inibição (**Figura 7**).

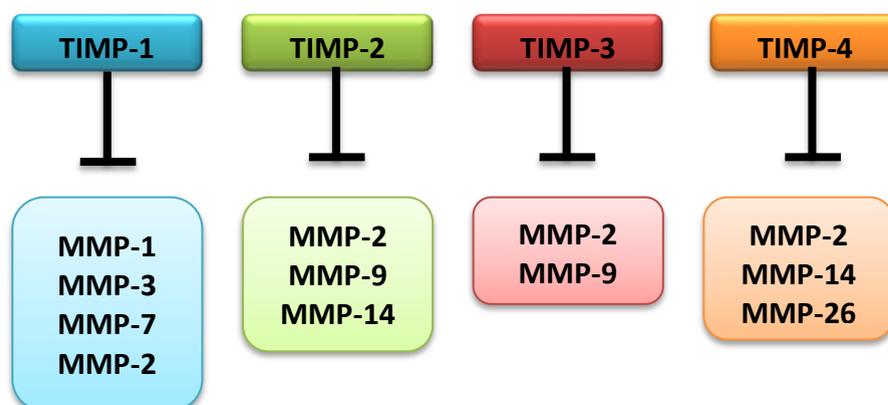


Figura 7: Resumo gráfico das preferências e especificidades na inibição. Fonte: Adaptado de (GOMIS-R"TH et al., 1997).

Existe uma interação bastante fraca entre o TIMP-1 e a maioria dos MT-MMPs, os TIMPs não parecem diferenciar muito entre as várias MMPs (BUTLER et al., 1999). Além disso, o TIMP-1 é capaz de se ligar à pró-gelatinase B, os TIMPs 2 e 4 têm alguma afinidade pela pró-gelatinase A, enquanto o TIMP-3 se liga a ambos (BUTLER et al., 1997; KINOSHITA et al., 1996; STRONGIN et al., 1995). O complexo entre os MT1-MMPs e o TIMP-2 atua como um "receptor" ligado à superfície celular para a ativação da pró-gelatinase A *in vivo*, além de apresentar a proMMP-2 ligada de modo que uma molécula MT1-MMP não

inibida adjacente clive o primeiro domínio PRO da MMP-2, seguido pela clivagem de ativação final por outra molécula de MMP-2 (DERYUGINA et al., 2001). A MMP-14 é um ativador particularmente eficiente, servindo presumivelmente como um exosítio específico da proMMP-2, enquanto a MMP-15 parece atuar em uma via alternativa independente do TIMP-2 (DERYUGINA et al., 2001).

2.7 Moléculas imunológicas solúveis (citocinas)

O corpo humano é protegido de agentes infecciosos, de danos ocasionados por eles e de outras substâncias nocivas como toxinas, por uma variedade de células e moléculas que juntas constituem o sistema imune. A resposta imune consiste em uma reação a componentes de microrganismos, bem como macromoléculas (proteínas e polissacarídeos), além de pequenas substâncias químicas, que são reconhecidas como elementos estranhos. No processo de defesa, há a participação primária de células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas, células *natural killer* (NK), proteínas sanguíneas, incluindo o sistema complemento e outros mediadores inflamatórios, como quimiocinas, citocinas e mediadores lipídicos (**Tabela2**) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MURPHY et al., 2010).

Em relação as citocinas, são moléculas derivadas de células fagocíticas mononucleares e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) são particularmente eficazes na promoção do infiltrado celular e reparos teciduais, característicos da inflamação. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é produzido por células mononucleares, mas também por neutrófilos, linfócitos ativados, células NK, células endoteliais e mastócitos. O indutor mais potente de produção do TNF pelos monócitos é o lipopolissacarídeos (LPS), atuando através do *toll-like receptor 2* (TLR2) e TLR4. Esta citocina interage com as células endoteliais para induzir a expressão de moléculas de superfície, conhecidas como molécula de adesão intracelular (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina, permitindo a migração de granulócitos para locais inflamatórios. O TNF é um potente ativador de neutrófilos, mediando adesão, quimiotaxia e degranulação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; BORISH; STEINKE, 2003a)

A citocina IL-6 é produzida por linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e células da medula óssea. Sob a influência da IL-6, os linfócitos B se diferenciam em células plasmáticas maduras e secretam imunoglobulinas. Além disso, ela medeia a ativação, crescimento e diferenciação de células T, induzindo a pirexia e a produção

de proteínas da fase aguda. É considerada o indutor mais importante na síntese de proteínas de fase aguda por hepatócitos, podendo também atuar regulando a resposta imune, inibindo a síntese de IL-1 e TNF (BORISH; STEINKE, 2003a; MURPHY et al., 2010).

Quanto à citocina IL-2, sua produção é derivada da interação de fatores como a estimulação de linfócitos T por antígenos e de sinais acessórios produzidos pelas citocinas IL-1 e IL-6. Além de seu papel como fator de crescimento de células T, a IL-2 também está envolvida na ativação de células NK, células B, células T citotóxicas e macrófagos (BORISH; STEINKE, 2003a).

A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina produzida por Linfócitos T e por mastócitos, capaz de estimular nos Linfócitos B a troca de isótipo para IgE, nos Linfócitos T estimula a diferenciação e produção de linfócitos Th2. Também é capaz de ativar a via alternativa de macrófagos e inibir a via clássica quando em conjunto com a citocina IL-13, além de estimular a proliferação de mastócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A IL-10 desempenha um papel chave na regulação imunológica. Produzida principalmente por macrófagos e células T, especialmente células T regulatórias, a IL-10 inibe a produção de IFN- γ e IL-12, além da expressão de moléculas coestimulatórias, modulando a intensidade e a duração de respostas imunes a processos inflamatórios, prevenindo respostas exacerbadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; MURPHY et al., 2010).

Tabela 02. Citocinas e suas funções biológicas

<i>Citocina</i>	<i>Fonte principal</i>	<i>Alvo / Efeito biológico</i>
<i>IL-2</i>	Células T	Cel. T: Proliferação e diferenciação de celular efetoras e de memória, promove o desenvolvimento de células T, regulação, sobrevivência e função Cel. NK: Proliferação e ativação Cel. B: Proliferação + síntese de Ac
<i>IL-4</i>	Cel. TCD4, mastócitos	Cel B: Isótipo mudando para IgE Cel. T: Diferenciação Th2, proliferação Macrófagos: Ativação alternativa e inibição da ativação clássica mediada por IFN- γ Mastócitos: Proliferação
<i>IL-6</i>	Macrófagos, células endoteliais,	Fígado: Síntese de proteínas de fase aguda

	célula T	Cél. B: Proliferação de células produtoras de Ac
IL-10	Monócitos	Macrófagos e células dendríticas: Inibição da expressão de IL-2, coestimuladores e MHC de classe II.
TNF	Macrófagos, células NK, cel.T	Cel. Endoteliais: Ativação (inflamação, coagulação) Neutrófilo: Ativação Fígado: Síntese de proteínas de fase aguda

Fonte: Adaptado de Borish *et al*, 2003(BORISH; STEINKE, 2003b)

O envenenamento botrópico pode induzir a elevação nas concentrações de TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IFN- γ e NO, e podem contribuir para a liberação de citocinas, com alterações típicas de inflamação. Foi demonstrado em modelo experimental que a batroxragina (BATXH - metaloproteinase isolada do veneno botrópico) é capaz de induzir a formação de edema, recrutamento de leucócitos e leva uma maior liberação de citocinas, principalmente TNF- α (DE ALMEIDA *et al.*, 2020; MITRMOONPITAK *et al.*, 2013; PETRICEVICH *et al.*, 2000b).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

- Avaliar o impacto das metaloproteinases de matriz, inibidores teciduais de metaloproteinases e citocinas inflamatórias em pacientes vítimas de acidente ofídico botrópico com diferentes classificações clínicas.

4.2. Objetivos específicos

- Realizar a quantificação de metaloproteinases (MMP1, MMP-2, MMP-3 MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-12 e MMP-13), de TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4), no plasma de pacientes vítimas de acidente ofídico botrópico durante a sua evolução clínica, antes e após a soroterapia;

- Avaliar os níveis plasmáticos de citocinas (IL-1b, IL-6, TNF, IL-10, IL-2 e IL-4) em pacientes vítimas de acidente ofídico botrópico durante a sua evolução clínica, antes e após a soroterapia;
- Correlacionar à gravidade do acidente e o impacto na resposta inflamatória com os níveis plasmáticos de metaloproteinases (MMP1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-10), de TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e citocinas (IL-1b, IL-6, TNF, IL-10, 112 e LI-4) do plasma de pacientes vítimas de acidente ofídico botrópico.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. População de Estudo e Elegibilidade

Tratou-se de um estudo observacional, longitudinal e prospectivo, realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). A população de estudo foi obtida por demanda espontânea composta por indivíduos que sofreram acidente ofídico por serpente do gênero *Bothrops* e procuraram atendimento médico na FMT-HVD no período de janeiro de 2021 a janeiro de 2023.

De acordo com a classificação clínica do acidente ofídico pode ser categorizada como leve, moderado ou grave, o que é importante para orientar as medidas terapêuticas a serem adotadas (SANTOS et al., 2014b). A classificação dos pacientes foi realizada de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde, conforme descrito na tabela 02, estratificando de acordo com as manifestações clínicas, o que é importante para orientar as medidas terapêuticas a serem adotadas (SANTOS et al., 2014b).

Com base nas manifestações clínicas e visando orientar a terapêutica a ser empregada, os acidentes botrópicos são classificados em Leve, Moderado e Grave, estando descrito a seguir a classificação do quadro clínico. Porém nosso estudo conta apenas com pacientes selecionados para a nossa população de estudo (Leve e Grave).

a) Leve: forma mais comum do envenenamento, caracterizada por dor e edema local pouco intenso ou ausente, manifestações hemorrágicas discretas ou ausentes, com ou sem alteração do Tempo de Coagulação.

b) Moderado: caracterizado por dor e edema evidente que ultrapassa o segmento anatômico picado, acompanhados ou não de alterações hemorrágicas locais ou sistêmicas como gengivorragia, epistaxe e hermatúria.

c) Grave: caracterizado por edema local endurecido intenso e extenso, podendo atingir todo o membro picado, geralmente acompanhado de dor intensa e, eventualmente com presença de bolhas. Em decorrência do edema, podem aparecer sinais de isquemia local devido à compressão dos feixes vículo-nervosos. E efeitos sistêmico como distúrbios de coagulação, insuficiência renal aguda e choque hipovolêmico (TAVARES-NETO, 2014).

Tabela 03. Classificação quanto à gravidade e soroterapia recomendada

Manifestações e tratamento	Classificação		
	Leve	Moderado	Grave
Locais			
• Dor		Evidentes	Intensas
• Edema	Ausentes ou discretas		
• Bolhas			
Sistêmicas			
• Hemorragia grave	Ausentes	Ausentes	Presentes
• Anúria			
• Choque			
Tempo de coagulação (TC)	Normal ou alterado	Normal ou alterado	Normal ou alterado
Soroterapia (ampolas)	2 a 4	4 a 8	12
Via de administração		intravenosa	

Acidente botrópico. TC: normal (10 min), prolongado (10 a 30 min) e incoagulável (50 min) (MINISTERIO DA SAÚDE, 2001).

Além dos pacientes, também foram coletadas 20 amostras do grupo controle em parceria com a Fundação HEMOAM, amostras estas de candidatos a doação de sangue, saudáveis, de ambos os gêneros, maiores de 18 anos e que não estejam fazendo uso de medicação que possa interferir no processo de coagulação (como anti-coagulantes, agentes antitrombóticos e etc), agentes anti-inflamatórios ou imunossupressores, compondo o grupo controle (**Figura 8**).

O presente estudo incluiu um grupo controle composto por indivíduos saudáveis, sem histórico prévio de acidentes ofídicos, que concordaram em participar da pesquisa mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A coleta de dados do grupo controle, realizada no decorrer do ano de 2022, envolveu a aplicação de questionários estruturados.

Esses instrumentos foram elaborados com o objetivo de obter informações sociodemográficas detalhadas dos participantes, bem como investigar a presença de possíveis comorbidades ou eventos adversos prévios que pudessem influenciar os resultados da

pesquisa, mesmo que não relatados espontaneamente pelos indivíduos. A aplicação dos questionários permitiu, portanto, a obtenção de um perfil abrangente do grupo controle, essencial para a análise comparativa com o grupo que sofreu envenenamento.

É imperativo destacar que todos os procedimentos delineados neste estudo, desde a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) até a inclusão dos pacientes, processamento e armazenamento das amostras biológicas, são meticulosamente executados por uma equipe de alunos vinculados ao *Biorrepositório Snakebite*. Este biorrepositório, sob a coordenação dos pesquisadores Dr. Marco Sartim, Dra. Jacqueline Sachett e Dr. Wuelton Monteiro, tem como missão principal o recrutamento de pacientes vítimas de acidentes ofídicos e outros acidentes causados por animais peçonhentos, tais como aranhas, escorpiões e abelhas.

O Biorrepositório é responsável por todo o fluxo de trabalho, desde o processamento inicial das amostras até o armazenamento criterioso, visando facilitar a distribuição desses materiais biológicos para os diversos projetos de pesquisa em andamento. A equipe de alunos, peça fundamental neste processo, opera em regime de escala, garantindo a cobertura de todas as etapas de coleta e processamento das amostras em um amplo horário de funcionamento, das 8h às 22h, todos os dias da semana.

A atuação contínua e dedicada dos alunos do Biorrepositório Snakebite assegura a qualidade e a integridade das amostras biológicas, elementos cruciais para o avanço das pesquisas no campo da saúde e para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos.

4.1.1. Critério de Inclusão

Foram incluídos no estudo, pacientes vítimas de acidente ofídico botrópico maiores de 18 anos, que consentiram em participar do projeto assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), e que procuraram atendimento da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), sem a realização da soroterapia previamente em outra unidade.

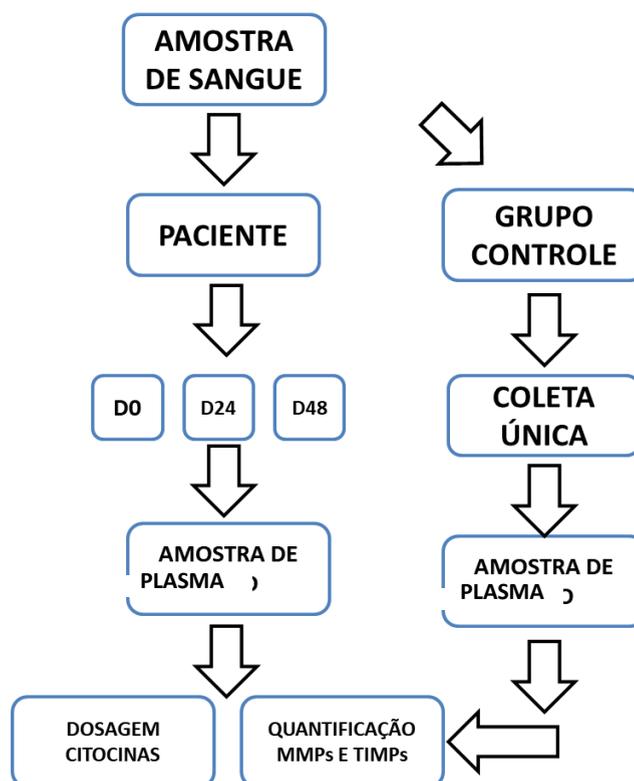


Figura 8: Fluxograma da estratégia de trabalho. Representação esquemática da estratégia de trabalho com os experimentos realizados.

Foram considerados elegíveis para inclusão no estudo um total de 30 pacientes, os quais foram alocados em dois grupos distintos com base na evolução clínica: o Grupo Leve (LEVE) e o Grupo Grave (SEVERE). Após a admissão, e mediante a anuência dos participantes, formalizada pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), a equipe de pesquisa procedeu ao acompanhamento dos pacientes em três momentos específicos: antes da soroterapia (T0), 24 horas após a administração da soroterapia (T1) e 48 horas após a soroterapia (T2). A dosagem de citocinas, bem como a quantificação de Metaloproteinases e Inibidores de Metaloproteinases, foi realizada por meio da técnica de Luminex, em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas). A coleta de amostras dos participantes do Grupo Controle (HD), contou com 20 participantes, efetuada em um único momento, em parceria com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (Fundação HEMOAM).

4.1.2. Critério de não Inclusão

Não foram incluídas gestantes, indivíduos com doença inflamatória informada ou em uso de medicação anti-inflamatória e imunossupressora. Também não foram incluídos

pacientes que realizaram soroterapia em outra unidade, ou vítimas de acidente ofídico não botrópico, além daqueles que apresentaram volume insuficiente de amostra para a realização dos testes.

4.2. Coleta de Dados e Amostras

Os participantes foram acompanhados em 3 momentos: antes da administração da soroterapia (T0), 24 horas (T1) e 48 horas após (T2), onde foram coletados aproximadamente 4ml de sangue periférico por punção venosa, em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer® EDTA). O sobrenadante das amostras foi armazenado em ultrafreezer -80°C, até a realização dos ensaios. Os dados clínico-laboratoriais dos pacientes foram obtidos nos prontuários físicos e eletrônicos (sistema iDoctor) da FMT-HVD, visando maior confiabilidade dos dados adquiridos.

4.3. Obtenção das Amostras de plasma

As amostras de plasma dos indivíduos que sofreram acidente ofídico por serpente do gênero *Bothrops* foi obtida a partir da coleta 4 mL de sangue periférico, coletados em tubos com sistema a vácuo, contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras de plasma foram obtidas após centrifugação dos tubos de coleta de sangue por 10 minutos a 3.000 rpm, em temperatura ambiente. O plasma foi separado, aliquotado em tubos tipo eppendorf e armazenados a -80°C para a realização dosagem de citocinas, MMPS e TIMPs.

4.4. Armazenamento

Todas as amostras de pacientes que sofreram acidente ofídicos foram armazenadas em ultrafreezer -80°C na FMT-HVD, juntamente com todas as amostras do biorepositório. Enquanto as amostras do grupo controle foram coletadas e armazenadas em ultrafreezer -80°C no laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da Fundação HEMOAM.

4.5. Quantificação de MMP's, TIMP's e Citocinas

Foi utilizada a Tecnologia Luminex xMAP, com os Kits Bio-Plex Pro™ Human MMP and TIMP Assays e o kit Bio-Plex Pro Human Cytokines em parceria com o Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas). Esta técnica envolve um

processo com demarcação de microesferas de látex com dois fluoróforos. A diluição do plasma dos pacientes que sofreram acidente ofídico por serpente do gênero *Bothrops* e indivíduos controle utilizada foi de 1:20 e 1:50 respectivamente, para dosagem de metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-10), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1, TIMP-2, TIMP3 e TIMP-4), além de citocinas (IL-1b, IL-6, TNF- α , IL-10, 112 e IL-4) respectivamente (**Figura 9**).

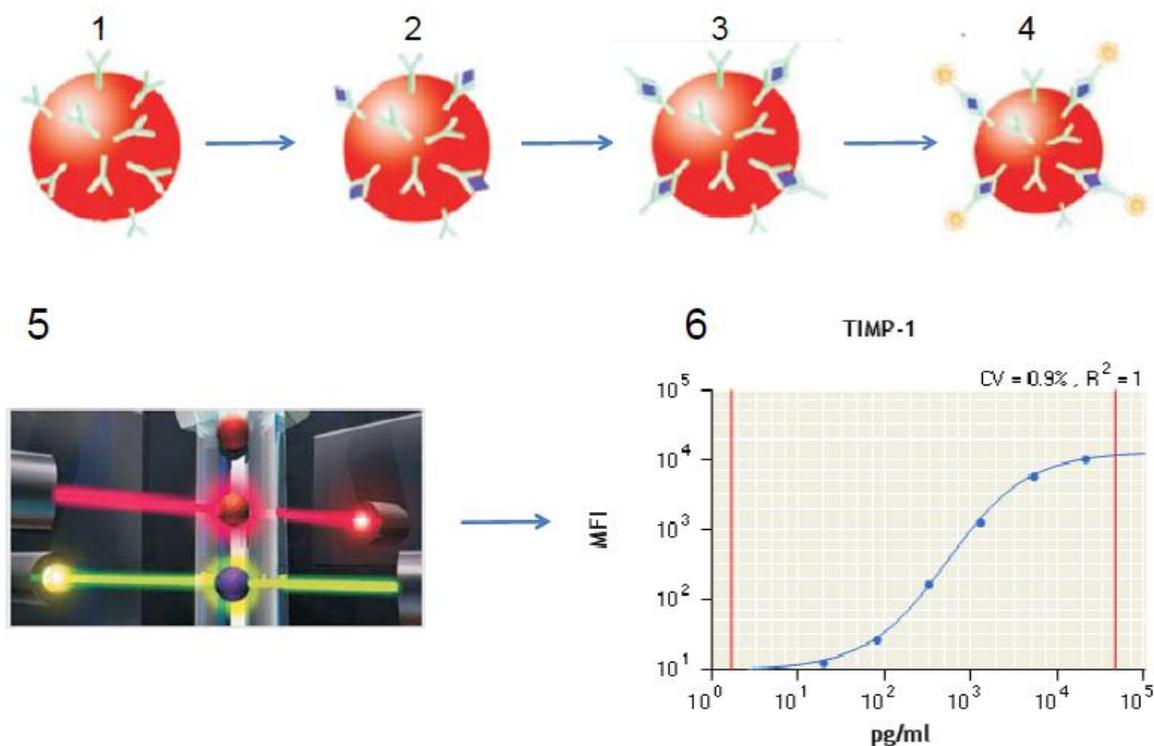


Figura 9: Representação da metodologia utilizando o sistema Luminex.

O ensaio se fundamenta na metodologia “sanduíche” convencional de dois-sítios e são realizados em placas de 96 poços, onde já se encontra o mix de microesferas acoplado a anticorpos de captura específicos para as citocinas escolhidas para o estudo, além das metaloproteinases MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 e inibidores de metaloproteinase TIMP-1, TIMP-2, TIMP3 e TIMP-4. Os padrões e as amostras são adicionados para que ocorra a ligação do anticorpo de captura ao analito específico.

A próxima etapa é a adição do anticorpo de detecção biotilado que se liga ao analito específico. O resultado é amplificado através de incubação com estreptavidinafluoresceína (SAPE). O SAPE se liga ao anticorpo biotilado e é responsável pela revelação do ensaio, por meio da emissão de sinal fluorescente.

As microesferas são adquiridas no equipamento Luminex através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. No equipamento, um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal de cada microesfera. Ao passarem pelo fluxo celular Luminex, cada microesfera é identificada e o sinal SAPE associado a elas será quantificado. Os valores dos padrões permitem a construção de uma curva padrão, a partir da qual é feita a quantificação das amostras. O resultado é obtido em pg/mL (**Figura 9**).

4.6. Aspectos Éticos

O presente estudo faz parte de um projeto maior que tem como título “Avaliação do perfil clínico-inflamatório dos acidentes botrópico”, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com o seguinte número de CAAE #39345520.9.0000.0005e número de parecer #4.478.678.

4.7. Análises Estatísticas

Os dados clínico-laboratoriais dos pacientes forão apresentados em formas de tabelas e gráficos, elaboradas com o programa Microsoft Excel. Para elaboração das análises descritivas e estatísticas convencionais foi utilizado o software *GraphPad Prism* (v.8.0.2). Inicialmente foram realizados testes para verificar normalidade dos dados através do teste de *Shapiro-Wilk*. As comparações de valores entre dois grupos de dados forão realizadas com T student ou Mann-Whitney, enquanto para as comparações das variáveis com três ou mais grupos, foi realizada por meio dos testes *ANOVA One-way* ou *Kruskal-Wallis*, seguido de pós-teste de *Tukey* ou *Dunn's*, para múltiplas comparações entre os grupos. Os níveis de significância estatística definidos em ambos os casos foram de $p < 0,05$. As correlações positivas e negativas forão consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A Tabela 04 apresenta um resumo das características sociodemográficas e clínicas dos indivíduos incluídos até o momento no estudo. Observou-se que o gênero masculino foi o mais afetado, representando 92% dos casos de acidentes. Adicionalmente, os grupos analisados apresentaram médias de idade semelhantes, porém no grupo de pacientes, está na faixa entre os indivíduos com idade apta a trabalho.

No que se refere às regiões anatômicas mais acometidas, constatou-se no grupo de pacientes, que os membros inferiores foram os mais afetados em ambos os grupos, correspondendo a 88% dos casos. Essa predominância sugere uma vulnerabilidade específica dessa região do corpo durante os acidentes. Em relação à gravidade dos acidentes, os pacientes foram selecionados a partir de dois grupos: aqueles que apresentaram um quadro leve (50%) e aqueles que manifestaram um quadro grave (50%).

Tabela 4 – Caracterização sociodemográfica da população de estudo

VARIÁVEIS	Pacientes N = 30	Grupo Controle N=20
Gênero, n (%)		
Masculino	28 (92)	16 (94)
Feminino	2 (8)	4 (6)
Idade anos, mediana (IQR)	39 (18-69)	31 [23–63]
Procedência acidente, n (%)		
Manaus	15 (50)	-
Rural	15 (50)	-
Classificação do acidente, n (%)		
Leve	15 (50)	-
Grave	15 (50)	-
Local da Picada, n (%)		
Membros superiores	4 (12)	-
Membros inferiores	26 (88)	-

Avaliamos e comparamos os valores de hemograma em pacientes que sofreram acidente ofídico por *B. atrox*, sendo estes estratificados nos grupos Leve e Grave, e uma análise intragrupo dos dados hematológicos foi realizada antes e após a administração da soroterapia, conforme descrito na Tabela 5. De forma geral, a análise intragrupo mostrou diminuição significativa nos

valores das séries vermelha e branca e plaquetas às 48 h após soroterapia (T2) em comparação com os valores antes da soroterapia (T0) e 24 horas após soroterapia (T1) nos grupos Leve e Grave.

Tabela 5. Dados de hemograma de pacientes com acidente botrópico estratificados em grupo Leve e Grave, antes e após soroterapia, em conjunto com o grupo controle (HD).

Parâmetros	Leve (n=15)			Grave (n=15)			HD (n=20)
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0
Hemácias	5,2 (4,8 - 5,3)	4,6 (4,4 - 4,9) ^a	3,2 (2,5 - 4,5) _{a,b}	5,2 (4,9 - 5,4)	4,8 (4,6 - 5,1) ^a	3,7 (0,7 - 4,7) _{a,b}	5,0 (4,6 - 5,4)
Hemoglobina	15,0 (14,3 - 15,4)	13,6 (12,1 - 14,2) ^a	8,8 (6,8 - 13,0) _{a,b}	15,2 (14,5 - 15,6)	13,9 (13,2 - 15,4) ^a	11,4 (1,9 - 13,5) _{a,b}	14,9 (13,6 - 16,0)
Plaquetas	221 (167 - 259) _§	191 (182 - 232)	117 (97 - 171) _{a,b,#}	185 (149 - 231) _§	202 (151 - 243)	61 (31 - 193) _{a,b}	243 (211 - 282)
Leucócitos Totais	10,9 (8,4 - 14,6) _§	11,6 (8,7 - 15,0)	4,8 (3,8 - 7,6) _{a,b}	13,3 (9,7 - 15,6) _§	12,3 (9,1 - 15,0)	8,3 (1,3 - 11,5) _{a,b}	6,2 (5,2 - 12,0)
Neutrófilos	77,0 (67,7 - 88,9) _§	67,8 (62,9 - 77,8) ^a	47,4 (36,8 - 62,3) _{a,b}	80,3 (69,0 - 89,0) _§	71,0 (64,4 - 82,9)	60,2 (10,0 - 77,7) _{a,b}	56,1 (50,0 - 61,5)
Linfócitos	13,0 (5,0 - 21,3) _§	16,9 (13,3 - 25,5) ^a	13,6 (11,3 - 20,5) _#	12,1 (5,3 - 20,3) _§	15,5 (10,0 - 22,0) ^a	8,5 (1,3 - 10,7) _b	29,7 (26,4 - 34,6)
Monócitos	4,0 (3,5 - 5,7) _§	5,6 (4,5 - 6,7) ^a	4,1 (3,3 - 5,7) _b	4,1 (3,1 - 5,1) _§	5,4 (4,0 - 6,6)	4,4 (0,7 - 5,3) ^b	6,0 (5,1 - 6,6)
Eosinófilos	2,0 (0,9 - 4,7) _§	1,8 (1,0 - 2,6)	2,8 (2,2 - 3,2) _b	1,8 (0,4 - 5,8) _§	2,3 (1,2 - 3,5)	1,8 (1,0 - 4,9)	3,3 (2,3 - 6,1)
Basófilos	0,4 (0,2 - 0,8)	0,3 (0,2 - 0,4) ^a	0,3 (0,2 - 0,3) _#	0,3 (0,2 - 0,4) _§	0,3 (0,2 - 0,4)	0,1 (0,0 - 0,3) _{a,b}	0,5 (0,3 - 0,9)

T0: antes da soroterapia; T1: 24 horas após soroterapia; T2: 48 horas após soroterapia; HD: doador saudável; IQR, intervalo interquartil. Valor de referência: Glóbulos vermelhos: 4,5 - 6,0 x10⁶/μL; Hemoglobina: 12 - 18 g/dL; Plaquetas: 130 - 400 x10³/μL; Leucócitos Totais: 5,2 - 12 x10³/μL; Neutrófilos: 1,9 - 8,0 x10³/μL; Linfócitos: 0,9 - 5,2 x10³/μL; Monócitos: 0,16 - 1 x10³/μL; Eosinófilos: 0,1 - 5,0 x10³/μL; Basófilos: 0 - 2,0 x10³/μL. Diferenças significativas em p < 0,05 para análise intragrupo estão representadas em negrito com as seguintes letras sobscritas “a” e “b”, referentes às comparações com T0 e T1, respectivamente. Diferenças significativas em p<0,05 para análise intergrupos estão representadas em negrito com os seguintes símbolos sobscritos: # e §, referentes às comparações com o grupo Grave e Doador Saudável, respectivamente.

Após o acidente botrópico (T0), observou-se um aumento significativo nas concentrações de MMP-1, MMP-7 e MMP-10 nos pacientes em comparação ao grupo controle (HD). Esse aumento reflete uma resposta inicial de degradação e remodelamento tecidual desencadeada pelo envenenamento, com MMP-1, MMP-7 e MMP-10 desempenhando um papel crucial na degradação da matriz extracelular, facilitando assim o processo inflamatório (**Figura 10**).

Em contrapartida, a metaloproteínase MMP-9 apresentou uma diminuição em relação ao grupo controle, com níveis reduzidos que se mantiveram consistentes tanto em pacientes com quadro clínico leve (Mild) quanto em pacientes com quadro grave (Severe). Essas alterações nas metaloproteínases, caracterizadas pela elevação de MMP-1, MMP-7 e MMP-10, acompanhada pela redução de MMP-9, delineiam um perfil enzimático inicial específico observado nos pacientes vítimas de acidentes botrópicos.

Adicionalmente, foi observado um aumento nas concentrações dos TIMPs, incluindo TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, em comparação ao grupo controle. Essas alterações sugerem uma resposta adaptativa que visa regular a atividade das metaloproteínases, refletindo a

complexidade da resposta inflamatória e do remodelamento tecidual após o evento de envenenamento

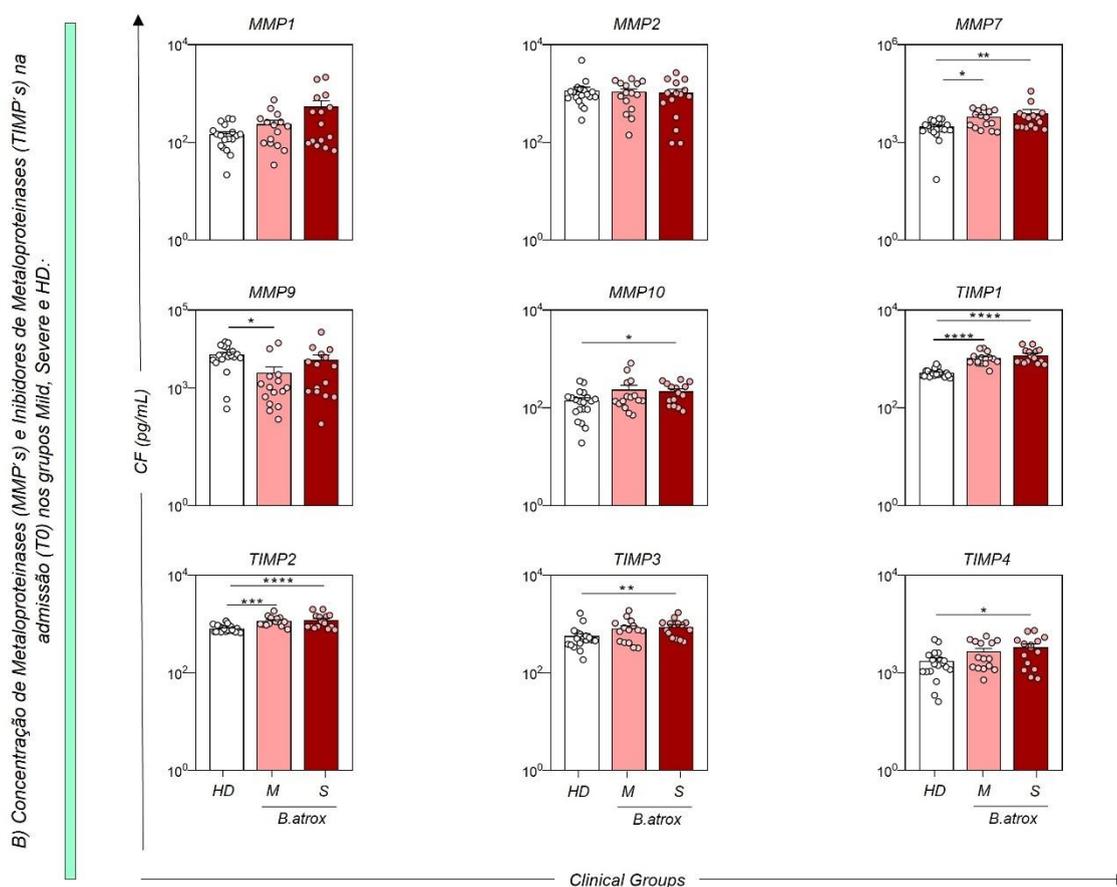


Figura 10: Concentração de MMPs e TIMPs (TO), nos grupos Leve, Grave e HD. * $p < 0,01$; ** $p < 0,008$; *** $p < 0,0001$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão em MFI (intensidade média de fluorescência), e a análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Ao TO, observou-se um aumento significativo nas concentrações das citocinas IL-6 e IL-10 nos pacientes vítimas de acidente ofídico, em comparação ao grupo controle, com elevações particularmente acentuadas nos casos classificados como Grave (**Figura 11**). Este aumento pode indicar uma resposta inflamatória inicial, com diferenças estatisticamente significativas para a IL-6, além de uma ativação de mecanismos anti-inflamatórios, refletida pelo aumento da IL-10, que tem como objetivo mitigar a intensidade da inflamação desde o início do quadro clínico.

Em contrapartida, as citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IL-4 apresentaram uma diminuição de concentração em seus níveis em relação ao grupo controle. Essa menor concentração foi observada de forma semelhante tanto em pacientes com quadro clínico leve quanto naqueles com condições graves, sugerindo uma resposta inflamatória diferenciada que pode ter implicações na patogênese e na evolução clínica dos pacientes.

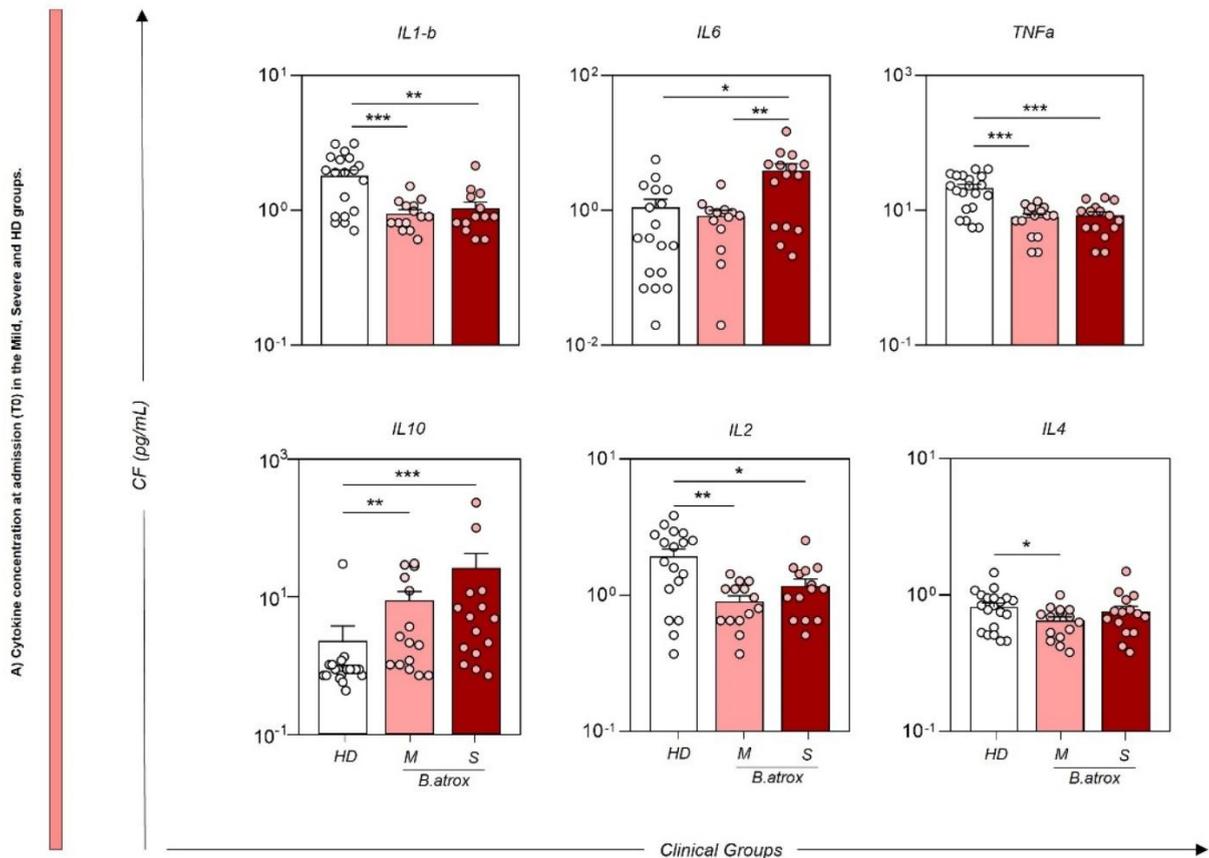


Figura 11: Concentração de moléculas imunológicas solúveis na admissão do paciente (T0), nos grupos Leve, Grave e HD. * $p < 0,01$; ** $p < 0,008$; *** $p < 0,0001$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão em MFI (intensidade média de fluorescência), e a análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Na análise dos dados durante o acompanhamento dos pacientes (**Figura 12**), observou-se um aumento significativo nas metaloproteinases de matriz MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-10 em todos os pacientes, especialmente ao T0, independentemente da gravidade do quadro clínico, evidenciando uma resposta inicial robusta de remodelação tecidual. Em contraste, a MMP-1 apresentou um aumento significativo antes da soroterapia apenas em pacientes com quadro clínico grave (Severe), sugerindo que sua ativação está associada à gravidade do envenenamento. Com a progressão do tempo, os níveis de todas as MMP's demonstraram uma diminuição gradual, indicando uma redução na atividade de remodelação da matriz extracelular à medida que o organismo busca a homeostase.

Os dados obtidos no momento da admissão dos pacientes (T0) também revelaram um aumento nos níveis de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e, em menor grau, TIMP-4 em todos os pacientes, independentemente da classificação clínica. Essa elevação reflete uma resposta inicial para regular a atividade das MMPs e protegendo o tecido. Com o passar do tempo, observou-se uma elevação gradual nos níveis de todos os TIMPs, refletindo um ajuste no controle da remodelação da matriz extracelular à medida que a inflamação se estabiliza.

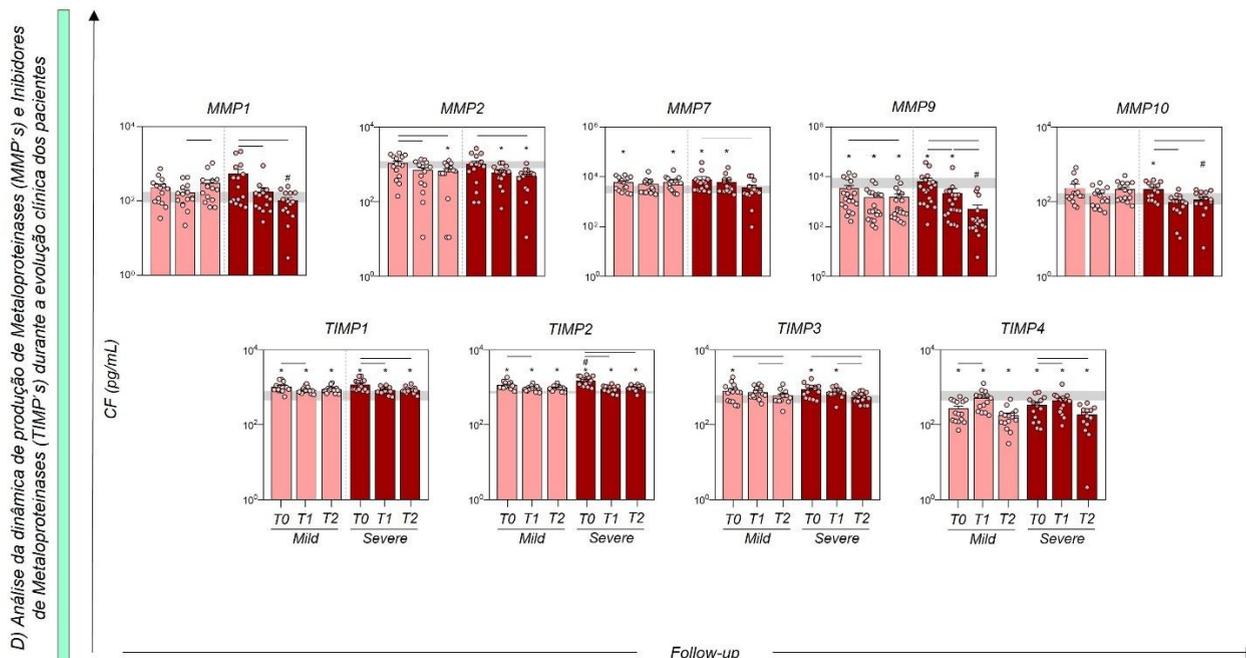


Figura 12: Análise da dinâmica de metaloproteínas e inibidores da metaloproteínase durante a evolução clínica dos pacientes. Ao fundo, o intervalo interquartil [25–75] da concentração de citocinas no grupo de doadores saudáveis em HD é usado como linha de base. A diferença estatística entre os grupos Leve e Grave sem agudo foi considerada quando $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão em MFI (intensidade média de fluorescência), e a análise estatística foi realizada usando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns.

Em seguida, analisamos a produção de moléculas imunológicas solúveis na admissão (T0) e em intervalos de 24 e 48 horas após a administração do antiveneno (T1 e T2, respectivamente). Essa abordagem permitiu a comparação temporal entre os grupos e a avaliação do comportamento das citocinas durante a internação hospitalar dos pacientes. No momento inicial (T0), após a ocorrência do acidente botrópico, observou-se um aumento significativo nas concentrações das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2, IL-10 e IL-4 em comparação aos tempos subsequentes (T1 e T2). Esse pico inicial de citocinas reflete uma resposta inflamatória imediata e intensa do organismo ao envenenamento, caracterizada pela mobilização de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e de citocinas reguladoras e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4), além da IL-2, que está associada à ativação das células imunes.

É importante ressaltar que essa elevação nas citocinas ao T0 ocorreu independentemente da gravidade do quadro clínico, sendo observada tanto em pacientes com manifestações leves (Mild) quanto em aqueles com manifestações graves (Severe). Com o decorrer do tempo, os níveis dessas citocinas diminuíram progressivamente, indicando uma redução na atividade inflamatória e uma tendência à estabilização do perfil imunológico. Notavelmente, a IL-10 apresentou uma diminuição mais acentuada entre os tempos T0 e T1. Em contrapartida, o TNF-alfa não demonstrou variações significativas em relação à gravidade do quadro clínico e ao decorrer dos tempos avaliados.

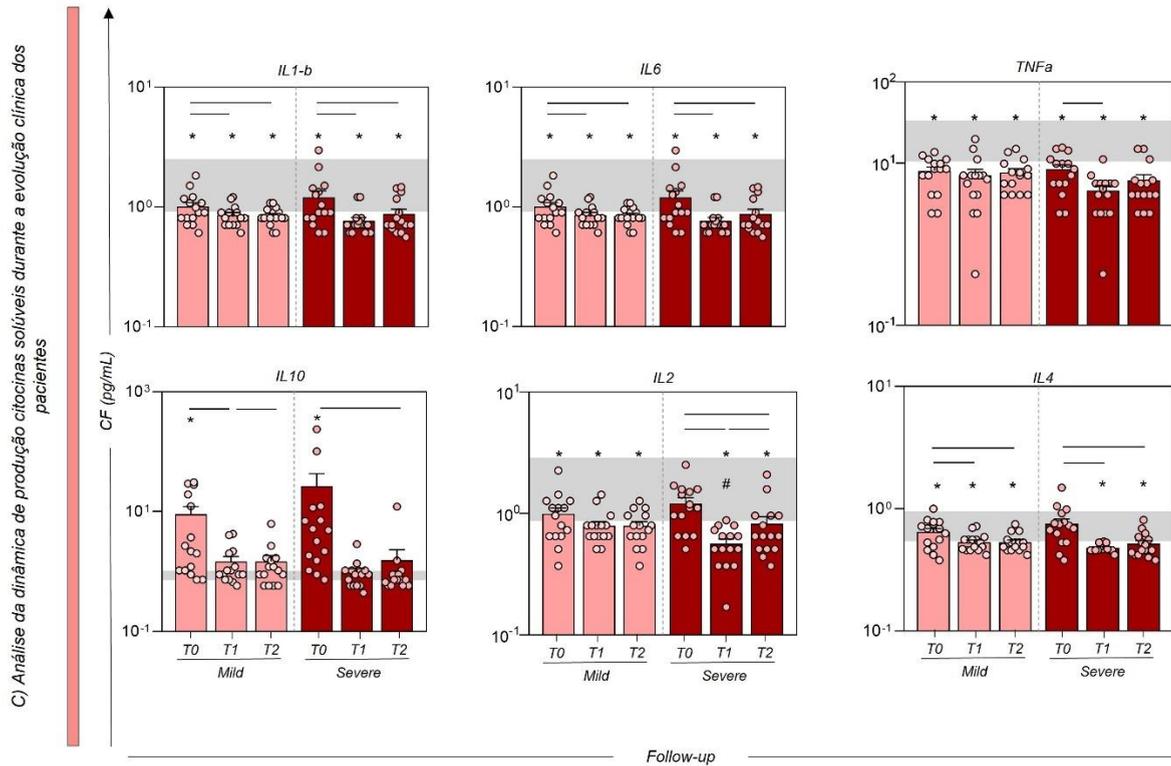


Figura 13: Análise da dinâmica da produção de moléculas imunológicas solúveis durante a evolução clínica dos pacientes. Ao fundo, o intervalo interquartil [25–75] da concentração de citocinas no grupo de doadores saudáveis em HD é usado como linha de base. A diferença estatística entre os grupos Leve e Grave sem agudo foi considerada quando $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão em MFI (intensidade média de fluorescência), e a análise estatística foi realizada usando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunns.

Através de uma análise não convencional é demonstrada a identificação de potenciais biomarcadores imunológicos em pacientes do Grupo Grave (SEVERE) durante o período de acompanhamento (**Figura 14**). A análise de alto produtores demonstrou um perfil com alta produção das moléculas IL-10, MMP-1, MMP-7, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 no grupo de pacientes que sofreu acidente ofídico botrópico. A análise do diagrama de Venn foi realizada para identificar os atributos comuns e seletivos entre cada subgrupo. Análise das intersecções demonstrou que, ao T0, há uma produção seletiva de MMP-10 no grupo GRAVE, destacando seu comportamento como potencial biomarcador de gravidade nestes pacientes.

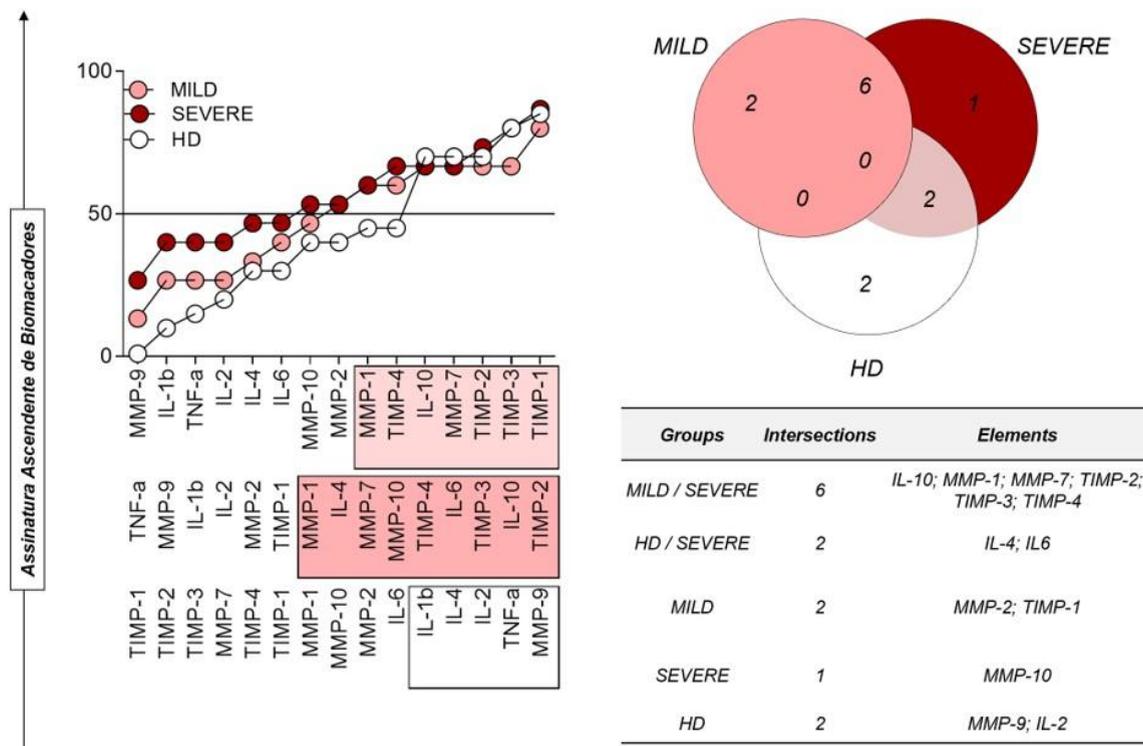


Figura 14: Análise não convencional para assinatura de principais produtores em pacientes GRAVE antes da soroterapia. Realizado com base na mediana global de cada uma das citocinas, MMPs e TIMPs dosados de cada concentração, utilizando dados de todos os pacientes (HD, MILD e GRAVE). Foi utilizada como ponto de corte a mediana global de cada molécula, expressa em MFI, classificando assim o indivíduo como “baixo” ou “alto” produtor das moléculas dosadas. A significância estatística foi considerada em todos os casos com $p < 0,05$. No diagrama de Venn é possível identificar quais moléculas se mostram potenciais biomarcadores, pois estão presentes em altas concentrações apenas no grupo GRAVE.

Através da análise de redes de interação biológicas entre as moléculas analisadas (citocinas, MMPs e TIMPs), foi observado que pacientes que sofreram acidente ofídico (LEVE e GRAVE) possuem interações diferentes do perfil de moléculas imunológicas exibido pelo grupo HD (**Figura 15**). No momento inicial (T0), o grupo LEVE revela uma rede de correlações significativamente robusta. Citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , desempenham um papel crucial ao induzir a produção MMPs, resultando em muitas interações 24 horas após a administração da soroterapia.

Estas citocinas ativam vias de sinalização intracelulares que promovem a expressão de MMPs, as quais por sua vez, facilitam a modulação da matriz extracelular. Esse processo é de relevância fundamental em diversas condições fisiopatológicas, como processos inflamatórios e lesões teciduais. As citocinas, as MMPs e os TIMPs estão intrinsecamente interligados no contexto da regulação da remodelação da matriz extracelular, além de

exercerem um papel central na orquestração da resposta inflamatória. Em contrapartida, o grupo GRAVE apresenta um número inicial superior de correlações antes da intervenção terapêutica. No entanto, essa rede de interações não se mantém ao longo do tempo, com uma diminuição substancial das correlações no T1 e T2, dando uma resposta imunológica desregulada que pode contribuir para o agravamento do quadro clínico de envenenamento.

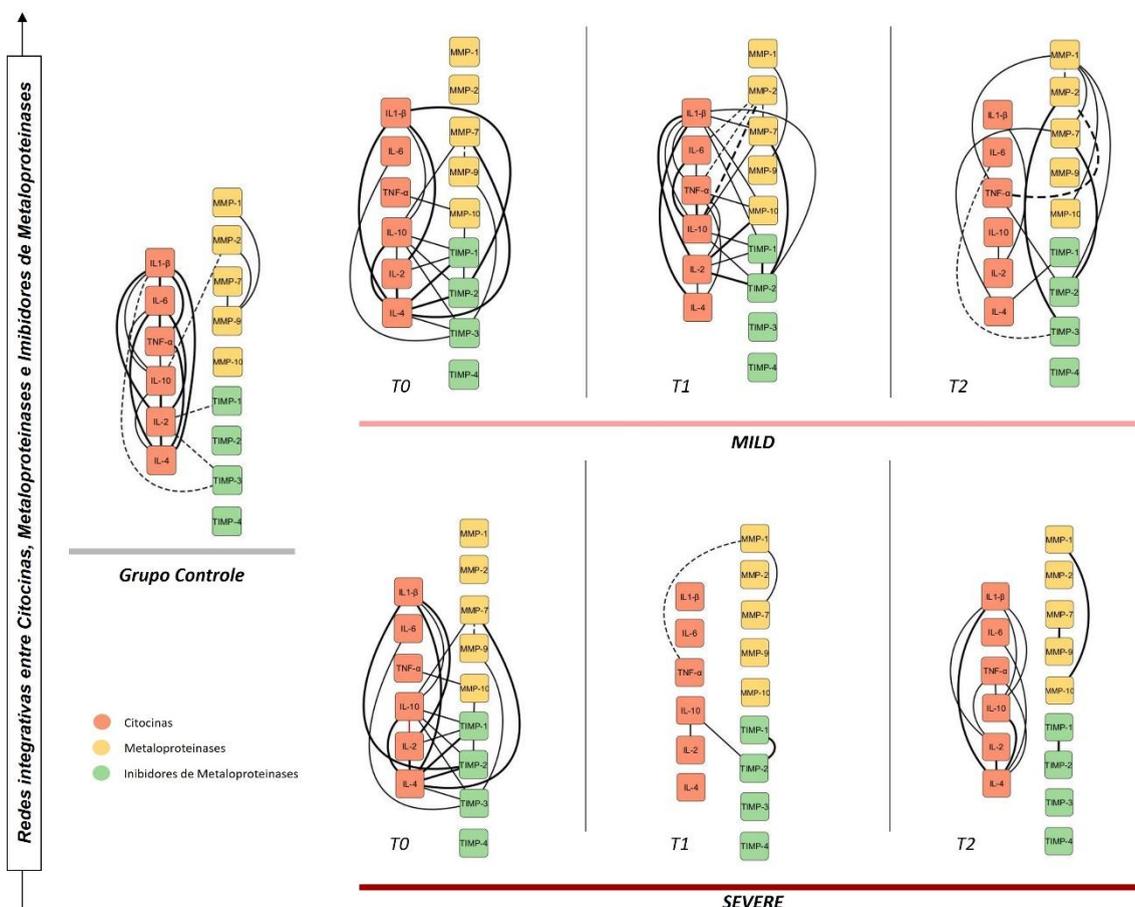


Figure 15. Rede entre moléculas imunológicas mostra interações entre os grupos durante o acompanhamento do estudo. Cada grupo de cor é usado para identificar as citocinas (laranja claro), metaloproteínas (amarelo) e inibidores de metaloproteínas (verde). As linhas tracejadas entre as moléculas indicam uma correlação negativa enquanto as linhas contínuas indicam correlação positiva. A espessura destas indica a força de correlação. O índice de correlação (r) foi utilizado para categorizar a força de correlação em fraca ($r \leq 0.35$), moderada ($r \geq 0.36$ para $r \leq 0.67$), ou forte ($r \geq 0.68$).

6. DISCUSSÃO

O envenenamento botrópico, causado pela picada de serpentes do gênero *Bothrops*, é caracterizado por manifestações locais e sistêmicas, incluindo edema, necrose, hemorragia e distúrbios da coagulação (LARRÉCHÉ et al., 2021a). Entre os componentes do veneno, as metaloproteinases desempenham um papel central na degradação da matriz extracelular, contribuindo para a destruição tecidual e a disfunção vascular. As metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais podem estar envolvidos nesse processo, regulando a degradação proteica e influenciando a extensão do dano tecidual (FERRAZ et al., 2015). O desequilíbrio entre MMPs e TIMPs pode potencializar a ação proteolítica das enzimas do veneno, agravando a lesão local e sistêmica, o que torna esses elementos alvos potenciais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento do envenenamento botrópico.

Alterações nos parâmetros hematológicos foram observadas nos pacientes, com a diminuição de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas (Tabela 5). Clinicamente, a redução desses parâmetros está correlacionada com a gravidade do acidente, e a trombocitopenia na admissão está ligada ao intenso quadro hemorrágico local e sistêmico, característico de vítimas de acidentes ofídicos graves (DE BRITO SOUSA et al., 2019; KAPLAN et al., 2015; TANS; ROSING, 2002)

A leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda está associada à extensão do dano tecidual nos pacientes. Corroborando com os dados observados no hemograma dos pacientes de nosso estudo, que mostrou aumento na contagem de neutrófilos. Também foi observada diminuição significativa de neutrófilos em T2 em ambos os grupos estudados (**Tabela 5**). Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a atingir o tecido lesado, além de atuarem diretamente nas complicações infecciosas após a picada, induzindo a síntese de mediadores inflamatórios. Eles também estão envolvidos na imunidade adaptativa, regulando as funções das células T (LIEW; KUBES, 2019; WANDERLEY et al., 2014)

Estudos experimentais mostraram uma rápida inversão na proporção de neutrófilos para linfócitos, mostrando que o veneno botrópico promove alterações imunológicas precoces e a proporção de linfócitos tem sido associada como preditor de gravidade nestes pacientes (KÖSE et al., 2021; LARRÉCHÉ et al., 2021c; RUCAVADO et al., 2016; ZULIANI; SOARES; GUTIÉRREZ, 2020). Da mesma forma, observou-se que os pacientes após

acidente botrópico apresentaram linfopenia em comparação ao grupo controle, acentuadamente no grupo Grave, reforçando sua correlação com a gravidade.

Pacientes que sofreram acidente ofídico devido ao envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops*, desenvolvem um quadro clínico inflamatório, que pode variar de uma lesão tecidual local, hemorragias locais e efeitos sistêmicos (LARRÉCHÉ et al., 2021a). Os efeitos nocivos das toxinas geram um processo inflamatório exacerbado, podendo causar efeitos nocivos da inflamação que contribuem para complicações locais em pacientes como necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (ALVES et al., 2018; OLIVEIRA SS, ALVES EC, SANTOS AS, PEREIRA JPT, SARRAFF LKS, NASCIMENTO EF, DE-BRITO-SOUSA JD, SAMPAIO VS, LACERDA MVG, SACHETT JAG, SANOMARTINS IS, 2017; SACHETT, Jacqueline A. G. et al., 2017). E durante esse processo inflamatório exacerbado, a produção e liberação de citocinas são acentuadas, podendo agravar o quadro clínico do paciente (GUTIÉRREZ et al., 2018a).

Os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) e os DAMPs (padrões moleculares associados a danos) também podem incluir padrões moleculares associados a venenos, denominados VAMPs (venom-associated molecular patterns). Essa classificação ajuda a explicar por que o veneno das serpentes pode desencadear uma resposta tão intensa. Ao interagir com PRRs (receptores de reconhecimento padrão), como TLRs e NLRs, os VAMPs ativam vias inflamatórias que levam à liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (ZOCCAL et al., 2014).

A liberação de mediadores inflamatórios no processo inicial do envenenamento pode gerar uma resposta inflamatória aguda, ativando células do sistema imune inato, como por exemplo, os macrófagos, que por sua vez regulam a produção de muitas citocinas (ZOCCAL et al., 2018). Os macrófagos desempenham um papel crucial no reconhecimento dos VAMPs, ativando mecanismos de sinalização que levam à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esses mediadores, como TNF- α e IL-6, são produzidos tanto de forma direta quanto indireta e têm funções importantes no processo inflamatório, contribuindo para a amplificação da resposta imunológica (PUCCA et al., 2015). Esses estudos corroboram com nossos resultados, pois os níveis da citocina IL-6 foram significativamente elevados, quando comparado aos achados do grupo controle.

Petricевич e colaboradores demonstraram que as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 estão associadas a casos clínicos graves, fazendo com que os pacientes desenvolvam características clínicas moderadas e graves (PETRICEVICH et al., 2000a). No entanto, nossos achados não

obtiveram níveis elevados de citocinas IL-1 β , TNF- α em comparação ao grupo controle, assim como as citocinas IL-2 e IL-4, no entanto os níveis da citocina reguladora IL-10 surpreendeu com seus níveis elevados em relação ao grupo controle, inclusive o grupo clínico grave obteve níveis mais expressivos desta citocina.

Um estudo realizado na Amazônia brasileira com pacientes envenenados por *Bothrops atrox* revelou que, antes da administração da terapia antiofídica, os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e imunomoduladoras, como IL-6, IL-10 e outras citocinas, foram significativamente elevados (TEIXEIRA et al., 2009). O aumento das citocinas IL-6 e IL-10 em comparação ao grupo controle, aliado à diminuição dos níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-2 e IL-4, sugere um perfil imunológico específico diante da condição comprovada. Além disso, o aumento de IL-10 reflete uma tentativa do organismo de regular e atenuar a resposta inflamatória, visto que a IL-10 é conhecida como uma citocina anti-inflamatória capaz de suprimir a atividade de outras citocinas pró-inflamatórias e limitar danos teciduais, como já demonstrados em outros estudos (IBIAPINA et al., 2019b; NEVES et al., 2022b; TEIXEIRA et al., 2009).

Por outro lado, a redução de IL-1 β e TNF- α sugere que o estímulo inflamatório inicial é menor ou bem controlado, uma vez que essas citocinas são mediadoras-chave da resposta inflamatória primária e são frequentemente elevadas em condições de inflamação aguda ou grave, e principalmente produção de prostanoídes e hiperalgesia inflamatória (FERRAZ et al., 2015). A redução dos níveis de IL-2 e IL-4, que estão implicadas na ativação e regulação dos linfócitos T e na resposta imunológica adaptativa, respectivamente, indica uma diminuição na ativação dessa via da resposta imune. No entanto, sugere que o organismo esteja priorizando uma modulação que previne a hiperatividade imunológica. Os padrões de variação nas concentrações das citocinas observadas indicam um ajuste imunológico voltado para a manutenção da homeostase inflamatória, estabelecendo um equilíbrio entre a resposta inflamatória e as ações reguladoras, a fim de limitar potenciais danos teciduais. Notavelmente, as citocinas IL-6 e IL-10 emergem como mediadores preditivos significativos.

Além das citocinas, as MMPs também são mediadores cruciais para danos e desenvolvimento de inflamação dos tecidos em uma variedade de patologias, e podem desempenhar um papel importante nas alterações do dano local causado pelo veneno (FERRAZ et al., 2015). Além disso, essas citocinas induzem a expressão de MMPs e provavelmente contribuem para a síntese de MMPs observada em alguns modelos

experimentais, uma vez que os incrementos iniciais de citocinas se correlacionaram com a expressão de MMPs (SARÉN; WELGUS; KOVANEN, 1996; TIDBALL, 1995).

Também conhecida como colagenase-1, a MMP-1 degrada o colágeno tipo I, um dos principais componentes da matriz extracelular, e em acidentes botrópicos, o aumento da MMP-1 pode estar associado à necrose e ao reparo tecidual exacerbado, especialmente em pacientes com quadros graves (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; PILCHER et al., 1997). Por sua vez, a MMP-7 conhecida como matrilisina, é mais envolvida na manipulação de componentes da membrana basal, e em acidentes botrópicos, seu aumento pode estar relacionado à destruição da integridade estrutural dos tecidos, amplificação do processo inflamatório. E mesmo o aumento da MMP-7 sendo necessário para o fechamento normal da ferida, sua superexpressão pode atrasar a cicatrização (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; HAYDEN; FORSYTH; KESHAVARZIAN, 2011). Também chamada de estromelisina-2, a MMP-10 está ligada à modulação da resposta inflamatória, ao ativar outras MMPs e facilitar a manipulação tecidual, regulada positivamente em queratinócitos da ponta migratória em feridas com envolvimento dérmico, refletindo um mecanismo de progressão do dano tecidual causado pelo veneno (ÅGREN et al., 2001; KRAMPERT et al., 2004).

Nossos achados evidenciam entre o aumento das metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-7 e MMP-10) e que os acidentes botrópicos podem estar relacionados à uma resposta inflamatória e aos danos teciduais induzidos pelo veneno, visto que o veneno de serpentes do gênero *Bothrops* contém componentes como proteases, fosfolipases e outras moléculas tóxicas que degradam a matriz extracelular e ativam vias inflamatórias (DOLEY; KINI, 2009; VONK et al., 2011). O aumento dessas MMPs indica a ativação de processos de manipulação da matriz extracelular e remodelamento tecidual, que podem contribuir para o quadro de inflamação, edema e necrose observados em vítimas de envenenamento do nosso estudo. Quando essa resposta ocorre de forma exacerbada, o resultado é a alta liberação de citocinas inflamatórias (como IL-6 e TNF- α), que regulam a expressão de MMPs, como foi demonstrado no nosso estudo no caso da IL-6 (RUCAVADO et al., 2002b; SARÉN; WELGUS; KOVANEN, 1996).

Essas alterações nas metaloproteinases de matriz, evidenciadas pelo aumento das concentrações de MMP-1, MMP-7 e MMP-10, em conjunto com a diminuição dos níveis de MMP-9, associadas à manifestação clínica dos pacientes, estabelecem um perfil enzimático característico do início do envenenamento botrópico. Este padrão reflete uma resposta tecidual intensa ao veneno, relacionada aos processos de degradação e remodelação da matriz

extracelular. Importante ressaltar que essas alterações não demonstram variações significativas entre pacientes com quadros clínicos leves e graves, sugerindo que o impacto inicial do veneno induz uma resposta uniforme, independentemente da gravidade do caso.

Rucavado e colaboradores realizaram um ensaio de modelo experimental injetando toxinas via intramuscular em ratos, entre essas toxinas, foi utilizada a metaloproteinase hemorrágica do tipo PI (BaP1). Entre os alvos do estudo estavam a MMP-2, MMP-9 e as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , observaram então que mesmo conseguindo induzir a formação bolhas, hemorragia e edema pela ação das toxinas, não foi possível detectar relações positivas desses sinais com as metaloproteinases de matriz alvos desse estudo (RUCAVADO et al., 2002b). Este estudo corrobora com nossos achados, pois os pacientes que apresentaram quadro clínico leve e grave, não obtiveram a expressão dessas MMPs superior à do grupo controle.

Estudos clínicos e experimentais em vítimas de envenenamento por *Bothrops* demonstram que o aumento de MMPs podem estar associados à resposta imunológica e aos danos locais e sistêmicos causados pelo veneno (CAVALCANTE et al., 2022; IBIAPINA et al., 2019b; RUCAVADO et al., 2002b). Esses resultados destacam o papel das MMPs como potenciais biomarcadores de gravidade no envenenamento botrópico.

As MMPs, podem ser liberadas em resposta ao veneno de *Bothrops*, promover manipulação tecidual e lesões para processos como necrose, inflamação e remodelação da matriz extracelular (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; PILCHER et al., 1997; RUCAVADO et al., 2002b). Para limitar o dano causado por essa manipulação descontrolada, os TIMPs são produzidos como parte de uma resposta regulatória do organismo, inibindo a ação excessiva dos MMPs (BUTLER et al., 1997; KINOSHITA et al., 1996; STRONGIN et al., 1995). Esses inibidores são proteínas reguladoras que desempenham um papel crucial no equilíbrio entre a manipulação e a proteção da matriz extracelular, neutralizando a atividade excessiva das metaloproteinases de matriz (MOORE; CROCKER, 2012).

Observamos um aumento nos níveis dos TIMPs em pacientes que sofreram envenenamento botrópico, especialmente do TIMP-4, quando comparados ao grupo controle. Confirmando assim que a ação dos TIMP-1 e TIMP-2 que deveriam impedir a degradação matriz da extracelular, necrose, destruição da integridade dos tecidos e ativação de outras MMPs, não obtiveram tanto êxito (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; GOMIS-RATH et al., 1997; MOORE; CROCKER, 2012).

A terapia com antiveneno específico é atualmente o único tratamento eficaz para o envenenamento causado por picadas de cobra. Esse tratamento neutraliza as toxinas presentes no veneno, promovendo uma restauração eficiente de funções necessárias, como a normalização dos fatores de coagulação (MONTEIRO et al., 2020b). Contudo, é importante ressaltar que o antiveneno não é capaz de reverter os danos já causados, específicos nos tecidos locais ou os efeitos dos mediadores inflamatórios (citocinas) liberados em resposta ao envenenamento, levando ao processo de necrose e a inflamação aguda no local da picada (CARDOSO et al., 1993, 2003).

Por isso, é essencial compreender a dinâmica das citocinas após o tratamento com soro antiofídico, acompanhando a evolução clínica dos pacientes e suas respostas ao tratamento. Esse monitoramento permite avaliar a eficácia do soro na modulação da resposta inflamatória, identificar possíveis complicações e ajustar intervenções terapêuticas para minimizar danos locais e sistêmicos.

Nossos resultados revelaram ainda um perfil de resposta imunológica em pacientes após acidentes botrópicos (T0), destacando a evolução temporal das concentrações de citocinas no plasma. A análise permitiu a avaliação de diversos aspectos, incluindo a observação de picos na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β beta, IL-6 e TNF- α , bem como citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4, além de IL-2, que estão associadas à ativação de células imunes. Esse pico inicial reflete uma resposta imunológica imediata do organismo ao envenenamento. O veneno ativa os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), promovendo a liberação de moléculas que iniciam uma defesa contra o dano tecidual (IBIAPINA et al., 2019b).

Observou-se que a elevação das citocinas no tempo T0 apresenta um padrão notavelmente semelhante entre pacientes com quadros clínicos leves e severos. Tal constatação sugere que a resposta inflamatória inicial ao veneno não é diretamente modulada pela gravidade do quadro clínico, mas sim pelo estímulo tóxico universal proporcionado pelo veneno. No entanto, essa elevação difere entre os pacientes com manifestações clínicas leves e graves, especialmente em relação à produção de IL-6 e IL-10. Diversos estudos citados anteriormente, enfatizam padrões análogos de resposta imunológica envolvendo essas citocinas, evidenciando sua relevância como biomarcadores para a gravidade da condição.

O mesmo raciocínio pode ser transposto para o contexto do envenenamento botrópico, considerando a resposta inflamatória aguda frequentemente observada nesses casos. Após a administração do soro antiofídico (T1), registrou-se uma redução significativa nos níveis de

citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , bem como nas citocinas reguladoras, como IL-10 e IL-4, ao longo do tempo. Em comparação ao momento inicial (T0), as concentrações dessas moléculas mostraram-se consistentes em 24 horas (T1) e apresentaram uma diminuição ainda mais acentuada após 48 horas (T2). Tal fenômeno evidencia uma modulação da resposta inflamatória, favorecendo a estabilização do quadro imunológico e a manutenção da homeostase durante o período de internação.

Para compreender a dinâmica das citocinas e o quadro clínico ao longo do tratamento de envenenamentos botrópicos, alguns estudos apresentam dados relevantes, como por exemplo, uma pesquisa publicada, avaliou mediadores imunológicos e alterações clínicas em pacientes com envenenamento por *Bothrops*. O estudo relatou reduções significativas em citocinas como IL-6, TNF- α , e IL-10 após 24(T1) e 48(T2) horas da administração do soro antiofídico. Essas reduções estão associadas à modulação inflamatória e à resposta ao tratamento, independentemente da gravidade inicial do quadro clínico (COELHO et al., 2023c; RYAN et al., 2021).

A citocina IL-10 é reconhecida como uma molécula central na modulação da resposta imunológica. Sua principal função é atenuar a ativação de neutrófilos e monócitos, o que resulta na redução da liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a IL-10 desempenha um papel essencial na regulação de processos inflamatórios e na contenção de vias citotóxicas exacerbadas, promovendo a homeostase imunológica e prevenindo danos teciduais excessivos (FARSKY et al., 1997; NEVES et al., 2022b). A redução dos níveis de IL-10 no T1 (24 horas) e T2 (48 horas) indica a resolução progressiva da resposta inflamatória inicial. Essa estabilização é esperada após a neutralização do veneno pelo soro antiofídico. A IL-10 apresenta uma queda mais acentuada, o que pode refletir uma menor necessidade de regulação anti-inflamatória ao longo do tempo.

Os dados apresentados revelam uma dinâmica interessante das MMPs em pacientes que sofreram envenenamento botrópico. O aumento das MMP-2, MMP-7, MMP-9 e MMP-10 em todos os pacientes na admissão (T0), independentemente da gravidade do quadro clínico, reflete uma resposta inflamatória inicial robusta e generalizada. Essa resposta está associada ao processo de remodelação tecidual necessário para lidar com os danos causados pelo veneno. As MMPs desempenham um papel crucial na degradação e reorganização da matriz extracelular, facilitando a resposta inflamatória e reparadora inicial (ÅGREN; AUF DEM KELLER, 2020; FARSKY et al., 1997; PILCHER et al., 1997; SHAPIRO, 1998).

A MMP-10 desempenha um papel significativo na patologia das lesões teciduais, contribuindo para a degradação da matriz extracelular e a regulação da resposta inflamatória. Sua atividade é particularmente relevante em contextos como feridas, inflamações e processos de cicatrização, similar ao que ocorrem em lesões por acidentes botrópicos. A MMP-10 é capaz de clivar componentes da matriz, como colágeno e elastina, facilitando a remodelação tecidual. Em situações de lesão, a ativação da MMP-10 permite a reestruturação da matriz, essencial para a migração celular e a reparação do tecido danificado. Estudos demonstram que a MMP-10 é expressa em níveis elevados em feridas crônicas, sugerindo sua participação na cicatrização e na remodelação da matriz (HANNOCKS et al., 2019c)

A MMP-10 também influencia a resposta inflamatória ao regular a liberação de citocinas e quimiocinas. Ela pode promover a migração de células imunes para o local da lesão, ajudando na resposta inicial ao dano. Em um estudo de Pardo et al. (2008), a MMP-10 foi associada à modulação da inflamação em doenças pulmonares, demonstrando sua capacidade de afetar a dinâmica celular em resposta a lesões. A desregulação da MMP-10 pode levar a cicatrização inadequada ou fibrose. Pesquisas indicam que níveis excessivos de MMP-10 podem estar associados a condições como a fibrose pulmonar, onde a remodelação excessiva da matriz resulta em comprometimento funcional (OHBAYASHI, 2002).

A atividade da MMP-10 é regulada por TIMPs, que mantêm o equilíbrio entre degradação e síntese da matriz. A desregulação desse equilíbrio pode resultar em patologias associadas a cicatrização deficiente ou excessiva, como observado em estudos de cicatrização de feridas (KANDHWAL et al., 2022)

O comportamento diferenciado da MMP-1, cuja diminuição significativa foi observada em pacientes com quadros clínicos graves, sugerindo que essa enzima pode estar mais diretamente ligada à gravidade do envenenamento. Esse padrão específico indica que a MMP-1 poderia ser considerada um biomarcador potencial para quadros mais graves, dado seu papel na intensificação da resposta inflamatória e na possível amplificação dos danos teciduais (ÅGREN et al., 2001; PILCHER et al., 1997).

Com o passar do tempo, a diminuição gradual dos níveis de todas as MMPs reflete o esforço do organismo em modular a atividade inflamatória e buscar a homeostase. Essa redução é esperada, já que uma atividade prolongada das MMPs pode levar a efeitos deletérios, como destruição excessiva do tecido e dificuldade na cicatrização (RUCAVADO et al., 2002b; SARÉN; WELGUS; KOVANEN, 1996).

Esses achados sublinham a relevância de monitorar as metaloproteinases da matriz em pacientes submetidos a envenenamento, tanto para elucidar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes ao envenenamento quanto para avaliar o potencial uso dessas enzimas como marcadores prognósticos e alvos terapêuticos. A correlação observada entre os níveis de MMPs e a gravidade do quadro clínico pode abrir novas perspectivas para a implementação de estratégias de manejo clínicas mais personalizadas.

Os dados revelam que, antes da aplicação da soroterapia (T0), ocorre um pico significativo nos níveis de TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e, em menor proporção, TIMP-4 em todos os pacientes, independentemente da gravidade do quadro clínico. Essa elevação inicial é interpretada como uma resposta regulatória do organismo em face do aumento da atividade das MMPs, desencadeado pelo envenenamento. O objetivo dessa resposta é mitigar a degradação excessiva da matriz extracelular e prevenir danos adicionais aos tecidos, contribuindo assim para uma modulação inicial da resposta inflamatória (NAKAMOTO et al., 2021).

No decorrer do período de internação, observa-se uma diminuição gradual nos níveis de todos os TIMPs, o que reflete uma adaptação fisiológica à medida que a inflamação é estabilizada e o processo de recuperação tecidual progride (GAO et al., 2024; KAPSORITAKIS et al., 2008). Essa queda nos níveis de TIMP's pode indicar que, após o controle inicial da atividade exacerbada das MMPs, o organismo reduz progressivamente sua necessidade de inibir essas enzimas, permitindo que o equilíbrio entre degradação e reconstrução tecidual seja restaurado (KAPSORITAKIS et al., 2008).

A independência dessa resposta inicial em relação à gravidade clínica reforça a ideia de que o aumento dos TIMPs é uma resposta sistêmica e uniforme, fundamental para controlar os efeitos locais e sistêmicos do veneno. No entanto, a regulação ao longo do tempo pode ser influenciada por fatores individuais, como a eficiência do sistema imunológico e a eficácia do tratamento antiveneno (PUCCA et al., 2019).

Estes resultados sugerem que os TIMPs exercem um papel fundamental não apenas na modulação da resposta tecidual imediata, mas também na transição para uma fase de recuperação e cicatrização regulada. O monitoramento da dinâmica dos TIMPs ao longo do tempo pode proporcionar informações valiosas acerca da evolução clínica e da eficácia do tratamento, além de evidenciar o potencial desses inibidores como marcadores prognósticos e alvos terapêuticos em casos de envenenamento botrópico.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente estudo apresenta algumas limitações, notadamente em decorrência do volume insuficiente de amostras, o que resultou em uma diminuição da população analisada. Em virtude dessa limitação, não foi possível realizar a dosagem das anafilotoxinas do sistema complemento, cuja relevância já foi amplamente estabelecida na resposta inflamatória, especialmente em relação à sua interação complexa com as metaloproteinases da matriz e os inibidores de metaloproteinases.

Entretanto, nossos resultados contribuem para a elucidação dos diversos mecanismos associados à resposta inflamatória aguda que se desenvolve após o envenenamento botrópico, proporcionando uma compreensão mais aprofundada da dinâmica desses mediadores. A adoção de abordagens estatísticas alternativas e a ampliação do número de amostras constituem perspectivas promissoras para futuras investigações, visando a obtenção de resultados mais robustos e precisos.

8. CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos em pacientes vítimas de envenenamento botrópico revela um complexo panorama da resposta inflamatória e da remodelação tecidual desencadeada pelo veneno. As alterações hematológicas, incluindo a diminuição de eritrócitos, hemoglobina e plaquetas, juntamente com a leucocitose neutrofílica, corroboram a gravidade do quadro clínico e a extensão do dano tecidual. A correlação entre os níveis de citocinas e MMPs sugere que a resposta inflamatória inicial é uniforme entre os pacientes, independentemente da gravidade do envenenamento, mas que a MMP-10 pode servir como um biomarcador promissor para quadros mais severos.

Além disso, a elevação dos TIMPs reflete uma resposta regulatória do organismo, visando conter a degradação excessiva da matriz extracelular e prevenir danos adicionais. A dinâmica temporal observada, com a redução progressiva tanto das MMPs quanto dos TIMPs, indica uma adaptação fisiológica que promove a estabilização da resposta inflamatória e a recuperação tecidual.

Esses achados ressaltam a importância do monitoramento das MMPs e TIMPs como potenciais biomarcadores de gravidade e prognóstico em envenenamentos botrópicos, além de destacar a necessidade de estratégias terapêuticas que considerem a complexidade da resposta imunológica e inflamatória. A compreensão dessas dinâmicas pode contribuir para a otimização do manejo clínico, visando minimizar complicações e promover uma recuperação mais eficaz nos pacientes afetados.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier, v. 8. ed, 2015.

ACIOGLU, E. et al. The role of matrix metalloproteinases in recurrent tonsillitis. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 5, p. 535–539, maio 2010.

ÅGREN, M. S. et al. Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds*. **Experimental Dermatology**, v. 10, n. 5, p. 337–348, 21 out. 2001.

ÅGREN, M. S.; AUF DEM KELLER, U. Matrix Metalloproteinases: How Much Can They Do? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2678, 12 abr. 2020.

AHOKAS, K. et al. Matrix Metalloproteinase-21 Is Expressed Epithelially During Development and in Cancer and Is Up-Regulated by Transforming Growth Factor- β 1 in Keratinocytes. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 12, p. 1887–1899, dez. 2003.

ALVES, E. C. et al. Predicting acute renal failure in Bothrops snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0202361, 17 ago. 2018.

AYUK, S. M.; ABRAHAMSE, H.; HOURELD, N. N. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1–9, 2016a.

BARAMOVA, E. N. et al. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 275, n. 1, p. 63–71, nov. 1989a.

BARAMOVA, E. N. et al. Identification of the Cleavage Sites by a Hemorrhagic Metalloproteinase in Type IV Collagen. **Matrix**, v. 10, n. 2, p. 91–97, maio 1990.

BAR-OR, A. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. **Brain**, v. 126, n. 12, p. 2738–2749, 23 set. 2003.

BARRON, L. A. et al. High-Salt Diet Enhances Vascular Reactivity in Pregnant Rats With Normal and Reduced Uterine Perfusion Pressure. **Hypertension**, v. 38, n. 3, p. 730–735, set. 2001.

BAYONA-SERRANO, J. D. et al. Replacement and Parallel Simplification of Nonhomologous Proteinases Maintain Venom Phenotypes in Rear-Fanged Snakes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 12, p. 3563–3575, 16 dez. 2020.

BERNARDONI, J. L. et al. Functional Variability of Snake Venom Metalloproteinases: Adaptive Advantages in Targeting Different Prey and Implications for Human Envenomation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109651, 14 out. 2014a.

BJARNASON, J. B.; HAMILTON, D.; FOX, J. W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 369 Suppl, p. 121–9, maio 1988.

BJÖRKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1755, n. 1, p. 37–69, maio 2005a.

BOCHNER, R. The international view of envenoming in Brazil: myths and realities. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. 29, 2013.

BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinase function. **Biochemical Society Symposia**, v. 70, p. 1–14, 1 set. 2003a.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins”. **FEBS Letters**, v. 331, n. 1–2, p. 134–140, 1993a.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 SUPPL. 2, p. 460–475, 2003a.

BRAUER, R. et al. Matrix metalloproteinase-19 inhibits growth of endothelial cells by generating angiostatin-like fragments from plasminogen. **BMC Biochemistry**, v. 12, n. 1, p. 38, 25 dez. 2011.

BRINCKERHOFF, C. E.; MATRISIAN, L. M. 2002 Brinckerhoff Matrisian **NatRevMolCellBiol**. v. 3, n. March, 2002a.

BRINCKERHOFF, C. E.; MATRISIAN, L. M. 2002 Brinckerhoff Matrisian **NatRevMolCellBiol**. v. 3, n. March, 2002b.

BURIN, S. M. et al. An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 664–671, abr. 2018.

BUTANTAN, I. SOROS. 2018.

BUTLER, G. S. et al. Membrane-Type-2 Matrix Metalloproteinase Can Initiate the Processing of Progelatinase A and is Regulated by the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, n. 2, p. 653–657, mar. 1997.

BUTLER, G. S. et al. Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 Interacts with Both the N- and C-terminal Domains of Gelatinases A and B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10846–10851, abr. 1999.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 5 jun. 2009.

CARDOSO, J. L. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **The Quarterly journal of medicine**, v. 86, n. 5, p. 315–25, maio 1993.

CARDOSO, J. L. C. et al. Venomous animals in Brazil: biology, clinic and therapeutics of envenomations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 338–338, dez. 2003.

CAVALCANTE, J. S. et al. Experimental *Bothrops atrox* Envenomation: Blood Plasma Proteome Effects after Local Tissue Damage and Perspectives on Thromboinflammation. **Toxins**, v. 14, n. 9, p. 613, 1 set. 2022.

CEZARETTE, G. N.; SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Inflammation and coagulation crosstalk induced by BJcuL, a galactose-binding lectin isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 296–304, fev. 2020.

CHELLUBOINA, B. et al. Matrix Metalloproteinase-12 Induces Blood–Brain Barrier Damage After Focal Cerebral Ischemia. **Stroke**, v. 46, n. 12, p. 3523–3531, dez. 2015.

CHIPPAUX, J.-P. Recommandations pour la production, le contrôle et l'enregistrement des immunoglobulines antivenimeuses. **Biologie Aujourd'hui**, v. 204, n. 1, p. 87–91, 8 abr. 2010.

CHUNG, L. et al. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 15, p. 3020–3030, 4 ago. 2004.

CLISSA, P. B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567–1573, out. 2001.

COELHO, K. F. et al. Exploring the Profile of Cell Populations and Soluble Immunological Mediators in *Bothrops atrox* Envenomations. **Toxins**, v. 15, n. 3, p. 196, 4 mar. 2023.

COMINELLI, A. et al. Matrix metalloproteinase-27 is expressed in CD163+/CD206+ M2 macrophages in the cycling human endometrium and in superficial endometriotic lesions. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 20, n. 8, p. 767–775, ago. 2014.

CORDEIRO, C. E. C. Análise De Perfis Proteicos De Venenos De Serpentes Do Gênero Bothrops. 2015.

COSTA, E. P. et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, n. 1, p. 13–17, 2002.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–73.

DA SILVA SOUZA, A. et al. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. **Toxicon**, v. 145, p. 15–24, abr. 2018.

DALVIE, D. et al. Metabolism Distribution and Excretion of a Matrix Metalloproteinase-13 Inhibitor, 4-[4-(4-Fluorophenoxy)-benzenesulfonylamino]tetrahydropyran-4-carboxylic Acid Hydroxyamide (CP-544439), in Rats and Dogs: Assessment of the Metabolic Profile of CP-544439 in. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 36, n. 9, p. 1869–1883, set. 2008.

DE ALMEIDA, M. T. et al. Inflammatory reaction induced by two metalloproteinases isolated from bothrops atrox venom and by fragments generated from the hydrolysis of basement membrane components. **Toxins**, v. 12, n. 2, 2020.

DE BRITO SOUSA, J. D. et al. Low accuracy of microscopic hematuria in detecting coagulopathy from Bothrops pit viper bites, Brazilian Amazon. **Clinical Toxicology**, v. 57, n. 9, p. 816–818, 2019.

DE SILVA, H. A.; RYAN, N. M.; DE SILVA, H. J. Adverse reactions to snake antivenom, and their prevention and treatment. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 81, n. 3, p. 446–452, mar. 2016.

DENARDO, D. G.; RUFFELL, B. **Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy**. **Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 1 jun. 2019.

DERYUGINA, E. I. et al. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. **Experimental cell research**, v. 263, n. 2, p. 209–23, 15 fev. 2001.

DETWILLER, K. Y. et al. Steroid-independent upregulation of matrix metalloproteinase 9 in chronic rhinosinusitis patients with radiographic evidence of osteitis. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 3, n. 5, p. 364–368, maio 2013.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851–2871, 4 set. 2009.

ECHEVERRÍA, S. et al. Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. **Chemico-Biological Interactions**, v. 281, p. 24–31, 2018.

EGUCHI, T. et al. Novel Transcription Factor-Like Function of Human Matrix Metalloproteinase 3 Regulating the CTGF/CCN2 Gene. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 7, p. 2391–2413, 1 abr. 2008.

ESCALANTE, T. et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1781–1794, ago. 2011a.

ESCALANTE, T. et al. 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, p. e28017, 8 dez. 2011b.

FARSKY, S. H. P. et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: In vivo and in vitro studies. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 185–193, fev. 1997.

FEITOSA, E. L. et al. Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: A case-control study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015a.

FEITOSA, E. S. et al. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: Highlights of the epidemiological trends in the state of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. Suppl I, p. 34–41, 2015b.

FERRAZ, C. R. et al. Jararhagin-induced mechanical hyperalgesia depends on TNF- α , IL-1 β and NF κ B in mice. **Toxicon**, v. 103, p. 119–128, set. 2015.

FINNISON, K. W. et al. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 5, p. 195–214, jun. 2013a.

FOLGUERAS, A. R. et al. Metalloproteinase MT5-MMP is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 38, p. 16451–16456, 22 set. 2009.

FORTIN, C. F. et al. MT6-MMP is present in lipid rafts and faces inward in living human PMNs but translocates to the cell surface during neutrophil apoptosis. **International Immunology**, v. 22, n. 8, p. 637–649, ago. 2010.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969–985, 2005.

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 Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016–3030, 2008a.

GAFFNEY, J. et al. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. **Matrix Biology**, v. 44–46, n. Ldl, p. 191–199, 2015.

GAO, M. et al. Regulation of inflammation during wound healing: the function of mesenchymal stem cells and strategies for therapeutic enhancement. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 15 fev. 2024.

GIMENES, S. N. C. et al. Observation of bothrops atrox snake envenoming blister formation from five patients: Pathophysiological insights. **Toxins**, v. 13, n. 11, p. 1–13, 2021.

GOMIS-RÜTH, F.-X. et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. **Nature**, v. 389, n. 6646, p. 77–81, set. 1997.

GOMIS-RÜTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 157–202, jun. 2003.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN AMPHIBIAN TISSUES: A TISSUE CULTURE ASSAY. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 48, n. 6, p. 1014–1022, jun. 1962.

GURURAJAN, R. et al. Isolation and Characterization of Two Novel Metalloproteinase Genes Linked to the Cdc2L Locus on Human Chromosome 1p36.3. **Genomics**, v. 52, n. 1, p. 101–106, ago. 1998.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2162, 13 jun. 2013.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17063, 14 set. 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. **Toxicon**, v. 148, p. 123–131, 2018a.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. e150, 6 jun. 2006.

GUTSCHALK, C. M. et al. GM-CSF enhances tumor invasion by elevated MMP-2, -9, and -26 expression. **Cancer Medicine**, v. 2, n. 2, p. 117–129, 26 abr. 2013.

HADCHOUEL, A. et al. Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms and Bronchopulmonary Dysplasia: Identification of MMP16 as a New Player in Lung Development. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, p. e3188, 11 set. 2008.

HANNOCKS, M.-J. et al. The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. **Matrix Biology**, v. 75–76, p. 102–113, jan. 2019a.

HAYDEN, D. M.; FORSYTH, C.; KESHAVARZIAN, A. The Role of Matrix Metalloproteinases in Intestinal Epithelial Wound Healing During Normal and Inflammatory States. **Journal of Surgical Research**, v. 168, n. 2, p. 315–324, jun. 2011.

HEGEDÜS, L. et al. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. **Journal of Cellular Physiology**, v. 216, n. 2, p. 480–485, ago. 2008.

HIRAKAWA, S. et al. Marked induction of matrix metalloproteinase-10 by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 12, p. 2141–2150, dez. 2013.

HITE, L. A. et al. **cDNA sequences for four snake venom metalloproteinase.pdf. Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1994.

HUANG, W. et al. Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. **FEBS Letters**, v. 384, n. 2, p. 155–161, 1996.

IBIAPINA, H. N. S. et al. An immunological stairway to severe tissue complication assembly in bothrops atrox snakebites. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. AUG, p. 1–12, 2019a.

JARA, P. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 308, n. 6, p. L511–L522, 15 mar. 2015.

JIANG, T.; XIE, P.; LIU, H. Circulating Anti-Matrix Metalloproteinase-7 Antibodies May Be a Potential Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 3, p. 650–657, mar. 2016.

JIROUSKOVA, M. et al. Hepatoprotective Effect of MMP-19 Deficiency in a Mouse Model of Chronic Liver Fibrosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e46271, 9 out. 2012.

JOHNSON, J. L. et al. Relationship of MMP-14 and TIMP-3 Expression with Macrophage Activation and Human Atherosclerotic Plaque Vulnerability. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–17, 2014.

JÚNIOR, F. A. N. et al. Bothrops alternatus Snake Venom Induces Cytokine Expression and Oxidative Stress on Renal Function. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 2058–2068, 24 out. 2019.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. et al. Venom-Related Transcripts from Bothrops jararaca Tissues Provide Novel Molecular Insights into the Production and Evolution of Snake Venom. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 3, p. 754–766, mar. 2015.

KAMIGUTI, A. S. et al. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of Bothrops jararaca. **Thrombosis and haemostasis**, v. 72, n. 2, p. 244–9, ago. 1994.

KANDHWAL, M. et al. **Role of matrix metalloproteinase in wound healing** *Am J Transl Res*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.ajtr.org>.

KAPLAN, Z. S. et al. Thrombin-dependent intravascular leukocyte trafficking regulated by fibrin and the platelet receptors GPIb and PAR4. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

KAPSORITAKIS, A. N. et al. Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) - 1 and - 4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. **BMC Gastroenterology**, v. 8, p. 1–8, 2008.

KIM, J. M. et al. Expression of matrix metalloproteinase-12 is correlated with extracapsular spread of tumor from nodes with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 270, n. 3, p. 1137–1142, 21 mar. 2013.

KINOSHITA, T. et al. Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. **Cancer research**, v. 56, n. 11, p. 2535–8, 1 jun. 1996.

KLEINER, D. E.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases and metastasis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 43, n. 7, p. S42–S51, 12 maio 1999.

KÖHRMANN, A. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 188, 16 dez. 2009.

KOMORI, K. et al. Absence of mechanical allodynia and A β -fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. **FEBS Letters**, v. 557, n. 1–3, p. 125–128, 16 jan. 2004.

KÖSE, A. et al. The Usefulness of Platelet Distribution Width and Platelet Distribution Width to Lymphocyte Ratio in Predicting Severity and Outcomes in Patients with Snakebite. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 32, n. 3, p. 284–292, 2021.

KOYAMA, H. et al. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 16, p. 2164–2170, out. 2000a.

KRAMPERT, M. et al. Activities of the Matrix Metalloproteinase Stromelysin-2 (MMP-10) in Matrix Degradation and Keratinocyte Organization in Wounded Skin. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 12, p. 5242–5254, dez. 2004.

LARRÉCHÉ, S. et al. Bleeding and thrombosis: Insights into pathophysiology of bothrops venom-related hemostasis disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, 2021a.

LEON, G. et al. Immune Response Towards Snake Venoms. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 381–398, 1 out. 2011.

- LEVIN, M. et al. Next generation matrix metalloproteinase inhibitors — Novel strategies bring new prospects. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 11, p. 1927–1939, 2017a.
- LI, W. et al. Identification of an Orally Efficacious Matrix Metalloprotease 12 Inhibitor for Potential Treatment of Asthma. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5408–5419, 10 set. 2009.
- LI, Z. et al. Significance of MMP11 and P14(ARF) expressions in clinical outcomes of patients with laryngeal cancer. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 15581–90, 2015.
- LIANG, Y. et al. Elevated IL-33 promotes expression of MMP2 and MMP9 via activating STAT3 in alveolar macrophages during LPS-induced acute lung injury. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 23, n. 1, p. 52, 31 dez. 2018.
- LIEW, P. X.; KUBES, P. The Neutrophil's role during health and disease. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 2, p. 1223–1248, 2019.
- LIN, C.-W. et al. Association of matrix metalloproteinase-11 polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics for oral squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 37, n. 10, p. 1425–1431, out. 2015.
- LIU, J. et al. MiR-155 inhibits cell migration of human cardiomyocyte progenitor cells (hCMPCs) via targeting of MMP-16. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 10, p. 2379–2386, out. 2012.
- LLANO, E. et al. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. **Cancer research**, v. 59, n. 11, p. 2570–6, 1 jun. 1999.
- LOHI, J. et al. Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) Expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 10134–10144, mar. 2001.
- MA, Y. et al. Matrix Metalloproteinase-28 Deletion Exacerbates Cardiac Dysfunction and Rupture After Myocardial Infarction in Mice by Inhibiting M2 Macrophage Activation. **Circulation Research**, v. 112, n. 4, p. 675–688, 15 fev. 2013.
- MACÊDO, J. K. A.; FOX, J. W. Biological Activities and Assays of the Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs). Em: **Venom Genomics and Proteomics**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 1–24.
- MARCHANT, D. J. et al. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 493–502, 28 maio 2014.

MASHIMO, Y. et al. Induction of the Matrix Metalloproteinase 13 Gene in Bronchial Epithelial Cells by Interferon and Identification of its Novel Functional Polymorphism. **Inflammation**, 4 dez. 2015.

MEANS, R. et al. Remote South American Snakebite with Extensive Myonecrosis. **Clinical Practice and Cases in Emergency Medicine**, v. 1, n. 1, p. 47–49, 23 fev. 2017.

MENALDO, D. L. et al. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A2 from Bothrops atrox venom. **Molecular Immunology**, v. 85, p. 238–247, maio 2017.

MÉTODOS, E.; BIBLIOMÉTRICOS, E. A DEFESA CONTRA O OPHIDISMO : diferentes edições de uma obra centenária desveladas pelas métricas. n. 2002, p. 1–7, 2011.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2da edição ed. Brasília: Ministerio da Saúde, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância em saúde**. 3ª edição ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2019.

MITRMOONPITAK, C. et al. Effects of phospholipase A2 and metalloprotease fractions of Russell's viper venom on cytokines and renal hemodynamics in dogs. **Toxicon**, v. 61, n. 1, p. 47–53, 2013.

MONTEIRO, W. M. et al. Bothrops atrox, the most important snake involved in human envenomings in the amazon: How venomics contributes to the knowledge of snake biology and clinical toxinology. **Toxicon: X**, v. 6, 2020a.

MOORE, C. S.; CROCKER, S. J. An Alternate Perspective on the Roles of TIMPs and MMPs in Pathology. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 1, p. 12–16, jan. 2012.

MORAES, C. L.; REICHENHEIM, M. E. Cross-cultural measurement equivalence of the Revised Conflict Tactics Scales (CTS2) Portuguese version used to identify violence within couples. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 783–796, jun. 2002.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by Bothrops atrox snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p. 12–20, 2012.

MORETTO DEL-REI, T. H. et al. Functional variability of Bothrops atrox venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. **Toxicon**, v. 164, n. April, p. 61–70, 2019.

MOROZEVICH, G. et al. Integrin $\alpha 5\beta 1$ controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. **Cell Cycle**, v. 8, n. 14, p. 2219–2225, 15 jul. 2009.

MOURA-DA-SILVA, A.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2893–2905, 1 out. 2007a.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 9, p. 2000–2005, set. 1996.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: Evidences for recombination between different classes of SVMPs. **BMC Genetics**, v. 12, 1 nov. 2011.

MURPHY, K. et al. **Imunobiologia de Janeway**. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

NAGASE, H.; FUSHIMI, K. Elucidating the Function of Non catalytic Domains of Collagenases and Aggrecanases. **Connective Tissue Research**, v. 49, n. 3–4, p. 169–174, 6 jan. 2008a.

NAGASE, H.; FUSHIMI, K. Elucidating the Function of Non catalytic Domains of Collagenases and Aggrecanases. **Connective Tissue Research**, v. 49, n. 3–4, p. 169–174, 6 jan. 2008b.

NAGASE, H.; FUSHIMI, K. Elucidating the Function of Non catalytic Domains of Collagenases and Aggrecanases. **Connective Tissue Research**, v. 49, n. 3–4, p. 169–174, 6 jan. 2008c.

NAKAMOTO, M. et al. A Biomimetic of Endogenous Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Inhibition Mechanism and Contribution of Composition, Polymer Size, and Shape to the Inhibitory Effect. **Nano Letters**, v. 21, n. 13, p. 5663–5670, 14 jul. 2021.

NEVES, J. C. F. et al. CCL-2 and CXCL-8: Potential Prognostic Biomarkers of Acute Kidney Injury after a *Bothrops atrox* Snakebite. **Mediators of Inflammation**, v. 2022, p. 1–14, 7 set. 2022a.

NWOMEH, B. C. et al. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, n. 2, p. 127–134, mar. 1998.

OH, C. et al. Intrauterine hypoxia upregulates proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in fetal guinea pig hearts. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 1, p. 78.e1-78.e6, jul. 2008.

OHBAYASHI, H. **Matrix Metalloproteinases in Lung Diseases** *Current Protein and Peptide Science*. [s.l: s.n.].

OHUCHI, E. et al. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Digests Interstitial Collagens and Other Extracellular Matrix Macromolecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2446–2451, jan. 1997.

OLIVEIRA SS, ALVES EC, SANTOS AS, PEREIRA JPT, SARRAFF LKS, NASCIMENTO EF, DE-BRITO-SOUSA JD, SAMPAIO VS, LACERDA MVG, SACHETT JAG, SANO-

MARTINS IS, M. WM. Factors Associated with Systemic Bleeding in Bothrops Envenomation in a Tertiary Hospital in the Brazilian Amazon. **Toxins**, v. 11(1). pii, 2017a.

OLSZEWSKA, E. et al. Diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in cholesteatoma. **Histology and histopathology**, v. 31, n. 3, p. 307–15, mar. 2016.

PADMAVATI, P. et al. mRNA Expression of MMP-28 (Epilysin) in Gingival Tissues of Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: A Reverse Transcriptase PCR Study. **Disease Markers**, v. 35, p. 113–118, 2013.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 617–629, ago. 2004.

PEREIRA DA SILVA, T. et al. Espécies vegetais utilizadas no bloqueio da atividade hemorrágica induzida pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* sp.: uma revisão da literatura. **Scientia Amazonia**, v. v. 6, n. 2, p. 36–57, 2017.

PETRICEVICH, V. L. et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, n. 9, p. 1253–1266, set. 2000a.

PILCHER, B. K. et al. The Activity of Collagenase-1 Is Required for Keratinocyte Migration on a Type I Collagen Matrix. **The Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 6, p. 1445–1457, 16 jun. 1997.

PORLAN, E. et al. MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 629–638, 22 jul. 2014.

PUCCA, M. B. et al. Electrophysiological characterization of the first *Tityus serrulatus* alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages. **Biochimie**, v. 115, p. 8–16, ago. 2015.

PUCCA, M. B. et al. History of envenoming therapy and current perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JULY, p. 1–13, 2019.

PUENTE, X. S. et al. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. **Cancer research**, v. 56, n. 5, p. 944–9, 1 mar. 1996.

RADICHEV, I. A. et al. Biochemical Characterization of the Cellular Glycosylphosphatidylinositol-linked Membrane Type-6 Matrix Metalloproteinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 21, p. 16076–16086, maio 2010.

RODRIGUES, F. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 16, p. 1149–1156, mar. 2004.

RODRIGUES SGRIGNOLLI, L. et al. Acute Kidney Injury Caused by Bothrops Snake Venom. **Nephron Clinical Practice**, v. 119, n. 2, p. c131–c137, 8 jul. 2011a.

RODRIGUES SGRIGNOLLI, L. et al. Acute Kidney Injury Caused by Bothrops Snake Venom. **Nephron Clinical Practice**, v. 119, n. 2, p. c131–c137, 8 jul. 2011b.

ROHANI, M. G. et al. MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 10, p. 2377–2384, out. 2015.

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of Inflammation**, v. 11, n. 2, p. 121–128, 2002a.

RUCAVADO, A. et al. Viperid envenomationwound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 1–14, 2016.

RYAN, R. Y. M. et al. Immunological Responses to Envenomation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. May, p. 1–20, 2021.

RYDLOVA, M. et al. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases. **Anticancer research**, v. 28, n. 2B, p. 1389–97, 2008.

SACHETT, J. A. G. et al. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005745, 10 jul. 2017.

SADOWSKI, T. et al. Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 7–8, p. 870–880, abr. 2005.

SANTOS, A. L. DOS et al. Estudo retrospectivo dos acidentes por serpentes atendidos no Hospital Geral de Palmas-TO, no período de 2010 e 2011. **Desafios - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 1, n. 1, p. 227–246, 2014a.

SARÉN, P.; WELGUS, H. G.; KOVANEN, P. T. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 9, p. 4159–65, 1 nov. 1996.

SARTIM, M. A. et al. Disseminated intravascular coagulation caused by moojenactivase, a procoagulant snake venom metalloprotease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1077–1086, out. 2017.

SCHESKE, L.; RUITENBERG, J.; BISSUMBHAR, B. Needs and availability of snake antivenoms: relevance and application of international guidelines. **International Journal of Health Policy and Management**, v. 4, n. 7, p. 447–457, 4 abr. 2015.

SHAPIRO, S. D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 602–608, out. 1998.

SIIGUR, E. et al. Factor X activator from *Vipera lebetina* snake venom, molecular characterization and substrate specificity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1568, n. 1, p. 90–98, nov. 2001.

SILVA, C. A. et al. Activation of α M β 2-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 3, p. 950–956, set. 2004a.

SILVA, C. A. et al. Activation of α M β 2-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 3, p. 950–956, set. 2004b.

SILVEIRA, K. S. O. et al. Pulmonary mechanics and lung histology in acute lung injury induced by *Bothrops jararaca* venom. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 139, n. 2, p. 167–177, jan. 2004.

SINAN. **Ministerio da Saúde. Acidente por animais peçonhentos- Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/>>. Acesso em: 17 mar. 2023.

SINAN. **Ministerio da Saúde. Acidente por animais peçonhentos- Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação**.

SI-TAYEB, K. et al. Matrix Metalloproteinase 3 Is Present in the Cell Nucleus and Is Involved in Apoptosis. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 4, p. 1390–1401, out. 2006.

SOARES, F. G. S. et al. Lower levels of CXCL-8 and IL-2 on admission as predictors of early adverse reactions to *Bothrops* antivenom in the Brazilian Amazon. **Cytokine**, v. 152, p. 155825, abr. 2022.

SOHAIL, A. et al. MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 27, n. 2, p. 289–302, 20 jun. 2008.

SOKAI, A. et al. Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, p. 120, 29 dez. 2015.

SOUSA, L. F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2442, 12 set. 2013.

STÖCKER, W. et al. The metzincins - Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, n. 5, p. 823–840, 31 dez. 2008a.

STRACKE, J. O. et al. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). **FEBS Letters**, v. 478, n. 1–2, p. 52–56, 28 jul. 2000.

STRONGIN, A. Y. et al. Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5331–5338, mar. 1995.

SUN, Y.; LI, Y. Expression of mRNA for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human laryngeal cancer. **Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih**, v. 19, n. 3, p. 170–3, set. 2004.

SUOMELA, S. et al. Expression of MMP-10, MMP-21, MMP-26, and MMP-28 in Merkel cell carcinoma. **Virchows Archiv**, v. 455, n. 6, p. 495–503, 17 dez. 2009.

TAKAHASHI, T.; OHSAKA, A. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principles from proteolytic activity. **BBA - Protein Structure**, v. 207, n. 1, p. 65–75, 1970.

TAKEDA, S. ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: A structural overview. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 8–11, 2016.

TANS, G.; ROSING, J. Snake Venom Activators of Factor X: An Overview. **Haemostasis**, p. 225–233, 2002.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017.

TATTI, O. et al. MMP16 Mediates a Proteolytic Switch to Promote Cell–Cell Adhesion, Collagen Alignment, and Lymphatic Invasion in Melanoma. **Cancer Research**, v. 75, n. 10, p. 2083–2094, 15 maio 2015.

TAVARES-NETO, J. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. [s.l: s.n.].

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 67–76, jul. 2009.

TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 27, n. 7, p. 1022–1032, jul. 1995.

TOMLINSON, M. L. et al. Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. **Mechanisms of Development**, v. 125, n. 11–12, p. 1059–1070, nov. 2008.

TONGE, D. et al. Axonal growth towards *Xenopus* skin in vitro is mediated by matrix metalloproteinase activity. **European Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 4, p. 519–531, fev. 2013.

TORTORELLA, M. D. et al. The Interglobular Domain of Cartilage Aggrecan Is Cleaved by Hemorrhagic Metalloproteinase HT-d (Atrolysin C) at the Matrix Metalloproteinase and Aggrecanase Sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5846–5850, mar. 1998.

TOXICOLOGIA, B. I. D. E. Boletim de Toxicologia – CIATOX/SUVISA/SES - Edição Nº 5 Agosto– 2022|Volume 5. v. d, 2022.

URÍA, J. A.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. **Cancer research**, v. 60, n. 17, p. 4745–51, 1 set. 2000.

VAZ, V. H. DA S.; BRAZIL, O. A. V.; PAIXÃO, A. E. A. Propriedade intelectual do soro antiofídico: a efetividade a partir da correlação entre os investimentos do governo federal nos principais institutos responsáveis pela produção do soro e realização de pesquisas para o tratamento de acidentes ofídicos no b. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 28, n. 3, p. 409–421, set. 2020.

VELASCO, G. et al. Cloning and Characterization of Human MMP-23, a New Matrix Metalloproteinase Predominantly Expressed in Reproductive Tissues and Lacking Conserved Domains in Other Family Members. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 8, p. 4570–4576, fev. 1999.

VELASCO, G. et al. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. **Cancer research**, v. 60, n. 4, p. 877–82, 15 fev. 2000.

VELASCO-LOYDEN, G.; ARRIBAS, J.; LÓPEZ-CASILLAS, F. The Shedding of Betaglycan Is Regulated by Pervanadate and Mediated by Membrane Type Matrix Metalloprotease-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 7721–7733, 2004a.

VONK, F. J. et al. Snake venom: From fieldwork to the clinic. **BioEssays**, v. 33, n. 4, p. 269–279, abr. 2011.

WANDERLEY, C. W. S. et al. Bothrops jararacussu snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. **Toxicon**, v. 90, p. 134–147, 2014.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 8, p. 2145–2154, 1991.

ZHANG, H. et al. MMP-14 can serve as a prognostic marker in patients with supraglottic cancer. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 266, n. 9, p. 1427–1434, 13 set. 2009.

ZHANG, X. et al. Insights into the distinct roles of MMP-11 in tumor biology and future therapeutics (Review). **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 5, p. 1783–1793, maio 2016.

ZHAO, Z. et al. Increased MMP-21 expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with progression and prognosis. **Medical Oncology**, v. 31, n. 8, p. 91, 12 ago. 2014.

ZOCCAL, K. F. et al. TLR2, TLR4 and CD14 Recognize Venom-Associated Molecular Patterns from *Tityus serrulatus* to Induce Macrophage-Derived Inflammatory Mediators. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88174, 7 fev. 2014.

ZOCCAL, K. F. et al. LTB4 and PGE2 modulate the release of MIP-1 α and IL-1 β by cells stimulated with Bothrops snake venoms. **Toxicon**, v. 150, p. 289–296, ago. 2018.

ZULIANI, J. P.; SOARES, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Polymorphonuclear neutrophil leukocytes in snakebite envenoming. **Toxicon**, v. 187, n. July, p. 188–197, 2020.

10. PRODUTO DA TESE

Artigo a ser submetido a revista: *Toxins*, tópico especial *Animal Venoms*.

Snake Venom Metalloproteinases, Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors: Role in Snakebites

Cristiano Oliveira da Silva¹§, Juliana Costa Ferreira Neves^{2,3}§, Fábio Magalhães-Gama⁴, Kamille Beltrão Seixas³, Aleksandr Martin Batista de Brito², Fabiane Bianca Albuquerque Barbosa¹, Wuelton Marcelo Monteiro¹ & Allyson Guimarães Costa^{2,3,5*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil;

² Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil;

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil;

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Minas), Belo Horizonte, Brazil;

⁵ Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, UFAM, Manaus, Brazil.

§ **These authors contributed equally to this work.**

***Corresponding Author:** Allyson Guimarães da Costa - allyson.gui.costa@gmail.com, UFAM, Av. Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 1200, Coroado, Manaus, AM, CEP 69067-005, Brazil.

Abstract: A serpente *Bothrops atrox* (*B. atrox*) ocasiona grande parte dos acidentes ofídicos na região norte do Brasil. A reação inflamatória desencadeada pela sua peçonha (BAV) é responsável pelos sinais clínicos, com efeitos locais e sistêmicos observados nos pacientes. O remodelamento da matriz extracelular (MEC) nesses acidentes é regulado por enzimas proteolíticas como as metaloproteinases de matriz (MMPs), podendo ser influenciado pelo processo inflamatório. Estudos mostram a redução na atividade dos Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs) em pacientes com quadros clínicos graves de envenenamento, contribuindo para o desequilíbrio na regulação das MMPs. Em conjunto, as metaloproteinases presentes no veneno de serpentes (SVMPs) têm

uma ampla atividade, capazes de degradar a matriz extracelular, o que pode levar a hemorragias locais e outros efeitos tóxicos, contribuindo na gravidade do acidente. Nesta revisão, fornecemos uma visão geral de MMPs, TIMPs e SVPMs e o seu papel frente a diversos envenenamentos por animais peçonhentos como acidentes por *Bothrops sp.e demais viperídeos*

Keywords: Bothrops snakebites, immune response, SVMPs, MMPs, TIMPs, envenomations

INTRODUÇÃO

O envenenamento por picada de cobra é considerado uma doença tropical negligenciada (DTN) e representa uma importante questão saúde pública em várias partes do mundo. Essa condição afeta principalmente comunidades rurais localizadas em regiões tropicais e subtropicais, muitas vezes caracterizadas por recursos limitados e sistemas de saúde inadequados. As regiões mais afetadas incluem a Índia, o Sudeste Asiático, a África Subsaariana e a América Latina (1,2).

Os sintomas do envenenamento por serpentes da Família Viperidae são decorrentes da ação individual ou sinérgica de diferentes toxinas que compõem o veneno, como as Fosfolipases A2 (PLA 2s), Metaloproteinases (SVMPs), Serinoproteinases (SVSPs), L-aminoácido oxidases (LAAOs), entre outros (5,6). Dentre os componentes, as metaloproteinases (SVMPs) representam a principal toxina, sendo particularmente importante para a adaptação das serpentes aos diferentes ambientes, destacando sua grande relevância para a família, bem como, o interesse dos pesquisadores em compreender seu impacto durante o envenenamento (7,8) (9)(10).

Em paralelo, as metaloproteinases de matriz (MMPs), também conhecidas como matrixinas, correspondem a uma família de endopeptidases dependentes de zinco, envolvidas no processo de degradação e remodelação de componentes da matriz extracelular (MEC), como fibronectina, laminina, colágenos, elastina e glicoproteínas da membrana basal. As MMPs desempenham papéis importantes em processos fisiológicos, como cicatrização de feridas, angiogênese, desenvolvimento embrionário, plasticidade sináptica, polaridade celular, migração celular e proliferação (13)(14).

A atividade das MMPs é inibida através de bloqueio reversível pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que são reguladores proteicos endógenos (15,16). Em

seus tecidos específicos, os TIMPs apresentam expressão de maneira constitutiva ou induzível, que é regulada no nível transcricional por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (123,124). O equilíbrio entre as MMPs e TIMPs é essencial para a manutenção adequada da homeostase funcional no tecido. Por outro lado, o desequilíbrio entre a produção de metaloproteinases e seus inibidores pode ter um papel crucial em processos celulares que concedam vantagens e favoreçam a progressão tumoral (12,13).

No contexto do envenenamento por serpentes da Família Viperidae, estudos sobre as SVMPs, MMPs e TIMPs são fundamentais por razões que vão desde a compreensão dos componentes do veneno, processo inflamatório local e/ou sistêmico gerado, além do reparo e resolução da patologia. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo reunir a literatura disponível sobre o papel destas enzimas e seu impacto frente as envenenamentos por serpentes

1. Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs) ou matrixinas foram descritas pela primeira vez como uma enzima proteolítica de colágeno que levava a degradação de moléculas proteicas da ECM durante a reabsorção da cauda de um girino (17). Essa descoberta ajudou a lançar as bases para a compreensão do papel das MMPs na degradação da ECM em outros processos biológicos (120,121). Hoje essas enzimas são caracterizadas por serem altamente homólogas, multidomínios e dependentes de zinco, desempenhando um papel crucial na inflamação, angiogênese, remodelação tecidual e formação do tecido cicatricial.

As MMPs compartilham uma estrutura central comum, composta por um pró-peptídeo, um domínio catalítico de metaloproteinase, uma região de peptídeo ligante (conhecida como região da dobradiça) e um domínio de hemopexina (18–21). A região da dobradiça permite a flexibilidade da estrutura da MMP, proporcionando sua adaptação à forma do substrato que está sendo degradado (18–21). O componente catalítico das MMPs, que possui uma ligação ao zinco e um sítio ativo com um resíduo de ácido glutâmico, é essencial para determinar a especificidade do substrato. Paralelamente, o domínio HPX desempenha um papel na ligação do substrato e na modulação da atividade dessas enzimas.

Em vertebrados, a família das MMPs compreende 28 membros, dos quais pelo menos 23 são expressos em tecidos humanos, e 14 são expressos na vasculatura (87). Com base na sua distribuição subcelular e especificidade para componentes da ECM, as MMPs são subdivididas em metaloproteinases de matriz do tipo membrana (MT-MMPs), colagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas (121). Além disso, diferentes classes de MMPs

apresentam características estruturais específicas que as diferenciam da estrutura prototípica (88-90). A topologia das MMPs é amplamente preservada, sendo uma notável diferença entre elas encontrada no subsítio S1', um bolsão hidrofóbico de profundidade variável que desempenha um papel crucial na interação específica entre a MMP e seu substrato. (88).

As MMPs estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos ou patológicos (Tabela 1), que podem ser regulados por hormônios, citocinas, fatores de crescimento, bem como seus inibidores teciduais (120). Além da degradação das proteínas da MEC, as MMPs processam diversos fatores biológicos destacados e moléculas que não fazem parte da MEC, exercendo uma influência direta na homeostase tecidual. Nesse sentido,

Como enzimas proteolíticas, as MMPs são estritamente controladas em múltiplos estágios, que incluem desde a expressão gênica até a ativação do zimogênio e a inibição endógena (92).

O equilíbrio entre citocinas pró- e anti-inflamatórias controla a expressão e secreção de

MMP	Classe	Processo fisiológico	Condição patológica	Referências
1	Colagenases intersticiais	Resposta imune; cicatrização de feridas	Distúrbio fibrotico, aterosclerose vascular; câncer	(23,24)
2	Gelatinase A	Angiogênese	Doenças crônicas venosas; infecções virais; aterosclerose vascular; câncer	(25–27)
3	Estromelisin 1	Remodelação tecidual	Doenças crônicas venosas; distúrbio fibrotico; doenças hepáticas; osteoartrite; aterosclerose vascular; câncer	(28–30)
7	Matrilisinas	Apoptose	Aterosclerose vascular; câncer	(31–33)
8	Colagenases de neutrófilos	Cicatrização de feridas	Doenças pulmonares	(23,34,35)
9	Gelatinase B	Apoptose	Doenças crônicas venosas; doenças hepáticas; doenças pulmonares; osteoartrite; aterosclerose vascular; câncer	(23,25,26,36,37)
10	Estromelisin 2	Apoptose; remodelação tecidual; cicatrização de feridas	Doenças crônicas venosas; infecções virais; câncer	(38–40)
11	Estromelisin 3	Cicatrização de feridas	Doenças neurológicas; câncer	(41–43)
12	Metaloelastase de macrófagos	Resposta imune	Doenças pulmonares; infecções virais; câncer	(44–47)
13	Colagenases	Resposta imune; remodelação tecidual	Doenças pulmonares; osteoartrite; infecções virais; câncer	(35,44,48,49)
14	Tipo membrana 1 (MT-MMP)	Apoptose; resposta imune; remodelação tecidual	Aterosclerose vascular; câncer	(20,50,51)
15	Tipo membrana 2 (MT-MMP)	Apoptose	Câncer	(52,53)
16	Tipo membrana 3 (MT-MMP)	Angiogênese	Câncer	(54–56)
17	Tipo membrana 4 (MT-MMP)	Resposta imune	Câncer	(57,58)
18	Colagenases	Crescimento axonal		(35,59,60)
19	Estromelisin-4	Cicatrização de feridas; angiogênese	Doenças hepáticas; doenças pulmonares; doenças neurológicas; osteoartrite	(61–64)
20	Esmaltenisina humana	Formação do esmalte dentário		(65,66)
21	Xenopus-MMP	Embriogênese	Câncer	(67–69)
22	MMP de galinha	Remodelação tecidual	Câncer	(70)
23	Arranjo de cisteína (CA)-MMP	Apoptose, reprodução/menstruação	Câncer	(71,72)
24	Tipo membrana 5 (MT-MMP)	Resposta imune	Doenças neurológicas; câncer	(73–76)
25	Tipo membrana 6 (MT-MMP)	Apoptose; resposta imune	Doenças pulmonares; câncer	(77,78)
26	Matrilisina	Remodelação tecidual	Doenças crônicas venosas; câncer	(79,80)
27	Estromelisin-5	Embriogênese; reprodução/menstruação	Câncer	(81–83)
28	Epilisin	Embriogênese; remodelação tecidual	Aterosclerose vascular; câncer	(84–86)

MMP2 e MMP9, sendo demonstrado em alguns estudos que essas MMPs possuem um papel importante na neuroinflamação, que também é potencializado devido expressão de mediadores inflamatórios (89). Citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-6) e

metaloproteinases de matriz (MMP2 e MMP9) são reguladas positivamente através da ativação de STAT3 (90,91).

Aumento nos níveis de MMPs e uma expressão elevada dessas enzimas, notadamente MMP-3, MMP-9 e MMP-13, foram observados em tecidos inflamados de pacientes afetados por diversas doenças inflamatórias. (31,93,94). Tanto a MMP-1 quanto a MMP-7 facilitam a migração epitelial em diversos tecidos, diminuindo a afinidade da integrina $\alpha 2 \beta 1$. No entanto, essas metaloproteinases controlam a atividade desse receptor de matriz por meios distintos. A MMP-1 influencia a sinalização de fora para dentro, alterando o ligante, enquanto a MMP-7 afeta a sinalização de dentro para fora, regulando a ativação de integrinas, o que, por conseguinte, auxilia na migração celular (89). Além da degradação das proteínas da matriz extracelular (MEC), as MMPs processam diversos fatores biológicos destacados e moléculas que não fazem parte da MEC, exercendo uma influência direta na homeostase tecidual. Sendo enzimas proteolíticas, as MMPs são estritamente controladas em múltiplos estágios, que incluem desde a expressão gênica até a ativação do zimogênio e a inibição endógena (92).

Aumento nos níveis de MMPs e uma expressão elevada dessas enzimas, notadamente MMP-3, MMP-9 e MMP-13, foram observados em tecidos inflamados de pacientes afetados por diversas doenças inflamatórias. (31,93,94). Além disso, as MMPs têm sido associadas à diferenciação de adipócitos e remodelação do tecido adiposo, no qual níveis elevados de MMP-2, MMP-8 e MMP-9 foram encontrados no tecido adiposo de pacientes obesos em comparação com indivíduos saudáveis (95,96). As MMPs participam da resposta inflamatória, remodelando a matriz extracelular e promovendo eventos associados ao influxo de células inflamatórias, liberação de fatores de crescimento incorporados na matriz e início da regeneração tecidual. (97). Com base nessas informações, é viável estabelecer relações importantes entre as MMPs e a resposta imunológica, desencadeada pela quebra da homeostase.

2. Inibidores teciduais de metaloproteinases

A atividade das MMPs é inibida através de bloqueio reversível pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que são reguladores proteicos endógenos, que ligam-se a um domínio catalítico de forma não covalente na proporção de 1:1 (98). Em mamíferos, os TIMPs são caracterizados por possuírem 2 domínios, que são estabilizados por três ligações dissulfeto. Os domínios N-terminais contêm aproximadamente 125 aminoácidos, enquanto os C-terminais são menores, com cerca de 65 resíduos (105). Assim como as MMPs, a regulação

da expressão dos TIMPs ocorre durante a remodelação tecidual e em condições fisiológicas, desempenhando um papel crucial na manutenção do equilíbrio da ECM.

A família dos TIMPs é composta por 4 proteínas (TIMP-1–4), que estão presentes na ECM em forma solúvel, exceto o TIMP-3, que está ligado à ECM (122). Os TIMPs apresentam uma notável capacidade de regular as diferentes classes de MMPs, embora existam preferências e especificidades em suas ações inibitórias (101). O TIMP-1, que é secretado pela maioria das células do corpo, inibe todos os tipos de MMPs (ligando-se fortemente à MMP-9 e pró-MMP-9). O TIMP-2 é expresso constitutivamente na maioria dos tecidos, mas não é induzido por fatores de crescimento. O TIMP-3 é expresso nos tecidos como uma proteína de matriz e nas membranas basais dos olhos e rins, enquanto o TIMP-4 é expresso no coração, ovários, rins, pâncreas, cólon, testículos, cérebro e tecido adiposo (123,124).

Em seus tecidos específicos, os TIMPs apresentam expressão de maneira constitutiva ou induzível, que é regulada no nível transcricional por citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (123,124). XX. O desequilíbrio eventual entre MMPs e TIMPs pode resultar em inflamação e desencadear uma resposta imune inespecífica, que pode ser danosa ao tecido hospedeiro (99). Além disso, a perda da sinalização mediada por TIMPs devido à redução em sua concentração, pode ter implicações significativas na patologia de distúrbios inflamatórios, doenças cardiovasculares e câncer, uma vez que a degradação descontrolada da ECM pode promover a inflamação crônica, remodelação vascular anormal e metástase (101).

Embora os papéis dos TIMPs possam ser atribuídos à inibição das MMPs, estes reguladores proteicos também exibem uma função na comunicação celular (102). O TIMP-1, por exemplo, possui atividade promotora do crescimento celular em queratinócitos humanos, enquanto o TIMP-2 exibe atividade potencializadora eritróide (103,104). Além disso, os terminais C dos TIMPs também desempenham um papel importante na interação com os receptores de superfície celular, que pode resultar na ativação de cascatas de sinalização intracelular, afetando o comportamento das células.

Existe uma interação fraca entre o TIMP-1 e a maioria das MMPs, onde os TIMPs não parecem diferenciar com facilidade as várias MMPs (106). Além disso, o TIMP-1 é capaz de se ligar à pró-gelatinase B, os TIMPs 2 e 4 tem afinidade pela pró-gelatinase A, enquanto o TIMP-3 se liga a ambos (107–109). O complexo entre os MT1-MMPs e o TIMP-2 atua como um “receptor” ligado à superfície celular para a ativação da pró-gelatinase A *in vivo* apresentando a proMMP-2 ligada de modo que uma molécula MT1-MMP não inibida

adjacente dê um primeiro corte no domínio PRO da MMP-2, seguido pela clivagem de ativação final por outra molécula de MMP-2 (110). A MMP-14 é um ativador particularmente eficiente, servindo presumivelmente como um exosítio específico da proMMP-2, enquanto a MMP-15 parece atuar em uma via alternativa independente do TIMP-2 (110).

Os TIMPs exibem variações nos tipos de complexos não inibitórios que formam, sendo essa interação mediada pelos seus domínios C-terminais. Por exemplo, o TIMP-2 demonstra forte afinidade com o zimogênio da MMP-2 (proMMP-2), resultando na formação de um complexo que desempenha um papel crucial na ativação da proMMP-2 na superfície celular. Em contraste, o TIMP-1 forma um tipo específico de complexo não inibitório sob essa mesma condição. (111,112). Diferentemente do TIMP-1, o TIMP-2 e o TIMP-3 demonstram ser inibidores eficazes das MMPs do tipo membrana (MT-MMPs). Além disso, apenas o TIMP-3 atua como um inibidor eficaz do fator de necrose tumoral (110).

Um biomimético de inibidores teciduais endógenos de metaloproteinases (TIMPs) foi desenvolvido através da introdução de três elementos de ligação a um tetrapolímero sintético, e após a avaliação da contribuição da composição, tamanho e forma dos polímeros que mimetizam TIMPs para a inibição de BaP1, uma metaloproteinase de veneno de cobra da classe PI (SVMP), foi observado que o TIMP abiótico é eficaz contra classes de SVMPs em veneno de cobra (113). Estes inibidores de metaloproteinases, e possíveis novos métodos podem ser capazes de neutralizar a atividade de enzimas específicas presentes no veneno de cobras, ajudando assim a mitigar os efeitos tóxicos causados por essas enzimas no organismo humano.

3. EVOLUÇÃO DAS MMPS PARA AS SVMPS

Um estudo investigou transcriptomas de 58 espécies de cobras om presas frontais descobriu que uma enzima diferente, metaloproteinase de matriz (MMP), é na verdade o componente dominante do veneno em três subfamílias (Tachymeninae, Xenodontinae e Conophiinae) de cobras de presas traseiras. as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) desempenhem um papel análogo ao das Snake Venom Metaoproteinases (SVMPs) no que diz respeito a ação proteolítico do veneno. Recentemente, foi identificado um novo subtipo de MMP altamente ativo, denominado svMMP, que se originou de forma independente em pelo menos três ocasiões a partir de um MMP-9 endógeno (114).

As svMMPs são proteínas únicas encontradas em venenos de cobra, que pertencem a uma antiga linhagem independente de proteínas dentro da classe Metzincinas de proteinases.

Elas desempenham funções importantes no veneno de cobra e têm propriedades catalíticas semelhantes às de outras metaloproteínas de matriz, mas com recursos adicionais que permitem se adaptar ao ambiente desejado do veneno (115,116). Sua origem evolutiva se distingue das demais proteínas pertencentes a essa classe, onde pesquisas recentes apontam para a possibilidade de que as svMMPs tenham emergido devido a um processo de divergência evolutiva que ocorreu há muitos milhões de anos, estabelecendo uma separação entre essas proteínas e as SVMPs tradicionais pertencentes à família das Matrixinas (117–119).

As cobras da família Dipsadidae, que são conhecidas por terem uma grande diversidade de espécies (115). Muitas cobras da família em questão possuem venenos que exibem uma notável atividade proteolítica e hemorrágica, particularmente dentro da subfamília Xenodontinae. Acredita-se que SVMPs desempenhem um papel influente na atividade proteolítica desses venenos. É importante observar que essas cobras compartilham semelhanças com víboras em relação à sua toxicidade, o que implica que representam um potencial risco para os seres humanos, caso os incidentes não sejam tratados de maneira apropriada. (120,121).

Há a expressão de transcritos que codificam MMP nas glândulas de veneno de cobras da família Dipsadidae, mais especificamente em Tachymeninae e Conophiinae, dentro da subfamília Xenodontinae. A expressão desses transcritos é altamente específica, o que significa que apenas as espécies dentro dessa subfamília possuem essas proteínas em seus venenos. Algumas espécies, como *Thamnodynastes strigatus* e *Erythrolamprus miliaris*, foram as primeiras a terem as svMMPs relatadas em seus venenos, mas com estudo atuais, muitos outros táxons também expressam essas proteínas em seus venenos (114).

Em resumo, os achados indicam que a seleção natural pode favorecer a otimização de atributos fenotípicos cruciais através de modificações em genes não homólogos, levando à produção de componentes bioquímicos alternativos. Isso demonstra a complexidade e a diversidade dos processos evolutivos envolvidos na adaptação de organismos a ambientes desafiadores (122).

4. SVMPs

As Snake Venom Metaloproteases (SVMPs) são enzimas dependentes da ligação com íons metálicos, geralmente zinco, para exercer suas funções. Estão distribuídas, em sua maioria, nos venenos de cobras da família Viperidae, mas também pode ser encontradas,

embora em concentrações mais baixas, em espécies das famílias Elapidae, Colubridae e Atractaspididae (10,123–125). As proteinases, incluindo as SVMPs e SVSPs, são consideradas os principais constituintes dos venenos de víboras e têm papéis importantes na indução de efeitos tóxicos no hospedeiro. Enquanto os SVSPs têm atividades específicas, como a interferência na cascata de coagulação e na regulação da pressão arterial, os SVMPs têm uma atividade mais ampla e são capazes de degradar a matriz extracelular, o que pode levar a hemorragias locais e outros efeitos tóxicos (126–128). São classificadas em 3 classes principais e 8 subclasses, que se diferem a partir da presença ou ausência de domínios não-catalíticos observados pelo transcriptoma ou proteínas isoladas do veneno (129).

A classe P-I é a menor SVMP e, do ponto de vista estrutural, também é a mais simples, contendo, em sua forma madura, apenas o domínio catalítico metaloproteinase, no qual está associado a sequência ligante de zinco. Além disso, são divididas em 2 subgrupos que levam em consideração o tipo de função que exercem: P-IA, que possui atividade hemorrágica e P-IB com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica (129). A classe P-II são particularmente semelhantes à P-I, entretanto com a adição de domínios de disintegrina à sua estrutura (129). Além disso, são classificadas em P-IIb, P-IIc, P-IId e P-IIe, que diferem entre si pela sequência de motivos e outros ligantes estruturais. Essas alterações também podem interferir na funcionalidade dessas subclasses de enzimas, dependendo da localização em que se encontram (130). Já a P-III é a classe de toxinas com maior complexidade estrutural e massa molecular que varia entre 60 e 100 kDa. É constituída por um pro-domínio, um domínio catalítico metaloprotease, além de domínios semelhantes a desintegrina (disintegrin-like) e ricos em cisteína (13). Devido a sua complexidade estrutural, foram classificadas em 4 subclasses que apresentam estruturas distintas: P-IIIa, P-IIIb, P-IIId, P-IIId (129).

As SVMPs atuam principalmente na degradação de componentes da matrix extracelular, proteínas plasmáticas e da cascata de coagulação, lhes conferindo diferentes atividades biológicas com a degradação de proteínas plasmáticas, de superfície celular e componentes da matrix extracelular (131,132). Além disso, essas enzimas podem interagir com receptores como as integrinas nas superfícies de plaquetas, fibroblastos e células endoteliais, ativando ou inibindo o processo de resposta celular. Portanto, as SVMPs tem um papel importante na fisiopatologia dos envenenamentos ofídicos, uma vez que essas ações induzem alterações sistêmicas significativas como distúrbios na coagulação sanguínea, agregação plaquetária e hemorragias (131). Além disso, atuam no local da inoculação do veneno ocasionando edema, dermonecrose, mionecrose, sangramentos, bolhas e uma forte reação inflamatória (133,134).

As SVMPs que apresentam maior complexidade e peso molecular, como as da classe P-III estão relacionadas com maior atividade hemorrágica, sendo capazes de induzir sangramentos sistêmicos além de locais, enquanto as de classe P-I se limitam a hemorragia local, principalmente pela degradação de componentes da membrana basal de capilares sanguíneos (130,133). As SVMPs de classe P-II, além da atividade hemorrágica, também estão associada a inibição de agregação plaquetária, enquanto as subclasse de P-III estão envolvidas em diversas atividades, incluindo hemorrágica, apoptótica, ativação de protrombina e ativação de fator X. Essa função diferenciada pode ser atribuída a diversidade estrutural nas toxinas, devido a presença de diferentes domínios funcionais em regiões distintas de uma mesma molécula (135).

Tabela 1 Metalloproteases do veneno de cobras (SVMP) e suas atividades biológicas

CLASSE DE SVMP	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	EXEMPLO	REFERÊNCIAS
P-I	Pró-inflamatória	BpirMP	(136)
	Fibrinolítica	Batroxase	(137)
	Apoptótica	Bap1	(138)
	Inibição de adesão celular	BpMP-II	(139)
	Inibição de angiogenese	BNP1	(140) (141)
	Ativação do sistema complemento Hemorrágica		
P-II	Hemorrágica	BlatH1	(142)
	Fibrinogenolítica	Stejnitin	(143)
	Fibrinolítica	CcMP-II	(144)
	Inibição de agregação plaquetária	BlatPII	(145)
	Apoptótica	Agkistin	(146)
P-III	Pró-inflamatória	Jararagina	(132)
	Necrótica	VaH3	(147)
	Hemorrágica	VaF1	(148)
	Fibrinogenolítica	SV-PAD-2	(149)
	Inibição de agregação plaquetária	HR-Ele-1	(150)
	Inibição de adesão celular	Basparin A VLAIP	(151)

4.1 Viperidae e as SVMPs

Para as toxinas presentes na cobras da família Viperidae, existem 24 famílias de proteínas em 10 espécies dessa família de serpentes, e as proteínas foram agrupadas em dez famílias principais. No geral, as mais abundantes em Viperideos são as SVMPs, seguidas pelas PLA 2 e SVSP (152). As SVMPs, PLA2, e SVSPs são algumas das principais classes de toxinas encontradas no veneno das cobras viperídeas, e essas toxinas compõem uma parte significativa do proteoma do veneno dessas cobras. Elas desempenham papéis críticos no envenenamento por picada dessas cobras e contribuem para os efeitos tóxicos (153,154).

Venenos de cobras viperídeas causam danos em tecidos no local da picada (hemorragia, necrose, bolhas e edema) e alterações sistêmicas associadas a sangramento, como coagulopatia, alterações hemodinâmicas e nefrotoxicidade (2,155). Além disso, causam danos proeminentes a outras células, vasos sanguíneos e componentes da MEC do tecido muscular, gerando assim um cenário patológico associado a uma regeneração muscular esquelética deficiente (156). O processo de regeneração muscular envolve uma série de eventos altamente orquestrados que acompanham a ativação e diferenciação descritas das células miogênicas para serem bem-sucedidos. Esses processos ocorrem concomitantemente com uma interação complexa e dinâmica de fenômenos inflamatórios locais e de remodelamento da MEC, no qual reações inflamatórias agudas podem interrompê-lo (157–159). Também ocorre interação entre mioblastos e miotubos, células inflamatórias e a população de células residentes da linhagem fibroadipogênica que, ao serem ativadas, contribuem para a síntese e remodelação da MEC, com envolvimento de MMPs e entre outros (160).

Os venenos das cobras da família Viperidae possuem quantidades significativas de SVMPs e serino proteinases, que têm a capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular. Além disso, a presença da enzima hialuronidase no veneno contribui para amplificar as alterações na MEC (161). Concomitantemente, o início da inflamação aguda no músculo necrótico desencadeia uma superexpressão de MMPs e outras proteinases inflamatórias endógenas. Essas enzimas desempenham um papel adicional na remodelação da matriz extracelular (161,162). Os estudos proteômicos realizados em exsudatos coletados de tecidos injetados com veneno bruto de *B. asper* e com SVMPs isoladas possibilitaram a identificação de fragmentos provenientes de diversas proteínas que compõem a matriz extracelular (MEC). Entre essas proteínas, incluem-se diversos tipos de colágenos, tanto fibrilares como não fibrilares, fibronectina, laminina, nidogênio, tetranectina, vitronectina, lumican, decorina, tenascina, trombospondina, fibrilina, proteoglicano de sulfato de condroitina e agrecano. Essa identificação reflete uma degradação generalizada da matriz extracelular (163–165).

A inflamação gerada pela ação das toxinas de cobras da família viperidae é iniciada pela capacidade de leucócitos locais e circulantes em reconhecerem diretamente os componentes da peçonha, além de produtos da degradação de componentes teciduais. Essa estimulação é responsável pela produção de mediadores inflamatórios presentes no plasma (sistema complemento) e produzidos por células (citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos), culminando em um infiltrado inflamatório de células e resultando em um edema proeminente

e a geração de dor, acompanhado de hemorragia e mionecrose (166,167). As cobras do gênero *Bothrops*, especialmente a espécie *B. atrox* possuem destaque por apresentarem efeitos locais mais intensos se comparados a outros gêneros, devido as grandes concentrações de SVMPs (168,169).

Os eventos inflamatórios causados pela peçonha de *Bothrops atrox* e seus componentes isolados são caracterizados pela migração de neutrófilos, monócitos e macrófagos e síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, como as citocinas (IL-12p70, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e INF- γ), quimiocinas (CXCL-8, CXCL-1 e CXCL-2), mediadores lipídicos (PGE2, LTB4 e CysLeucotrienos) e componentes do sistema complemento (C1q, C3a, C4a e C5a) (170–172). A reação inflamatória exacerbada induzida pela peçonha de viperídeos está diretamente associada à um caráter degenerativo, isto é, são responsáveis por um efeito adverso causado principalmente por neutrófilos e fagócitos pela produção de espécies reativas de oxigênio gerando lesões celulares (134).

Como consequência da ação das SVMPs hemorrágicas dessas alterações patológicas podem ser profundas, causando sofrimento não apenas para as vítimas, mas também para suas famílias e comunidades. A recuperação completa após uma picada de cobra viperídeo geralmente requer tratamento médico imediato e abrangente, incluindo a administração de antiveneno, reabilitação física e terapia para minimizar os efeitos adversos a longo prazo e melhorar a qualidade de vida dos afetados (173). Dados semelhantes foram obtidos com a análise de PLA2 miotóxicos isolados de diversos venenos de viperídeos, resultando numa condição inflamatória caracterizada pela produção de uma ampla gama de mediadores. Esses mediadores incluem MMPs, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento dentre outros, e podem ser detectados tanto em homogeneizados de tecidos quanto pela análise de exsudados coletados do tecido muscular (97,174,175).

4.2 Elapidae e as SVMPs

A família Epapidae conta com 17 espécies, podendo assim identificar 34 famílias de proteínas (152). AS 3FTxs, PLA2 e SVMPs, e constituem uma média de 87% do veneno. Essas três toxinas também foram relatadas como as proteínas mais dominantes de Elapidae (153). As 3FTx e as PLA2 nos venenos das cobras cuspidoras africanas, como as víboras *Bitis* spp. desempenham papéis significativos nos efeitos tóxicos desse veneno, incluindo a indução de necrose local do tecido (176). Os venenos das cobras elapídeas geralmente contêm neurotoxinas, que afetam o sistema nervoso (177).

Os venenos de cobras pertencentes à família Elapidae, em sua maioria, provocam predominantemente efeitos neurotóxicos, que culminam em paralisia neuromuscular. A ausência de tratamento adequado pode progredir para uma paralisia respiratória. Alguns venenos elapídeos também têm a capacidade de causar necrose localizada e miotoxicidade sistêmica (2,155). Em determinados cenários, como nas picadas de várias espécies de elapídeos terrestres australianos, cobras marinhas e algumas viperídeos, como a cascavel sul-americana, observa-se o desenvolvimento de miotoxicidade sistêmica, conhecida como rabdomiólise. (2,155,178).

O dano à membrana plasmática desencadeia um rápido influxo de íons cálcio do líquido extracelular, aproveitando um acentuado gradiente através dessa membrana. Isso, por sua vez, desencadeia uma série de eventos degenerativos intracelulares. Esses eventos incluem hipercontração das miofibrilas, dano às mitocôndrias e a ativação de proteinases intracelulares dependentes de cálcio, como as calpaínas e as PLA2s. Essas mudanças ocorrem rapidamente e levam a célula a um ponto além do qual não há retorno possível, resultando em danos celulares irreversíveis. (179,180). A degeneração aguda do músculo esquelético, conhecida como mionecrose, é uma ocorrência comum em envenenamentos provocados por picadas de cobras pertencentes à família Elapidae(2,155). No entanto, é relevante destacar que apenas alguns venenos de elapídeos, notadamente aqueles de determinadas espécies de cobras, como o gênero *Naja*, também têm a capacidade de causar danos teciduais locais. Esses danos são provocados pela ação de enzimas, como as PLA2s, e por citotoxinas, incluindo cardiotoxinas, que fazem parte da família 3FTx, característica dos venenos elapídeos. (181,182).

SVMPs e SVSPs detectadas no veneno *Naja annulifera* desencadeiam respostas inflamatórias e imunológicas levando ao reconhecimento pelo sistema imune, que contribui para as manifestações clínicas observadas durante o envenenamento, como a inflamação sistêmica observada em cães (183–185). E, embora detectadas em baixa abundância na análise proteômica, as SVMPs e SVSPs são capazes de clivar a cadeia alfa do fibrinogênio, o que sugere que estas proteinases podem contribuir para as alterações hemostáticas também relatadas (186). O ácido hialurônico é responsável pela formação de várias estruturas celulares por fazer parte da MEC, em contrapartida, as hialuronidases presentes nas toxinas da *Naja annulifera*, clivam essa estrutura permitindo à passagem do veneno do tecido a corrente sanguínea, aumentando a permeabilidade do tecido (187,188).

Os venenos das cobras elapídeas frequentemente resultam em mudanças patológicas significativas tanto no tecido muscular quanto no sistema nervoso. Essas transformações têm

como consequência sequelas que têm um impacto profundo na qualidade de vida das vítimas, gerando considerável sofrimento não apenas para elas, mas também para suas famílias e comunidades (173).

A capacidade de causar degradação proteolítica de fibrinogênio e fibrina, indução de apoptose, inibição da agregação plaquetária e hemorragia é uma característica comumente observada em muitos venenos de cobras e condiz com metaloproteinases de veneno de cobras (SVMPs), um dos dois tipos de proteinases bem caracterizadas encontradas em venenos de cobra (189). A maioria das pesquisas tradicionais sobre venenos de cobras tem se concentrado em famílias de cobras com presas frontais (Viperidae e Elapidae). No entanto, algumas espécies que causam envenenamento leve em humanos apresentam composições tóxicas em sua peçonha, como por exemplo as espécies das famílias de cobras sem presas frontais (Colubridae, Dipsadidae e Natricidae) que foram fortemente negligenciados durante muito tempo, apesar do conhecimento de inúmeras espécies capazes de ocasionar envenenamentos clinicamente relevantes (116). Em uma definição mais formal, uma cobra “colubridae” refere-se apenas a espécies pertencentes à família Colubridae, que atualmente inclui as subfamílias Natricinae, Pseudoxenodontinae, Dipsadinae, Scaphiodontophiinae, Calamariinae, Grayiinae e Colubrinae (190).

Essas cobras representam a parcela mais proeminente da biodiversidade de cobras, sendo a família Dipsadidae a mais diversificada em número de espécies (121). Assim como acontece com as víboras, foi documentado que os venenos das cobras da família Dipsadidae, especialmente dentro da subfamília Xenodontinae, exibem efeitos notáveis de natureza proteolítica e hemorrágica, sendo as SVMPs terem sido apontadas como as principais toxinas responsáveis pela sua atividade proteolítica (115,120,191). Em *Conopsis lineatus*, todas as cinco transcrições SVMP são da subclasse P-III (SVMPIIIs), que é típica entre cobras (190). A inexistência de proteínas tipo P-II, PI e desintegrinas de codificação curta nos venenos de colubrídeos é consistente com a teoria de que essas proteínas evoluíram posteriormente na família Viperidae a partir de um gene ancestral do tipo P-III, após a bifurcação dessa linhagem evolutiva (192,193).

Os colubrídeos possuem capacidade limitada de injetar veneno em humanos e, portanto, a atividade biológica dos venenos da maioria das espécies é totalmente desconhecida. Como todas as cobras, elas são predadoras, e o veneno é de importância para capturar, matar e/ou digerir a presa (120). O que significa que seus venenos podem ser ricos e diversos em tipos de proteínas. Para a maioria das espécies de colubrídeos, especialmente o gênero *Philodryas*

tendem a ser dominados por SVMPs, como alguns viperídeos, sendo tipicamente hemorrágicos ou citotóxicos representando aproximadamente 32% da composição da peçonha (194).

As cobras Colubrid pertencentes ao gênero *Philodryas*, difundidas em toda a América do Sul, apresentam lesões (inchaço, equimoses, sangramento transitório pelas perfurações no local da picada), semelhantes às produzidas pelas espécies *Bothrops* (195). Semelhante aos Colubrídeos, os venenos de Dipsadidae e Natricidae também foram relatados como possuidores de altos efeitos proteolíticos e hemorrágicos, tendo as SVMPs como o principal agente de sua atividade proteolítica, sendo a diferença na distribuição dos subgrupos de SVMPs (120).

Uma outra grande descoberta em espécies pertencentes a família Dipsadidae, é que o tipo mais abundante de transcrito (47%) e também o principal tipo de proteína no veneno correspondem a um tipo de MMP, que não está relacionada com as SVMP encontradas em todas as famílias de cobras, sendo a MMP-9 sugerida como componente do veneno e que eles são proteoliticamente ativas (115). No entanto, as composições de veneno de cobras com presas traseiras ainda são amplamente desconhecidas, limitando nossa capacidade de descrever os venenos dessas cobras.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O envenenamento por picada de cobra, especialmente por serpentes da família Viperidae, continua a ser um desafio significativo para a saúde pública, afetando principalmente comunidades em regiões tropicais e subtropicais. As metaloproteinases de veneno de cobra (SVMPs) desempenham um papel central na patogênese do envenenamento, contribuindo para a degradação da matriz extracelular e desencadeando respostas inflamatórias que podem levar a complicações severas. A interação entre SVMPs, metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) é crucial para entender os mecanismos de dano tecidual e os processos de cicatrização. A pesquisa sobre as diferentes classes de venenos, incluindo aqueles de cobras menos estudadas, como as da família Dipsadidae, é essencial para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e para a melhoria da resposta médica a esses envenenamentos.

As perspectivas na pesquisa sobre envenenamentos por picadas de cobra incluem a ampliação da Pesquisa sobre Venenos. É necessário um foco maior nas cobras de famílias menos estudadas, como Dipsadidae e Colubridae, para compreender melhor a diversidade e a

toxicidade de seus venenos. O desenvolvimento de antivenenos eficazes, que possam neutralizar uma gama mais ampla de toxinas, incluindo as SVMPs e suas variantes, é vital para melhorar os resultados clínicos após envenenamentos. Investigações sobre a evolução das metaloproteinases e suas adaptações podem fornecer insights sobre como esses venenos se desenvolveram e suas implicações na ecologia das serpentes. A pesquisa em biomiméticos e inibidores sintéticos de metaloproteinases pode abrir novas possibilidades para o tratamento de envenenamentos, reduzindo os efeitos adversos das toxinas.

Além disso, é necessário aumentar a conscientização nas comunidades rurais sobre os riscos de picadas de cobra e as medidas preventivas que podem ajudar a reduzir a incidência de envenenamentos. Essas direções não apenas contribuirão para o avanço do conhecimento científico, mas também para a melhoria da saúde pública e da qualidade de vida das comunidades afetadas.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Todos os protocolos e formulários de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FMT-HVD (CEP/FMT-HVD processo #492.892/2014). Os pacientes foram tratados de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde.

CONFLICTING INTEREST

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

FUNDING

O apoio financeiro foi concedido sob a forma de subvenções da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - #002/2008, #007/2018 and #005/2019, PAMEQ Program - #004/2019, PAPAC Program - #005/2019 and PECTI-AM/SAÚDE Program #004/2020), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Lalloo DG. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. *PLoS Negl Trop Dis* (2009) 3:e569. doi:

- 10.1371/journal.pntd.0000569
2. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. *Nat Rev* (2017) 3: doi: 10.1038/nrdp.2017.63
 3. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG, de Silva HJ. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Med* (2008) 5:e218. doi: 10.1371/journal.pmed.0050218
 4. Chippaux JP. Snake-bites: Appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ* (1998) 76:515–524.
 5. Doley R, Kini RM. Protein complexes in snake venom. *Cell Mol Life Sci* (2009) 66:2851–2871. doi: 10.1007/s00018-009-0050-2
 6. Vonk FJ, Jackson K, Doley R, Madaras F, Mirtschin PJ, Vidal N. Snake venom: From fieldwork to the clinic. *BioEssays* (2011) 33:269–279. doi: 10.1002/bies.201000117
 7. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM. Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett* (2009) 583:1736–1743. doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.029
 8. Sousa LF, Nicolau CA, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, Mourão RH V., Lima-dos-Santos I, Sano-Martins IS, Chalkidis HM, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) 7: doi: 10.1371/journal.pntd.0002442
 9. Takahashi T, Ohsaka A. Purification and some properties of two hemorrhagic principles (HR2a and HR2b) in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*; complete separation of the principles from proteolytic activity. *BBA - Protein Struct* (1970) 207:65–75. doi: 10.1016/0005-2795(70)90137-6
 10. Tasoulis T, Isbister GK. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins (Basel)* (2017) 9: doi: 10.3390/toxins9090290
 11. Fox JW, Serrano SMT. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* (2005) 45:969–985. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.012
 12. Hite LA, Jia L-G, Bjarnason JB, Fox JW. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinase.pdf. *Arch Biochem Biophys* (1994) 308:182–191.

13. Bode W, Gomis-Rüth FX, Stöckler W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *FEBS Lett* (1993) 331:134–140. doi: 10.1016/0014-5793(93)80312-I
14. Brinckerhoff CE, Matrisian LM. 2002 Brinckerhoff Matrisian *NatRevMolCellBiol.* (2002) 3:
15. Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinase function. *Biochem Soc Symp* (2003) 70:1–14. doi: 10.1042/bss0700001
16. Huang W, Suzuki K, Nagase H, Arumugam S, Van Doren SR, Brew K. Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in *E. coli*. *FEBS Lett* (1996) 384:155–161. doi: 10.1016/0014-5793(96)00304-3
17. GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1962) 48:1014–1022. doi: 10.1073/pnas.48.6.1014
18. NAGASE H, VISSSE R, MURPHY G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* (2006) 69:562–573. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002
19. Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The Biochemical, Biological, and Pathological Kaleidoscope of Cell Surface Substrates Processed by Matrix Metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (2007) 42:113–185. doi: 10.1080/10409230701340019
20. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Digests Interstitial Collagens and Other Extracellular Matrix Macromolecules. *J Biol Chem* (1997) 272:2446–2451. doi: 10.1074/jbc.272.4.2446
21. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Gehron Robey P, Poole AR, Pidoux I, et al. MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate Collagen Turnover. *Cell* (1999) 99:81–92. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80064-1
22. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* (2019) 19:369–382. doi: 10.1038/s41577-019-0127-6

23. Ayuk SM, Abrahamse H, Houreld NN. The Role of Matrix Metalloproteinases in Diabetic Wound Healing in relation to Photobiomodulation. *J Diabetes Res* (2016) 2016:1–9. doi: 10.1155/2016/2897656
24. Chung L, Dinakarandian D, Yoshida N, Lauer-Fields JL, Fields GB, Visse R, Nagase H. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis. *EMBO J* (2004) 23:3020–3030. doi: 10.1038/sj.emboj.7600318
25. Björklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* (2005) 1755:37–69. doi: 10.1016/j.bbcan.2005.03.001
26. Koyama H, Iwata H, Kuwabara Y, Iwase H, Kobayashi S, Fujii Y. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. *Eur J Cancer* (2000) 36:2164–2170. doi: 10.1016/S0959-8049(00)00297-5
27. Morozevich G, Kozlova N, Cheglakov I, Ushakova N, Berman A. Integrin $\alpha 5\beta 1$ controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity. *Cell Cycle* (2009) 8:2219–2225. doi: 10.4161/cc.8.14.8980
28. Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M. Novel Transcription Factor-Like Function of Human Matrix Metalloproteinase 3 Regulating the CTGF/CCN2 Gene. *Mol Cell Biol* (2008) 28:2391–2413. doi: 10.1128/MCB.01288-07
29. Si-Tayeb K, Monvoisin A, Mazzocco C, Lepreux S, Decossas M, Cubel G, Taras D, Blanc J-F, Robinson DR, Rosenbaum J. Matrix Metalloproteinase 3 Is Present in the Cell Nucleus and Is Involved in Apoptosis. *Am J Pathol* (2006) 169:1390–1401. doi: 10.2353/ajpath.2006.060005
30. Li Y, Kilani RT, Rahmani-Neishaboer E, Jalili RB, Ghahary A. Kynurenine Increases Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Expression in Cultured Dermal Fibroblasts and Improves Scarring In Vivo. *J Invest Dermatol* (2014) 134:643–650. doi: 10.1038/jid.2013.303
31. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2004) 4:617–629. doi:

- 10.1038/nri1418
32. Acioglu E, Yigit Ö, Alkan Z, Server EA, Uzun H, Gelisgen R. The role of matrix metalloproteinases in recurrent tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* (2010) 74:535–539. doi: 10.1016/j.ijporl.2010.02.016
 33. Jiang T, Xie P, Liu H. Circulating Anti–Matrix Metalloproteinase-7 Antibodies May Be a Potential Biomarker for Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* (2016) 74:650–657. doi: 10.1016/j.joms.2015.09.016
 34. Nwomeh BC, Liang H-X, Diegelmann RF, Cohen IK, Yager DR. Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Repair Regen* (1998) 6:127–134. doi: 10.1046/j.1524-475X.1998.60206.x
 35. Nagase H, Fushimi K. Elucidating the Function of Non catalytic Domains of Collagenases and Aggrecanases. *Connect Tissue Res* (2008) 49:169–174. doi: 10.1080/03008200802151698
 36. Detwiller KY, Smith TL, Mace JC, Trune DR, Sautter NB. Steroid-independent upregulation of matrix metalloproteinase 9 in chronic rhinosinusitis patients with radiographic evidence of osteitis. *Int Forum Allergy Rhinol* (2013) 3:364–368. doi: 10.1002/alr.21135
 37. Olszewska E, Matulka M, Mroczko B, Pryczynicz A, Kemon A, Szmitkowski M, Mierzwinski J, Pietrewicz T. Diagnostic value of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 in cholesteatoma. *Histol Histopathol* (2016) 31:307–15. doi: 10.14670/HH-11-677
 38. Rohani MG, McMahan RS, Razumova M V., Hertz AL, Cieslewicz M, Pun SH, Regnier M, Wang Y, Birkland TP, Parks WC. MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages. *J Invest Dermatol* (2015) 135:2377–2384. doi: 10.1038/jid.2015.167
 39. Sokai A, Handa T, Tanizawa K, Oga T, Uno K, Tsuruyama T, Kubo T, Ikezoe K, Nakatsuka Y, Tanimura K, et al. Matrix metalloproteinase-10: a novel biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* (2015) 16:120. doi: 10.1186/s12931-015-0280-9
 40. Hirakawa S, Kojima T, Obata K, Okabayashi T, Yokota S, Nomura K, Obonai T, Fuchimoto J, Himi T, Tsutsumi H, et al. Marked induction of matrix metalloproteinase-

- 10 by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. *J Med Virol* (2013) 85:2141–2150. doi: 10.1002/jmv.23718
41. Li Z, Ding S, Zhong Q, Li G, Zhang Y, Huang XC. Significance of MMP11 and P14(ARF) expressions in clinical outcomes of patients with laryngeal cancer. *Int J Clin Exp Med* (2015) 8:15581–90.
 42. Lin C-W, Yang S-F, Chuang C-Y, Lin H-P, Hsin C-H. Association of matrix metalloproteinase-11 polymorphisms with susceptibility and clinicopathologic characteristics for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* (2015) 37:1425–1431. doi: 10.1002/hed.23771
 43. ZHANG X, HUANG S, GUO J, ZHOU L, YOU L, ZHANG T, ZHAO Y. Insights into the distinct roles of MMP-11 in tumor biology and future therapeutics (Review). *Int J Oncol* (2016) 48:1783–1793. doi: 10.3892/ijo.2016.3400
 44. Kim JM, Kim HJ, Koo BS, Rha KS, Yoon Y-H. Expression of matrix metalloproteinase-12 is correlated with extracapsular spread of tumor from nodes with metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* (2013) 270:1137–1142. doi: 10.1007/s00405-012-2161-x
 45. Marchant DJ, Bellac CL, Moraes TJ, Wadsworth SJ, Dufour A, Butler GS, Bilawchuk LM, Hendry RG, Robertson AG, Cheung CT, et al. A new transcriptional role for matrix metalloproteinase-12 in antiviral immunity. *Nat Med* (2014) 20:493–502. doi: 10.1038/nm.3508
 46. Li W, Li J, Wu Y, Rancati F, Vallese S, Raveglia L, Wu J, Hotchandani R, Fuller N, Cunningham K, et al. Identification of an Orally Efficacious Matrix Metalloprotease 12 Inhibitor for Potential Treatment of Asthma. *J Med Chem* (2009) 52:5408–5419. doi: 10.1021/jm900809r
 47. Chelluboina B, Klopfenstein JD, Pinson DM, Wang DZ, Vemuganti R, Veeravalli KK. Matrix Metalloproteinase-12 Induces Blood–Brain Barrier Damage After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* (2015) 46:3523–3531. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011031
 48. Dalvie D, Cosker T, Boyden T, Zhou S, Schroeder C, Potchoiba MJ. Metabolism Distribution and Excretion of a Matrix Metalloproteinase-13 Inhibitor, 4-[4-(4-Fluorophenoxy)-benzenesulfonylamino]tetrahydropyran-4-carboxylic Acid

- Hydroxyamide (CP-544439), in Rats and Dogs: Assessment of the Metabolic Profile of CP-544439 in. *Drug Metab Dispos* (2008) 36:1869–1883. doi: 10.1124/dmd.108.022566
49. Mashimo Y, Sakurai-Yageta M, Watanabe M, Arima T, Morita Y, Inoue Y, Sato K, Nishimuta T, Suzuki S, Watanabe H, et al. Induction of the Matrix Metalloproteinase 13 Gene in Bronchial Epithelial Cells by Interferon and Identification of its Novel Functional Polymorphism. *Inflammation* (2015) doi: 10.1007/s10753-015-0291-1
 50. Johnson JL, Jenkins NP, Huang W-C, Di Gregoli K, Sala-Newby GB, Scholtes VPW, Moll FL, Pasterkamp G, Newby AC. Relationship of MMP-14 and TIMP-3 Expression with Macrophage Activation and Human Atherosclerotic Plaque Vulnerability. *Mediators Inflamm* (2014) 2014:1–17. doi: 10.1155/2014/276457
 51. Radichev IA, Remacle AG, Shiryaev SA, Purves AN, Johnson SL, Pellecchia M, Strongin AY. Biochemical Characterization of the Cellular Glycosylphosphatidylinositol-linked Membrane Type-6 Matrix Metalloproteinase. *J Biol Chem* (2010) 285:16076–16086. doi: 10.1074/jbc.M110.107094
 52. Zhang H, Liu M, Sun Y, Lu J. MMP-14 can serve as a prognostic marker in patients with supraglottic cancer. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology* (2009) 266:1427–1434. doi: 10.1007/s00405-009-0943-6
 53. Sun Y, Li Y. Expression of mRNA for membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human laryngeal cancer. *Chinese Med Sci J = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih* (2004) 19:170–3. doi: 15506641
 54. Hadchouel A, Decobert F, Franco-Montoya M-L, Halphen I, Jarreau P-H, Boucherat O, Martin E, Benachi A, Amselem S, Bourbon J, et al. Matrix Metalloproteinase Gene Polymorphisms and Bronchopulmonary Dysplasia: Identification of MMP16 as a New Player in Lung Development. *PLoS One* (2008) 3:e3188. doi: 10.1371/journal.pone.0003188
 55. Tatti O, Gucciardo E, Pekkonen P, Holopainen T, Louhimo R, Repo P, Maliniemi P, Lohi J, Rantanen V, Hautaniemi S, et al. MMP16 Mediates a Proteolytic Switch to Promote Cell–Cell Adhesion, Collagen Alignment, and Lymphatic Invasion in Melanoma. *Cancer Res* (2015) 75:2083–2094. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1923
 56. Liu J, van Mil A, Aguor ENE, Siddiqi S, Vrijssen K, Jaksani S, Metz C, Zhao J,

- Strijkers GJ, Doevendans PA, et al. MiR-155 inhibits cell migration of human cardiomyocyte progenitor cells (hCMPCs) via targeting of MMP-16. *J Cell Mol Med* (2012) 16:2379–2386. doi: 10.1111/j.1582-4934.2012.01551.x
57. Puente XS, Pendás AM, Llano E, Velasco G, López-Otín C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* (1996) 56:944–9.
58. Sohail A, Sun Q, Zhao H, Bernardo MM, Cho J-A, Fridman R. MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Cancer Metastasis Rev* (2008) 27:289–302. doi: 10.1007/s10555-008-9129-8
59. Tonge D, Zhu N, Lynham S, Leclere P, Snape A, Brewer A, Schlomann U, Ferdous T, Tennyson C, Bartsch JW, et al. Axonal growth towards *Xenopus* skin in vitro is mediated by matrix metalloproteinase activity. *Eur J Neurosci* (2013) 37:519–531. doi: 10.1111/ejn.12075
60. Tomlinson ML, Garcia-Morales C, Abu-Elmagd M, Wheeler GN. Three matrix metalloproteinases are required in vivo for macrophage migration during embryonic development. *Mech Dev* (2008) 125:1059–1070. doi: 10.1016/j.mod.2008.07.005
61. Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Ludwig A, Proksch E, Titz B, Sedlacek R. Matrix metalloproteinase 19 processes the laminin 5 gamma 2 chain and induces epithelial cell migration. *C Cell Mol Life Sci* (2005) 62:870–880. doi: 10.1007/s00018-005-4478-8
62. Brauer R, Beck IM, Roderfeld M, Roeb E, Sedlacek R. Matrix metalloproteinase-19 inhibits growth of endothelial cells by generating angiostatin-like fragments from plasminogen. *BMC Biochem* (2011) 12:38. doi: 10.1186/1471-2091-12-38
63. Jara P, Calyeca J, Romero Y, Plácido L, Yu G, Kaminski N, Maldonado V, Cisneros J, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinase (MMP)-19-deficient fibroblasts display a profibrotic phenotype. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* (2015) 308:L511–L522. doi: 10.1152/ajplung.00043.2014
64. Jirouskova M, Zbodakova O, Gregor M, Chalupsky K, Sarnova L, Hajduch M, Ehrmann J, Jirkovska M, Sedlacek R. Hepatoprotective Effect of MMP-19 Deficiency in a Mouse Model of Chronic Liver Fibrosis. *PLoS One* (2012) 7:e46271. doi:

- 10.1371/journal.pone.0046271
65. Stracke JO, Fosang AJ, Last K, Mercuri FA, Pendás AM, Llano E, Perris R, Di Cesare PE, Murphy G, Knäuper V. Matrix metalloproteinases 19 and 20 cleave aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP). *FEBS Lett* (2000) 478:52–56. doi: 10.1016/S0014-5793(00)01819-6
 66. Barron LA, Giardina JB, Granger JP, Khalil RA. High-Salt Diet Enhances Vascular Reactivity in Pregnant Rats With Normal and Reduced Uterine Perfusion Pressure. *Hypertension* (2001) 38:730–735. doi: 10.1161/01.HYP.38.3.730
 67. Zhao Z, Yan L, Li S, Sun H, Zhou Y, Li X. Increased MMP-21 expression in esophageal squamous cell carcinoma is associated with progression and prognosis. *Med Oncol* (2014) 31:91. doi: 10.1007/s12032-014-0091-8
 68. Suomela S, Koljonen V, Skoog T, Kukko H, Böhling T, Saarialho-Kere U. Expression of MMP-10, MMP-21, MMP-26, and MMP-28 in Merkel cell carcinoma. *Virchows Arch* (2009) 455:495–503. doi: 10.1007/s00428-009-0856-1
 69. Ahokas K, Lohi J, Illman SA, Llano E, Elomaa O, Impola U, Karjalainen-Lindsberg M-L, Saarialho-Kere U. Matrix Metalloproteinase-21 Is Expressed Epithelially During Development and in Cancer and Is Up-Regulated by Transforming Growth Factor- β 1 in Keratinocytes. *Lab Invest* (2003) 83:1887–1899. doi: 10.1097/01.LAB.0000106721.86126.39
 70. Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ. Isolation and Characterization of Two Novel Metalloproteinase Genes Linked to the Cdc2L Locus on Human Chromosome 1p36.3. *Genomics* (1998) 52:101–106. doi: 10.1006/geno.1998.5401
 71. Hegedüs L, Cho H, Xie X, Eliceiri GL. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *J Cell Physiol* (2008) 216:480–485. doi: 10.1002/jcp.21417
 72. Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C. Cloning and Characterization of Human MMP-23, a New Matrix Metalloproteinase Predominantly Expressed in Reproductive Tissues and Lacking Conserved Domains in Other Family Members. *J Biol Chem* (1999) 274:4570–4576. doi: 10.1074/jbc.274.8.4570
 73. Folgueras AR, Valdés-Sánchez T, Llano E, Menéndez L, Baamonde A, Denlinger BL, Belmonte C, Juárez L, Lastra A, García-Suárez O, et al. Metalloproteinase MT5-MMP

- is an essential modulator of neuro-immune interactions in thermal pain stimulation. *Proc Natl Acad Sci* (2009) 106:16451–16456. doi: 10.1073/pnas.0908507106
74. Llano E, Pendás AM, Freije JP, Nakano A, Knäuper V, Murphy G, López-Otin C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* (1999) 59:2570–6.
 75. Komori K, Nonaka T, Okada A, Kinoh H, Hayashita-Kinoh H, Yoshida N, Yana I, Seiki M. Absence of mechanical allodynia and A β -fiber sprouting after sciatic nerve injury in mice lacking membrane-type 5 matrix metalloproteinase. *FEBS Lett* (2004) 557:125–128. doi: 10.1016/S0014-5793(03)01458-3
 76. Porlan E, Martí-Prado B, Morante-Redolat JM, Consiglio A, Delgado AC, Kypta R, López-Otín C, Kirstein M, Fariñas I. MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nat Cell Biol* (2014) 16:629–638. doi: 10.1038/ncb2993
 77. Fortin CF, Sohail A, Sun Q, McDonald PP, Fridman R, Fülöp T. MT6-MMP is present in lipid rafts and faces inward in living human PMNs but translocates to the cell surface during neutrophil apoptosis. *Int Immunol* (2010) 22:637–649. doi: 10.1093/intimm/dxq048
 78. Velasco G, Cal S, Merlos-Suárez A, Ferrando AA, Alvarez S, Nakano A, Arribas J, López-Otín C. Human MT6-matrix metalloproteinase: identification, progelatinase A activation, and expression in brain tumors. *Cancer Res* (2000) 60:877–82. doi: 10706098
 79. Uría JA, López-Otín C. Matrilysin-2, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res* (2000) 60:4745–51.
 80. Gutschalk CM, Yanamandra AK, Linde N, Meides A, Depner S, Mueller MM. <sc>GM-CSF</sc> enhances tumor invasion by elevated <sc>MMP</sc> -2, -9, and -26 expression. *Cancer Med* (2013) 2:117–129. doi: 10.1002/cam4.20
 81. Bar-Or A. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* (2003) 126:2738–2749. doi: 10.1093/brain/awg285

82. Cominelli A, Gaide Chevronnay HP, Lemoine P, Courtoy PJ, Marbaix E, Henriët P. Matrix metalloproteinase-27 is expressed in CD163+/CD206+ M2 macrophages in the cycling human endometrium and in superficial endometriotic lesions. *MHR Basic Sci Reprod Med* (2014) 20:767–775. doi: 10.1093/molehr/gau034
83. Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer* (2009) 9:188. doi: 10.1186/1471-2407-9-188
84. Lohi J, Wilson CL, Roby JD, Parks WC. Epilysin, a Novel Human Matrix Metalloproteinase (MMP-28) Expressed in Testis and Keratinocytes and in Response to Injury. *J Biol Chem* (2001) 276:10134–10144. doi: 10.1074/jbc.M001599200
85. Ma Y, Halade G V., Zhang J, Ramirez TA, Levin D, Voorhees A, Jin Y-F, Han H-C, Manicone AM, Lindsey ML. Matrix Metalloproteinase-28 Deletion Exacerbates Cardiac Dysfunction and Rupture After Myocardial Infarction in Mice by Inhibiting M2 Macrophage Activation. *Circ Res* (2013) 112:675–688. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300502
86. Padmavati P, Savita S, Shivaprasad BM, Kripal K, Rithesh K. mRNA Expression of MMP-28 (Epilysin) in Gingival Tissues of Chronic and Aggressive Periodontitis Patients: A Reverse Transcriptase PCR Study. *Dis Markers* (2013) 35:113–118. doi: 10.1155/2013/653982
87. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res* (2003) 92:827–839. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D
88. Gall A-L, Ruff M, Kannan R, Cuniassè P, Yiotakis A, Dive V, Rio M-C, Basset P, Moras D. Crystal structure of the stromelysin-3 (MMP-11) catalytic domain complexed with a phosphinic inhibitor mimicking the transition-state¹Edited by R. Huber. *J Mol Biol* (2001) 307:577–586. doi: 10.1006/jmbi.2001.4493
89. Hannocks M-J, Zhang X, Gerwien H, Chashchina A, Burmeister M, Korpos E, Song J, Sorokin L. The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes. *Matrix Biol* (2019) 75–76:102–113. doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.007
90. Oh C, Dong Y, Liu H, Thompson LP. Intrauterine hypoxia upregulates

- proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in fetal guinea pig hearts. *Am J Obstet Gynecol* (2008) 199:78.e1-78.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2007.12.004
91. Liang Y, Yang N, Pan G, Jin B, Wang S, Ji W. Elevated IL-33 promotes expression of MMP2 and MMP9 via activating STAT3 in alveolar macrophages during LPS-induced acute lung injury. *Cell Mol Biol Lett* (2018) 23:52. doi: 10.1186/s11658-018-0117-x
 92. Gaffney J, Solomonov I, Zehorai E, Sagi I. Multilevel regulation of matrix metalloproteinases in tissue homeostasis indicates their molecular specificity in vivo. *Matrix Biol* (2015) 44–46:191–199. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.012
 93. Mohammed FF. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2003) 62:43ii – 47. doi: 10.1136/ard.62.suppl_2.ii43
 94. Nissinen L, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* (2014) 1840:2571–2580. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.03.007
 95. Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Ramírez B, Silva C, Rotellar F, Gil MJ, Cienfuegos JA, Salvador J, Frühbeck G. Increased adipose tissue expression of lipocalin-2 in obesity is related to inflammation and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activities in humans. *J Mol Med* (2009) 87:803–813. doi: 10.1007/s00109-009-0486-8
 96. Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, Tinelli C, Salvadeo SAT, Ciccarelli L, Piccinni MN, Gravina A, Ramondetti F, Maffioli P, et al. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Levels in Obese Patients. *Endothelium* (2008) 15:219–224. doi: 10.1080/10623320802228815
 97. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CFP, Fernández CM, Díaz C, Gutiérrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm* (2002) 11:121–128. doi: 10.1080/09629350220131980
 98. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* (1991) 5:2145–2154. doi: 10.1096/fasebj.5.8.1850705
 99. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* (2000) 1477:267–283. doi: 10.1016/S0167-4838(99)00279-4
 100. Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (2001) 45:101–106. doi: 10.1002/1529-0131(200102)45:1<101::AID-

ANR90>3.0.CO;2-7

101. Gomis-R`th F-X, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, et al. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* (1997) 389:77–81. doi: 10.1038/37995
102. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1477:267–83. doi: 10.1016/s0167-4838(99)00279-4
103. Bertaux B, Hornebeck W, Eisen AZ, Dubertret L. Growth Stimulation of Human Keratinocytes by Tissue Inhibitor of Metalloproteinases. *J Invest Dermatol* (1991) 97:679–685. doi: 10.1111/1523-1747.ep12483956
104. Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E, Iwata K. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett* (1992) 298:29–32. doi: 10.1016/0014-5793(92)80015-9
105. Moore CS, Crocker SJ. An Alternate Perspective on the Roles of TIMPs and MMPs in Pathology. *Am J Pathol* (2012) 180:12–16. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.008
106. Butler GS, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G. Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 Interacts with Both the N- and C-terminal Domains of Gelatinases A and B. *J Biol Chem* (1999) 274:10846–10851. doi: 10.1074/jbc.274.16.10846
107. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase. *J Biol Chem* (1995) 270:5331–5338. doi: 10.1074/jbc.270.10.5331
108. Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, Akizawa T, Seiki M. Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* (1996) 56:2535–8.
109. Butler GS, Will H, Atkinson SJ, Murphy G. Membrane-Type-2 Matrix Metalloproteinase Can Initiate the Processing of Progelatinase A and is Regulated by the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Eur J Biochem* (1997) 244:653–657. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00653.x
110. Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin

- AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin alphavbeta3 promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* (2001) 263:209–23. doi: 10.1006/excr.2000.5118
111. Nagase H. Cell surface activation of progelatinase A (proMMP-2) and cell migration. *Cell Res* (1998) 8:179–186. doi: 10.1038/cr.1998.18
112. Murphy G, Knäuper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the “hemopexin” domain? *Matrix Biol* (1997) 15:511–518. doi: 10.1016/S0945-053X(97)90025-1
113. Nakamoto M, Escalante T, Gutiérrez JM, Shea KJ. A Biomimetic of Endogenous Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Inhibition Mechanism and Contribution of Composition, Polymer Size, and Shape to the Inhibitory Effect. *Nano Lett* (2021) 21:5663–5670. doi: 10.1021/acs.nanolett.1c01357
114. Bayona-Serrano JD, Viala VL, Rautsaw RM, Schramer TD, Barros-Carvalho GA, Nishiyama MY, Freitas-de-Sousa LA, Moura-da-Silva AM, Parkinson CL, Grazziotin FG, et al. Replacement and Parallel Simplification of Nonhomologous Proteinases Maintain Venom Phenotypes in Rear-Fanged Snakes. *Mol Biol Evol* (2020) 37:3563–3575. doi: 10.1093/molbev/msaa192
115. Ching ATC, Paes Leme AF, Zelanis A, Rocha MMT, Furtado M de FD, Silva DA, Trugilho MRO, da Rocha SLG, Perales J, Ho PL, et al. Venomics Profiling of *Thamnodynastes strigatus* Unveils Matrix Metalloproteinases and Other Novel Proteins Recruited to the Toxin Arsenal of Rear-Fanged Snakes. *J Proteome Res* (2012) 11:1152–1162. doi: 10.1021/pr200876c
116. Junqueira-de-Azevedo I, Campos P, Ching A, Mackessy S. Colubrid Venom Composition: An -Omics Perspective. *Toxins (Basel)* (2016) 8:230. doi: 10.3390/toxins8080230
117. Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* (1998) 12:1075–95.
118. Huxley-Jones J, Clarke T-K, Beck C, Toubaris G, Robertson DL, Boot-Handford RP. The evolution of the vertebrate metzincins; insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evol Biol* (2007) 7:63. doi: 10.1186/1471-2148-7-63
119. Stöcker W, Grams F, Reinemer P, Bode W, Baumann U, Gomis-Rüth F-X, McKay DB.

- The metzincins - Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. *Protein Sci* (2008) 4:823–840. doi: 10.1002/pro.5560040502
120. Acosta O, Leiva L., Peichoto M., Maruñak S, Teibler P, Rey L. Hemorrhagic activity of the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. *Toxicon* (2003) 41:1007–1012. doi: 10.1016/S0041-0101(03)00074-6
 121. UETZ P. The original descriptions of reptiles. *Zootaxa* (2010) 2334:59. doi: 10.11646/zootaxa.2334.1.3
 122. Junqueira-de-Azevedo ILM, Bastos CMV, Ho PL, Luna MS, Yamanouye N, Casewell NR. Venom-Related Transcripts from *Bothrops jararaca* Tissues Provide Novel Molecular Insights into the Production and Evolution of Snake Venom. *Mol Biol Evol* (2015) 32:754–766. doi: 10.1093/molbev/msu337
 123. Quinton L, Le Caer JP, Phan G, Ligny-Lemaire C, Bourdais-Jomaron J, Ducancel F, Chamot-Rooke J. Characterization of toxins within crude venoms by combined use of Fourier transform mass spectrometry and cloning. *Anal Chem* (2005) 77:6630–6639. doi: 10.1021/ac050575k
 124. Ching ATC, Rocha MMT, Paes Leme AF, Pimenta DC, de Fátima D. Furtado M, Serrano SMT, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo ILM. Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. *FEBS Lett* (2006) 580:4417–4422. doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.010
 125. Tasoulis T, Wang CR, Sumner J, Dunstan N, Pukala TL, Isbister GK. The Unusual Metalloprotease-Rich Venom Proteome of the Australian Elapid Snake *Hoplocephalus stephensii*. *Toxins (Basel)* (2022) 14:1–21. doi: 10.3390/toxins14050314
 126. Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* (2009) 54:958–975. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.01.038
 127. Serrano SMT, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* (2005) 45:1115–1132. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.020

128. Fox JW, Serrano SMT. Exploring snake venom proteomes: Multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* (2008) 8:909–920. doi: 10.1002/pmic.200700777
129. Fox JW, Serrano SMT. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J* (2008) 275:3016–3030. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x
130. Takeda S. ADAM and ADAMTS family proteins and snake venom metalloproteinases: A structural overview. *Toxins (Basel)* (2016) 8:8–11. doi: 10.3390/toxins8050155
131. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: Biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* (2005) 45:997–1011. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.029
132. Laing GD, Clissa PB, Theakston RDG, Moura-da-Silva AM, Taylor MJ. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. *Eur J Immunol* (2003) 33:3458–3463. doi: 10.1002/eji.200324475
133. Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A, Herrera C, Fox JW. A comprehensive view of the structural and functional alterations of extracellular matrix by snake venom metalloproteinases (SVMPs): Novel perspectives on the pathophysiology of envenoming. *Toxins (Basel)* (2016) 8: doi: 10.3390/toxins8100304
134. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Herrera C, Fernández J, Lomonte B, Fox JW. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. *Toxicon* (2018) 148:123–131. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.016
135. Markland FS, Swenson S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* (2013) 62:3–18. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.004
136. Bernardes CP, Menaldo DL, Mamede CCN, Zoccal KF, Cintra ACO, Faccioli LH, Stanziola L, de Oliveira F, Sampaio S V. Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from Bothrops pirajai venom. *Mol Immunol* (2015) 68:456–464. doi: 10.1016/j.molimm.2015.09.023
137. Cintra ACO, Toni LGB De, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, Sampaio S V. Batroxase , a new metalloproteinase from B . atrox snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* (2012) 60:70–82. doi:

- 10.1016/j.toxicon.2012.03.018
138. 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* (2010) 88:424–432. doi: 10.1016/j.yexmp.2010.02.002
 139. Achê DC, Gomes MSR, de Souza DLN, Silva MA, Brandeburgo MIH, Yoneyama KAG, Rodrigues RS, Borges MH, Lopes DS, Rodrigues V de M. Biochemical properties of a new PI SVMP from Bothrops pauloensis: Inhibition of cell adhesion and angiogenesis. *Int J Biol Macromol* (2015) 72:445–453. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.08.050
 140. Menaldo DL, Bernardes CP, Jacob-ferreira AL, Nogueira-santos CG, Casaregasawara TM, Pereira-crott LS, Sampaio S V. Effects of Bothrops atrox venom and two isolated toxins on the human complement system: Modulation of pathways and generation of anaphylatoxins. (2016) 80:91–100.
 141. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and in Situ hydrolysis. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4: doi: 10.1371/journal.pntd.0000727
 142. Camacho E, Villalobos E, Sanz L, Pérez A, Escalante T, Lomonte B, Calvete JJ, Gutiérrez JM, Rucavado A. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: Characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of Bothriechis lateralis. *Biochimie* (2014) 101:145–155. doi: 10.1016/j.biochi.2014.01.008
 143. Han YP, Lu XY, Wang XF, Xu J. Isolation and characterization of a novel P-II class snake venom metalloproteinase from Trimeresurus stejnegeri. *Toxicon* (2007) 49:889–898. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.11.030
 144. Boukhalfa-Abib H, Laraba-Djebari F. CcMP-II, a new hemorrhagic metalloproteinase from Cerastes cerastes snake venom: Purification, biochemical characterization and amino acid sequence analysis. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* (2015) 167:65–73. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.09.004
 145. Camacho E, Sanz L, Escalante T, Pérez A, Villalta F, Lomonte B, Neves-Ferreira AGC, Feoli A, Calvete JJ, Gutiérrez JM, et al. Novel catalytically-inactive PII

- metalloproteinases from a viperid snake venom with substitutions in the canonical zinc-binding motif. *Toxins (Basel)* (2016) 8: doi: 10.3390/toxins8100292
146. Wang SH, Shen XC, Yang GZ, Wu XF. cDNA cloning and characterization of Agkistin, a new metalloproteinase from *Agkistrodon halys*. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 301:298–303. doi: 10.1016/S0006-291X(02)03001-2
147. Sajevec T, Leonardi A, Kovačić L, Lang-Balija M, Kurtović T, Pungerčar J, Halassy B, Trampuš-Bakija A, Križaj I. VaH3, one of the principal hemorrhagins in *Vipera ammodytes ammodytes* venom, is a homodimeric P-IIIc metalloproteinase. *Biochimie* (2013) 95:1158–1170. doi: 10.1016/j.biochi.2013.01.003
148. Leonardi A, Sajevec T, Latinović Z, Pungerčar J, Lang Balija M, Trampuš Bakija A, Vidmar R, Halassy B, Križaj I. Structural and biochemical characterisation of VaF1, a P-IIIa fibrinogenolytic metalloproteinase from *Vipera ammodytes ammodytes* venom. *Biochimie* (2015) 109:78–87. doi: 10.1016/j.biochi.2014.12.013
149. Oyama E, Takahashi H. Purification and characterization of two high molecular mass snake venom metalloproteinases (P-III SVMPS), named SV-PAD-2 and HR-Ele-1, from the venom of *Protobothrops elegans* (Sakishima-habu). *Toxicon* (2015) 103:30–38. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.06.010
150. Loría GD, Rucavado A, Kamiguti AS, Theakston RDG, Fox JW, Alape A, Gutiérrez JM. Characterization of “basparin A,” a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. *Arch Biochem Biophys* (2003) 418:13–24. doi: 10.1016/S0003-9861(03)00385-0
151. Trummal K, Tõnismägi K, Siigur E, Aaspõllu A, Lopp A, Sillat T, Saat R, Kasak L, Tammiste I, Kogerman P, et al. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. *Toxicon* (2005) 46:46–61. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.03.008
152. Offor BC, Muller B, Piater LA. A Review of the Proteomic Profiling of African Viperidae and Elapidae Snake Venoms and Their Antivenom Neutralisation. *Toxins (Basel)* (2022) 14:723. doi: 10.3390/toxins14110723
153. Tasoulis T, Pukala TL, Isbister GK. Investigating Toxin Diversity and Abundance in Snake Venom Proteomes. *Front Pharmacol* (2022) 12: doi: 10.3389/fphar.2021.768015

154. Damm M, Hempel B-F, Süßmuth RD. Old World Vipers-A Review about Snake Venom Proteomics of Viperinae and Their Variations. *Toxins (Basel)* (2021) 13: doi: 10.3390/toxins13060427
155. Warrell DA. Snake bite. *Lancet* (2010) 375:77–88. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61754-2
156. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Lomonte B, Angulo Y, Fox JW. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? *Toxicon* (2010) 55:166–170. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.08.006
157. Ten Broek RW, Grefte S, Von den Hoff JW. Regulatory factors and cell populations involved in skeletal muscle regeneration. *J Cell Physiol* (2010)n/a-n/a. doi: 10.1002/jcp.22127
158. Tidball JG. “Inflammation in Skeletal Muscle Regeneration.,” *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 243–268 doi: 10.1007/978-1-4020-6768-6_12
159. Juban G, Chazaud B. Metabolic regulation of macrophages during tissue repair: insights from skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett* (2017) 591:3007–3021. doi: 10.1002/1873-3468.12703
160. Grounds MD. “Complexity of Extracellular Matrix and Skeletal Muscle Regeneration.,” *Skeletal Muscle Repair and Regeneration*. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 269–302 doi: 10.1007/978-1-4020-6768-6_13
161. Nagaraju, S., K. Kemparaju and KSG. Hyaluronidases, a neglected class of glycosidases from snake venom: beyond a spreading factor. *Handb venoms toxins Reptil* (2009)237–258.
162. Saravia-Otten P, Robledo B, Escalante T, Bonilla L, Rucavado A, Lomonte B, Hernández R, Flock J-I, Gutiérrez JM, Gastaldello S. Homogenates of skeletal muscle injected with snake venom inhibit myogenic differentiation in cell culture. *Muscle Nerve* (2013) 47:202–212. doi: 10.1002/mus.23489
163. Rucavado A, Escalante T, Shannon J, Gutiérrez JM, Fox JW. Proteomics of Wound Exudate in Snake Venom-Induced Pathology: Search for Biomarkers To Assess Tissue Damage and Therapeutic Success. *J Proteome Res* (2011) 10:1987–2005. doi:

- 10.1021/pr101208f
164. Herrera C, Macêdo JKA, Feoli A, Escalante T, Rucavado A, Gutiérrez JM, Fox JW. Muscle Tissue Damage Induced by the Venom of *Bothrops asper*: Identification of Early and Late Pathological Events through Proteomic Analysis. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10:e0004599. doi: 10.1371/journal.pntd.0004599
 165. Escalante T, Rucavado A, Pinto AFM, Terra RMS, Gutiérrez JM, Fox JW. Wound Exudate as a Proteomic Window to Reveal Different Mechanisms of Tissue Damage by Snake Venom Toxins. *J Proteome Res* (2009) 8:5120–5131. doi: 10.1021/pr900489m
 166. Burin SM, Menaldo DL, Sampaio S V., Frantz FG, Castro FA. An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms. *Int J Biol Macromol* (2018) 109:664–671. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.101
 167. Leon G, Sanchez L, Hernandez A, Villalta M, Herrera M, Segura A, Estrada R, Maria Gutierrez J. Immune Response Towards Snake Venoms. *Inflamm Allergy - Drug Targets* (2012) 10:381–398. doi: 10.2174/187152811797200605
 168. Silva CA, Zuliani JP, Assakura MT, Mentele R, Camargo ACM, Teixeira CFP, Serrano SMT. Activation of $\alpha M\beta 2$ -mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem Biophys Res Commun* (2004) 322:950–956. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.012
 169. Larréché S, Chippaux JP, Chevillard L, Mathé S, Résière D, Siguret V, Mégarbane B. Bleeding and thrombosis: Insights into pathophysiology of bothrops venom-related hemostasis disorders. *Int J Mol Sci* (2021) 22: doi: 10.3390/ijms22179643
 170. Menaldo DL, Bernardes CP, Zoccal KF, Jacob-ferreira AL, Costa TR, Del MPFM, Naal RMZG, Frantz FG, Faccioli LH, Sampaio S V. Immune cells and mediators involved in the inflammatory responses induced by a P-I metalloprotease and a phospholipase A 2 from *Bothrops atrox* venom. *Mol Immunol* (2017) 85:238–247. doi: 10.1016/j.molimm.2017.03.008
 171. Ibiapina HN dos S, Costa AG da, Sachett J de AG, Silva IM, Tarragô AM, Neves JCF, Kerr MWA, Santana MF, Martins-Filho O, Lacerda MVG, et al. An Immunological Stairway to Severe Tissue Complication Assembly in *Bothrops atrox* Snakebites. *Front Immunol* (2019) 10:1–12. doi: 10.3389/fimmu.2019.01882
 172. Moreira V, Dos-Santos MC, Nascimento NG, da Silva HB, Fernandes CM, D'Império

- Lima MR, Teixeira C. Local inflammatory events induced by Bothrops atrox snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon* (2012) 60:12–20. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.03.004
173. Gutiérrez JM, Escalante T, Hernández R, Gastaldello S, Saravia-Otten P, Rucavado A. Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms? *Toxins (Basel)* (2018) 10:1–21. doi: 10.3390/toxins10050182
174. Rucavado A, Nicolau CA, Escalante T, Kim J, Herrera C, Gutiérrez JM, Fox JW. Viperid envenomation wound exudate contributes to increased vascular permeability via a DAMPs/TLR-4 mediated pathway. *Toxins (Basel)* (2016) 8:1–14. doi: 10.3390/toxins8120349
175. de Freitas Oliveira C, da Silva Lopes D, Mendes MM, Homsí-Brandeburgo MI, Hamaguchi A, de Alcântara TM, Clissa PB, de Melo Rodrigues V. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from Bothrops (neuwiedii) pauloensis snake venom. *Toxicon* (2009) 53:560–569. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.12.025
176. Petras D, Sanz L, Segura Á, Herrera M, Villalta M, Solano D, Vargas M, León G, Warrell DA, Theakston RDG, et al. Snake Venomics of African Spitting Cobras: Toxin Composition and Assessment of Congeneric Cross-Reactivity of the Pan-African EchiTAB-Plus-ICP Antivenom by Antivenomics and Neutralization Approaches. *J Proteome Res* (2011) 10:1266–1280. doi: 10.1021/pr101040f
177. Oliveira AL, Viegas MF, da Silva SL, Soares AM, Ramos MJ, Fernandes PA. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. *Nat Rev Chem* (2022) 6:451–469. doi: 10.1038/s41570-022-00393-7
178. Azevedo-Marques MM, Cupo P, Coimbra TM, Hering SE, Rossi MA, Laure CJ. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by south american rattlesnake (Crotalus durissus terrificus) envenomation in brazil. *Toxicon* (1985) 23:631–636. doi: 10.1016/0041-0101(85)90367-8
179. Montecucco C, Gutiérrez JM, Lomonte B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: Common aspects of their mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci* (2008) 65:2897–2912. doi: 10.1007/s00018-008-8113-3
180. Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom

- phospholipases A 2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* (2003) 42:915–931. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.005
181. Homma M, Kosuge T, Okonogi T, Hattori Z, Sawai Y. A histopathological study on arterial lesions caused by Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. *Jpn J Exp Med* (1967) 37:323–36.
182. Ownby CL, Fletcher JE, Colberg TR. Cardiotoxin 1 from cobra (*Naja naja atra*) venom causes necrosis of skeletal muscle in vivo. *Toxicon* (1993) 31:697–709. doi: 10.1016/0041-0101(93)90376-T
183. Fujita T. Evolution of the lectin–complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:346–353. doi: 10.1038/nri800
184. Silva-de-França F, Villas-Boas IM, Serrano SM de T, Cogliati B, Chudzinski SA de A, Lopes PH, Kitano ES, Okamoto CK, Tambourgi D V. *Naja annulifera* Snake: New insights into the venom components and pathogenesis of envenomation. *PLoS Negl Trop Dis* (2019) 13:e0007017. doi: 10.1371/journal.pntd.0007017
185. Langhorn R, Persson F, Åblad B, Goddard A, Schoeman JP, Willesen JL, Tarnow I, Kjelgaard-Hansen M. Myocardial injury in dogs with snake envenomation and its relation to systemic inflammation. *J Vet Emerg Crit Care* (2014) 24:174–181. doi: 10.1111/vec.12127
186. Cayetano-Salazar L, Nava-Tapia DA, Astudillo-Justo KD, Arizmendi-Izazaga A, Sotelo-Leyva C, Herrera-Martinez M, Villegas-Comonfort S, Navarro-Tito N. Flavonoids as regulators of TIMPs expression in cancer: Consequences, opportunities, and challenges. *Life Sci* (2022) 308:120932. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120932
187. Kemparaju K, Girish KS. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem Funct* (2006) 24:7–12. doi: 10.1002/cbf.1261
188. da Silva Bitencourt C, Gelfuso GM, Pereira PAT, de Assis PA, Tefé-Silva C, Ramos SG, Arantes EC, Faccioli LH. Hyaluronidase-Loaded PLGA Microparticles as a New Strategy for the Treatment of Pulmonary Fibrosis. *Tissue Eng Part A* (2015) 21:246–256. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0403
189. Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics* (2011) 74:1781–1794. doi: 10.1016/j.jprot.2011.03.026

190. Pyron R, Burbrink FT, Wiens JJ. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol Biol* (2013) 13:93. doi: 10.1186/1471-2148-13-93
191. Gutiérrez JM, Sasa M. BITES AND ENVENOMATIONS BY COLUBRID SNAKES IN MEXICO AND CENTRAL AMERICA. *J Toxicol Toxin Rev* (2002) 21:105–115. doi: 10.1081/TXR-120004743
192. Casewell NR, Wagstaff SC, Harrison RA, Renjifo C, Wuster W. Domain Loss Facilitates Accelerated Evolution and Neofunctionalization of Duplicate Snake Venom Metalloproteinase Toxin Genes. *Mol Biol Evol* (2011) 28:2637–2649. doi: 10.1093/molbev/msr091
193. Moura-da-Silva AM, Theakston RDG, Cramptonl JM. Evolution of disintegrin cysteine-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: Gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. *J Mol Evol* (1996) 43:263–269. doi: 10.1007/BF02338834
194. Kini RM, Koh CY. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins (Basel)* (2016) 8:1–27. doi: 10.3390/toxins8100284
195. Junqueira-de-Azevedo ILM, Campos PF, Ching ATC, Mackessy SP. Colubrid Venom Composition: An -Omics Perspective. *Toxins (Basel)* (2016) 8:1–24. doi: 10.3390/toxins8080230

11. ANEXO I



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Estudo: Avaliação do perfil clínico-inflamatório dos acidentes botrópicos - SNAKEBIO

PESQUISADOR PRINCIPAL: Dra. Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett
Centro de pesquisa: Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
TELEFONE: (092) 2127-3598

Por favor leia estas informações com atenção. Tome o tempo necessário para fazer as perguntas que você quiser. A equipe do estudo explicará qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

1. INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado para participar de um estudo clínico porque foi diagnosticado com acidente ofídico. A equipe que conduz o estudo acha que você tem as condições iniciais para poder participar do estudo. Antes de concordar em participar do estudo, é muito importante que você entenda as informações fornecidas neste documento e quais serão as implicações para você durante o período do estudo. Este termo descreve o objetivo, os procedimentos, os benefícios, os riscos, os desconfortos e as precauções do estudo. Descreve também os procedimentos alternativos que estão disponíveis para você e seu direito para se retirar do estudo a qualquer momento. Caso você concorde e assine este documento, uma cópia ficará conosco e a outra cópia será sua.

Você deve ser bem sincero com seu médico a respeito do seu histórico de saúde, incluindo o uso anterior e atual de outras medicações. Caso contrário, você poderá ser prejudicado ao participar desse estudo.

Se não puder ler ou escrever, uma testemunha, que é uma pessoa independente, do patrocinador e do médico lerá este documento para você. Se concordar com a participação, sua impressão digital (carimbo do seu dedo polegar) substituirá a sua assinatura.

2. DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este estudo clínico será realizado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMTHVD), que é um centro de saúde em Manaus (AM) que há muitos anos trata pessoas com acidente ofídico. Neste estudo serão acompanhadas aproximadamente 500 pacientes com mais de 10 anos de idade.

Se você concordar em participar desse estudo e tiver as condições para ser selecionado, você será acompanhado pela equipe de pesquisadores por 7 dias consecutivos a partir da data do acidente.

3. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Página 1 de 6

Rubrica do Participante/ Representante legal: _____ Rubrica do(a) pesquisador(a) responsável/delegado(a): _____



Se você concordar com a participação Iho no estudo, o médico realizará um exame físico, coleta de amostras de sangue, verificará o histórico médico, bem como uso de medicações anteriores e atuais.

3.1 Visitas

Nos 3 primeiros dias, você deverá permanecer internado para realizar exames diários para avaliação do envenenamento ofídico.

A partir daí, ele deverá ser atendido pela equipe do estudo no 7º dia apenas no retorno ambulatorial.

Em cada visita, será realizado um exame clínico e físico. Em todas as visitas, uma pequena quantidade de sangue será retirada por meio de uma punção venosa e será coletada e guardada para análises complementares.

A equipe buscará reduzir a uma coleta de sangue por visita e sempre conversará com o senhor sobre isso. Todos os resultados desses exames serão comunicados a você e permanecerão confidenciais.

3.2 Exame Físico e Avaliação física

Você passará por um exame físico na inclusão do estudo, incluindo medir temperatura corporal, frequência da respiração, frequência do coração e a pressão do seu sangue. Faremos medição de altura, peso, perímetro cefálico, otoscopia, oroscopia, inspeção geral e avaliação do local da picada. Essa avaliação será feita na admissão, durante a internação e nos atendimentos ambulatoriais (7º dia) e em qualquer momento que ele tenha algum sintoma durante o acompanhamento

3.3 Coleta de sangue

O sangue será coletado para realização de diferentes exames nos dias: 0, 1º, 2º, 3º e 7º de acompanhamento. Vamos coletar 20 mL de sangue do braço (um pouco mais que uma colher de sopa). Esses exames incluem testes para identificação do veneno e para saber sobre a sua saúde. Também vamos guardar um pouco do seu sangue para fazer exames depois e saber mais sobre o envenenamento.

3.4 Coleta de secreção do local da picada

No local da picada podem ocorrer bolhas com secreção e infecção local, neste caso, seria necessário a coleta do material para estudar a presença de veneno e de bactérias que fizeram a complicação local ocorrer. Os exames destas secreções ajudarão a entender o processo de gravidade local e saber qual a melhor forma de prevenir e tratar estes sinais e sintomas.

Por favor, informe abaixo se você concorda ou não, marcando com X uma das opções. Se decidir que não, não tem problema. Você poderá continuar no estudo mesmo assim e não perguntaremos mais sobre isso.

() Sim, concordo

() Não, não concordo

Atenção: Esses exames não atrasarão o início do tratamento da doença.

4. RISCOS OU INCONVENIÊNCIAS RAZOAVELMENTE PREVISÍVEIS

Os riscos deste estudo são, basicamente, os possíveis eventos indesejados dos procedimentos médicos como, por exemplo, o incômodo ao realizar a coleta de sangue.



Coleta de sangue: os riscos de coletar sangue são muito pequenos e podem incluir tonturas, dor, manchas arroxeadas ou infecção. Você pode ter uma pequena dor durante a introdução da agulha.

5. BENEFÍCIOS RAZOAVELMENTE ESPERADOS

Esse estudo clínico oferece benefício individual direto para os participantes porque os procedimentos realizados ajudarão a determinar um perfil clínico-epidemiológico-inflamatório dos acidentes botrópicos. Os exames laboratoriais realizados permitirão ao médico do estudo determinar a sua evolução para melhorar ou não sua saúde e será monitorado de perto por 7 dias.

Além disso, você deverá retornar à clínica para futuras avaliações e/ou tratamentos se você estiver ainda com sintomas do acidente ofídico.

A sua participação nos ajudará a entender melhor o envenenamento ofídico e atingir os objetivos do estudo. A sua comunidade também poderá se beneficiar dos resultados deste estudo no futuro.

6. PROCEDIMENTOS OU TRATAMENTOS ALTERNATIVOS

Mesmo se você decidir que não deve participar do estudo, você receberá um tratamento adequado. Se tiver dúvidas a respeito das alternativas de tratamento, favor fazer as suas perguntas ao seu médico do estudo. Você e seu médico podem decidir qual o melhor tratamento para você.

7. PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA NO ESTUDO – RETIRADA DO ESTUDO

A sua participação de neste estudo é totalmente voluntária. Você tem o direito de retirar a participação dele a qualquer momento e por qualquer razão. Recusar-se a participar ou descontinuar o estudo não afetará a assistência médica a você ou perda de benefícios aos quais você tenha direito de outra forma. A recusa não afetará sua relação com o seu médico.

A participação dele neste estudo será interrompida pelos motivos a seguir, você concorde ou não:

- Se eu não seguir os procedimentos do estudo,
- Se, na opinião do médico do estudo, for o melhor para você,
- Se as autoridades regulatórias responsáveis ou o Comitê de Ética decidir encerrar o estudo.

Antes da sua participação no estudo clínico, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deve ser pessoalmente assinado e datado por você, ou por uma testemunha imparcial, se você não puder ler ou escrever (neste caso você fornece sua digital) e pela pessoa que conversou sobre o consentimento livre e esclarecido.

Antes de assinar esse termo (ou deixar sua impressão digital como assinatura), você deverá fazer todas as perguntas que tiver sobre o que você não entendeu. A equipe responsável pelo estudo responderá suas perguntas.

Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e poderá solicitar informações adicionais a qualquer momento durante o estudo, do médico no centro ou poderá entrar em contato no número de telefone que está neste termo.

8. RESPONSABILIDADES DO PACIENTE/RECOMENDAÇÕES PRÁTICAS

A partir do primeiro dia e até o final do estudo, você não deverá tomar qualquer outra medicação sem conversar antes com o médico. Se atualmente ele estiver tomando outros medicamentos é importante que você informe ao médico.



Se você faltar a uma consulta, uma pessoa do centro de saúde entrará em contato para verificar porque ele faltou à consulta e trará você ao centro de saúde para avaliação.

9. CUSTOS, NÃO REMUNERAÇÃO E COMPENSAÇÃO

Todo o tratamento para antiofídico será dado a você sem nenhum custo durante o estudo. Portanto, a sua participação neste estudo não terá nenhum custo para você e a sua participação neste estudo não será remunerada.

Caso ocorra algum dano, mencionado ou não neste termo, que tenha sido resultante de sua participação no estudo, nós asseguramos o tratamento e acompanhamento médico necessários, bem como uma eventual indenização.

10. CONFIDENCIALIDADE

A garantia de sigilo e privacidade dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada. Toda informação obtida durante este estudo, incluindo os registros médicos, dados pessoais e da pesquisa são confidenciais. A sua identidade pessoal, quer dizer, seu nome, endereço e outros dados, permanecerão sob sigilo, no centro de estudos. A forma de garantir este sigilo será identificá-lo através de um código numérico e data de nascimento. Somente a equipe do estudo será capaz de ligar o código numérico ao nome completo. Durante sua participação neste estudo clínico, seu médico irá coletar dados pessoais e os dados sobre a sua saúde. Estas informações serão guardadas por pelo menos 15 anos.

Você tem o direito de acessar os seus dados junto ao médico do estudo e pedir correções, caso estes estejam errados ou incompletos.

11. OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES

O Investigador Principal deste estudo é a Pesquisadora Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett e Wuelton Marcelo Monteiro, que podem ser encontrado no seguinte endereço: Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro. Manaus, Amazonas - Brasil – CEP: 69040-000, de segunda a sexta feira das 8h às 12h e telefones (92) 981518086 ou (92) 991652486 (horário comercial e não comercial).

Em qualquer fase do estudo, você terá acesso ao investigador e sua equipe para comunicar sintomas inesperados e não habituais durante o estudo, esclarecer dúvidas ou pedir informações adicionais.

Este estudo foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e está de acordo com as normas nacionais e internacionais para sua realização. Se você tiver alguma dúvida ou quiser alguma informação adicional sobre os seus direitos como participante de pesquisa ou sobre os aspectos éticos do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado no endereço Av. Pedro Teixeira, 25 - Manaus - Amazonas – CEP: 69040-000 e telefone (92) 2127-3572. O CEP funciona de segunda a sexta-feira, de 8h às 14h, sem intervalo de almoço.

1. Eu li ou leram para mim o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Concordo que eu participe desse estudo. Concordo em cooperar totalmente com os pesquisadores do estudo e entrarei em contato com eles imediatamente caso eu apresente quaisquer sintomas inesperados ou não usuais durante o estudo. Durante o período do estudo, eu informarei sobre quaisquer outros tratamentos médicos que eu possa vir a precisar.
3. Informe ao médico do estudo sobre todas as minhas doenças e medicações que eu use, além de informar sobre todas as consultas médicas recentes.



PÁGINA DE ASSINATURAS

Se você leu este termo de consentimento livre e esclarecido (ou se ele lhe foi explicado), todas as suas perguntas foram respondidas e você concorda em participar deste estudo, favor inserir e assinar seu nome abaixo e rubricar todas as páginas deste termo de consentimento livre e esclarecido. O TCLE também será assinado e todas as páginas do termo também serão rubricadas pelo membro da equipe do estudo que realizou a discussão deste documento com você.

Nome do participante:

Assinatura

Data: / /

Impressão datiloscópica

Nome da testemunha (se houver)

Assinatura

Data: / /

Razão para necessidade da testemunha

Impressão datiloscópica

Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos, riscos previsíveis do estudo ao participante acima mencionado.

Nome do profissional:

Assinatura do profissional

Data:

12. ANEXO II**Formulário de Registro Clínico - CRF**

**“Avaliação do perfil clínico-inflamatório dos acidentes botrópicos na
Amazônia Brasileira - SNAKEBIO”**

Prontuário: Nome:

Cod. Estudo:

Pesquisadores Responsáveis: Jacqueline A. G. Sachett **Contato:** (92) 8151-8086

1. Dados do paciente

1.1 Contato telefônico: () _____ () _____

1.2 Endereço: _____ nº _____ Bairro: _____

1.3 Município: _____

1.4 Sexo: 1- Masculino 2-Feminino ____/____/____

1.5 Data de nascimento : ____/____/____ 1.6 Idade:

2. Dados do acidente ofídico

2.1 Procedência: 1- Manaus 2-Interior Qual? _____

2.2 Detalhamento do local: _____

2.3 Data do Acidente: ____/____/____ 2.4 Hora Aproximada do Acidente: ____:____

2.5 Procurou atendimento em outra unidade (primeiros socorros)*: 1- Sim 2-Não

2.6 Hora de admissão: ____:____ 2.7 Quais*: _____

2.8 Data de entrada: ____/____/____ 2.9 Data de saída: ____/____/____

2.10 Data da internação na FMT-HVD: ____/____/____ 2.11 Hora da Admissão: ____:____

2.12 Data da saída na FMT-HVD: ____/____/____

2.13 Motivo: 1- Alta 2-Óbito 3-Transferência 4-Evasão Motivo

2.14 Zona de Ocorrência: 1-Rural 2-Urbana 3-Periurbana 9-Ignorado

2.15 Local da picada: 1-Cabeça 2-Braço 3-Perna 4-Tronco 5-Pescoço 6-Mão
7-Coxa 8-Antebraço 9-Pé 10-Outro (Espec.): _____

2.16 Lado do corpo afetado: 1-Direito 2-Esquerdo 3-Central

2.17 Andou ou caminhou após acidente: 1-Não 2-Sim. Quanto tempo? ____min.

2.18 Acidente relacionado ao trabalho: 1-Não 2-Sim

2.19 Houve acidente anterior: 1-Não 2-Sim. Quantos? _____
 Data do último: _____ / _____ (mês/ano)

Assinatura e Carimbo: _____

Botrópico

Leve: quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos), sangramento em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação. Soro: Antibotrópico (SAB)	2 a 4 ampolas
Moderado: edema (edema local de 3 a 4 segmentos) e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação. Soro: Antibotrópico (SAB)	5 a 8 ampolas
Grave: alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos), hemorragia grave, hipotensão, anúria. Soro: Antibotrópico (SAB)	12 ampolas

Laquétrico

Moderado: quadro local presente (Idem Bothropico), pode haver sangramentos, manifestações vagais leves (PA > 80x40mmHg e Pulso acima de 50bpm) Soro: Antibotrópico-laquétrico (SABL)	10 ampolas
Grave: quadro local intenso (Idem Bothropico), hemorragia intensa, com manifestações vagais (PA < 80x40mHg e Pulso abaixo de 50bpm) Soro: Antibotrópico-laquétrico (SABL)	20 ampolas

3. Soroterapia – Classificação do Acidente ofídico

3.1 Tipo do acidente 1- Botrópico 2-Laquéutico 3-Não identificado

3.2 Classificação do acidente (**vide tabela abaixo**): 1-Leve 2-Moderado 3-Grave

Classificação do Acidente e Soroterapia (*antes de iniciar soroterapia coletar sangue conforme POP – coleta sanguínea):

3.3 Hora da Soroterapia: ____:____

3.4 Reação Adversa à Soroterapia (até 24 horas após infusão): 1-Não 2-Sim

Taquicardia Taquipneia Dispneia Urticária Náuseas

Vômito Hipotensão Prurido Choque Broncoespasmo

Rouquidão e estridor laríngeo Reação anafilática

outra: _____

3.5 Hora da Reação Adversa: ____:____

Assinatura e Carimbo: _____

4. Histórico – T0 (0 horas)**4.1 Houve medicamentos orais/injetáveis anteriores a internação:**

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

4.2 Houve uso de produtos no local do acidente:

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

4.3 Condutas adotadas após o acidente 1-Não 2-Sim

Torniquete/ garrote Sucção labial Outro: _____

5. Dados clínicos do paciente

5.1 Data da avaliação: | _ | _ | | | _ | | | **5.2 Hora:** ____ : ____

5.3 Pressão arterial | _ | _ | | | / | | | | mm Hg **5.4 Pulso** | _ | _ | | | por min

5.5 Temp. | _ | _ | | | °C **5.6 Freq. Resp.** | _ | _ | |rpm

5.7 Peso corporal | _ | _ | | kg **5.8. Altura** | _ | _ | | cm

5.9 Doenças, Tratamentos ou Queixas concomitantes 1-Não 2-Sim

Doenças Hematológicas Uso de anticoncepcional

Uso de anticoagulante Outro: _____

5.10 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim

5.10.1 Sangramento sangramento em pele ou mucosas

equimose evidentes

sangramento sem comprometimento do estado geral

5.10.2 **Edema** Leve - edema local de até 2 segmentos

Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

Grave - edema local de 5 segmentos

- Circunferência da região acometida (Centímetros)

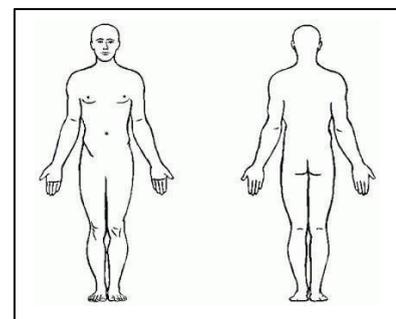
Lado direito: _____ cm

Lado esquerdo: _____ cm

região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm*

* marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P - local da picada)



5.10.3 **Linfonodos** ausente presente Tamanho (cm): _____

Consistência elástica pétreo amolecida

Sensibilidade doloroso indolor

Mobilidade aderido a planos profundos não aderido (móvel)

5.10.4 **Dor** - **classificação numérica na escala de 0 - 10**

Valor*: Ausente: 0 Leve: 1-3 Moderado: 4-7 Grave: 8-10

* Antes do uso de analgésico Vômito

5.10.5 **Tonalidade Perilesional:** 1-Não 2-Sim

Normal violácia vermelhidão necrótica (enegrecida)

5.10.6 **Características da Pele:** 1-Não 2-Sim

equimose bolhas secreção serosa somente a marca da presa

5.10.7 Temperatura: Área acometida _____ °C 5.10.8 Área contralateral _____ °C

5.11 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X

Anúria Cefaleia Choque Cólicas abdominais Convulsão

Diarreia Enterorragia (melena e hematoquesia) Epistaxe

Equimose Gengivorragia Hematêmese Hematúria

Hemoptise Hemorragia conjuntival Hipermenorragia Náuseas

Oligúria Otorragia Petéquias Sudorese Vômito

Outras: _____

Assinatura e Carimbo: _____

6. Tratamento/medicação concomitante (até o final do tratamento)

6.1 Data: | | || | || | |

6.2 Medicamentos concomitantes? 1-Não 2-Sim – Especifique:

Marca / Nome genérico	Via/formul.	Regime	Indicação	Data de início	Data de término
.....	_	○
.....	_	○
.....	_	○
.....		○

Assinatura e Carimbo: _____

7. Dados da serpente

7.1 Trouxe a serpente: 1- Não 2- Sim

INFORMAÇÕES ABAIXO SERÃO INFORMADAS PELA GERÊNCIA DE ANIMAIS PEÇONHENTOS

7.2 Serpente envolvida: 1-*Bothrops* 2-*Lachesis* 3-Outro (Espec.): _____
4-Ignorado

7.3 Sexo da serpente: 1-Masculino 2-Feminino 3-Indefinido

7.4 Idade da serpente: _____ **7.5 Tamanho da serpente:** _____ cm.

8. Histórico – T24 (24 horas)**8.1 Houve medicamentos orais/injetáveis anteriores a internação:**

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

8.2 Houve uso de produtos no local do acidente:

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

8.3 Condutas adotadas após o acidente 1-Não 2-Sim

Torniquete/ garrote Sucção labial Outro: _____

9. Dados clínicos do paciente

9.1 Data da avaliação: |__| |__| || |__| |__| |__| | **9.2 Hora:** ____ : ____

9.3 Pressão arterial |__| |__| | / |__| |__| | mm Hg **9.4 Pulso** |__| |__| | por min

9.5.Temp. |__| |. |__| °C **9.6 Freq. Resp.** |__| |rpm

9.7 Peso corporal |__| |__| | kg **9.8. Altura** |__| |__| | cm

9.9 Doenças, Tratamentos ou Queixas concomitantes 1-Não 2-Sim

Doenças Hematológicas Uso de anticoncepcional

Uso de anticoagulante Outro: _____

9.10 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim

5.10.2 Sangramento sangramento em pele ou mucosas

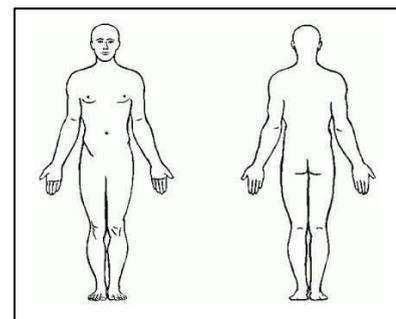
equimose evidentes

sangramento sem comprometimento do estado geral

9.10.2 **Edema** Leve - edema local de até 2 segmentos

Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

Grave - edema local de 5 segmentos



- Circunferência da região acometida (Centímetros)

Lado direito: _____ cm

Lado esquerdo: _____ cm

região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm*

* marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P - local da picada)

9.10.3 **Linfonodos** ausente presente Tamanho (cm): _____

Consistência elástica pétreo amolecida

Sensibilidade doloroso indolor

Mobilidade aderido a planos profundos não aderido (móvel)

9.10.4 **Dor** - **classificação numérica na escala de 0 - 10**

Valor*: Ausente: 0 Leve: 1-3 Moderado: 4-7 Grave: 8-10

* Antes do uso de analgésico

9.10.5 **Tonalidade Perilesional:** 1-Não 2-Sim

Normal violácia vermelhidão necrótica (enegrecida)

9.10.6 **Características da Pele:** 1-Não 2-Sim

equimose bolhas secreção serosa somente a marca da presa

9.10.7 Temperatura: Área acometida _____ °C

9.10.8 Área contralateral _____ °C

9.11 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X

Anúria Cefaleia Choque Cólicas abdominais Convulsão

Diarreia Enterorragia (melena e hematoquesia) Epistaxe

Equimose Gengivorragia Hematêmese Hematúria

Hemoptise Hemorragia conjuntival Hipermenorragia Náuseas

Oligúria Otorragia Petéquias Sudorese Vômito

Outras: _____

Assinatura e Carimbo: _____

Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.

10. Dados clínicos do paciente – T48 (48 horas)

10.1 Data da avaliação: |__| |__| || |__| |__| |__| | 10.2 Hora: ____: ____

10.3 Pressão arterial |__| |__| | | / |__| |__| | mm Hg 10.4 Pulso |__| |__| | por min

10.5 Temp. |__| |__| |. |__| °C 10.6 Freq. Resp. |__| |__| | rpm

10.7 Queixas concomitantes

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

10.8 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim

5.10.3 **Sangramento** sangramento em pele ou mucosas

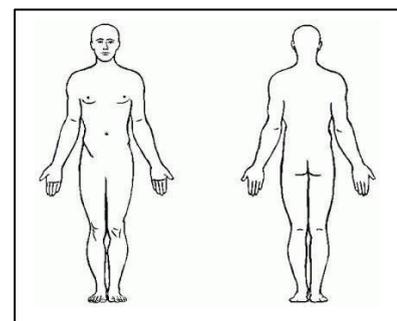
equimose evidentes

sangramento sem comprometimento do estado geral

10.8.2 **Edema** Leve - edema local de até 2 segmentos

Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

Grave - edema local de 5 segmentos



- Circunferência da região acometida (Centímetros)

Lado direito: _____ cm

Lado esquerdo: _____ cm

região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm*

* marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P - local da picada)

10.8.3 **Linfonodos** ausente presente Tamanho (cm): _____

Consistência elástica pétreia amolecida

Sensibilidade doloroso indolor

Mobilidade aderido a planos profundos não aderido (móvel)

10.8.4 **Dor** - **classificação numérica na escala de 0 - 10**

Valor*: Ausente: 0 Leve: 1-3 Moderado: 4-7 Grave: 8-10

* Após uso de analgésico

10.8.5 **Tonalidade Perilesional:** 1-Não 2-Sim

Normal violácia vermelhidão necrótica (enegrecida)

10.8.6 **Características da Pele:** 1-Não 2-Sim

equimose bolhas secreção serosa somente a marca da presa

10.8.7 Temperatura: Área acometida _____ °C

10.8.8 Área contralateral _____ °C

10.9 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X

Anúria Cefaleia Choque Cólicas abdominais Convulsão

Diarreia Enterorragia (melena e hematoquesia) Epistaxe

Equimose Gengivorragia Hematêmese Hematúria

Hemoptise Hemorragia conjuntival Hipermenorragia Náuseas

Oligúria Otorragia Petéquias Sudorese Vômito

Outras: _____

Assinatura e Carimbo: _____

Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.

11. Dados clínicos do paciente – T72 (72 horas)

11.1 Data da avaliação: |__| |__| || |__| |__| |__| | 11.2 Hora: ____ : ____

11.3 Pressão arterial |__| |__| | | / |__| |__| | mm Hg 11.4 Pulso |__| |__| | por min

11.5 Temp. |__| |__| |. |__| |__| °C 11.6 Freq. Resp. |__| |__| | rpm

11.7 Queixas concomitantes

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

11.8 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim

5.10.4 Sangramento sangramento em pele ou mucosas

equimose evidentes

sangramento sem comprometimento do estado geral

11.8.2 **Edema** Leve - edema local de até 2 segmentos

Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

Grave - edema local de 5 segmentos

- Circunferência da região acometida (Centímetros)

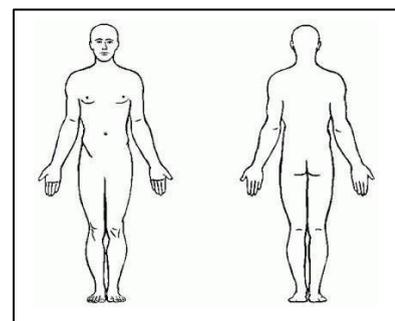
Lado direito: _____ cm

Lado esquerdo: _____ cm

região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm*

* marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P - local da picada)



11.8.3 **Linfonodos** ausente presente Tamanho (cm): _____

Consistência elástica pétreia amolecida

Sensibilidade doloroso indolor

Mobilidade aderido a planos profundos não aderido (móvel)

11.8.4 **Dor** - **classificação numérica na escala de 0 - 10**

Valor*: Ausente: 0 Leve: 1-3 Moderado: 4-7 Grave: 8-10

* Após uso de analgésico

11.8.5 **Tonalidade Perilesional:** 1-Não 2-Sim

Normal violácia vermelhidão necrótica (enegrecida)

11.8.6 **Características da Pele:** 1-Não 2-Sim

equimose bolhas secreção serosa somente a marca da presa

11.8.7 Temperatura: Área acometida _____ °C

11.8.8 Área contralateral _____ °C

11.9 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X

Anúria Cefaleia Choque Cólicas abdominais Convulsão

Diarreia Enterorragia (melena e hematoquesia) Epistaxe

Equimose Gengivorragia Hematêmese Hematúria

Hemoptise Hemorragia conjuntival Hipermenorragia Náuseas

Oligúria Otorragia Petéquias Sudorese Vômito

Outras: _____

Assinatura e Carimbo: _____

12. Dados da lesão do acidente ofídico

12.1 Infecção Secundária ao Acidente Ofídico: 1-Não 2-Sim

12.2 Data do diagnóstico: ____ / ____ / ____ 12.3 Hora: ____ : ____

12.4 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim

celulite abscesso Outro (Espec.): _____

12.5 Antibioticoterapia: _____ Posologia: _____

Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.

Assinatura e Carimbo: _____

13. Dados clínicos do paciente - Dia 7 (ou alta)

13.1 Data da avaliação: |__| |__| || |__| |__| |__| | 13.2 Hora: ____ : ____

13.3 Pressão arterial |__| |__| | | / |__| |__| | mm Hg 13.4 Pulso |__| |__| | por min

13.5 Temp. |__| |__| |. |__| °C 13.6 Freq. Resp. |__| |__| rpm

13.7 Queixas concomitantes

1-Não 2-Sim (Espec.): _____

13.8 Manifestações Locais: 1-Não 2-Sim5.10.5 **Sangramento** sangramento em pele ou mucosas equimose evidentes sangramento sem comprometimento do estado geral13.8.2 **Edema** Leve - edema local de até 2 segmentos Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos Grave - edema local de 5 segmentos

- Circunferência da região acometida (Centímetros)

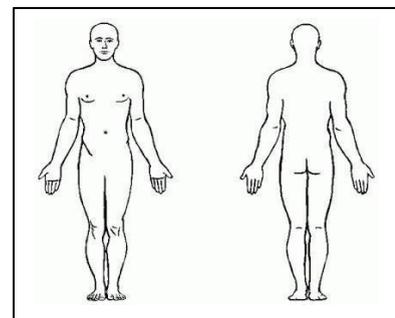
Lado direito: _____ cm

Lado esquerdo: _____ cm

região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm*

* marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P - local da picada)

13.8.3 **Linfonodos** ausente presente Tamanho (cm): _____Consistência elástica pétreo amolecidaSensibilidade doloroso indolorMobilidade aderido a planos profundos não aderido (móvel)13.8.4 **Dor** - **classificação numérica na escala de 0 - 10**Valor*: Ausente: 0 Leve: 1-3 Moderado: 4-7 Grave: 8-10

* Após uso de analgésico

13.8.5 **Tonalidade Perilesional:** 1-Não 2-Sim Normal violácia vermelhidão necrótica (enegrecida)

13.8.6 Características da Pele: 1-Não 2-Sim

equimose bolhas secreção serosa somente a marca da presa

13.8.7 Temperatura: Área acometida _____°C 13.8.8 Área contralateral _____°C

13.9 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X

Anúria Cefaleia Choque Cólicas abdominais Convulsão

Diarreia Enterorragia (melena e hematoquesia) Epistaxe

Equimose Gengivorragia Hematêmese Hematúria

Hemoptise Hemorragia conjuntival Hipermenorragia Náuseas

Oligúria Otorragia Petéquias Sudorese Vômito

Outras: _____

Assinatura e Carimbo: _____

Fotodocumentação: Favor tirar uma foto da lesão antes da retirada da amostra para exame.

14. Exames Laboratoriais**14.1 Sangue**

	DADOS	T0	T24	T48	T72	D7	UN.	REF.
ERITROGRAMA	HEMÁCIAS						milhões/mm ³	4.7 A 6.1
	HEMOGLOBINA						G/DL	13,0 A 16,0
	HEMATÓCRITO						%	40,0 A 52,0
	M.C.V.						FL	80 A 97
	M.C.H.						PG	27,0 A 31,0
	M.C.H.C						G/DL	33,0 A 37,0
	R.D.W.						%	11,5 A 14,5%
LEUCOGRAMA	LEUCÓCITOS						/ mm ³	4.000-10.800
	SEGMENTADOS						%/ mm ³	42,1 A 75,2
	MIELÓCITOS						%/ mm ³	
	METAMIELÓCITOS						%/ mm ³	
	BASTÕES						%/ mm ³	
	EOSINÓFILOS						%/ mm ³	0,0 A 3,0
	BASÓFILOS						%/ mm ³	0,0 A 3,0
	LINFÓCITOS						/ mm ³	20,0 A 51,1
	MONÓCITOS						/ mm ³	
	PLAQUETAS						/ mm ³	130.000-400.000

	M.P.V.						FL	7,40 A 10,4
	P.C.T							
	P.D.W.							
COA GUL O- GRA	TC						MINUTOS	ATÉ 10
	TAP						"/%	13,5"= 100%
BIOQUÍMICA	URÉIA							Adultos 15 - 2,5 - 6,4 >60 anos 17 - 2,9 - 7,5
	CREATININA							Homens Mulheres Inferior a 1,2 Inferior a 1,1
	SÓDIO							
	POTÁSSIO							
	BILIRRUBINA TOTAL							
	BILIRRUBINA INDIRETA							
MARCADORES INFLAMATÓRIOS	CK							
	CK-MB							
	VHS							
	DHL							
	Proteína C reativa							
	AST							
	ALT							

14.2 Urina

Carac. Gerais	VOL							
	COR							amarelo citrino
	ASPECTO							Lí Mpido
	pH							4,5 – 7,8
	DENSIDADE							1,005 – 1,030
Bioquímica	GLICOSE							negativo
	PROTEÍNAS							negativo
	CORPOS CETÔNICOS							negativo
	BILIRRUBINA							negativo
	HEMOGLOBINA							Até 0,015 mg
	NITRITO							negativo
	UROBILINOGÊNIO							até 1 mg/dL
Sedimentoscopia	CEL. EPITELIAIS							0 – 1 (pavimentoso)/ campo 400X
	LEUCÓCITOS							0 – 4/campo 400X
	HEMÁCIAS							Homens: 0 – 3/campo 400X Mulheres: 0 – 5/campo 400X
	CRISTAIS							
	CILINDROS							0 – 1 (hialino)/campo 100X
	BACTERIÚRIA							Ausente ou escassa

15. Avaliação Final

15.1 Última avaliação

| | || | || | |

15.2 Completou todos os procedimentos

1-Não

2-Sim

Se não, Especifique: _____