

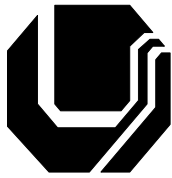
Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA  
METALOPROTEASE ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE  
*Bothrops moojeni.***

**Carla Cristine Neves Mamede**

Uberlândia-MG

2011



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA  
METALOPROTEASE ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE  
*Bothrops moojeni*.**

**Carla Cristine Neves Mamede**

Orientador: Dr. Fábio de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica).

Uberlândia-MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M264c Mamede, Carla Cristine Neves, 1986-  
Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente bothrops moojeni / Carla Cristine Neves Mamede. – 2011.

82 f. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

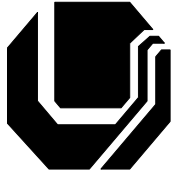
Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa – Veneno - Teses. 2. Bothrops – Teses. 3. Enzimas proteolíticas – Teses. 4. Jararaca (Cobra) – Veneno - Teses. I. Oliveira, Fábio de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:

615.99:598.126

---



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease  
isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*.**

**ALUNA:** CARLA CRISTINE NEVES MAMEDE

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Dr. Fábio de Oliveira

**Examinadores:** Dra. Júnia de Oliveira Costa  
Dra. Renata Santos Rodrigues

**Data da Defesa:** 26/07/2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

(Fábio de Oliveira)

## DEDICATÓRIA

À Dra. Leonilda Stanziola,  
pela amizade, dedicação e confiança  
despendidas a mim e a este trabalho.

Ao meu mestre Dr. Fábio de Oliveira,  
que com profissionalismo, ética e empenho  
me orientou neste trabalho.

Ao técnico “Helinho”,  
pela disponibilidade, carinho e consideração despendidos a mim e ao meu  
trabalho.

Aos animais,  
que sem direito de escolha, deram a vida por este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leondes e Zolande, e minha irmã, Cláudia, pelo amor incondicional, pelo exemplo de união e caráter.

A todos da minha família, Neves e Mamede, pelo incentivo e apoio ao meu sucesso.

Aos meus mestres, especialmente Dr. Fábio, Dr. Beletti, Dra. Veridiana e Dra. Leonilda, pelo estímulo, orientação e apoio a minha formação profissional.

Aos meus antigos e eternos colegas de laboratório, Júnia, Mário, Nadia, Kelly, Mayara e Saulo, pela amizade e alegria compartilhadas e pelo companheirismo na execução deste trabalho.

Aos meus recentes colegas de laboratório, Ana Luiza, Mariana, Thalita, Bruna e Déborah, pelo apoio, confiança e convivência.

Às minhas parceiras de testes, Thaísa e Flávia, pela ajuda nos experimentos com os animais e pelo conhecimento, dramas e alegrias compartilhados.

Aos insubstituíveis funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, Beth e Helinho, pelo apoio, presteza e amizade.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia N-Biofar (INCT-NBiofar) pelo apoio financeiro.

A todos que diferente e substancialmente contribuíram com a idealização, desenvolvimento e consolidação desse trabalho, de meu ideal profissional, de minha vida!

Ando devagar  
Porque já tive pressa  
E levo esse sorriso  
Porque já chorei demais

...

É preciso amor  
Pra poder pulsar  
É preciso paz pra poder sorrir  
É preciso a chuva para florir

...

Penso que cumprir a vida  
Seja simplesmente  
Compreender a marcha  
E ir tocando em frente

...

Cada um de nós compõe a sua historia  
Cada ser em si  
Carrega o dom de ser capaz  
E ser feliz

...

Composição: Almir Sater e Renato Teixeira

## SUMÁRIO

<b>Apresentação</b>	1
<b>Capítulo I: Fundamentação Teórica: Peçonha de serpentes: constituição, caracterização, efeitos e aplicações</b>	3
1. Serpentes brasileiras	4
2. Envenenamento ofídico	9
3. Peçonhas de serpentes	12
3.1. Metaloproteases ofídicas	14
4. Mecanismos e efeitos inflamatórios	18
5. Referências bibliográficas	23
<b>Capítulo II: Purificação e caracterização biológica de uma metaloprotease presente na peçonha da serpente <i>Bothrops moojeni</i></b>	37
Resumo	38
Abstract	39
1. Introdução	40
2. Materiais e métodos	41
2.1. Obtenção da peçonha de <i>B. moojeni</i> e dos animais experimentais	41
2.2. Fracionamento da peçonha bruta de <i>B. moojeni</i> e purificação da metaloprotease	41
2.3. Caracterização bioquímica	42
2.4. Caracterização funcional	42
2.4.1. Atividade inflamatória: ação edematogênica e hiperalgésica	43
2.4.2. Atividade miotóxica	43
3. Resultados e discussão	44
4. Referências bibliográficas	51
<b>Capítulo III: Caracterização farmacológica do edema e da hiperalgésia induzidos pela Moozincina: uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente <i>Bothrops moojeni</i></b>	55
Resumo	56
Abstract	57
Introduction	58
Materials and methods	59
Results	61
Discussion	63
References	66



## Apresentação

Essa dissertação reúne fundamentos teóricos e experimentais de pesquisas científicas desenvolvidas de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica para obtenção do título de Mestre.

O objetivo principal desse trabalho foi caracterizar bioquímica e funcionalmente uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. Nesse propósito, as seguintes metas foram definidas:

- 1- purificação e caracterização bioquímica de uma metaloprotease da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*;
- 2- análise morfológica de efeitos locais e sistêmicos induzidos pela metaloprotease;
- 3- caracterização farmacológica do edema e da hiperalgesia induzidos pela metaloprotease.

Cumpridas as metas, esse trabalho resultou na caracterização bioquímica e funcional da Moozincina, uma metaloprotease isolada da peçonha de *B. moojeni*. Essa protease apresenta massa molecular de 28 kDa, atividade fibrinogenolítica e miotóxica, além de efeitos edematogênico e hiperalgésico relacionados à ativação de vias inflamatórias específicas. Para melhor fundamentação teórica e descrição dos resultados alcançados essa dissertação foi dividida em capítulos.

No capítulo I foi feita uma abordagem teórica a respeito de assuntos relacionados às diferentes etapas do trabalho experimental. Ao descrever as características dos envenenamentos ofídicos, relacionando-os a constituição e efeitos fisiopatológicos das peçonhas, são fornecidas informações relevantes para o entendimento e discussão dos resultados obtidos. As referências citadas foram acessadas nos serviços *on line* de indexação científica como, *Scielo*, *Web of Knowledge* e *Scopus*.

O capítulo II apresenta as etapas iniciais de purificação e caracterização biológica de uma metaloprotease da peçonha da serpente *B. moojeni*. Nesse sentido foi isolada e caracterizada parcialmente uma metaloprotease fibrinogenolítica da classe P-I, denominada Moozincina, que foi capaz de induzir edema, hiperalgesia e mionecrose.

O capítulo III apresenta uma análise funcional da metaloprotease isolada previamente. Esse capítulo refere-se à caracterização farmacológica do edema e hiperalgesia induzidos pela Moozincina. Os resultados e implicações desse trabalho são apresentados de acordo com padrões textuais e científicos exigidos pelo periódico a ser submetido (Toxicon).

Os resultados e discussões aqui apresentados são relevantes para o enriquecimento teórico, metodológico e científico de pesquisas relacionadas ao estudo de proteases de peçonhas de serpentes. As informações contidas nessa dissertação destacam uma diferente abordagem do estudo de efeitos biológicos desencadeados por metaloproteases botrópicas, bem como contribuem para o entendimento do mecanismo de ação e caracterização dessas toxinas.

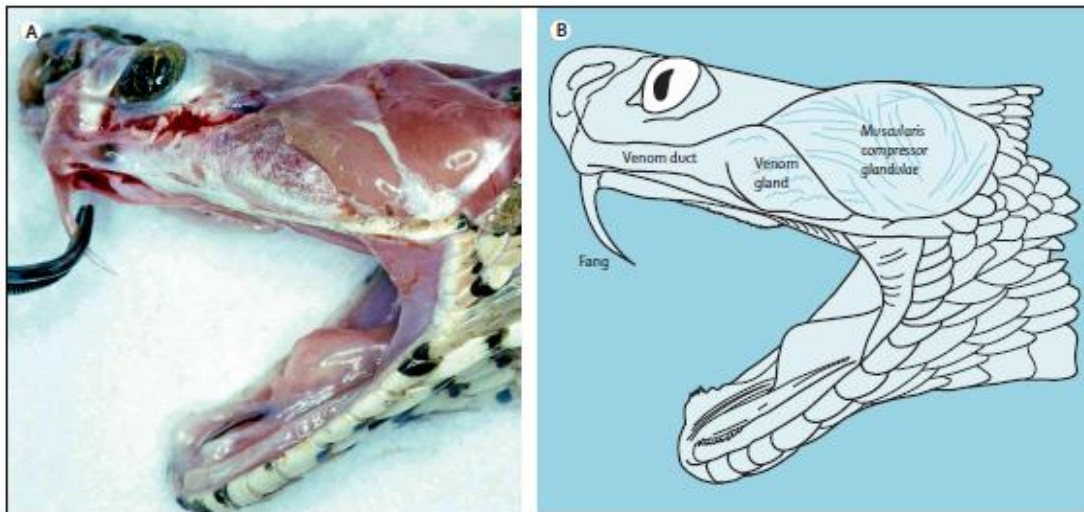
## **Capítulo I**

### **Fundamentação Teórica**

#### **Peçonha de serpentes: constituição, caracterização, efeitos e aplicações**

## 1. Serpentes brasileiras

No Brasil, já foram identificadas mais de 260 espécies de serpentes, que podem ser classificadas em dois grupos básicos: peçonhentas e não peçonhentas (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001). As serpentes peçonhentas são providas de glândulas onde produzem e armazenam a peçonha, bem como dentes inoculadores móveis localizados na região do maxilar superior (Fig. 1.1). Aquelas que não apresentam esse aparato produtor e inoculador de peçonha não são peçonhentas, mas podem provocar ferimentos graves por estrangulamento ou infecção (Cardoso, 2003). As serpentes peçonhentas brasileiras pertencem a quatro gêneros principais: *Micrurus*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*. Essas serpentes estão distribuídas por todo território nacional e são responsáveis pelos acidentes ofídicos de relevância médica (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).



**Figura 1.1:** Anatomia bucal de um tipo de serpente peçonhenta. A) Espécie dissecada. B) Representação das localizações da glândula de peçonha (Venom gland) e da presa inoculadora do tipo solenóglifa (Fang) (Warrel, 2010).

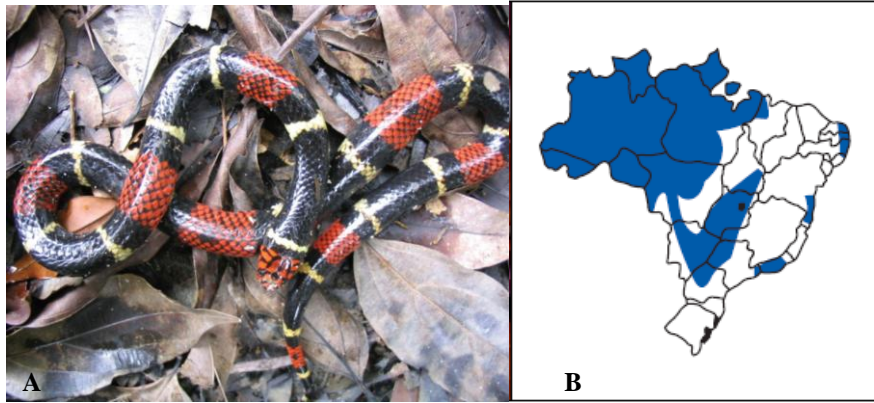
A presença de fosseta loreal, um órgão sensorial termorreceptor localizado entre as narinas e os olhos do animal, e de presas inoculadoras é a forma mais segura de identificar uma serpente peçonhenta (Fig. 1.2). No entanto, as espécies peçonhentas do gênero *Micrurus* são uma exceção, pois não

apresentam fosseta loreal, além de possuírem presas diminutas, fixas na maxila e difíceis de serem identificadas (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).



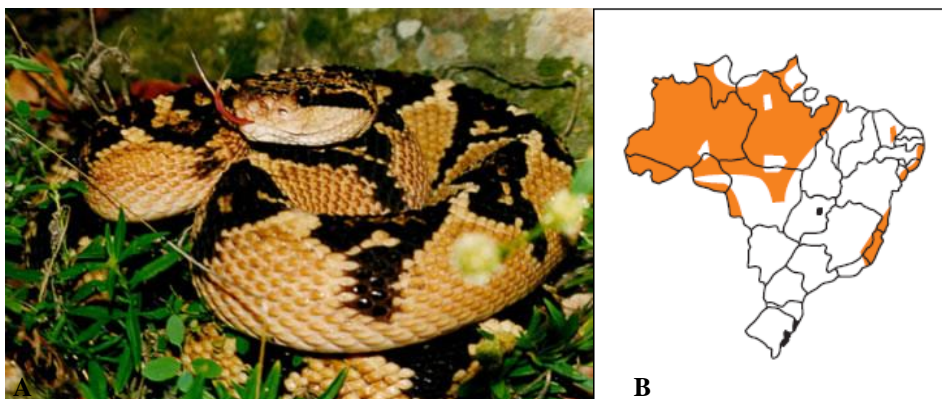
**Figura 1.2:** Foto de uma serpente peçonhenta. A seta evidencia a presença de fosseta loreal.  
Fonte: [www.portaldoprofessor.mec.gov.br](http://www.portaldoprofessor.mec.gov.br)

As serpentes do gênero *Micrurus* pertencem à família Elapidae e são conhecidas popularmente como corais. Geralmente, são espécies não agressivas e apresentam um padrão de cor característico em anéis vermelhos, brancos e pretos com diferentes combinações. As espécies não peçonhentas desse gênero, as falsas corais, podem mimetizar a coloração das corais verdadeiras (peçonhentas), que só são seguramente identificadas pela presença dos dentes inoculadores. Diferente das outras serpentes peçonhentas brasileiras, a presa das corais é curta e fixa na região anterior do osso maxilar, que é uma característica de dentição proteróglifa (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001). Por isso, os acidentes são mais raros, cerca de 0,7%, e, geralmente, ocorrem somente quando essas serpentes são manuseadas intencionalmente (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009). A maioria dos acidentes é registrada na região sul do Brasil, onde a espécie *M. corallinus* é predominante. No entanto, a região amazônica é o local que abriga o maior número de espécies *Micrurus*, como *M. spixii* e *M. lemniscatus*, e a única espécie de hábitos aquáticos, *M. surinamensis* (Fig. 1.3) (Cardoso *et al.*, 2003; Bucarechi *et al.*, 2006).



**Figura 1.3:** (A) *Micrurus surinamensis* (Foto: Pardal e col., 2010). (B) Distribuição da espécie no Brasil (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).

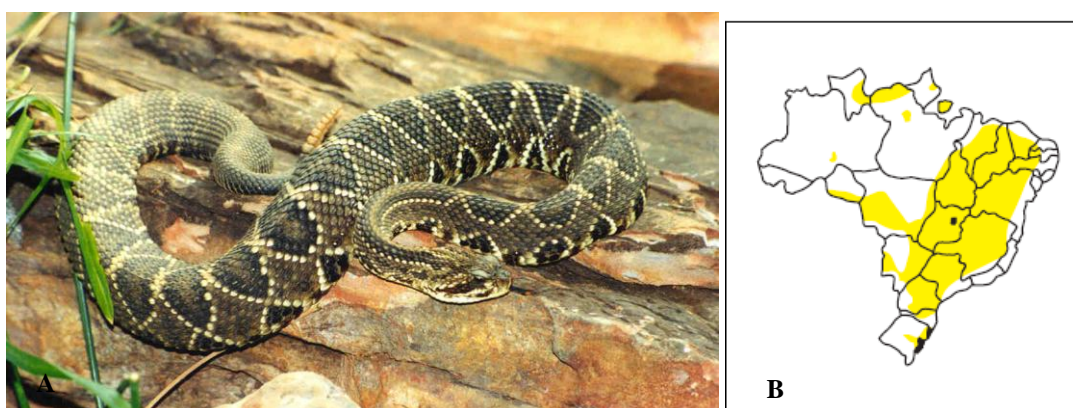
Os gêneros *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis* e *Bothrocophias*) pertencem à família Viperidae, subfamília Crotalinae. Para o gênero *Lachesis*, as espécies brasileiras compreendem apenas a espécie *L. muta* (Fig. 1.4), com duas subespécies predominantes no Brasil: *L. muta muta* e *L. muta rhombeata* (Zamudio & Greene, 1997). Essas serpentes são comuns em ambientes florestais, como Amazônia e Mata Atlântica. São as maiores serpentes das América, podendo atingir até 4 m de comprimento (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009).



**Figura 1.4:** (A) *Lachesis muta* (Foto: [www.ivb.rj.gov.br/.../lachesis\\_1\\_gde.jpg](http://www.ivb.rj.gov.br/.../lachesis_1_gde.jpg)). (B) Distribuição da espécie no Brasil (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).

Tanto as serpentes do gênero *Bothrops* quanto as *Crotalus* são amplamente encontradas em áreas de cerrado (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001). Do gênero

*Crotalus*, apenas a espécie *Crotalus durissus* (*Caudisona durissa*, segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2010) ocorre no Brasil (Fig. 1.5), distribuída em várias subespécies, como *C. durissus terrificus* e *C. durissus collilineatus* (Hoge & Romano; 1979). As espécies são encontradas em ambientes abertos, áreas secas e raramente em faixas litorâneas. Essas serpentes são comumente denominadas de cascavéis e são facilmente identificadas pela presença de um guizo ou chocalho na porção terminal da cauda, que emite um ruído característico (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009).

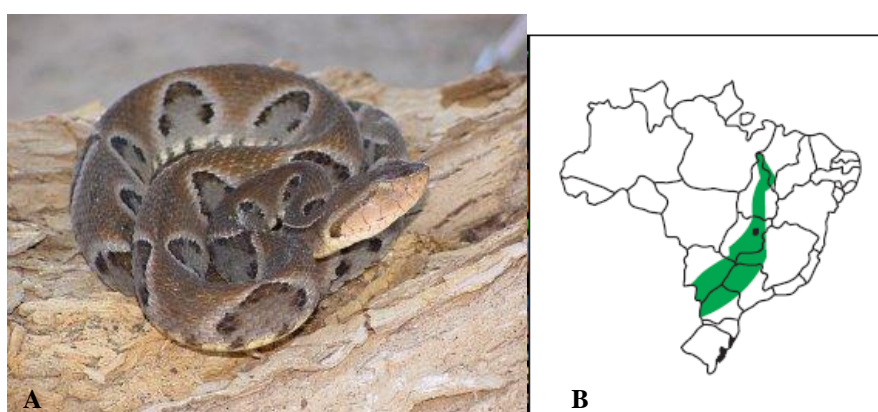


**Figura 1.5:** (A) *Crotalus durissus* (Foto: [http://portaldoprofessor.mec.gov.br/storage/recursos/9742/crotalus\\_durissus.jpg](http://portaldoprofessor.mec.gov.br/storage/recursos/9742/crotalus_durissus.jpg)). (B) Distribuição da espécie no Brasil (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).

O gênero *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis* e *Bothrocophias*) apresenta espécies distribuídas em todo território brasileiro (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009). Estas serpentes habitam preferencialmente ambientes úmidos, como matas e áreas cultivadas, locais de proliferação de roedores, zonas rurais e periferias de cidades. Apresentam hábitos noturnos e são agressivas quando ameaçadas (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001). As serpentes botrópicas, assim como crotálicas, apresentam dentição solenóglifa, caracterizada por presas caniculadas, móveis e localizadas na porção anterior da maxila (que se projetam para frente no momento do ataque), o que garante maior eficiência na inoculação da peçonha (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009).

As espécies *Bothrops* sp. são extremamente variáveis ecológica, geográfica e morfológicamente, em comparação com outros gêneros da subfamília Crotalinae (Fenwick *et al.*, 2009). De acordo com classificações recentes, o clado botropóide contém 47 espécies, distribuídas em três gêneros: *Bothrocophias* (Gutberlet & Campbell, 2001), *Bothriopsis* e *Bothrops* (Campbell & Lamar, 2004). Essa classificação tem sido adotada pelo Ministério da Saúde (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009). No entanto, com base em evidências morfológicas e moleculares, Fenwick e col. (2009) propuseram uma nova análise filogenética com cinco gêneros: *Bothrops*, *Bothriopsis* (Campbell & Lamar, 2004), *Bothrocophias* (Gutberlet & Campbell, 2001), *Bothropoides* e *Rhinocerophis*. Algumas espécies comuns do sudeste brasileiro como *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus* foram renomeadas, respectivamente, como, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides jararaca* e *Rhinocerophis alternatus* (Fenwick *et al.*, 2009). Enquanto a espécie *Bothrops moojeni* foi mantida neste gênero.

A serpente *B. moojeni* (Fig. 1.6), conhecida como caiçaca, é a principal espécie dos cerrados. São serpentes robustas e silenciosas (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001). Na região sudeste do Brasil, especificamente nos municípios do Triângulo Mineiro, essa espécie é predominante e responsável pela maioria dos acidentes botrópicos (Da Silva *et al.*, 2003).



**Figura 1.6:** (A) *Bothrops moojeni* (Foto: [www.tc.umn.edu/.../Bothrops%20moojeni\\_1.JPG](http://www.tc.umn.edu/.../Bothrops%20moojeni_1.JPG)). (B) Distribuição da espécie no Brasil (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).



## 2. Envenenamento ofídico

A maioria dos acidentes com serpentes, cerca de 73,5 %, ocorre com espécies do gênero *Bothrops* (incluindo *Bothriopsis* e *Bothrocophias*), enquanto os gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* são responsáveis por 7,5%, 3% e 0,7% dos casos, respectivamente (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009). As propriedades da peçonha diferem entre os gêneros, sendo predominantemente neurotóxica na crotálica e elapídica, proteolítica e inflamatória na botrópica e laquética. As peçonhas botrópicas e crotálicas também são capazes de induzir distúrbios de coagulação e miotoxicidade (Rosenfeld, 1971; Nishioka & Silveira, 1992; Barraviera & Ferreira, 2005; Warrell, 2010).

O envenenamento crotálico apresenta o maior índice de letalidade (1,87%), em relação aos demais acidentes (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001). A elevada toxicidade da peçonha crotálica é atribuída, principalmente, à crotoxina, um componente neurotóxico que atua nas terminações nervosas inibindo a liberação de acetilcolina, desencadeando paralisias motoras e outros distúrbios neurológicos. O sintoma mais característico do envenenamento crotálico é o aparecimento da chamada “fácies miastênica” ou “fácies neurotóxica”, onde se observam a queda das pálpebras, visão dupla, dificuldade de acomodação visual, paralisia do músculo dos olhos, flacidez da musculatura facial e paralisia dos nervos cranianos (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).

Além disso, devido à ação miotóxica da peçonha crotálica, podem ocorrer manifestações evidentes de rabdomiólise, ou seja, lesão de fibras musculares, com dores musculares generalizadas, liberação de enzimas e mioglobina no plasma sanguíneo e na urina. (Rosenfeld, 1971). As manifestações hematológicas, como incoagulabilidade ou aumento do tempo de coagulação do sangue, também ocorrem nesse tipo de acidente (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001). As lesões musculares sistêmicas, os distúrbios de coagulação e a nefrotoxicidade direta decorrentes do envenenamento crotálico contribuem para insuficiência renal, que é uma das principais causas de óbito neste caso (Pinho et al., 2000).

Nesses acidentes não são observados sinais inflamatórios significativos no local da picada. A ausência de dor local ou dor e edema discretos, seguidos de parestesia local, com sensação de formigamento e adormecimento podem acontecer (Rosenfeld, 1971). Curiosamente, essa peçonha também é capaz de provocar analgesia e tem sido utilizada no tratamento de dores em humanos desde o século passado (Brazil, 1950).

Os acidentes com serpentes do gênero *Micrurus* apresentam manifestações clínicas muito semelhantes as do envenenamento crotálico. A peçonha daquelas serpentes também contém neurotoxinas que agem rapidamente sobre receptores neurais, afetando funções neurológicas e motoras (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001; Pardal et al., 2010).

No acidente laquélico, os efeitos locais e sistêmicos são praticamente indistinguíveis do quadro desencadeado pela peçonha botrópica, embora ocorra com menor frequência (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009).

No envenenamento botrópico as manifestações locais são marcantes e ocorrem já nas primeiras horas após a picada. Evidencia-se o aparecimento de edema, dor e equimoses na região afetada, progredindo para mionecrose e maiores complicações que podem levar a amputação e/ou déficit funcional do membro acometido (Nishioka & Silveira, 1992). A patogênese desses efeitos está relacionada, principalmente, à ação proteolítica da peçonha sobre estruturas endoteliais e à lesão tecidual induzida por proteases e componentes miotóxicos. As alterações na microvasculatura desencadeiam extravasamento de plasma e reação inflamatória no local da picada. O aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de proteínas e mediadores inflamatórios levam a formação de edema, geralmente acompanhado de dor (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Gutiérrez & Rucavado, 2000; Teixeira *et al.*, 2009; Zychar *et al.*, 2010).

Os efeitos sistêmicos da peçonha botrópica devem-se, principalmente, aos distúrbios de coagulação. As toxinas ofídicas, que afetam o sistema hemostático, podem afetar a coagulabilidade sanguínea e danificar vasos, causando eventos trombóticos e hemorrágicos (Guia de vigilância epidemiológica, MS, 2009). Os efeitos hemostáticos secundários, como produção de microcoágulos, hipotensão arterial e desidratação podem

comprometer ainda mais o estado do acidentado, ocasionando choque hipovolêmico, lesão de órgãos e trombose (Sajevic *et al.*, 2011). O quadro 2.1 resume alguns efeitos hemostáticos provocados por toxinas isoladas de peçonhas botrópicas. Apesar da baixa letalidade, a frequência de sequelas é elevada, em torno de 10% nos acidentes botrópicos, associada a fatores de risco, como uso de torniquete e retardo na administração da soroterapia.

**Quadro 2.1:** Efeitos hemostáticos provocados por toxinas isoladas de peçonhas botrópicas.

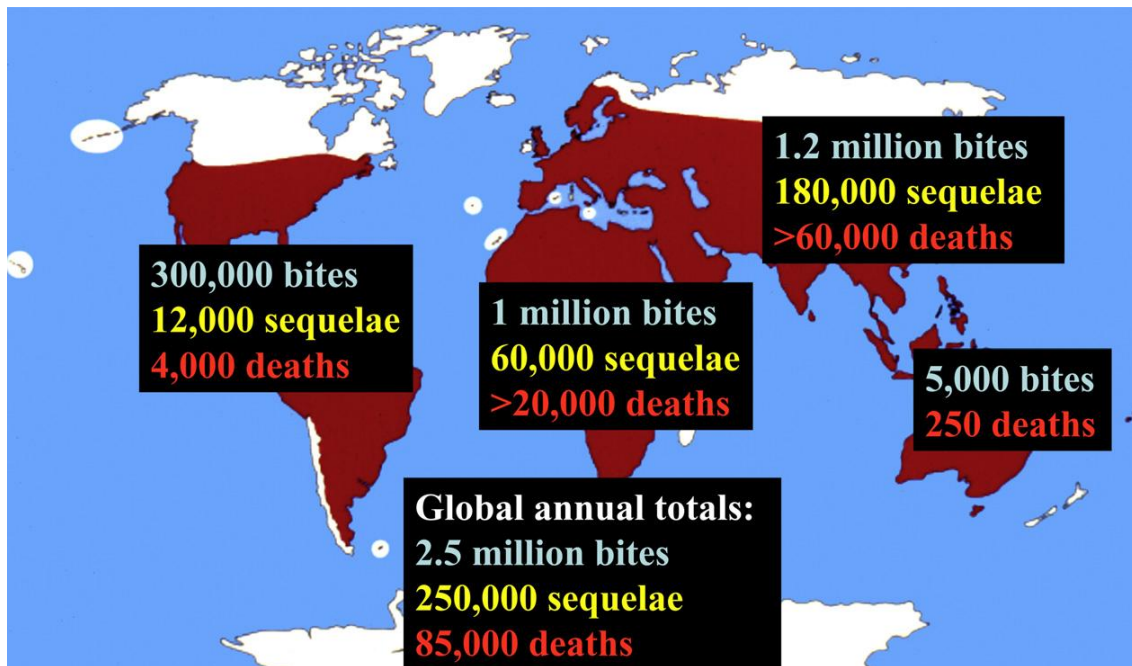
<b>Toxina</b>	<b>Serpente</b>	<b>Atividade</b>	<b>Referência</b>
BaP1	<i>B. asper</i>	Hemorrágica, mionecrótica e inflamatória	Gutierrez <i>et al.</i> , 1995; Rucavado <i>et al.</i> , 1995
Jararagina	<i>B. jararaca</i>	Hemorrágica e inibidora de agregação plaquetária	Paine <i>et al.</i> , 1992; Kamiguti <i>et al.</i> , 1996
Bhaltermina	<i>B. alternatus</i>	Desfibrinogenante	Costa <i>et al.</i> , 2010
BleucMP	<i>B. leucurus</i>	Anticoagulante e trombolítica	Gomes <i>et al.</i> , 2011
BmooMPa-I	<i>B. moojeni</i>	Desfibrinogenante e trombolítica	Bernardes <i>et al.</i> , 2008

A administração da soroterapia adequada é o tratamento mais eficaz no controle das manifestações clínicas do ofidismo. A precocidade do atendimento é crucial para o salvamento e reabilitação das vítimas, ainda assim as complicações locais são de difícil reversão pela terapêutica tradicional. O soro antiofídico é formado por concentrados de imunoglobulinas, produzido por sensibilização de diversos animais (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, FUNASA, 2001).

No entanto, a produção de um soro antiofídico capaz de neutralizar satisfatoriamente os diversos efeitos das diferentes peçonhas ainda tem sido estudada. Existe uma imensa variedade de serpentes em todo mundo, com diferenciações geográficas, morfológicas e biológicas que refletem nos efeitos fisiopatológicos de suas peçonhas e na utilização de soros antiofídicos (Chippaux *et al.*, 1991; Boldrini-França *et al.*, 2010). Queiroz e col. (2008) evidenciaram uma ampla taxa de variação interespecífica da composição e atividade da peçonha de serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*, o que justificaria a deficiência da neutralização de alguns efeitos pelo soro antibotrópico usual. (Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por

animais peçonhentos, FUNASA, 2001). Além disso, o tratamento de envenenamentos por serpentes é um desafio da saúde pública ainda negligenciada na maioria das regiões do mundo (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Mais estudos e incentivos políticos são necessários para aumentar a produção de antivenenos mais seguros e eficazes. Esses investimentos poderiam minimizar os impactos dos acidentes ofídicos, que incluem consideráveis índices de morbidades e mortalidade da população economicamente ativa (Fig. 2.2) (Gutiérrez *et al.*, 2010).



**Figura 2.2:** Estimativa global e regional de morbidade e mortalidade provocadas por envenenamentos ofídicos (Gutiérrez *et al.*, 2010).

### 3. Peçonhas de serpentes

A peçonha produzida por serpentes configura um arsenal bioquímico, decorrente de aquisições evolutivas, que garante a captura e digestão de presas, bem como uma eficiente estratégia de defesa (Kochva *et al.*, 1983). Várias substâncias farmacologicamente ativas que compõem as peçonhas, principalmente constituintes protéicos, atuam na indução de alterações fisiológicas locais e sistêmicas no homem e em outros animais. O conhecimento do mecanismo de ação dessas toxinas possibilita a elaboração de modelos farmacológicos eficientes no tratamento do próprio envenenamento

e de outras disfunções similares, bem como em diversas aplicações clínicas, desde o diagnóstico à terapêutica (Marsh & Williams, 2005).

As peçonhas de serpentes são compostas por inúmeras substâncias, como íons e biomoléculas, especialmente proteínas e peptídeos farmacologicamente ativos (Tu, 1977; Calvete *et al.*, 2007). Dentre os componentes protéicos das peçonhas de serpentes encontram-se: metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases  $A_2$ , fosfodiesterases, colinesterases, L-aminoácido-oxidases, nucleosidases, hialuronidases, desintegrinas, entre outros (Matsui *et al.*, 2000; Sweson & Markland Jr., 2005; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006; Matsui *et al.*, 2010).

De forma geral, nas peçonhas ofídicas os componentes mais representativos incluem fosfolipases  $A_2$ , serino e metaloproteases (Alam *et al.*, 1996; Tashima *et al.*, 2008). As fosfolipases  $A_2$  são enzimas que catalisam a hidrólise específica da ligação 2-acil-éster de fosfolipídeos de membrana, promovendo a liberação de ácidos graxos e lisofosfatídeos (Kini & Evans, 1989; Kudo & Murakami, 2002; Soares *et al.*, 2004). Elas são consideradas uma importante classe de proteínas encontradas em peçonhas do gênero *Bothrops* sp., responsáveis por diversas propriedades biológicas, incluindo cardio e miotoxicidade, ações hemolíticas, anticoagulantes e antiplaquetária (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Kini, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004; Montecucco *et al.*, 2008; Santos-Filho *et al.*, 2008).

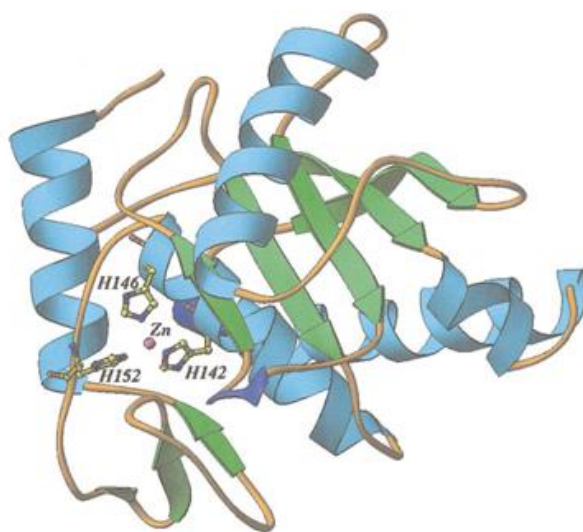
As serinoproteases compreendem enzimas com região catalítica altamente conservada, apresentando os seguintes resíduos de aminoácidos: Serina195, Histidina57 e Aspartato102 (Serrano & Maroun, 2005). As serinoproteases agem de diferentes formas sobre a hemostasia, interferindo na agregação plaquetária, em diversos fatores da cascata de coagulação e no sistema fibrinolítico (Pirkle, 1998). Trombina-símile (ou *trombin-like*) são exemplos de serinoproteases de peçonha de serpentes que tem efeito semelhante à trombina plasmática, pois também são capazes de degradar o fibrinogênio plasmático, um importante fator da cascata de coagulação (Pirkle, 1998; Matsui *et al.*, 2000).

As metaloproteases agem, principalmente, como fatores hemorrágicos, interferindo também na cascata de coagulação, na agregação plaquetária e em

mecanismos inflamatórios (Gutiérrez & Rucavado, 2000; Matsui *et al.*, 2000; Fox & Serrano, 2005).

### 3.1. Metaloproteases ofídicas

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (*snake venom metalloproteinases* - SVMPs) são caracterizadas pela dependência catalítica de íons metálicos ( $Zn^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  ou  $Mg^{+2}$ ) e pela grande diversidade estrutural e funcional (Gutiérrez & Rucavado, 2000). Estas enzimas são sintetizadas na glândula de peçonha como proteínas multidomínios, incluindo um domínio pró-enzima responsável pela inativação dessas proteases antes da secreção. As SVMPs, em geral, são zinco dependentes (metzincinas) e apresentam uma sequência peptídica metal-ligante com três resíduos de histidina e uma glicina, constituindo o domínio catalítico metaloprotease (Fig. 3.1) (Rodrigues *et al.*, 2000; Fox & Serrano, 2005; Ramos & Selistre-de-Araujo, 2006).

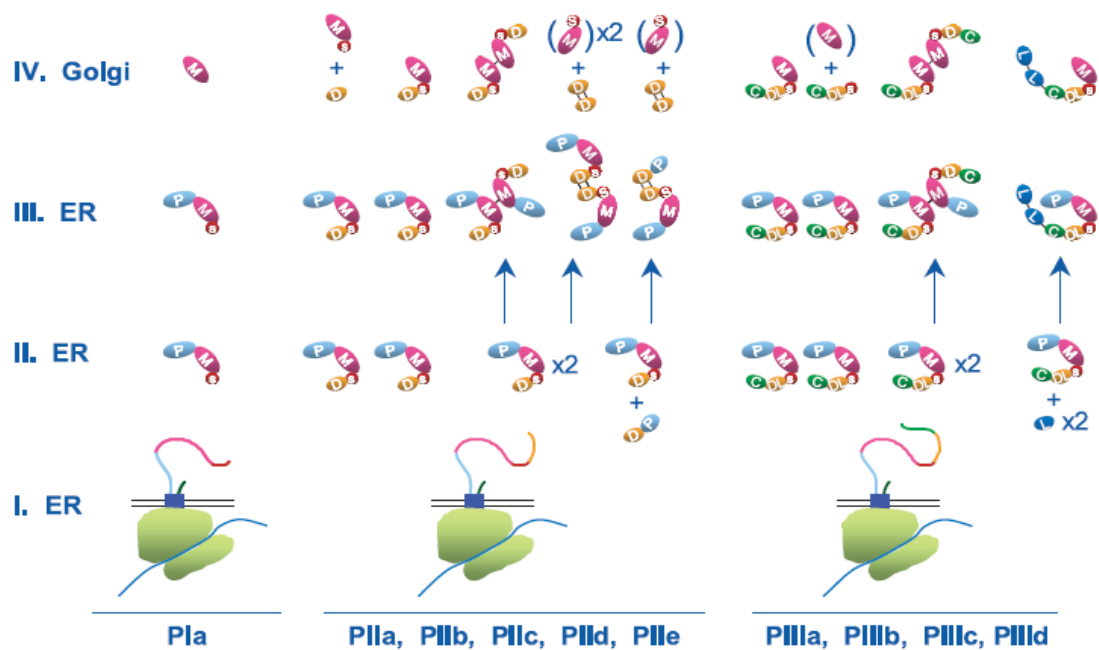


**Figura 3.1:** Modelagem molecular da neuwiedase, uma metaloprotease P-I. Destaque para o domínio metaloprotease, com resíduos de histidina (H142/146/152) associados ao zinco (Zn) (Rodrigues *et al.*, 2000).

De acordo com a organização de diversos domínios não enzimáticos, as SVMPs foram distribuídas em três classes principais: P-I, P-II e P-III (Fig.3.2) (Fox & Serrano, 2008a). A classe P-I apresenta proteínas com massa molar entre 20 e 30 kDa que contêm apenas o domínio catalítico. As proteases de 30 a 60 kDa compõem a classe P-II, constituídas pelos domínios metaloprotease e

desintegrina. A classe P-III compreende as enzimas com massas molares entre 60-100 kDa, contém os domínios desintegrina-*like* (semelhante a desintegrina) e rico em cisteína adicional ao domínio metaloprotease. As classes P-II e P-III são divididas em diferentes subclasses, de acordo com processamento proteolítico ou dimerização. As subunidades semelhantes a lectina tipo C são encontradas associadas por pontes dissulfeto a metaloproteases P-III, configurando a subclasse P-IIIId, anteriormente descrita como P-IV (Fox & Serrano, 2005). A subclasse P-IIIId tem sido considerada como decorrente de modificação pós-traducional (Fox & Serrano, 2008a). De acordo com esses pesquisadores, as proteínas de peçonha de serpentes, como todas as proteínas de secreção, sofrem modificações pós-traducionais direcionadas por sequências sinais e mecanismos próprios do retículo endoplasmático e complexo de golgi celulares, como oxidação e formação de ligações dissulfeto, glicosilação e multimerização. Essas modificações associadas aos mecanismos genômicos e transcriptômicos poderiam elucidar a complexa estruturação e funcionalidade das SVMPs. As técnicas de venômica, proteômica e transcriptômica também têm auxiliado no direcionamento da purificação de toxinas específicas e de relevante potencial terapêutico (Serrano & Fox, 2008; Boldrini-França et al., 2009).

Diversos efeitos biológicos da peçonha de serpentes são atribuídos às metaloproteases, incluindo hemorragia, edema, inflamação e necrose (Gutiérrez & Rucavado, 2000). A patogênese desses efeitos está relacionada, principalmente, à ação das SVMPs sobre componentes vasculares e fatores de coagulação. Essa característica contribui para um efeito hemorrágico diferencial entre as classes P-I, P-II e P-III e para outros efeitos biológicos dessas toxinas.



**Figura 3.2:** Representação esquemática hipotética da biossíntese e das modificações pós-traducionais de SVMPs proposta por Fox e Serrano (2008a). I: A tradução das proteases na superfície do retículo endoplasmático; II, III e IV: No retículo endoplasmático e no complexo de golgi ocorrem modificações diversas na associação dos domínios metaloprotease e não-enzimáticos para produção das três classes de SVMPs (PI, PII e PIII), liberadas em vesículas secretórias. Os parênteses indicam que esse produto de transformação não tem sido observado na peçonha. P= pró-domínio; M= domínio metaloprotease; Dis= domínio desintegrina; DL= domínio desintegrina-like; Cys= domínio rico em cisteína; L= domínio lectina.

Vários estudos demonstram que a presença dos domínios não enzimáticos direciona e potencializa o mecanismo hemorrágico das SVMPs (Kamiguti *et al.*, 1996; Jia *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 2005; Escalante *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2006; Baldo *et al.*, 2010). A alta atividade hemorrágica da classe P-III tem sido atribuída à presença dos domínios desintegrina-*like* e rico em cisteína. Esses domínios se associam a componentes da membrana basal e integrinas de células endoteliais, posicionando o domínio catalítico em uma localização favorável à proteólise e ruptura da microvasculatura (Serrano *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006; Moura-da-Silva *et al.*, 2008; Sajevic *et al.*, 2011). As metaloproteases P-I, por não apresentarem os domínios adicionais, praticamente não causam hemorragia, ou a provocam por mecanismos indiretos, devido a lesão tecidual e degradação de fatores de coagulação (Rodrigues *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2001; Gutiérrez *et al.*, 2005).



Baldo e col. (2010) investigaram o mecanismo hemorrágico de duas metaloproteases: a jararagina (Paine *et al.*, 1992), da classe P-III, altamente hemorrágica e a BaP1 (Baldo *et al.*, 2008), uma P-I com baixo efeito hemorrágico. Nesse estudo, os autores relataram que a intensa hemorragia induzida pela jararagina está relacionada ao seu acúmulo nos capilares, através das propriedades adesivas dos domínios não enzimáticos, permitindo rápida proteólise de componentes da membrana basal, especialmente colágeno tipo IV. O domínio rico em cisteína é essencial para a ligação da metaloprotease a substratos que expressam o fator de von Willebrand (vWF), enquanto o domínio desintegrina-*like* seria responsável pela alta afinidade de ligação ao colágeno e concentração da toxina no endotélio. Contrariamente, a BaP1 não foi capaz de degradar colágeno e de induzir hemorragia *in vivo*. Apesar do domínio catalítico dessas metaloproteases ser semelhante, um mecanismo adicional, relacionado ao acúmulo dessas nos capilares, pode potencializar a hidrólise de componentes endoteliais com consequente rompimento dos vasos e sangramento (Jia *et al.*, 1997; Baldo *et al.*, 2010). A ação dos domínios desintegrina e rico em cisteína também interferem nos mecanismos de agregação plaquetária, geralmente provocando a inibição desse processo, o que pode contribuir ainda mais para o efeito hemorrágico (Kamiguti, 1996; Wijeyewickrema *et al.*, 2005; Moura-da-Silva *et al.*, 2007).

As metaloproteases também são exploradas por sua ação fibrino(geno)lítica, aplicadas como agentes trombolíticos ou na prevenção da formação de trombos (Ahmed *et al.*, 1990; Markland, 1996; Swenson & Markland Jr., 2005). O mecanismo de ação dessas proteases consiste na proteólise direta do fibrinogênio ou do complexo de fibrina, levando à incoagulabilidade sanguínea por esgotamento daquele fator de coagulação ou por dissolução do trombo formado, respectivamente (Markland Jr., 1998). A molécula de fibrinogênio apresenta estrutura dimérica formada por três cadeias polipeptídicas, denominadas A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$ , que contêm fibrinopeptídeos na região N-terminal. Através de uma série de mecanismos proteolíticos fisiológicos, o fibrinogênio é convertido em fibrina, levando a formação de coágulos (Davie *et al.*, 1991).

Diferentes metaloproteases isoladas de peçonhas botrópicas, especialmente da classe P-I, interferem nesse processo (Rodrigues *et al.*,

2000; Bernardes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009). Enzimas fibrinogenolíticas ou fibrinogenases são classificadas conforme a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio (Markland Jr., 1998). Aquelas que degradam preferencialmente a cadeia A $\alpha$  são classificadas como  $\alpha$ -fibrinogenases, enquanto as  $\beta$ -fibrinogenases apresentam maior especificidade pela cadeia B $\beta$  (Markland Jr., 1998, Matsui *et al.*, 2000; Swenson & Markland Jr., 2005). Até o momento, ainda não foram caracterizadas toxinas botrópicas que hidrolisem a cadeia  $\gamma$ . Algumas fibrinogenases são capazes de degradar coágulos de fibrina já formada, apresentando também atividade fibrinolítica (Bernardes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2011). Essas metaloproteases têm sido consideradas como drogas potenciais no tratamento de pacientes com distúrbios trombóticos vasculares (Braud *et al.*, 2000; Marsh & Willians, 2005).

#### **4. Mecanismos e efeitos inflamatórios**

A reação inflamatória é um mecanismo fisiopatológico relevante para o progresso da lesão tecidual induzida pelo envenenamento ofídico (Granger & Kubes, 1994; Voronov *et al.*, 1999). A inflamação pode ser definida como uma reação imunobiológica a lesões e agentes nocivos que interferem no mecanismo fisiológico animal. O reconhecimento inicial da resposta inflamatória leva a produção e/ou liberação de diversas substâncias químicas endógenas, como: histamina, bradicinina, óxido nítrico, eicosanóides e citocinas. Esse processo culmina na ativação e recrutamento de células de defesa para contenção da infecção ou do dano tecidual (Granger & Kubes, 1994). A peçonha ofídica pode ativar diferentes vias inflamatórias, estimulando a ativação de células e mediadores inflamatórios específicos. A investigação desse efeito inflamatório permite a caracterização dos mecanismos farmacológicos e fisiopatológicos envolvidos, principalmente, em efeitos locais ocasionados pelas peçonhas de serpentes, como edema e dor.

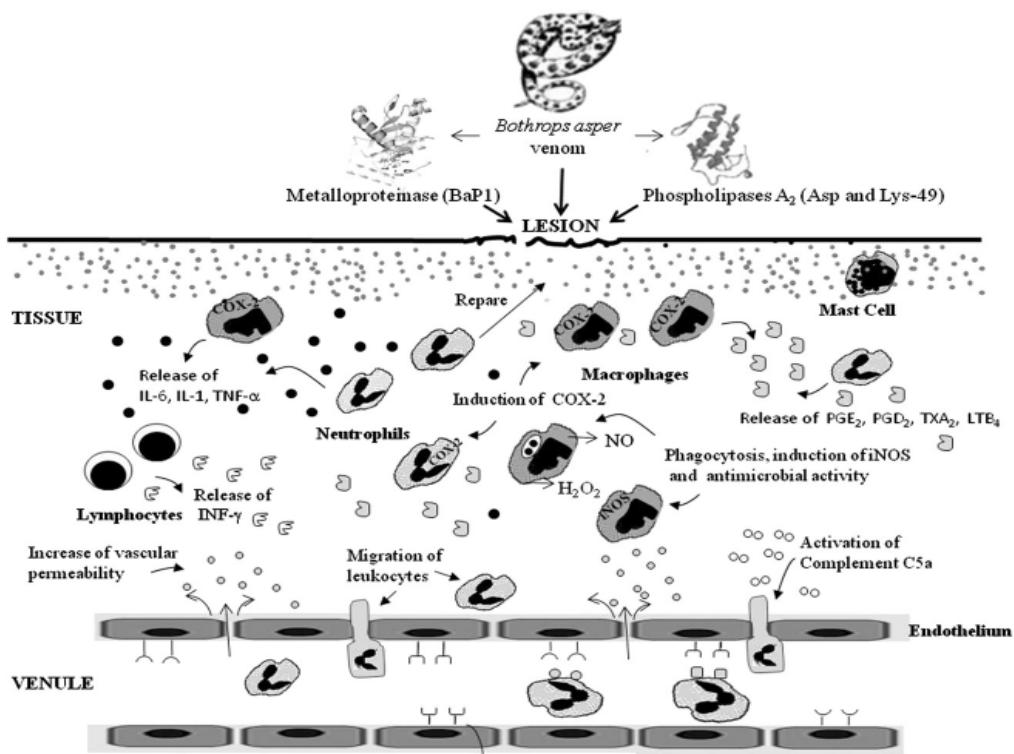
A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, mecanismos primários na formação de edema, dependem da liberação de mediadores inflamatórios como histamina e eicosanóides. O exsudado formado permite a liberação de maior quantidade de mediadores plasmáticos e celulares, bem

como fatores de coagulação e fibrinolíticos, componentes do sistema complemento e citocinas, além da indução de migração de células de defesa (Fig. 4.1) (Williams, 1984). Os mastócitos, por exemplo, que são células residentes de regiões vascularizadas, possuem numerosos grânulos que armazenam potentes mediadores biologicamente ativos, apresentando ação imediata na reação inflamatória (Metz & Maurer, 2007). A desgranulação de mastócitos favorece a liberação de aminas vasoativas, principalmente histamina (Hofstra *et al.*, 2003), contribuindo para o efeito edematogênico das peçonhas (Faria *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*; 2003; Nascimento *et al.*, 2010). Nascimento e col. (2010) demonstraram que a peçonha de *B. asper*, através da desgranulação de mastócitos, provoca a liberação de histamina. Pela ativação de receptores específicos, em especial os receptores H<sub>1</sub> encontrados em células endoteliais, a histamina aumenta a permeabilidade vascular, provocando formação de edema e infiltração leucocitária (Majno *et al.*, 1961; Nascimento *et al.*, 2010). O aumento de fluxo sanguíneo na área lesada, devido à dilatação e ao intumescimento dos capilares e arteríolas, também causa eritema (hiperemia) e elevação da temperatura local (calor) (Granger & Kubes, 1994).

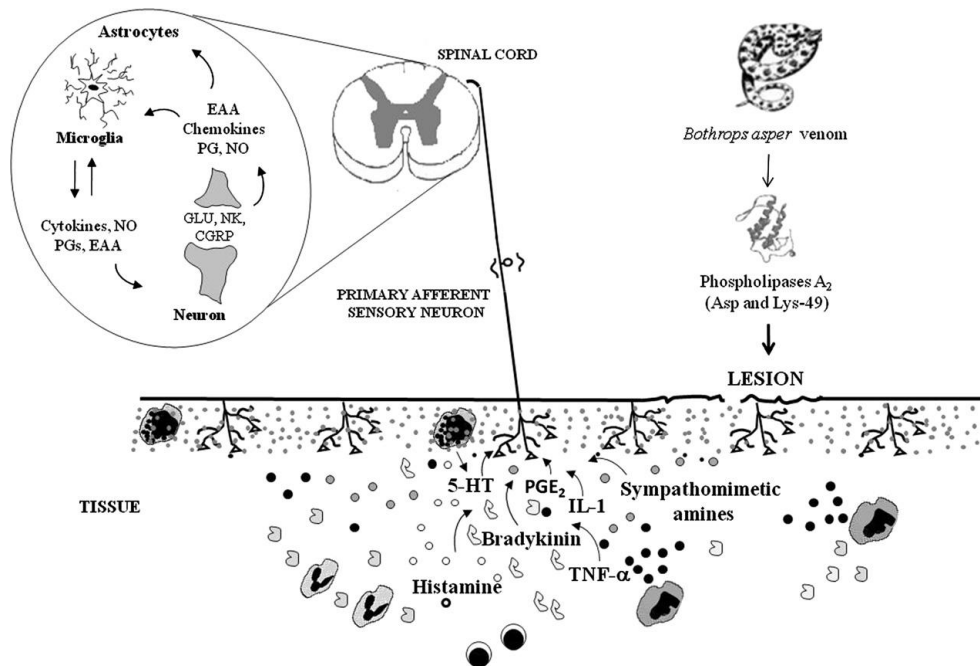
A inflamação também está frequentemente associada à dor e hiperalgesia (McMahon *et al.*, 2005). As aminas biogênicas (histamina, serotonina, adrenalina), em altas concentrações, também podem atuar em neurônios nociceptivos. Esses neurônios expressam, por exemplo, receptores H<sub>1</sub>, cuja ativação aumenta a permeabilidade das fibras axônicas ao cálcio, acarretando a síntese e liberação de outros agentes inflamatórios e transmissão de estímulo doloroso (Dray, 1995). Segundo a Associação Internacional de Estudo da Dor (IASP), dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial e/ou de fato, engloba então, aspectos biológicos, culturais e psíquicos. A dor transitória é observada quando neurônios sensitivos são ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. As fibras nervosas responsáveis pela nocicepção são denominadas fibras C, A $\delta$  e receptores silenciosos (*silent nociceptors*). Os últimos só se tornam ativados em algumas condições patológicas, como no processo inflamatório. As fibras nervosas nociceptivas estão envolvidas na transdução do estímulo nocivo periférico, na condução do potencial de ação

para a medula espinal e na transmissão da informação nociceptiva para os neurônios centrais (Schaible & Schmidt, 1988; Woolf & Costigan, 1999; Julius & Basbaum, 2001).

Na inflamação, a dor pode ocorrer espontaneamente e/ou por fenômenos de sensibilização, como alodinia (sensibilização central) e hiperalgesia (Fig. 4.2). A sensibilização de nociceptores pela ação de mediadores inflamatórios caracteriza a hiperalgesia (Besson, 1999; Kidd & Urban, 2001; Millan, 1999). Dentre os mediadores inflamatórios envolvidos na nocicepção, podemos destacar bradicinina, serotonina, histamina, citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$ ), eicosanóides, mediadores simpáticos e óxido nítrico (NO). Estudos experimentais evidenciaram que o efeito hiperalgésico induzido por peçonhas ofídicas é mediado por eicosanóides e bradicinina, principalmente (Teixeira *et al.*, 1994; Chacur *et al.*, 2001; Chacur *et al.*, 2003).



**Figura 4.1:** Representação hipotética da reação inflamatória induzida por proteínas isoladas da peçonha de *B. asper*. Metalloproteases e fosfolipases A<sub>2</sub> provocam lesão tecidual, desencadeando reação inflamatória local e edema. Mediadores inflamatórios e quimiotáticos são liberados e induzem o aumento da permeabilidade vascular, ativação e recrutamento de mastócitos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. IL-6, IL-1: interleucinas; TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral; PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>: prostaglandinas; TXA<sub>2</sub>: tromboxano; LTB<sub>4</sub>: leucotrieno; NO: óxido nítrico; COX-2: ciclooxigenase 2, INF- $\gamma$ : interferon-gama; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio (Teixeira *et al.*, 2009).



**Figura 4.2:** Representação do mecanismo central (aldonia) e periférico (hiperalgesia) envolvido na nocicepção induzida por fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas da peçonha de *B. asper*. Fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas provocam lesão tecidual, estimulando a liberação de diversos mediadores inflamatórios (bradicinina, serotonina, histamina, aminas simpatomiméticas, prostaglandinas e citocinas) que agem sobre receptores específicos de neurônios sensoriais (*primary afferent sensory neuron*). 5-HT: serotonina; PGs, PGE<sub>2</sub>: prostaglandinas; IL-1: interleucinas; TNFα: fator de necrose tumoral; NO: óxido nítrico; EAA, GLU: neurotransmissores; NK, CGRP: neuropeptídeos (Teixeira *et al.*, 2009).

A bradicinina é considerada um dos mediadores mais importantes da hiperalgesia. Os neurônios sensitivos apresentam receptores B<sub>2</sub> para bradicinina, cuja estimulação desencadeia aumento da permeabilidade a sódio e cálcio, com consequente ativação de fibras nervosas, liberação de neuropeptídeos, além da produção de ácido araquidônico e eicosanóides (Dray, 1995). A bradicinina ainda pode ativar células endoteliais que produzem óxido nítrico (NO), podendo contribuir também para a formação de edema (Busconi & Michel, 1993, Barbosa *et al.*, 2003). O NO é um gás solúvel sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em células endoteliais, macrófagos e células neurais, e está relacionado à vasodilatação (Busconi & Michel, 1993). Algumas aminas simpatomiméticas, como adrenalina e dopamina, também participam de fenômenos inflamatórios e hiperalgésicos (Chaves *et al.*, 1995; Chacur *et al.*, 2003). A ativação de α-adrenoceptores

pode estar associada à nocicepção, assim como a alterações vasculares, que também podem ser desencadeadas por  $\beta$ -adrenoceptores (McMahon, 1991; Chaves *et al.*, 1995).

Os eicosanóides são derivados lipídicos como: prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT). Pela ação de fosfolipases endógenas, ou provenientes das peçonhas ofídicas, os fosfolípidios de membrana são hidrolisados e liberam ácido araquidônico (Cabral, 2005). O ácido araquidônico pode ser degradado pela via da lipoxigenase, dando origem aos leucotrienos ou pela via das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que catalisam a biosíntese de prostaglandinas e tromboxanos (Majno & Joris, 2004). O LTB<sub>4</sub> é um potente agente quimiotático e ativador das respostas dos neutrófilos, tais como adesão ao endotélio vascular e geração de radicais livres, agravando a lesão tecidual. Os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> estão associados, principalmente, a vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular. A prostaglandina E<sub>2</sub>, produzida por macrófagos estimulados, possui efeito vasodilatador e participa da mediação hiperalérgica. A prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), encontrada na parede dos vasos, além de ser um inibidor de agregação plaquetária, possui efeito vasodilatador e aumenta o fluxo venular. A PGD<sub>2</sub>, o principal metabólito da via da ciclooxigenase nos mastócitos, é responsável por eventos vasculares que potencializam o edema (Kumar *et al.*, 2005).

O agravamento dos danos provocados pela ação das toxinas ofídicas associado à persistência do processo inflamatório pode fazer o quadro local evoluir para necrose e, muitas vezes, determinar a perda do membro afetado (Ruseenfeld, 1971). A necrose é um processo patológico de morte celular, caracterizado pela perda, parcial ou completa, da arquitetura e funcionalidade tecidual (Montenegro & Franco, 2004). Nos acidentes ofídicos a necrose pode ocorrer por diferentes mecanismos. A necrose muscular (mionecrose), por exemplo, é causada pela ação direta de fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas sobre a membrana das células musculares, pelas alterações vasculares ocasionadas por metaloproteases ou por proteínas miotóxicas que interferem no controle iônico dessas fibras (Harris, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2009). Outra característica deste processo é a presença de infiltrado leucocitário no local da lesão. Os leucócitos ativados liberam mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanóides, que amplificam a resposta inflamatória contribuindo para o

processo de necrose (Voronov *et al.*, 1999). O recrutamento de leucócitos é decorrente da resposta inflamatória induzida pela ação das proteínas presentes na peçonha e pela própria degeneração tecidual. O componente celular da reação é representado, primordialmente, por leucócitos polimorfonucleados (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleados (macrófagos e linfócitos). Nos estágios iniciais, a célula leucocitária predominante é o neutrófilo, responsável pela eliminação de agentes lesivos. Os macrófagos são observados em fases mais tardias e crônicas da inflamação, estando associados à fagocitose de restos celulares. Essas células também são elementos importantes no reparo e regeneração tecidual da mionecrose (Zamuner *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2009). Diversos estudos histológicos e ultraestruturais têm investigado a ação de diferentes proteínas isoladas de peçonhas botrópicas sobre o processo de necrose tecidual, investigando inclusive a reação inflamatória desencadeada nesse evento (Rucavado *et al.*, 1995; Santos-Filho *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010). Menezes e col. (2008) demonstraram que os domínios adicionais das metaloproteases da classe PIII, principalmente, podem estar relacionados ao aumento da migração leucocitária na microvasculatura. Enquanto, metaloproteases P-I parecem desencadear esses mecanismos inflamatórios a partir da ação do próprio domínio proteolítico (Fernandes *et al.*, 2006).

## 5. Referências bibliográficas

Ahmed, N.K.; Gaddis, R.R.; Tennant, K.D.; Lacz, J.P. Biological and thrombolytic properties of fibrolase: a new fibrinolytic protease from snake venom. **Haemostasis**, v. 20, p. 334–340, 1990.

Alam, J.M., Qasim, R., Alam, S.M. Enzymatic activities of some snake venoms from families Elapidae and Viperidae. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v.9 (1), p. 37–41, 1996.

Baldo, C.; Jamora, C.; Yamanouye, N.; Zorn, T.M.; Moura-da-Silva, A.M. Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom

Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4(6), p. 727, 2010.

Baldo, C.; Tanjoni, I.; Leon, I.R.; Batista, I.F.C.; Della-Casa, M.S.; Clissa, P.B.; Weinlich, R.; Lopes-Ferreira, M.; Lebrun, I.; Amarante-Mendes, G.P.; Rodrigues, V.M.; Perales, J.; Valente, R.H.; Moura-Da-Silva, A.M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, p. 54-65, 2008.

Barbosa, A.M.; Amaral, R.O.; Teixeira, C.F.; Hyslop, S.; Cogo, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515–523, 2003.

Besson, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

Barraviera, B.; Ferreira Jr, R.S. Acidentes ofídicos. Em: Veronesi R. Veronesi: **Tratado de infectologia**. Atheneu; São Paulo; 3a ed., p.1929-1947, 2005.

Bernardes, C.P.; Santos- Filho, N. A.; Costa, T. R.; Gomes, M. S. R.; Torres, F. S.; Costa, J.; Borges, M. H.; Richardson, M., Dos Santos, D. M.; Pimenta, A. M. C.; Homs-Brandeburgo, M. I.; Soares, A. M.; Oliveira, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 574-584, 2008.

Boldrini-França, J.; Rodrigues, R.S.; Fonseca, F.P.P.; Menaldo, D.L.; Ferreira, F.B.; Henrique-Silva, F.; Soares, A.M.; Hamaguchi, A.; Rodrigues, V.M.; Otaviano, AR.; Homs-Brandeburgo, M.I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, p. 586–595, 2009.

Boldrini-França, J.; Corrêa-Netto, C.; Silva, M.M.; Rodrigues, R.S.; De La Torre, P.; Pérez, A.; Soares, A.M.; Zingali, R. B.; Nogueira, R.A.; Rodrigues, V.M.;



Sanz, L.; Calvete, J.J. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **J Proteomics**, v. 73, p. 1758–1776, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed., 816 p., 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Fundação Nacional de Saúde, 3ª ed., 112 p., 2001.

Brazil, V. Do emprego da peçonha em terapêutica. **An. Paul. Med. Cir.**, p. 398-408, 1950.

Braud, S.; Bon, C.; Wisner, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

Bucarechi, F.; Hyslop, S.; Vieira, R.J.; Toledo, A.S.; Madureira, P.R.; Capitani, E.M. Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Rev Inst Med Trop.**, v. 48, p. 141-145, 2006.

Busconi, L.; Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 268 (12), p. 9030-9033, 1993.

Cabral, G. A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Science**, v. 77 (14), p. 1699-1710, 2005.

Calvete, J.J.; Juárez, P.; Sanz, L. Snake venomomics: Strategy and applications. **J Mass Spectrom.**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.

Campbell, J.A., Lamar, W.W. **The venomous reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates, 2004.

Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Fan, H.W.; Málaque, C.M.S.; Haddad Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. SP: Sarvier, 2003.

Chacur, M.; Picolo, G.; Gutiérrez, J.M.; Teixeira, C.F.P.; Cury, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 39, p. 1173–1181, 2001.

Chacur, M.; Longo, I.; Picolo, G.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Guerra, J.L.; Teixeira, C.F.P.; Cury, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon**, v. 41, p. 667–678, 2003.

Chaves, F.; Barboza, M.; Gutiérrez, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 33, p. 31–39, 1995.

Chippaux, J.P., Williams, V., White, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279–1303, 1991.

Costa, J.O.; Fonseca, K.C.; Mamede, C.C.N.; Beletti, M.E.; Santos-Filho, N.A.; Soares, A.M. ; Arantes, E.C. ; Hirayama, S.N.S.; Selistre-de-Araújo, H.S.; Fonseca, F.; Oliveira, F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377, 2010.

Da Silva, C.J.; Jorge, M.T.; Ribeiro, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, p. 251–255, 2003.

Davie, E.W.; Fujikawa, K.; Kisiel, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, v. 30, 10363-10370, 1991.

Dray, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 125-131, 1995.

Faria, L., Antunes, E., Bon, C., de Araujo, A.L. Pharmacological characterization of the rat paw oedema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**, v. 39, p. 825-830, 2001.

Fenwick, A.M.; Gutberlet Jr, R.L.; Evans, J.A.; Parkinson, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological J. L. S.**, v. 156, p. 617–640, 2009.

Fernandes, C.M.; Zamuner, S.R. et al. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, v. 47, p. 549–559, 2006.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T. Structural considerations of the snake venom metalloproteases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteases. **Toxicon**, v. 45 (8), p. 969–985, 2005.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909–920, 2008.

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, p. 3016–3030, 2008a.

Gomes, M.S.R.; Mendes, M.M.; Oliveira, F.; Andrade, R.M.; Bernardes, C.P.; Hamaguchi, A.; Alcântara, T.M.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Homsibrandeburgo, M.I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, 53, 24-32, 2009.

Gomes, M.S.R.; Queiroz, M.R.; Mamede, C.C.N.; Mendes, M.M.; Hamaguchi, A.; Homsibrandeburgo, M.I. ; Sousa, M.V.; Aquino, E.N.; Castro, M.S.;

Oliveira, F. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Bioch. Physiol.**, v. 153, p. 290-300, 2011.

Granger, D.N., Kubes, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, p. 662–675, 1994.

Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33 (11), p. 1405–1424, 1995.

Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A. Snake venom metalloproteinase: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.

Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A.; Escalante, T.; Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997–1011, 2005.

Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A.; Chaves, F.; Díaz, C.; Escalante, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 958–975, 2009.

Gutiérrez, J.M.; Williams, D.; Fan, H.W.; Warrell, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223–1235, 2010.

Gutberlet Jr., R.L.; Campbell, J.A. Generic recognition for a neglected lineage of South American pitvipers (Squamata: Viperidae: Crotalinae) with the description of a new species from the Colombian Chocó. **American Mus. Nov.**, p. 1–15, 2001.

Harris, J.B. Myotoxic phospholipases A2 and the regeneration of skeletal muscles. **Toxicon**, v. 42, p. 933–945, 2003.

Hoffman, M.; Monroe, D.M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 85, p. 958–965, 2001.

Hofstra, C.L.; Desai, P.J.; Thurmond, R. L.; Fung-Leung, W.P. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 305, p. 1212-1221, 2003.

Hoge, A.R.; Romano, H.S. Sinopse das serpentes peçonhentas. **Mem. Inst. Butantan**, v. 42/43, p. 373-496, 1979.

Jia, L.G.; Wang, X.M.; Shannon, J.D.; Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin-A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 13094–13102, 1997.

Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

Kamiguti, A.S.; Hay, C.R.M.; Zuzel, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of  $\alpha 2\beta 1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase jarararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996.

Kidd, B. L.; Urban, L. A. Mechanisms of inflammatory of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 87, p. 3-11, 2001.

Kini, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase  $A_2$  enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827–840, 2003.

Kini. R. M.; Evans. H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases  $A_2$ . **Toxicon**, v. 27 (6), p. 613-635, 1989.

Kochva, E., Nakar, O., Ovadia, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **Am. Zool.**, v. 23, p. 427–430, 1983.

Kudo, I.; Murakami, M. Phospholipases A<sub>2</sub> enzymes. **Prostaglandins other lipid mediat.**, v. 69, p. 3-58, 2002.

Kumar, V.; Abbas, A. K.; Robbins e Cotran, F. N. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. Elsevier, 7 ed., Rio de Janeiro, 2005.

Larréché, S.; Mion, G.; Goyffon, M. Haemostasis disorders caused by snake venoms. **Ann. Fr. Anesth. Reanim.**, v. 27, p. 302–309, 2008.

Majno, G.; Joris, I. **Inflammation: The actors and their languages**. Principles of general pathology, 2 ed., Nova York, 2004.

Majno, G., Palade, G.E., Schoefl, G.I. Studies on inflammation. II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 11, p. 607–626, 1961.

Markland, F.S. Fibrinase, an active thrombolytic enzyme in arterial and venous thrombosis model systems. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 391, p. 427–438, 1996.

Markland Jr., F.S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 668–674, 1998.

Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477 (1–2), p. 146–156, 2000.

Matsui, T.; Hamako, J.; Titani, K. Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. **Toxins**, v. 2, p. 10-23, 2010.

Marsh, N.A.; Williams, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171–1181, 2005.

McMahon, S.B., Cafferty, W.B., Marchand, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp. Neurol.**, v. 192, p. 444–462, 2005.

McMahon, S.B. Mechanisms of sympathetic pain. **J. Br. Med. Bull.**, v. 47, p. 584–600, 1991.

Metz, M.; Maurer, M. Mast cells-key effector cells in immune responses. **Trends. Immunol.**, v. 28, p. 234-241, 2007.

Menezes, M.C.; Paes Leme, A.F. et al. Activation of leukocyte rolling by the cysteine-rich domain and the hyper-variable region of HF3, a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **FEBS Letters**, v. 582 (28), p. 3915-3921, 2008.

Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-154, 1999.

Montecucco, C.; Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 2897-2912, 2008.

Montenegro, M.R.; Franco, M. **Patologia, processos gerais**. Atheneu; 4<sup>o</sup> ed., Rio de Janeiro, 2004.

Moura-da-Silva, A.M.; Butera, D.; Tanjoni, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 2893–2905, 2007.

Moura-da-Silva, A.M.; Ramos, O.H.P.; Baldo, C.; Niland, S.; Hansen, U.; Ventura, J.S.; Furlan, S.; Butera, D.; Della-Casa, M.S.; Tanjoni, I.; Clissa, P.B.; Fernandes, I.; Chudzinski-Tavassi, A.M.; Eble, J.A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90 (3), p. 484–492, 2008.

Nascimento, N. G.; Sampaio, M. C.; Olivo, R. A.; Teixeira, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343–352, 2010.

Nishioka, S.A.; Silvera, P.V.P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 805–810, 1992.

Paine, M.J.; Desmond, H.P.; Theakston, R.D.; Crampton, J.M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869–22876, 1992.

Pardal, P.P.O.; Pardal, J.S.O.; Gadelha, M.A.C.; Rodrigues, L.S.; Feitosa, D.T.; Prudente, A.L.C. & Fan, H.W. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. **Rev. Inst. Med. Trop. SP**, v. 52(6), p. 333-337, 2010.

Pinho, F.O.; Vidal, E.C.; Burdmann, EA. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **J Bras Nefrol.**, v. 22(3), p.162-168, 2000.

Pirkle, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thromb. Haemostasis**, v. 79, p. 675-683, 1998.

Queiroz, G.P.; Pessoa, L.A.; Portaro, F.C.V.; Furtado, M.F.D.; Tambourgi, D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v. 52, p. 842–851, 2008.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araujo, H.S. Review: snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 142, p. 328–346, 2006.



Rodrigues, V.M.; Soares, A.M.; Guerra-Sá, R.; Rodrigues, V.; Fontes, M.R.M.; Giglio, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 381, p. 213–224, 2000.

Rodrigues, V. M.; Hamaguchi, A.; Ferro, E. A. V.; Homsí-Brandeburgo, M. I.; Giglio, J. R.; Marcussi, S.; Araújo, A. L.; Malta-Neto, N. R.; Soares, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, **Toxicon.**, v. 44, p. 305-314, 2004.

Rodrigues, V.M.; Soares, A.M.; Andrião-Escarso, S.H.; Franceschi, A.M.; Rucavado, A.; Gutiérrez, J.M.; Giglio, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471–479, 2001.

Rosenfeld, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. **Venomous A. Venoms**, v. 2, p. 345-403, 1971.

Rucavado, A.; Lomonte, B.; Ovadia, M.; Gutiérrez, J.M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. *Exp. Mol. Pathology*, v. 63, p. 186-199, 1995.

Santos-Filho, N. A.; Silveira, L. B.; Oliveira, C. Z.; Bernardes, C. P.; Menaldo, D. L.; Fuly, A. L.; Arantes, E. C.; Sampaio, S. V.; Mamede, C. C. N.; Beletti, M. E.; Oliveira, F.; Soares, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inductor phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908–917, 2008.

Sajević, T.; Leonardi, A.; Krizaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, p. 1–19, 2011.

Schaible, H.G.; Schmidt, R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandins E2. **J. Physiology**, v. 403, p. 91-104, 1998.

Serrano, S. M. T.; Maroun, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.

Serrano, S.M.; Jia, L.G.; Wang, D.; Shannon, J.D.; Fox, J.W. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **Biochem. J.**, v. 391, p. 69–76, 2005.

Serrano, S.M.; Kim, J.; Wang, D.; Dragulev, B.; Shannon, J.D.; Mann, H.H.; Veit, G.; Wagener, R.; Koch, M.; Fox, J.W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 39746–39756, 2006.

Serrano, S.M.T.; Fox, J.W. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909–920, 2008.

Soares, A.M., Fontes, M.R.M., Giglio, J.R. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, p. 1677-1690, 2004.

Swenson, S.; Markland Jr. F.S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021–1039, 2005.

Tashima, A.K.; Sanz, L.; Camargo, A.C.M.; Serrano, S.M.T.; Calvete, J.J. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **J Proteomics**, v. 71, p. 473–485, 2008.

Teixeira, C.; Cury, Y. Moreira, V. Picolo, G., Chaves, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*, v. 54, p. 988–997, 2009.

Teixeira, C.F.P.; Cury, Y.; Oga, S., Jancar, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). *Toxicon*, v. 32, p. 419-426, 1994.

TU, A. T. **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. New York: John Wiley and Sons, 1977.

Voronov, E.; Apte, R.N.; Soler, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 5, p. 5–33, 1999.

Warrell, David A. Snake bite. *Lancet*, v. 375, p. 77–88, 2010.

Wijeyewickrema, L.C., Berndt, M.C., Andrews, R.K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*, v. 45, p. 1051-1061, 2005.

Williams, T.J. Mechanisms of inflammatory oedema formations. **Blackwell S. Pub.**, p. 210-216, 1984.

Woolf, C. J.; Costigan, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc. Natl. Acad.*, v. 96, p. 7723-7730, 1999.

Zamudio, K. R.; Greene, H. W. Phylogeography of the bushmaster *Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 62: p. 421-442, 1997.

Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Muscará, M.N., Teixeira, S.A., Teixeira, C.F.P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon*, v. 39, p. 1505–1513, 2001.

Zychar, B.C.; Dale, C.S.; Demarchi, D.S.; Gonçalves, L.R.C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, p. 227–234, 2010.

## Capítulo II

**Purificação e caracterização biológica de uma metaloprotease presente na peçonha da serpente *Bothrops moojeni***

## RESUMO

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* contêm toxinas que contribuem com efeitos locais e sistêmicos vistos no envenenamento, como edema, mionecrose, distúrbios de coagulação e hemorragia. Grande parte desses efeitos pode ser desencadeada pela ação tóxica de metaloproteases presentes na peçonha botrópica. Este trabalho teve o objetivo de realizar a purificação e caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease, denominada Moozincina, presente na peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. A Moozincina tem massa molecular aproximada de 28 kDa e apresenta atividade fibrinogenolítica relevante, podendo ser classificada como uma metaloprotease fibrinogenolítica não-hemorrágica, pertencente à classe P-I. A Moozincina também foi capaz de induzir edema, hiperalgesia e mionecrose em animais experimentais. A análise morfológica da evolução da lesão muscular evidenciou a ocorrência de eventos degenerativos e infiltrado leucocitário já na terceira hora após a aplicação da toxina (Moozincina). Esses efeitos predominam até 48 horas após a administração da metaloprotease, quando também foi evidenciado efeito hemorrágico tardio no músculo esquelético, provavelmente desencadeado pela ação característica de metaloproteases sobre componentes vasculares e/ou por ação indireta decorrente da lesão muscular.

**Palavras-chave:** *Bothrops moojeni*, metaloprotease, fibrinogenases, mionecrose.

## ABSTRACT

Purification and biological characterization of a metalloprotease from *Bothrops moojeni* snake venom

*Bothrops* snake venoms contain proteins that contribute to the local and systemic effects seen after envenoming, such as edema, myonecrosis, coagulation disorders and hemorrhage. These effects can be triggered by the toxic action of metalloproteinases present in the bothropic venom. This study aimed to perform the purification, biochemical and functional characterization of a metalloproteinase called Moozincin, from *Bothrops moojeni* snake venom. Moozincin has approximate molecular mass of 28 kDa, displays relevant fibrinogenolytic activity and can be classified as a non-hemorrhagic fibrinogenolytic metalloprotease, in the class P-I. Moozincin was also able to induce edema, myonecrosis and hyperalgesia in experimental animals. Morphological analysis of the evolution of muscle injury revealed the occurrence of degenerative events and leukocyte infiltration already at three hours after application of Moozincin. These effects dominate until 48 hours after administration of the metalloprotease, when hemorrhagic effect was also demonstrated later in skeletal muscle, probably triggered by the action characteristic of metalloproteinases on vascular components and / or indirect action resulting from muscle injury.

**Keywords:** *Bothrops moojeni*, metalloprotease, fibrinogenases, myonecrosis.

## 1. Introdução

O envenenamento pela peçonha botrópica é caracterizado por efeitos locais proeminentes como, edema, dor, hemorragia e necrose, além de efeitos sistêmicos relacionados à coagulopatias, hemorragia sistêmica, disfunção renal, entre outros (Rucavado *et al.*, 2002). Grande parte desses efeitos pode ser desencadeada pela ação tóxica de metaloproteases presentes na peçonha botrópica.

Inúmeras metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) têm sido identificadas na peçonha de diferentes serpentes botrópicas, por exemplo: *B. jararacussu* (Marcussi *et al.*, 2007), *B. leucurus* (Simon-Sanchez *et al.*, 2007), *B. neuwiedi* (Baldo *et al.*, 2008), *B. moojeni* (Bernardes *et al.*, 2008; Gomes *et al.*, 2009) e *B. alternatus* (Gay *et al.*, 2009). SVMPs são um grupo heterogêneo de proteases com massas molares de 15000 a 380000 Da (Kini e Evans, 1992). SVMPs são classificadas de acordo com a organização de multidomínios das classes PI, PII e PIII (Fox & Serrano, 2008). As metaloproteases da classe P-I apresentam apenas o domínio protease; a classe P-II apresenta um domínio desintegrina adicional; enquanto a classe P-III, além de possuir os domínios anteriormente descritos, contém domínios ricos em cisteína, podendo apresentar também domínio lectina-símile. A classe P-I compreende proteases com pouca ou nenhuma ação hemorrágica e com massa molar entre 20 a 30 kDa; já as metaloproteases altamente hemorrágicas estão incluídas, principalmente, na classe P-II, com massa molar variando entre 30 a 60 kDa; aquelas com massa molar acima de 60 kDa compõem a classe P-III, que também apresentam considerável atividade hemorrágica, podendo ainda interferir na agregação plaquetária (Hite *et al.*, 1994; Bjarnason & Fox, 1994 e 1995; Fox & Serrano, 2008). A investigação bioquímica e funcional das SVMPs é importante para o entendimento da estrutura e do mecanismo de ação dessas toxinas, bem como para o estudo molecular das metaloproteases relacionado às aplicações terapêuticas (Laing e Moura-da-Silva, 2005).

Este trabalho teve como objetivo realizar a purificação e caracterização parcial bioquímica e funcional de uma metaloprotease da peçonha da serpente *B. moojeni*.



## 2. Material e métodos

### 2.1. Obtenção da peçonha de *B. moojeni* e dos animais experimentais

A peçonha dessecada da serpentes *B. moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents (Batatais-SP) e mantida à -20° C até o momento do uso.

Os animais experimentais, camundongos machos da raça Swiss (20-25 g) e ratos machos da raça Wistar (200-250 g), foram obtidos pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e mantidos no Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas (CEBEA-UFU), mediante aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo 028/09, CEUA/UFU).

### 2.2. Fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* e purificação da metaloprotease

A metaloprotease foi isolada conforme descrito por Fonseca (2010), com algumas modificações. Cerca de 400 mg da peçonha de *B. moojeni* foi dissolvido em tampão bicarbonato de amônio (Ambic) 0,05 M pH 7,8, centrifugado a 10000 g por 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi aplicado a uma coluna de troca iônica com resina do tipo DEAE-Sephacel (1,7 × 15 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída em gradiente crescente de concentração de Ambic (0,05 – 0,6 M). Frações de 3 mL/tubo foram coletadas num fluxo de 20 mL/hora (coletor Frac-920 - GE Healthcare), monitoradas por espectrofotometria num comprimento de onda  $\lambda = 280$  nm (Shimadzu Biotech). Em seguida, o cromatograma foi construído, as frações delimitadas foram reunidas em *pools*, dosadas, liofilizadas (L101 LioTop) e armazenadas à -20° C. Para purificação da metaloprotease de interesse, correspondente à fração P6, foi realizado um segundo passo cromatográfico de alta eficiência (AktaPurifier - GE Healthcare), em coluna de exclusão molecular Sephacryl (HiPrep 26/60 Sephacryl S300 320 mL - GE Healthcare), equilibrada e eluída com Ambic 0,05 M (pH 7,8). Frações de 2 mL/tubo foram coletadas em fluxo de 0,2 mL/min, pressão máxima de 0,5 MPa e monitoradas automaticamente em  $\lambda = 280$  nm. As frações resultantes, inclusive a de interesse que continha a metaloprotease, foram liofilizadas (L101 LioTop) e armazenadas à -20° C até o momento de uso.

### 2.3. Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica da metaloprotease de interesse foi estabelecida por Fonseca (2010), mas alguns testes foram refeitos para validar a purificação da mesma. O perfil eletroforético da metaloprotease foi determinado em gel de poliacrilamida a 14 % em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada a 20 mA e 150 V por aproximadamente 1 hora, usando tampão de corrida Tris-glicina, pH 8,3, contendo 0,01 % de dodecil sulfato de sódio (SDS). Para determinação da massa molar foi usado um padrão de proteínas contendo: fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20.1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.4 kDa). O gel foi corado por 15 min em azul de coomassie brilhante R-250 0,01 %, dissolvido em água: metanol: ácido acético (40: 50: 10 v/v) e descorado em ácido acético a 10 %. A massa molar relativa da protease purificada foi estimada pelo programa de análise de imagens Kodak 1D, de acordo com a migração dos marcadores de massa molar. A concentração protéica foi determinada de acordo com o método de microbiureto descrito por Itzhaki and Gill (1964), usando albumina bovina como padrão.

A atividade proteolítica foi confirmada usando como substrato fibrinogênio bovino, conforme descrito por Fonseca (2010). A metaloprotease purificada (10  $\mu$ g) foi incubada a 37° C com 50  $\mu$ L de fibrinogênio (1,5mg/ml salina) e com diferentes inibidores proteolíticos por 30 minutos: Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 5 mM) e 1,10 fenantrolina (5 mM) como agentes quelantes;  $\beta$ -mercaptoetanol (5 mM), como agente redutor; aprotinina (5 mM) e benzamidina (5 mM), como inibidores de serinoproteases . Após 30 minutos, a reação foi interrompida adicionando o tampão de amostra contendo: Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, SDS 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0,005 % e glicerol 10 % (v/v). A ação fibrinogenolítica da protease foi analisada em SDS-PAGE a 14 %.

### 2.4. Caracterização funcional

A avaliação dos efeitos biológicos desencadeados pela metaloprotease isolada da peçonha de *B. moojeni* foi realizada com base na análise da reação

inflamatória e das alterações morfológicas locais induzidas em animais experimentais.

#### **2.4.1. Atividade inflamatória: ação edematogênica e nociceptiva**

A atividade inflamatória da metaloprotease foi avaliada com base no efeito edematogênico e nociceptivo induzidos na pata de ratos. Amostras contendo 50 µg da metaloprotease foram dissolvidas em 100 µL de salina estéril e injetadas na região intraplantar (i.pl.) da pata posterior direita de ratos (200-250 g, n= 4), um volume semelhante de salina foi injetado na pata contralateral como controle negativo. Para avaliação da formação de edema, o volume (mL) de ambas as patas posteriores, medidas até a articulação tíbio-társica, foi mensurado com o auxílio do aparelho pletismômetro (modelo 7140, Ugo Basile, Itália). As medidas foram realizadas antes e após 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas de injeção da metaloprotease, de acordo com a técnica descrita por Van Arman et al. (1965). Concomitantemente, para avaliar a sensibilidade nociceptiva dos animais foi utilizado o teste de pressão da pata, usando o aparelho analgesímetro (Ugo Basile, Itália) conforme descrito por Randall e Sellito (1957). Neste teste, uma força em gramas (g) crescente (16 g/s) é continuamente aplicada sobre a superfície plantar de uma das patas posteriores do rato e interrompida quando o animal apresenta a reação de “retirada” do membro. O limiar de dor, neste modelo, é representado como a força (g) necessária para a indução desta reação. Os resultados de ambos os testes foram calculados a partir da diferença entre as medidas de ambas as patas e expressos em porcentagem de aumento do volume e diminuição do limiar de nociceptivo da pata, em relação às medidas iniciais.

#### **2.4.2. Atividade miotóxica**

A atividade miotóxica foi avaliada a partir de alterações morfológicas induzidas pela injeção intramuscular (i.m.) da metaloprotease no músculo gastrocnêmio de camundongos (20-25 g, n= 3). Os animais do grupo controle receberam injeção i.m. de 50 µL de salina estéril e os animais dos grupos de teste receberam 50 µg da metaloprotease isolada, dissolvida em 50 µL de salina. Após 3, 6, 12, 24 e 48 horas os animais foram sacrificados, com overdose de tiopental, e os músculos esqueléticos foram dissecados e

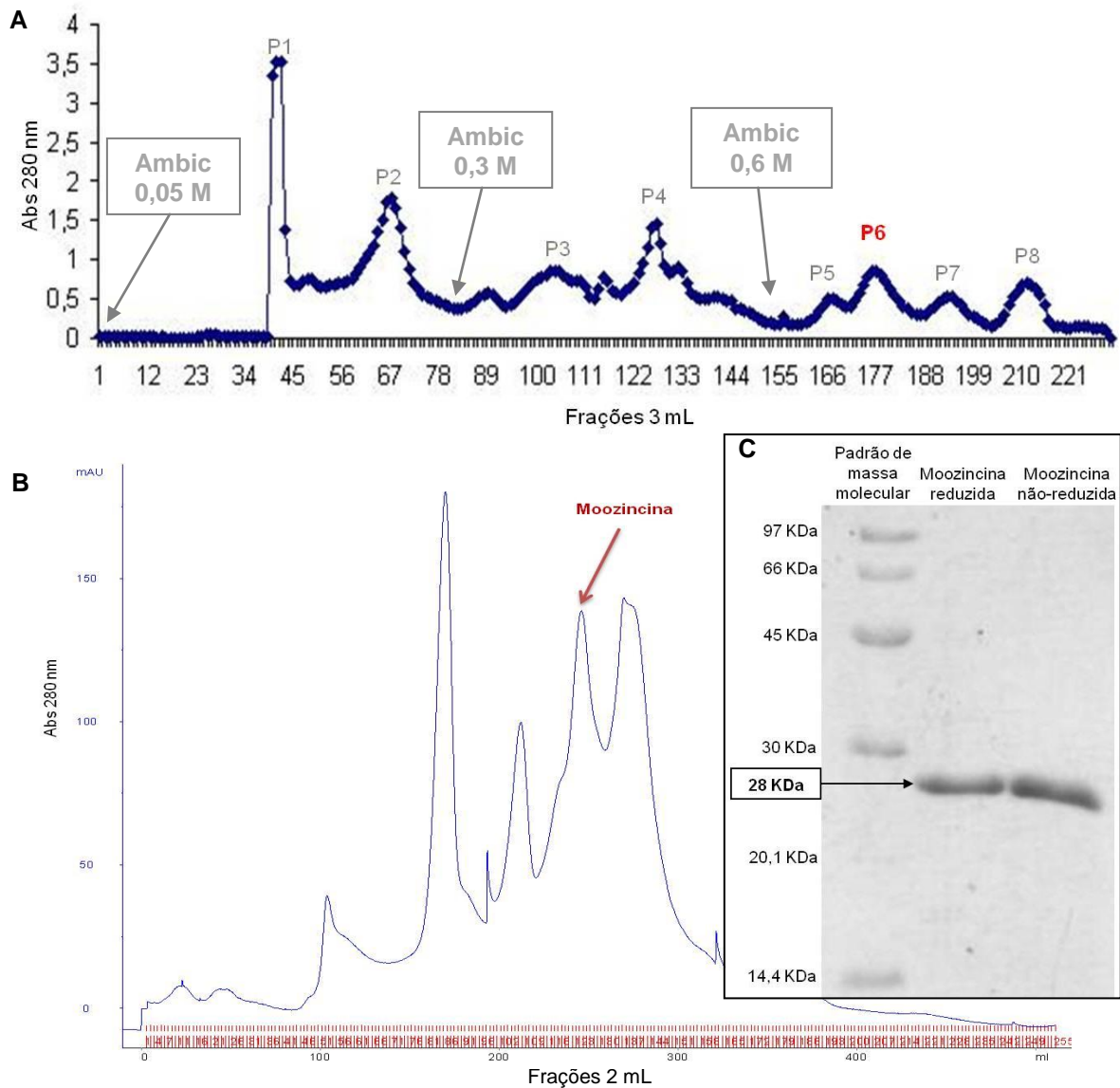
colocados em solução fixadora de formol a 10 %. Os músculos fixados foram processados em diferentes soluções de etanol e xilol para inclusão em parafina. Fragmentos de 5 µm foram preparados em lâmina histológica e corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise em microscopia ótica.

### 3. Resultados e discussão

A principal característica do envenenamento botrópico são os efeitos locais e sistêmicos decorrentes da ação proteolítica dos constituintes da peçonha. A patogênese desses efeitos está relacionada, principalmente, à ação das SVMs sobre componentes vasculares e fatores de coagulação, desencadeando hemorragia local e sistêmica, distúrbios de coagulação e lesões teciduais. Neste trabalho, a purificação e caracterização de uma metaloprotease da peçonha *B. moojeni* foram abordadas visando o entendimento do mecanismo bioquímico e funcional dessa toxina.

Previamente, tal metaloprotease foi purificada, caracterizada parcialmente e denominada Moozincina por Fonseca (2010). Segundo a autora, essa metaloprotease apresenta atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino e baixa toxicidade muscular e sistêmica. Ela não induz hemorragia, atividade coagulante, desfibrinação e atividade fosfolipásica, podendo ser classificada como uma metaloprotease fibrinogenolítica não-hemorrágica, pertencente à classe P-I.

No presente trabalho, a Moozincina foi purificada conforme Fonseca (2010), com algumas modificações. A peçonha bruta de *B. moojeni* foi fracionada em coluna de troca iônica DEAE-Sephacel, resultando na separação de 8 frações principais (P1 - P8) (Fig. 1A). A fração P6, por conter a metaloprotease de interesse (evidenciado em SDS-PAGE, dado não mostrado), foi submetida a outro procedimento cromatográfico de alta eficiência em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-300, resultando na purificação da metaloprotease (Fig. 1B). De acordo com o perfil eletroforético da metaloprotease isolada, foi possível confirmar, com excelente grau de pureza, o isolamento da Moozincina, que apresenta massa molar aproximada de 28 kDa em condições redutoras e não redutoras (Fig. 1C).



**Figura 1:** Purificação da metaloprotease Moozincina: (A) Fracionamento de 400 mg peçonha bruta de *B. moojeni* em coluna de troca iônica DEAE-Sepharcel (1,7 x 15 cm) eluída com gradiente crescente de Ambic 0,05 a 0,6 M (pH 7,8). Frações de 3 mL foram coletadas num fluxo de 20 mL/hora. (B) Cromatografia de alta eficiência em resina de exclusão molecular Sephacryl S-300 da fração P6, eluída em Ambic 0,05 M (pH 7,8), num fluxo de 0,2 mL/min. (C) Perfil eletroforético em SDS-PAGE (14%) da Moozincina em condições redutoras e não-redutoras, comparadas com padrão de massa molar.

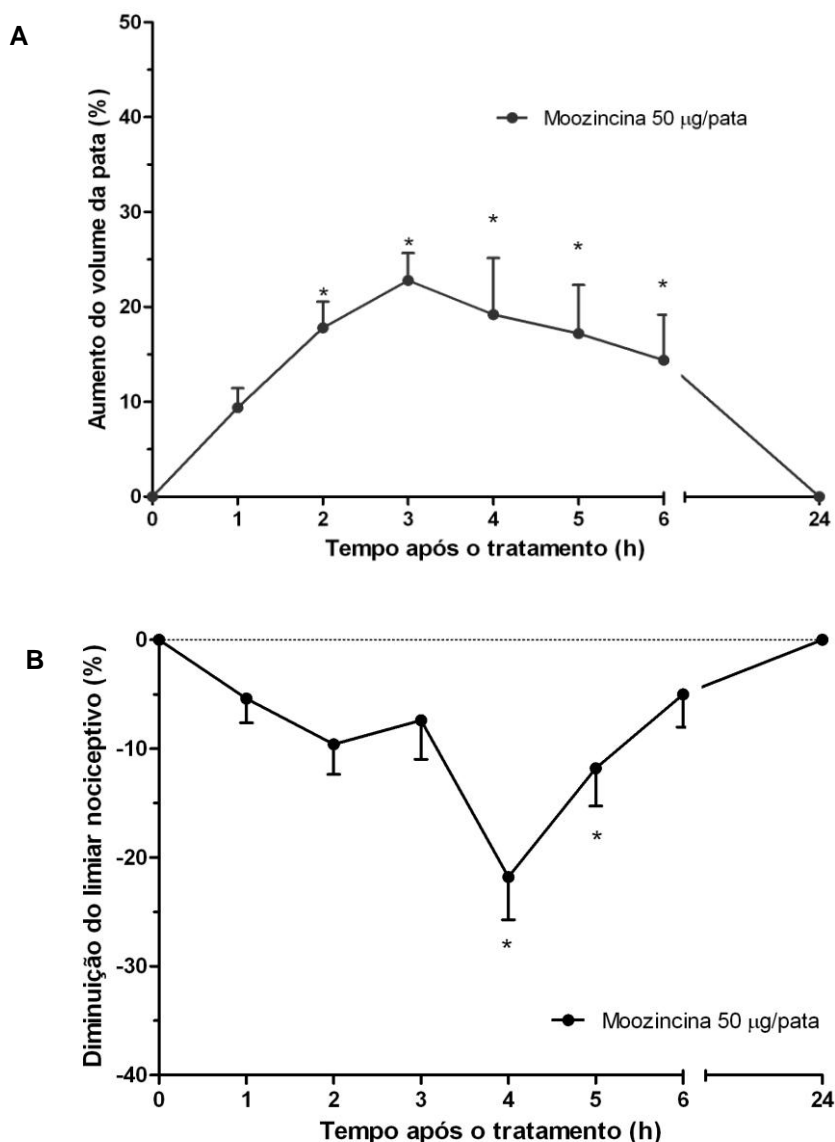
Embora a Moozincina tenha sido purificada por procedimentos cromatográficos parcialmente diferentes neste trabalho, ela manteve o mesmo perfil bioquímico caracterizado por Fonseca (2010). A ação proteolítica da Moozincina sobre fibrinogênio bovino, bem como o efeito inibitório dos agentes quelantes EDTA e 1,10-fenantrolina, e do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol foi

idêntico ao demonstrado por Fonseca (2010) (dados não mostrados). Os resultados apresentados no presente trabalho, assim como realizado por Fonseca (2010), demonstram que a Moozincina pode ser classificada como uma metaloprotease do tipo  $\alpha$ -fibrinogenase, por degradar, preferencialmente, a cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio. As SVMs têm sido amplamente estudadas devido à capacidade de degradar fibrinogênio e/ou fibrina, e podem apresentar aplicações terapêuticas relevantes. A ação fibrino(geno)lítica dessas proteases desencadeia o consumo de fibrinogênio sanguíneo e/ou proteólise de coágulos de fibrina, podendo ser aplicadas como agentes trombolíticos ou na prevenção da formação de trombos (Swenson & Markland Jr., 2005).

Os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por intensa lesão tecidual no local da picada, decorrente da ação proteolítica, tóxica e inflamatória dos constituintes da peçonha (Brasil, 2009; Zychar *et al.*, 2010). A caracterização funcional da Moozincina permitiu evidenciar que essa metaloprotease contribui para os efeitos locais do envenenamento botrópico. A Moozincina foi capaz de induzir edema e hiperalgesia na pata de ratos, além de provocar mionecrose em camundongos.

A administração intraplantar da Moozincina (50  $\mu$ g/pata) causou significativa alteração do volume e do limiar nociceptivo da pata dos ratos, levando a formação de edema e hiperalgesia (ANOVA,  $P \leq 0,05$ ). O pico máximo do efeito edematogênico, relativo a um aumento de 20 % do volume da pata dos animais, ocorreu entre a terceira e quinta horas após a injeção da Moozincina (Fig. 2A). A reação hiperalgésica máxima ocorreu na quarta hora após a inoculação da Moozincina, com uma diminuição aproximada de 20 % do limiar nociceptivo (Fig. 2B). Ambos os efeitos diminuem gradualmente até desaparecerem com 24 horas da injeção. Os efeitos edematogênico e hiperalgésico são eventos característicos da reação inflamatória local induzida pelos envenenamentos botrópicos. A patogênese desses eventos está relacionada, principalmente, à ação proteolítica das metaloproteases sobre os constituintes vasculares, bem como pela reação inflamatória decorrente (Zychar *et al.*, 2010). O mecanismo inflamatório depende da liberação de vários mediadores inflamatórios relacionados ao aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, sensibilização de nociceptores e recrutamento de células de defesa (Teixeira *et al.*, 2009). A caracterização farmacológica da

reação inflamatória induzida pela Moozincina pode auxiliar no entendimento desses efeitos.



**Figura 2:** Efeito edematogênico e hiperálgésico induzidos pela Moozincina (50 µg/pata). (A) O aumento do volume e (B) diminuição do limiar nociceptivo da pata de ratos foram avaliados em diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas) após a inoculação da metaloprotease. O edema e a hiperálgesia foram calculados a partir da diferença entre as medidas de ambas as patas e expressos em porcentagem de aumento do volume e diminuição do limiar de nociceptivo da pata, em relação às medidas iniciais. Cada ponto do gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão. \*Significativamente diferente comparado com as medidas iniciais ( $P < 0.05$ ).

A Moozincina foi capaz de induzir mionecrose em animais experimentais, analisada com base nas alterações morfológicas e reação inflamatória provocadas no músculo gastrocnêmio de camundongos. Nos

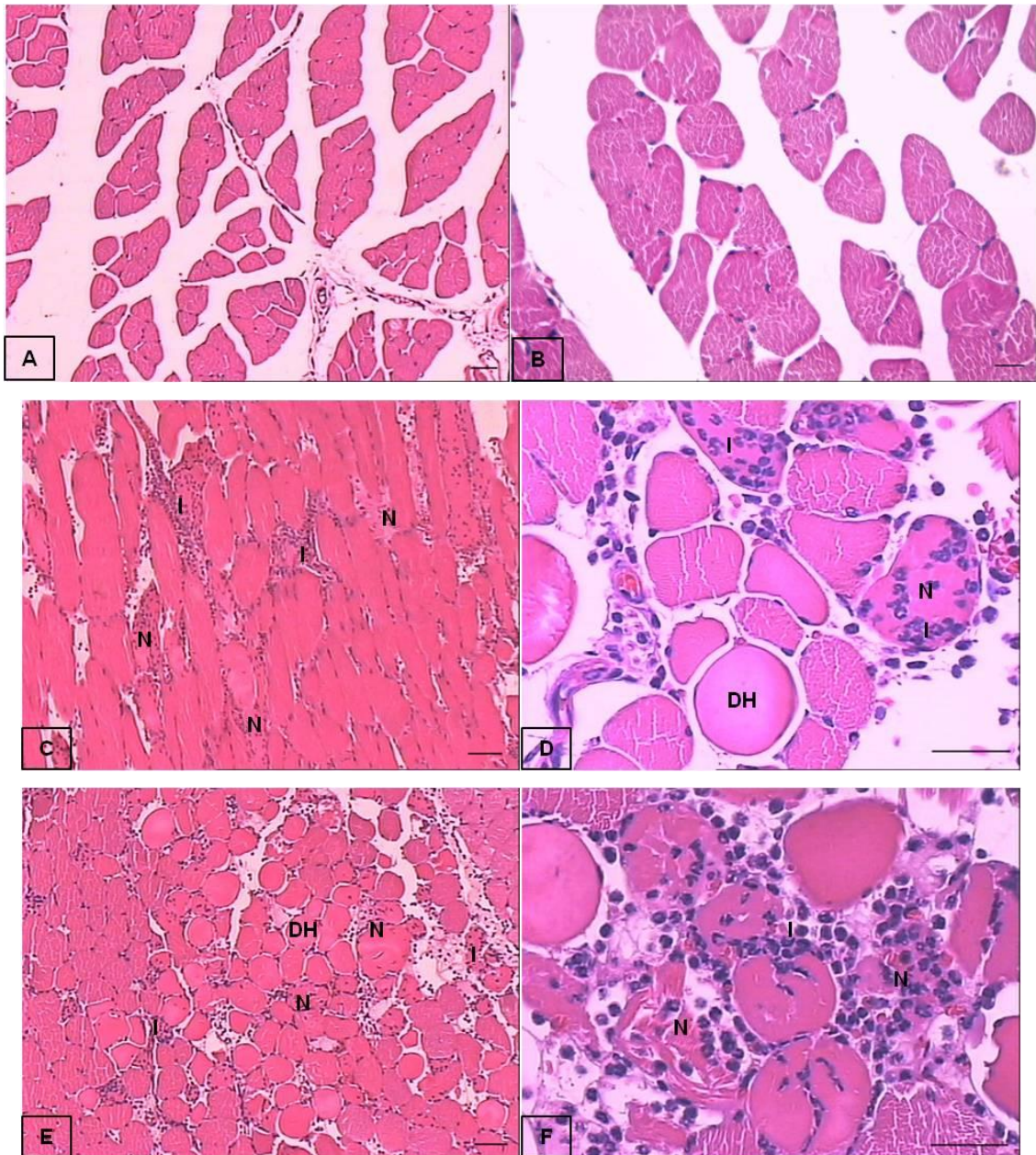
envenenamentos por serpentes botrópicas a necrose tecidual é um evento local relevante, que dependendo do local afetado, das condições do paciente e do acidente, pode levar a perda do tecido e amputação do membro afetado (Brasil, 2009).

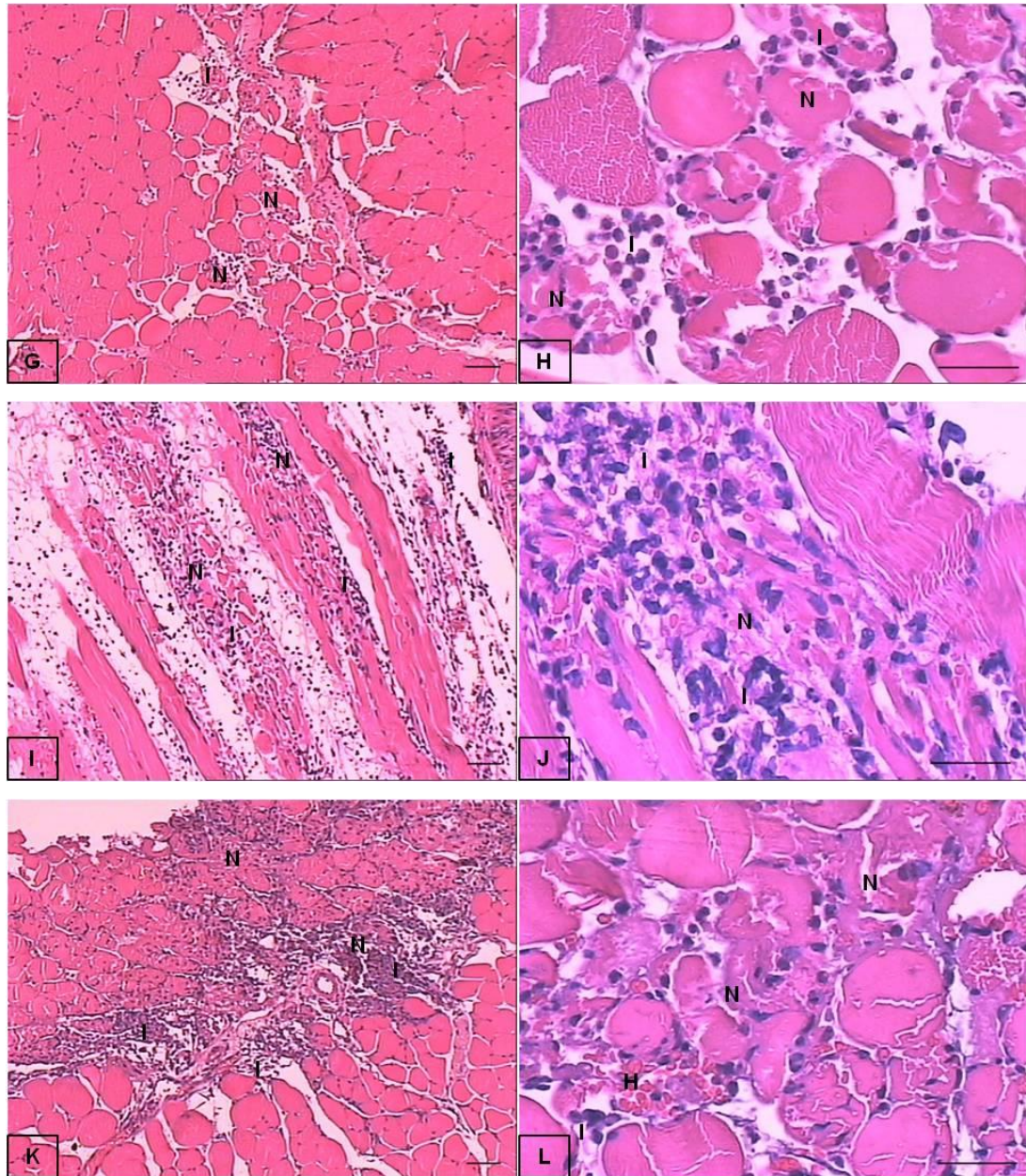
Para análise da evolução da lesão muscular causada pela Moozincina (50 µg), a mionecrose foi avaliada em diferentes tempos após o tratamento (3, 6, 12, 24 e 48 horas) e caracterizada pela alteração da morfologia tecidual, desorganização das fibras esqueléticas e reação inflamatória (Fig. 3). O grupo controle não apresentou nenhuma alteração morfológica significativa (Fig. 3AB). Após 3 (Fig. 3CD) e 6 horas (Fig. 3EF) da inoculação da Moozincina, o músculo apresentou degeneração hialina, necrose celular e infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos. Com 12 (Fig. 3GH) e 24 horas (Fig. 3IJ) a necrose muscular prevalece e o infiltrado inflamatório apresentou leucócitos mono e polimorfonucleados. Essas alterações histopatológicas prevalecem até 48 horas (Fig. 3KL) da injeção da Moozincina, no entanto nesse período pode ser evidenciado também extravasamento de células sanguíneas no tecido muscular, indicando um quadro hemorrágico local discreto. A ação de metaloprotease sobre as fibras musculares é pouco entendida, mas deve estar relacionada à proteólise de componentes vasculares desse tecido e mecanismos indiretos que levem à isquemia e lesão tecidual (Rodrigues *et al.*, 2001, Baldo *et al.*, 2010).

Embora a Moozincina não apresente atividade hemorrágica direta, conforme descrito por Fonseca (2010), o extravasamento sanguíneo observado no tecido muscular pode ser desencadeado pela ação proteolítica característica das metaloproteases, ou por ação indireta decorrente da lesão muscular. As metaloproteases da classe P-I são classificadas como fracamente hemorrágicas ou não apresentam esse efeito devido, principalmente, a ausência de domínios não enzimáticos adicionais que propiciariam a ancoragem protéica, potencializando a proteólise de componentes vasculares e o efeito hemorrágico (Jia *et al.*, 1997; Baldo *et al.*, 2010). No entanto, todas as metaloproteases apresentam o domínio protease funcional e uma concentração elevada ou a maior permanência dessas metaloproteases na corrente sanguínea poderia desencadear um extravasamento sanguíneo tardio, como causado pela Moozincina no tecido muscular. Outras metaloproteases não



hemorrágicas, como a LHF-II (Rucavado *et al.*, 1999) e a Neuwidase (Rodrigues *et al.*, 2000), apresentam efeitos semelhantes à Moozincina. A Neuwiedase, uma metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *B. neuwiedi*, embora não apresente ação hemorrágica, induz extravazamento sanguíneo no tecido pulmonar e no músculo esquelético em concentrações elevadas (Rodrigues *et al.*, 2001).





**Figura 3:** Fotomicrografias de cortes histológicos do músculo gastrocnêmio de camundongos, após 3, 6, 12, 24 e 48 horas da injeção de 50 µg da Moozincina. (A-B) Aspecto morfológico normal do músculo controle, após 24 horas da injeção de 50 µL de salina estéril. (C-L) Evolução da mionecrose induzida pela Moozincina: (C-D) após 3h, (E-F) após 6h, (G-H) após 12h, (I-J) após 24h e (K-L) após 48h. Legenda: (N) necrose celular, (I) infiltrado inflamatório, (DH) degeneração hialina e hemorragia (H). Escala = 100 µm (A, C, E, G, I, K) e 50 µm (B, D, F, H, J, L).

Neste trabalho foi purificada e caracterizada parcialmente uma metaloprotease fibrinogenolítica da classe P-I, denominada Moozincina. Essa metaloprotease foi capaz de induzir edema, hiperalgesia e mionecrose em animais experimentais. A análise histopatológica da evolução da lesão

muscular revelou que essa metaloprotease provoca necrose celular e reação inflamatória persistente até 48 horas do tratamento, além de efeito hemorrágico tardio no músculo esquelético. A análise ultraestrutural da lesão muscular e um estudo biológico mais detalhado dos efeitos da Moozincina podem contribuir para o entendimento do mecanismo de ação dessa metaloprotease.

#### 4. Referências bibliográficas

Baldo, C.; Jamora, C.; Yamanouye, N.; Zorn, T.M.; Moura-da-Silva, A.M. Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4(6), p. 727, 2010.

Baldo, C.; Tanjoni, I.; Leon, I.R.; Batista, I.F.C.; Della-Casa, M.S.; Clissa, P.B.; Weinlich, R.; Lopes-Ferreira, M.; Lebrun, I.; Amarante-Mendes, G.P.; Rodrigues, V.M.; Perales, J.; Valente, R.H.; Moura-Da-Silva, A.M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, p. 54-65, 2008.

Bernardes, C.P.; Santos-Filho, N.A.; Costa, T.R.; Gomes, M.S.R.; Torres, F.S.; Costa, J.; Borges, M.H.; Richardson, M.; Dos Santos, D.M.; Pimenta, A.M.C.; Homsí-Brandeburgo, M.I. Soares, A.M.; Oliveira, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 574–584, 2008.

Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. Snake venom metalloproteinases: reprotolysins. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 345-368, 1995.

Brasil. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed., 816 p., 2009.

Fonseca, Kelly C. **Purificação e caracterização bioquímica da moozincina, uma metaloprotease dependente de zinco presente na peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (caiçaca)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2010.

Fox, J.W. e 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, p. 3016–3030, 2008.

Gay, C.C.; Leiva, L.C.; Marunak, S.L.; Teibler, P.; Acosta De Pérez, O. Proteolytic edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 546-554, 2005.

Gomes, M.S.R.; Mendes, M.M.; Oliveira, F.; Andrade, R.M.; Bernardes, C.P.; Hamaguchi, A.; Alcântara, T.M.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Homs-Brandeburgo, M.I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 24–32, 2009.

Hite, L.A.; Jia, L.G.; Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 182-191, 1994.

Itzhaki, R.F. e Gill, D.M. A microbiuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v. 9, p. 401- 410, 1964.

Jia, L.G.; Wang, X.M.; Shannon, J.D.; Bjarnason, J.B.; Fox, J.W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin-A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 13094–13102, 1997.

Kini, R.N. e Evans, H.J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

Laing, G.D. e Moura-Da-Silva, A.M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 987-996, 2005.

Marcussi, S.; Bernardes, C.P.; Santos-Filho, N.A.; Mazzi, M.V.; Oliveira, C.Z.; Izidoro, L.F.M.; Fuly, A.L.; Magro, A.J.; Braz, A.S.K.; Fontes, M.R.M.; Giglio, J.R.; Soares, A.M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides**, v. 28, p. 2328-2339, 2007.

Randall, L.O. e Selitto, J.J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 111, p. 409-419, 1957.

Rodrigues, V.M.; Soares, A.M.; Andrião-Escarso, S.H.; Franceschi, A.M.; Rucavado, A.; Gutiérrez, J.M.; Giglio, J.R. Pathological alterations induced by neuwidase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471–479, 2001.

Rodrigues, V.M.; Soares, A.M.; Guerra-Sá, R.; Rodrigues, V.; Fontes, M.R.M.; Giglio, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 381, p. 213–224, 2000.

Rucavado, A.; Escalante, T.; Teixeira, C.F.; Fernandes, C.M.; Diaz, C.; Gutierrez, J.M. 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.**, v. 11, p. 121-128, 2002.

Rucavado, A.; Flores-Sánchez, E.; Franceschi, A.; Magalhães, A.; Gutiérrez, J.M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, p. 1297-1312, 1999.

Simon-Sanchez, J.; Scholz, S.; Fung, H.C.; Matarin, M.; Hernandez, D.; Gibbs Jr; Britton, A.; De Vrieze, F.W.; Peckham, E.; Gwinn-Hardy, K.; Crawley, A.; Keen, J.C.; Nash, J.; Borgaonkar, D.; Hardy, J.; Singleton, A. Genome-wide SNP assay reveals structural genomic variation, extended homozygosity and cell-line induced alterations in normal individuals. **Hum. Mol. Genet.**, v. 16, p. 1-14, 2007.

Swenson, S.; Markland Jr. F.S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021–1039, 2005.

Teixeira, C.; Cury, Y. Moreira, V. Picolo, G., Chaves, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 988–997, 2009.

Van Arman, C.G.; Begany, A.J.; Miller, J.M.; Pless, H.H. Some details of the inflammation caused by yeast and carrageenin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 150, p. 328-333, 1965.

Zychar, B.C.; Dale, C.S.; Demarchi, D.S.; Gonçalves, L.R.C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, p. 227–234, 2010.

## **Capítulo III**

**Caracterização farmacológica do edema e da hiperalgesia induzidos pela Moozincina: uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni***

## Resumo

Moozincina é uma metaloprotease recentemente isolada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. No presente trabalho foi realizada a caracterização farmacológica de efeitos inflamatórios induzidos pela Moozincina. A aplicação intraplantar da Moozincina (5, 25 and 50 µg/pata) induziu edema e hiperalgesia na pata de ratos. Os efeitos edematogênico e hiperalgésico máximos foram observados 3 e 4 horas após a injeção da toxina, respectivamente. Alguns fármacos como dexametasona (2,5 mg/kg) e indometacina (8,0 mg/kg) reduziram significativamente o edema e a hiperalgesia, já a prometazina (15 mg/kg) e o ácido nordiidroguaiarético (100 mg/kg) reduziram apenas o efeito edematogênico, enquanto HOE-140 (10 µg/pata) e NG-monometil-L-arginina (100 µg/pata) reduziu apenas a hiperalgesia. Esses resultados demonstram a participação de metabólitos de ácido araquidônico em ambos os efeitos inflamatórios induzidos pela Moozincina. Além disso, a ativação de receptores H1 de histamina está especificamente relacionada ao edema e a ação de bradicinina e de óxido nítrico à hiperalgesia.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*, Metaloprotease, Edema e Hiperalgesia



## Abstract

Pharmacological characterization of the oedema and hyperalgesia induced by Moozincin: a metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom

Carla C. Neves Mamede<sup>b,c</sup>, Flávia M. Chiste de Almeida<sup>a,c</sup>, Thaísa de Castro Fachinelli<sup>b</sup>, Kelly C. Fonseca<sup>b,c</sup>, Mayara R. de Queiroz<sup>c</sup>, Nadia C. G. de Moraes<sup>b,c</sup>, Leonilda Stanziola<sup>a,c</sup>, Fábio de Oliveira<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar)

\*Corresponding author: Tel. (fax): +55-34-3218-2200. E-mail address: [foliveira@umuaroma.ufu.br](mailto:foliveira@umuaroma.ufu.br)

Moozincin is a metalloproteinase recently isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. In this work, we study the inflammatory and hyperalgesic responses of Moozincin in rats hind paw. Intraplantar injection of Moozincin (5, 25 and 50 µg/paw) caused a dose and time-dependent hyperalgesia and edematogenic responses. The maximal oedematogenic and hyperalgesic effects were observed 3 and 4 hours after toxin injection, respectively. Dexamethasone (2.5 mg/kg) and Indomethacin (8.0 mg/kg) reduced significantly the oedema and hyperalgesic activity. Promethazine (15 mg/kg) and nordihydroguaiaretic acid (100 mg/kg) reduced significantly the oedema but did not reduce hyperalgesic activity. HOE-140 (10 µg/paw) and NG-monomethyl-L-arginine (100 µg/paw) reduced only the hyperalgesic effect. The result suggests that arachidonic acid metabolites are involving on pain and oedema mechanisms induced by Moozincin. Furthermore H1 receptors histamine are specifically related with oedema and bradykinin and NO action with hyperalgesia induced by Moozincin.

**Keywords:** *Bothrops moojeni*, Metalloproteinase, Oedema, Hyperalgesia

## Introduction

*Bothrops* venoms cause pronounced local tissue-damage characterized by haemorrhage, myonecrosis and oedema (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez et al., 1984; Brasil, 2009). The pathogenesis these effects are related with direct action of the different proteins from snake venoms and induced-inflammation, there is much evidence for the more contribution of phospholipases A<sub>2</sub> and metalloproteinases in inflammation induced by *Bothrops* venoms (Chacur et al., 2003; Teixeira et al., 2009; Zychar et al., 2010). Inflammatory response triggered by the action toxins leads to release chemical mediators mainly related to alterations microvessels, activation of nociceptors and inflammatory cells recruitment to the site of injury (Lomonte et al., 1993; Chacur et al., 2001; Zamuner et al., 2005; Teixeira et al., 2009). Various studies have shown local inflammatory reaction from *Bothrops* venom due to production of mediators as histamine, eicosanoids, bradykinin, nitric oxid (NO) and activation adrenergic receptors (Teixeira et al., 1994; Chaves et al., 1995; Chacur et al., 2003; Chacur et al., 2001; Nascimento et al., 2010; Zamuner et al., 2005). These pro-inflammatory mediators are associated with vasodilatation and oedema formation, besides act in sensory fibers involved to hyperalgesia (Trebien and Calixto, 1989; Woolf, 2004; Olivo et al., 2007; Teixeira et al., 2009).

Recent work (Fonseca, 2010) described the isolation of Moozincin, a non-hemorrhagic metalloproteinase from the snake venom of *B. moojeni*. The enzyme showed a molecular mass of about 28 kDa and did not induce hemorrhage, blood clotting, defibrinating or phospholipase A<sub>2</sub> activities, but displayed proteolytic activity on bovine fibrinogen and induces myonecrosis upon intramuscular injection in mice. In the present work, we investigate the oedematogenic and hyperalgesic effects in rats caused by Moozincin injection, demonstrating the role of venom metalloprotease in the inflammatory response by characterize the pharmacological modulation of their effect.

## Materials and methods

### *Toxin*

Desiccated *B. moojeni* snake venom was purchased from Pentapharm of Brazil (Uberlândia - MG, Brazil). Moozincin toxin was purified from *B. moojeni* snake venom as previously described (Fonseca, 2010).

### *Chemicals*

Carrageenin, promethazine (H1 receptor antagonist), yohimbine (alpha 2-adrenergic receptor antagonist), indomethacin (cyclooxygenases inhibitor), dexamethasone (phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor) and nordihydroguaiaretic acid (both cyclooxygenases and lipoxygenases inhibitor) were purchased from Sigma Chemical Co. (USA). NG-monomethyl-L-arginine - L-NMMA (nitric oxide synthase inhibitor), HOE-140 (bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist) was purchased from Tocris (USA). Carrageenin, promethazine, yohimbine, L-NMMA and HOE-140 were dissolved in sterile saline. Dexamethasone and nordihydroguaiaretic acid were prepared in sterile saline/ethanol (1:1 and 1:3) and indomethacin prepared in 1 M Tris-HCl buffer, pH 8.

### *Experimental Animals*

Male Wistar rats (200–250 g) and Swiss mice (20-25 g) were obtained from the CEBEA-UFU (Animal House of the Federal University of Uberlândia - MG, Brazil). The animals were housed in a temperature-controlled room (23°C) on an automatic 12 h light/dark cycle (6:00 AM – 6:00 PM of light phase). Food and water were freely available until the beginning of the experiments. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU, Protocol number 028/09).

### *Experimental protocol*

In order to investigate the dose of Moozincin able to induce oedema and hyperalgesia were used on the test previous curves with different doses (5, 25 and 50µg in sterile saline 0.1mL). Group of rats (n=4) were pretreated with different classes of drugs in appropriate times intervals simultaneously or before

injection of Moozincin (50 µg/paw). Carrageenin (250 µg/paw) was used as positive control for available the efficacy the pharmacological treatments. To investigate the involvement of arachidonic acid metabolites on hyperalgesia and oedema induced by Moozincin, different groups of rats were treated with dexamethasone (2.5 mg/kg, i.p., 60 min before), indomethacin (8 mg/kg, i.p., 30 min before) and nordihydroguaiaretic acid (100 mg/kg, i.p., 30 min before). To evaluate the contribution of histamine on hyperalgesic and edematogenic responses, animals received promethazine (15 mg/kg, i.p., 30 min before). To assess the participation the amines biogenics rats was injected with yohimbine (2.5 mg/kg i.p., 30 min before). The contribution of bradykinin and of nitric oxide (NO) were studied by treatment with HOE-140 (10 µg/paw, i.pl. injected simultaneously with the Moozincin) and L-NMMA (100 µg/paw, i.pl. injected simultaneously with the Moozincin), respectively. In order to choose the doses of the different drugs it was made dose-response experiments with carrageenin. The volume injected was 100µL for the intraplantar (i.pl.) injections and 200 µL for the intraperitoneal (i.p.) injections. All groups received 100 µL of sterile saline alone in contralateral paw for control purposes. To evaluation the participation of the mast cell (MC) degranulation Moozincin (50 µg in sterile saline 0.1mL) was injected into peritoneal cavity (i.p.) of mice and control group received equal volume of sterile saline. Different times (5, 10, 15 and 30 min) selected after Moozincin injection the animals were killed under thiopental overdose. The abdomen was opened and the mesentery was carefully removed, placed in 10% formaldehyde, mounted on a glass slide and then stained with toluidine blue stain for histological assessment of mast cell degranulation for light microscopy. Mast cell degranulation was expressed as the proportion of mast cells with extruded granules relative to the total mast cells present in the stained mesentery.

#### *Evaluation of paw oedema formation*

Moozincin was injected into the subplantar surface (i.pl.) of one hind paw with the contralateral paw injected with equal volume of sterile saline. The volumes of both paws were measured plethysmographically (model 7140 plethysmometer, Ugo Basile, Italy) before and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours after Moozincin injection. Results were calculated as difference between both paws

and expressed as percentage of increase in paw volume relative to initial volume.

#### *Evaluation of hyperalgesia*

Hyperalgesia was induced by subcutaneous injection of Moozincin into the plantar surface of rats hind paw and measured according to the paw pressure test (Randall and Selitto, 1957). The weight in grams (g) required to elicit a nociceptive response, paw flexion, was determined as the nociceptive threshold. A *cut-off* value of 300 g was used to prevent damage to the paws. Moozincin was administered into the right hind paw and the same volume of sterile saline was injected in the left hind paw for control. The nociceptive threshold was measured before and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours after Moozincin injection. Results were calculated as the difference between both paws and expressed as percentage of decrease nociceptive threshold relative to initial threshold. To reduce stress, the rats were habituated to the apparatus one day before the experiments.

#### *Statistical analysis*

The statistical analyses were carried out by ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons. Results represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$ );  $P < 0.05$  values were considered statistically significant.

## **Results**

#### *Characterization of oedema and hyperalgesia induced by Moozincin*

The intraplantar injection of Moozincin into the rat hind-paw caused a significant increase in volume and sensitivity to pain. The intraplantar injection of Moozincin (50  $\mu$ g/paw) induced footpad oedema, evidencing local increase in vascular permeability. The maximum increase in hind-paw swelling (around 20%) occurred between 3 and 5 hour after Moozincin injection, gradually decreased over the next hours and completely disappeared within 24 hours (Fig. 1A).

The intraplantar injection of Moozincin (50 µg/paw) into the rat hind-paw caused a significant decrease in pain threshold. The peak of the hyperalgesic response occurred 4 h after Moozincin injection (around 20%), decreasing thereafter and completely disappearing within 24 h (Fig. 1B).

The doses of 5 and 25 µg/paw not induce oedematogenic and hyperalgesic effects statistically significant, compared to initial values. The dose chosen for drug treatments experiments was 50 µg/paw.

### *Pharmacological modulation on oedema and hyperalgesia induced by Moozincin*

#### *Involvement of arachidonic acid metabolic*

Fig. 2A and B shows that pretreatment of rats with drugs which interfere with arachidonic acid metabolism reduce oedema and hyperalgesia induced by Moozincin. Dexamethasone (phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor) and indomethacin (cyclooxygenases inhibitor) were able to reduce the both hyperalgesic and oedematogenic effects induced by Moozincin in their maximal responses. Although the nordihydroguaiaretic acid (COX and LOX inhibitor) significantly reduced oedema induced by Moozincin, it is not able to inhibit of the hyperalgesic effect.

#### *Influence of histamine*

Fig. 2C shows that treatment of animals with promethazine (histamine H<sub>1</sub> receptor antagonist) significantly reduced oedema formation induced by Moozincin. These treatments not affected hyperalgesic effect this toxin (table 1).

#### *Influence of bradykinin and of nitric oxide*

As demonstrated in Fig. 2D HOE-140 (bradykinin B<sub>2</sub> receptors antagonist) and L-NMMA (NOS inhibitor) significantly reduced the hyperalgesic effect caused by Moozincin. These treatments not affected oedematogenic effect this toxin (table 1).

### *Influence of sympathomimetic amines*

As shown in Table I, yohimbine not affect hyperalgesia and oedema induced by Moozincin.

### *Involvement of mast cells*

Moozincin induced a significant MC degranulation at times from 5 (51%) to 15 (54%) min in comparison with control (14%). At 30 min (21%) of MC degranulation was not statistically different of the control ( $P \leq 0,05$ )

## **Discussion**

The inflammatory reaction is characterized by oedema and frequently associated with hyperalgesia. These events are dependent on a synergism of numerous mediators that increase vascular permeability, vasodilation and activate of nociceptors. Envenomation caused by snakes from *Bothrops* sp. elicits a pronounced inflammatory response at the bite site, characterized by severe local effects as oedema, haemorrhage, pain and hyperalgesia, leukocyte infiltration and myonecrosis (Rosenfeld, 1971; Gutiérrez, et al., 1984; Teixeira et al., 1994 and 2009; Brasil, 2009; Zychar et al., 2010). In this study we investigate the inflammatory events of a metalloprotease, denoted Moozincin, recently isolated from *B. moojeni* snake venom (Fonseca, 2010) in rats paw. Here, we described the involvement of the Moozincin in oedematogenic and hyperalgesic responses, as well as some mechanisms underlying such effect were tested pharmacological interventions on oedema and hyperalgesia induced by Moozincin.

Our results demonstrate that the intraplantar injection of 50 µg Moozincin causes significant increased in hind-paw swelling and sensitivity to pain (Fig. 1A and B). The time course was similar to the oedema and hyperalgesia formation, the first presented the maximal response between 3 and 5 hour and the second effect at 4 hours after toxin injection. Several works on *Bothrops* crude venoms shows that oedematogenic or hyperalgesic effects reaching a maximum already in the first two hours (Nascimento et al., 2010; Faria et al., 2001; Chacur et al., 2002 and 2003). The same and others studies demonstrate that injection of

higher doses the crude venom or of the isolated toxins ensures the maintenance of inflammatory effects for a longer time (Nascimento et al., 2010; Chacur et al. 2001 and 2003; Barbosa et al., 2003). Inflammatory event distinguished by oedema formation and hyperalgesic effect is mainly mediated by metalloproteinases and phospholipases A<sub>2</sub> components of venoms *Bothrops* sp. (Teixeira et al., 2005; Gutiérrez and Lomonte, 1995; Zychar et al., 2010).

Our work sought analyzed the role of several mediators on oedematogenic and hyperalgesic effects induced by Moozincin using specific inhibitors or receptor antagonists. Moreover, carrageenin, a known inflammatory agent, was used as a positive control to assure the efficacy of the drugs and the determination of optimal doses used (Chacur et al., 2001; Cunha et al., 2000).

The finding evidence participation of the arachidonic acid metabolism in both phenomenous induced by Moozincin (Fig. 2A and B), while histamine is concerned only oedema (Fig. 2C) and bradykinin and NO is related only to hyperalgesia (Fig. 2D).

The involvement of eicosanoids in inflammation induced by Moozincin was further confirmed by treatment with dexamethasone, which markedly reduced oedematogenic and hyperalgesic effects. This drug is a know corticosteroid that indirectly inhibited the phospholipase A<sub>2</sub> enzyme, whose activity is related in the arachidonic acid release from membrane phospholipids and triggering cascade synthesis of eicosanoids (Dennis, 2000). The inhibitory effect of indomethacin and nordihydroguaiaretic acid on oedema indicate that COX, responsible for prostaglandins formation, and LOX, leukotrienes training, are involved in this response. However, the indomethacin played a significant role in hyperalgesic response. Thus, these data indicate that prostaglandins and leukotrienes are relevant mediators of oedema induced by Moozincin, but just prostaglandins seem to be concerned in hyperalgesic response. Inhibitors of the eicosanoids metabolisms have inhibitory actions on inflammatory events induced by numerous snake venoms (Barbosa et al., 2003; Olivo et al., 2007; Chacur et al., 2001 and 2003), even the oedema caused by *B. moojeni* (Nascimento et al., 2010). Among some eicosanoids related inflammation has been cited leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandins E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) and D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (Zamuner et al., 2005; Kanaoka and Urade, 2003). These mediators were found in inflammatory exudates induced by bothropic



venoms and were associated with vasodilation, increase in vascular permeability, hyperalgesic effect and induction of leukocyte recruitment (Zamuner et al., 2005; Kanaoka and Urade, 2003; Teixeira et al., 1994).

Histamine also contributed the oedematogenic effect caused by Moozincin. It is known that promethazine, histamine H1 receptor antagonist, substantially reduces oedema formation. The results also demonstrated MC degranulation induced by Moozincin, suggest participation these inflammatory cells in release of histamine and oedema formation. The increase in vascular permeability depend primarily on release of histamine due activation MC, that activating endothelial cell H1 receptors causes venular gaps and increased production of pro-inflammatory prostaglandins (Cole and Lewis, 1989; Hofstra et al., 2003). Our data corroborate with the findings of Nascimento et al (2010). These authors described that histamine, prostaglandins and leukotrienes are involved in local edema induced by venom of *B. moojeni*. Our results are in close agreement to the current literature showing the involvement of histamine in oedema induced by different *Bothrops* snake venoms *B. lanceolatus* (Faria et al, 2001; Guimarães et al, 2004), *B. insularis* (Barbosa et al, 2003) and *B. jararaca* (Trebien and Calixto, 1989).

Pretreatment with HOE-140 (bradykinin B<sub>2</sub> receptors antagonist) and L-NMMA (NOS inhibitor), markedly reduced the hyperalgesia induced by Moozincin, confirmed the participation bradykinin and NO in this effect. Bradykinin is a inflammatory mediator related with activation/sensitization of the nociceptors and responsible by stimulates the release of the others hyperalgesic mediators, as eicosanoids and cytokines (Dray et al., 1988; Ferreira et al., 1993). Stimulation of bradykinins receptors in endothelial cells may induce vasodilatation mainly mediated by NO (Palmer et al., 1987). NO is a potent vasodilator and may potentiate the increase in vascular permeability induce by some mediators such as histamine. Moreover NO is a known nociceptive agent involved in the mechanism of bradykinin-induced hyperalgesia and who affects the neurotransmission, but as a mediator of inflammatory reactions is controversial in the literature and need more details (Barbosa et al., 2003; Nakamura et al., 1996). Although bradykinin and NO are involved in the hyperalgesic effect induced by Moozincin, the treatment with HOE-140 and L-

NMMA not affect oedema formation, probably due not endothelial receptors activation by Moozincin.

Various works demonstrate that inflammatory events, mainly pain, also involve the participation of sympathomimetic amines, through an action on  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenoceptors (Chacur et al., 2003; McMahon, 1991; Sato and Perl, 1991). Curiously, the sympathomimetic amines seem to be not interfering in oedema or hyperalgesic effects caused by Moozincin, since yohimbine is not able to reduce these responses.

In conclusion the Moozincin, a metalloprotease isolated from *B. moojeni* venom is able to induce oedema formation and has hyperalgesic effect, in similar time-course. The oedema and hyperalgesic events are mediated by arachidonic acid metabolism. COX and LOX pathways seem to interact in the oedema formation, whereas COX appears to be involved in hyperalgesia. Interestingly, our results showed that histamine inhibits only the oedematogenic response, while bradykinin and NO participates only in the phenomena of hyperalgesia induced by Moozincin. These results suggest that Moozincin play a significant role in local inflammatory effects resulting from *B. moojeni* envenomation. The pharmacological treatments were important further understanding the mechanisms involved in oedema and hyperalgesia induced by this metalloprotease.

## References

Barbosa A.M, Amaral R.O., Teixeira C.F.P., Hyslop S., Cogo J.C. 2003 Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom; Toxicon 42, 515-523

Brasil. Ministério da Saúde. 2009 Guia de vigilância epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed., 816

Chacur M., Picolo G., Gutiérrez J.M., Teixeira C.F.P., Cury Y. 2001 Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom; *Toxicon* 39, 1173-1181

Chacur M., Picolo G., Teixeira C.F.P., Cury Y. 2002 Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom; *Toxicon* 40, 1047-1051

Chacur M., Longo I., Picolo G., Gutiérrez J.M., Lomonte B., Guerra J.L., Teixeira C.F.P., Cury Y. 2003 Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases  $A_2$  from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants; *Toxicon* 41, 667-678

Chaves F., Barbosa M., Gutiérrez J.M. 1995 Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice; *Toxicon*, 33, 31-39

Cole, O.F., Lewis, G.P., 1989 Prostanoid production by rat aortic endothelial cells by bradykinin and histamine. *Eur. J. Pharmacol.* 169, 307-312

Cunha, J.M., Cunha, F.Q., Poole, S., Ferreira, S.H., 2000 Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1418-1424

Dennis, E.A., 2000 Phospholipase  $A_2$  in eicosanoid generation; *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 32-35

Dray, A., Bettaney, J., Forster, P. Perkins, M.N. 1988 Activation of a bradykinin receptor in peripheral nerve and spinal cord in the neonatal rat in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, 95, 1008-1010.

Faria, L. de, Antunes E, Bon C., Araújo A. Lôbo de 2001 Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom; *Toxicon* 39, 825-830.

Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Poole, S. 1993 Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, 110, 1227-1231.

Fonseca, K.C. 2010 Purificação e caracterização bioquímica da moozincina, uma metaloprotease dependente de zinco presente na peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (caiçaca). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

Guimarães A.Q., Cruz-Höfling M.A., Ferreira de Araújo P.M., Bom C., Lobo de Araújo A. 2004 Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. *Inflammation Research* 53(7): 284-91

Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., Odell, G.V., 1984. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.* 40, 367–379

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Phospholipase A<sub>2</sub>, myotoxins from *Bothrops* snake-venoms. *Toxicon* 33, 1405–1424

Hofstra, C.L., Desai, P.J., Thurmond, R.L., Fung-Leung, W.P. 2003 Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 1212–1221

Kanaoka, Y., Urade, Y. 2003 Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69, 163-167

Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A. 1993 Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93–105

McMahon, S.B. 1991 Mechanisms of sympathetic pain. *J. Br. Med. Bull.* 47, 584-600.

Nakamura, A., Fujita, M., Shiomi, H., 1996 Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. Br. J. Pharmacol. 117, pp. 407–412

Nascimento, N.G. 2010 Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved; Toxicon 55, 343-352

Olivo, R.A., Teixeira, C.F., Wallace, J.L., Gutierrez, J.M., Zamuner, S.R. 2007 Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. Toxicon 49, 670-677.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. 1987 Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature, 327, 524-526.

Randall, L.O, Selitto, J.J. 1957 A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. Arch. Int. Pharmacodyn. 111, R409-419

Rosenfeld, G. 1971 Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. Venomous A. Venoms 2, 345-403

Sato, J., Perl, E.R. 1991 Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. Science 251, 1608-1610

Teixeira, C.; Cury, Y. Moreira, V. Picolo, G., Chaves, F. 2009 Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. Toxicon, v. 54, p. 988–997

Teixeira, C.F.P., Cury, Y., Oga, S., Jancar, S. 1994 Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor. Toxicon 32, 419–426

Teixeira, C.F.P., Fernandes, C.M., Zuliani, J.P., Zamuner, S.F. 2005 Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 100, 181–184

Trebién H.A., Calixto J.B. 1989 Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom; Agents Actions 26(3-4), 292-300

Woolf, C.J. 2004. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. Ann. Intern. Med. 140, 441–451

Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P. 2005 Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. Toxicon 46, 806-813

Zychar B.C., Dale C.S., Demarchi D.S., Gonçalves L.R.C. 2010 Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice; Toxicon 55, 227-234

Figure 1

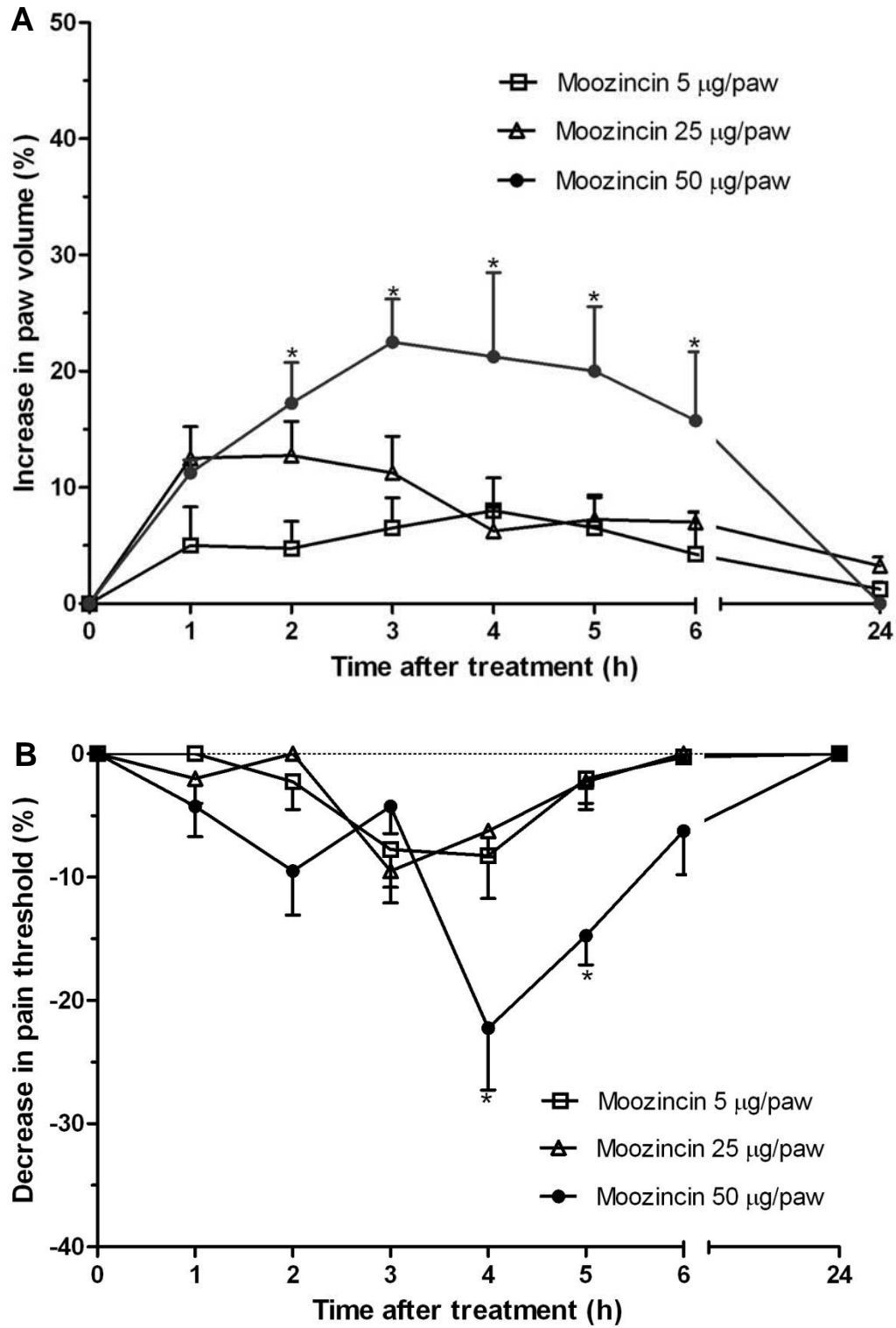
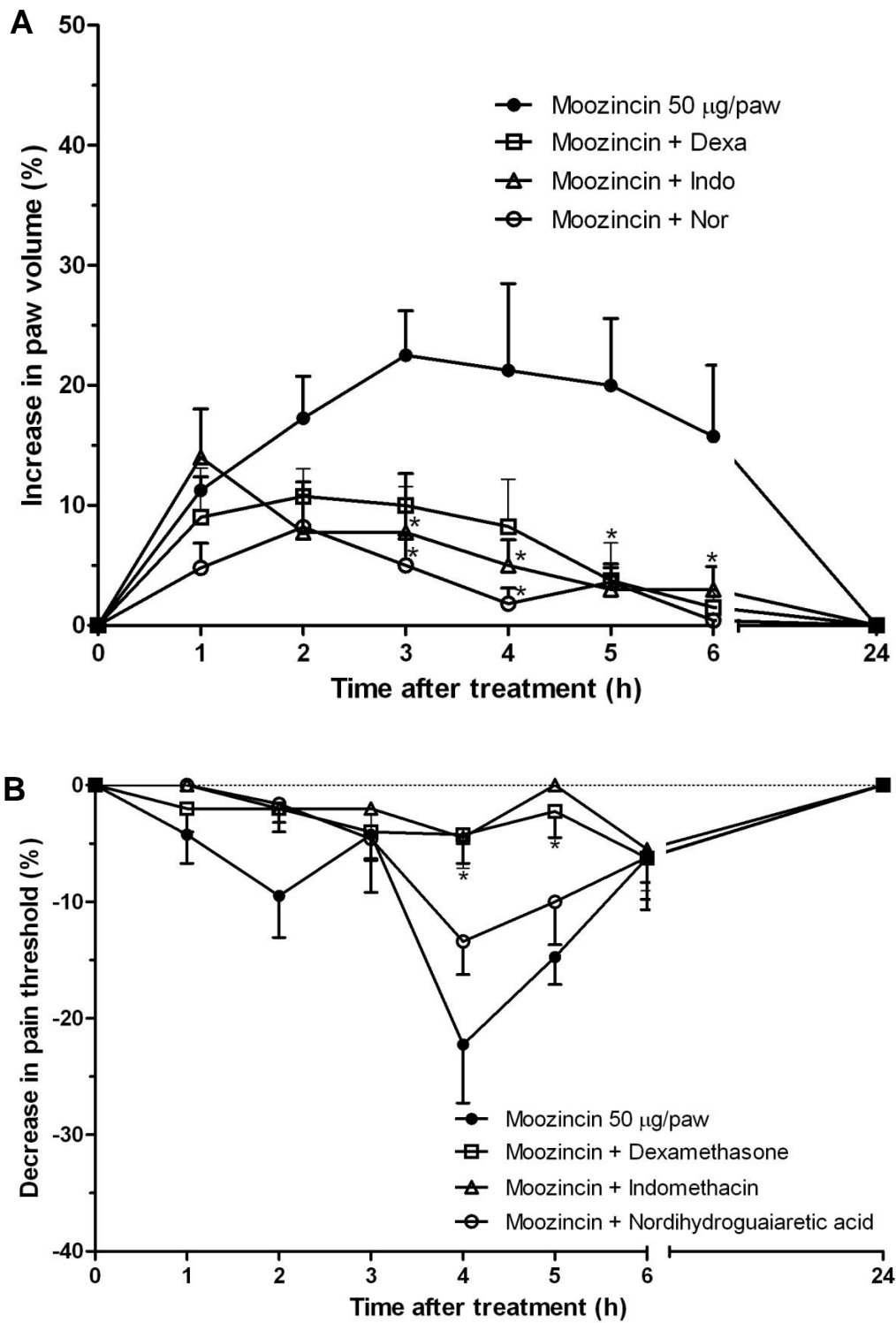
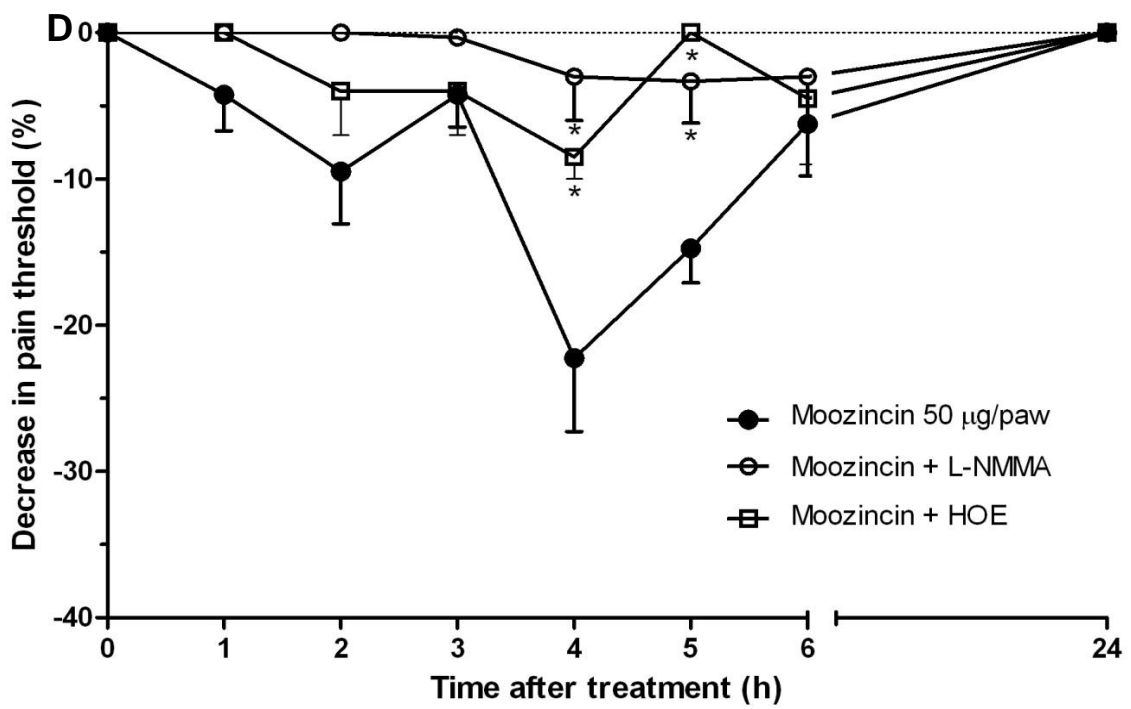
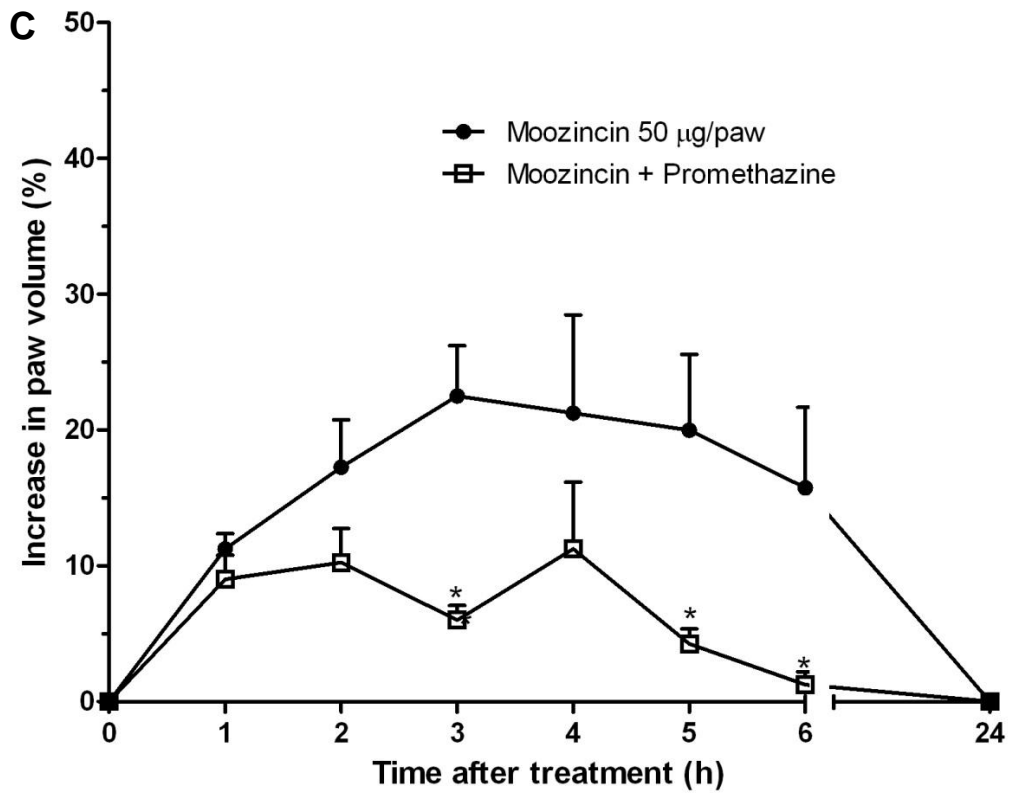


Figure 2







**Table I**

Drug treatment	Oedema (%)	Δ	Hyperalgesic effect (%)	Δ
Moozincin 50 µg/paw	22.50 ± 4.30		-22.25 ± 4.40	
Dexamethasone	10.00 ± 2.74	-12.50 (*)	-4.25 ± 3.93	18.00 (***)
Indomethacin	7.750 ± 3.24	-14.75 (*)	-4.50 ± 3.87	17.75 (**)
Nordihydroguaiaretic acid	5.00 ± 4.05	-17.50 (***)	-13.40 ± 2.03	8.85
HOE-140	16.00 ± 1.05	-6.50	-8.50 ± 3.12	13.75 (*)
L-NMMA	18.33 ± 0.84	-4.16	-3.00 ± 3.89	19.25 (***)
Promethazine	6.00 ± 3.62	-16.50 (*)	-21.50 ± 0.16	0.75
Yohimbine	17.00 ± 1.21	-5.50	-18.75 ± 0.76	3.50

**Legends**

**Fig.1.** Comparison of oedema and hyperalgesic effects induces of different doses of the Moozincin. Increase in paw volume (A) and decrease in pain threshold response (B) were determined in rat hind paws before and at different times after the intraplantar injection of Moozincin (5 - 50 µg/paw) and sterile saline in contralateral paw. Oedema and hyperalgesia were calculated from the difference between both values in both paws and expressed in percentage of increase volume and decrease of pain threshold in relation to initial values. Each point represents the mean ± SEM. \*Significantly different compared with initial values ( $P<0.05$ ).

**Fig.2.** Pharmacological characterization of the oedematogenic and hyperalgesic effects induces by Moozincin. Promethazine (15 mg/kg, i.p.), Indomethacin (8.0 mg/kg, i.p.) and Nordihydroguaiaretic acid (100 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before, Dexamethasone (2.5 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before, HOE-140 (10 µg/paw) and L-NMMA (100 µg/paw) was administered simultaneous with the intraplantar injection of the Moozincin (50 µg/paw). Increase in paw volume (A and C) and decrease in pain threshold response (B and D) were determined in rat hind paws before and at different times after the

intraplantar injection of Moozincin (50 µg/paw) and saline in contralateral paw. Oedema and hyperalgesia were calculated from the difference between both values in both paws and expressed in percentage of increase volume and decrease of pain threshold in relation to initial values. Each point represents the mean ± SEM of four animals. \*Significantly different compared with Moozincin (50 µg/paw) ( $P < 0.05$ ).

**Table 1:** Evaluation of the oedematogenic and hyperalgesic effects induced by Moozincin. Promethazine (15 mg/kg, i.p.), Indomethacin (8.0 mg/kg, i.p.), Nordihydroguaiaretic acid (100 mg/kg, i.p.) and yohimbine (2.5 mg/kg, i.p.) was administered 30 min before, Dexamethasone (2.5 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before, HOE-140 (10 µg/paw) and L-NMMA (100 µg/paw) was administered simultaneous with the intraplantar injection of the Moozincin (50 µg/paw). Oedema and hyperalgesic effects were evaluated 3 and 4 hours, respectively, after intraplantar injection of Moo (50 µg/paw) and sterile saline in contralateral paw (control). Results were calculated from the difference between both values in both paws and expressed in percentage of increase volume and decrease of pain threshold in relation to initial values. Each column represents the mean ± SEM of four animals. \*\*\* $P < 0.001$  e \*\* $P < 0.01$  \* $P < 0.05$ , compared with Moozincin (50 µg/paw).