

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Batroxase, uma nova metaloprotease da classe PI isolada da peçonha
de *Bothrops atrox*: avaliação da atividade funcional

Lanuze Grazielle Benato de Toni

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Batroxase, uma nova metaloprotease da classe PI isolada da peçonha
de *Bothrops atrox*: avaliação da atividade funcional

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Lanuze G. Benato de Toni

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

De Toni, Lanuze Grazielle Benato

Batroxase, uma nova metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *Bothrops atrox*: avaliação da atividade funcional. Ribeirão Preto, 2011.

130p. : il., 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

1. Metaloprotease. 2. SVMPs. 3. Inflamação. 4. Citotoxicidade

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lanuze Grazielle Benato de Toni

Batroxase, uma nova metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *Bothrops atrox*: avaliação da atividade funcional

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Suely Vilela

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____
Instituição _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais João
Marcos e Zuleica e a minha filha Júlia.

AGRADECIMIENTOS

Aos meus pais João Marcos e Zuleica pela confiança, apoio, dedicação e amor.

À minha filha Júlia por ser o motivo do meu crescimento quanto ser humano e da minha vida.

Às fundações FAPESP, CAPES, CNPq pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização do meu trabalho.

À Profa. Dra. Suely Vilela, pela orientação deste trabalho e oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

À Profa. Glória pela orientação em parte deste trabalho, pelo apoio profissional, pela ajuda nas decisões e por sempre confiar na minha capacidade e em meu trabalho. Muito obrigada!

À Zezé, por toda a PACIÊNCIA com as minhas dificuldades, pela ajuda nos experimentos, nas análises e no desenvolvimento desta dissertação, sempre mostrando profissionalismo e ensinando como desenvolver a pesquisa.

Aos colegas de laboratório: Cássio, Sante, Luís, Renato, Marco Aurélio, Thales, Ithana e Franco pela ajuda e dedicação.

À minha “irmãzinha Rachel” pelos conselhos, apoio e dedicação. Pessoa maravilhosa com a qual aprendi a dar mais valor à família e principalmente ao casamento.

À “Delinha” por toda ajuda no desenvolvimento deste projeto, o qual não seria possível sem a sua ajuda. Pela amizade e pelos conselhos, tanto profissionais quanto pessoais. “Delinha” muito obrigada!

Aos meus colegas da FCFRP: Danilo, “Caroline”, Nô, Lucas, Tássia, Renata, Johara e Dênis pelos cafés, baladinhas, jantinhas, pelo bate-papo e pela paciência na crise de existência.

À minha amiga Bel, pelo apoio incondicional a minha pesquisa e ao meu desenvolvimento profissional.

À minha amiga Ingrid, por toda a ajuda concedida no âmbito profissional e pessoal.

Aos meus amigos de Santa Rita do Passa Quatro e muitos outros que não citei os nomes, muito obrigada pela amizade e pelos bons momentos que sempre me proporcionaram, fazendo com que meus dias fossem de muita alegria.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

“Você não pode mudar o vento,
mas pode ajustar as velas do barco
para chegar onde quer”

Confúcio

DE TONI, L.G.B. **Batroxase, uma nova metaloprotease da classe PI isolada da peçonha de *Bothrops atrox*: avaliação da atividade funcional.** 2011. 130f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Peçonhas de serpentes são ricas em proteínas, peptídeos, compostos inorgânicos, lipídeos e carboidratos. Entre os principais constituintes protéicos podemos destacar as metaloproteases (SVMPs), responsáveis pelos processos hemorrágicos e inflamatórios, induzindo a formação de edema e infiltração de leucócitos. Da peçonha de *Bothrops atrox*, foi isolada uma metaloprotease denominada Batroxase. Esta SVMP foi isolada a partir de três passos cromatográficos, sendo duas exclusões moleculares, uma clássica e outra em FPLC, e uma troca aniônica utilizando CLAE. As SVMPs podem ser classificadas de acordo com os domínios existentes em sua estrutura. Entre as diversas classes, existem as SVMPs da classe PI, que possuem fraca atividade hemorrágica e baixo peso molecular. A Batroxase apresentou massa molecular de 27 kDa (dados não mostrados) e DHM de 10 μ g, podendo ser classificada como uma metaloprotease de classe PI. A atividade proteolítica da Batroxase foi avaliada sobre diferentes substratos presentes na matriz extracelular e em algumas proteínas presentes no plasma, responsáveis pela ativação da coagulação. Dos constituintes da matriz extracelular (MEC) avaliadas, a Batroxase apresentou atividade sobre o colágeno tipo IV e sobre a fibronectina, esta atividade facilita o processo hemorrágico, desde que estes substratos são encontrados na MEC de tecidos epiteliais e vasos sanguíneos. A atividade sobre proteínas presentes no plasma foi avaliada, evidenciando a capacidade de degradar o fibrinogênio e a fibrina, principalmente a cadeia β . Esta atividade pode ser inibida na presença de inibidores de metaloproteases EDTA e EGTA, e na presença do redutor de proteínas β -mercaptoetanol. A atividade sobre a fibrina e sobre o fibrinogênio interfere no processo de coagulação, dificultando a interrupção de processos hemorrágicos. Após a formação de um coágulo, a Batroxase foi capaz de dissolvê-lo completamente, capacidade esta, relacionada à sua atividade fibrinolítica. As plaquetas quando na presença da Batroxase não foram induzidas a se agregarem, e quando, na adição de ADP, não foi capaz de inibir a agregação. A atividade inflamatória foi elucidada, evidenciando a participação na formação de edema e hiperalgisia, bem como infiltração de leucócitos. Na avaliação farmacológica foi observada a participação de mediadores pró-inflamatórios como a histamina via receptores H_1 , a serotonina via receptores 5-HT $_1$, e a formação de leucotrienos no edema e a histamina via receptores H_1 e formação de leucotrienos na hiperalgisia. A infiltração de leucócitos observada foi mediada principalmente por neutrófilos nas primeiras horas, seguida do aumento de células mononucleares. A Batroxase possui citotoxicidade ausente ou baixa sobre as linhagens tumorais testadas, com análise significativa apenas para JURKAT, B16-F10, SK-BR3 em altas concentrações. Em células como EL-4 e PBMC sugerem que a Batroxase apresenta atividade imunorregulatória, induzindo proliferação celular em baixas concentrações e inibindo este crescimento em concentrações mais altas como observado em células JURKAT, A-20 e PBMC. É capaz de estimular a produção de citocinas próinflamatórias e antiinflamatórias de maneira distinta induzindo preferencialmente a produção de citocinas do padrão Th1 como IFN- γ , que, após adição de estímulo policlonal anti-CD3, apresentou atividade supressora na capacidade proliferativa de

células T, inibindo a produção de citocinas do padrão Th1 como a IL-2 e IFN- γ , citocinas do padrão Th2 como a IL-4 e citocinas do padrão Th17 como a IL-17A.

Palavras-chave: SVMs, matriz extracelular, inflamação, citotoxicidade

DE TONI, L.G.B. **Batroxase, a new metalloproteinase of class PI isolated from *Bothrops atrox* snake venom: functional evaluation.** 2011. 130f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Snake venoms are rich in components like proteins, peptides, lipids, carbohydrates and inorganic compounds. Among their main proteins components, the metalloproteinases (SVMPs) are responsible for hemorrhagic and inflammatory effects, edema formation and leucocytes recruitment. Batroxase, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops atrox* snake venom, was purified using three chromatographic steps, namely: two molecular exclusion steps, one as classic chromatography and another as FPLC, and an anionic exchange in HPLC. SVMPs can be classified by specific domains in their structure. Among the various classes, there are SVMP PI, which has weak hemorrhagic activity and low molecular weight. Batroxase showed a molecular mass of 27 kDa (data not shown) and DHM of 10 µg. The proteolytic activity was evaluated on different substrates in the extracellular matrix and some plasma proteins, responsible for activation of coagulation. Batroxase was able to degrade extracellular matrix (ECM) components like, type IV collagen and fibronectin, inducing bleeding process, since these components are found in the ECM of epithelial tissues and blood vessels. The activity of proteins present in plasma was evaluated, demonstrating the ability to degrade fibrinogen and fibrin, especially the β chain, which can be inhibited in the presence of metalloproteinase inhibitors as EDTA and EGTA, as well as with a reducing protein agent β-mercaptoethanol. Activity on fibrin and fibrinogen interfere with the clotting process, making difficult to interrupt processes like bleeding. After clot formation, Batroxase was able to dissolve it completely, which is related to their fibrinolytic activity. The platelets in the presence of Batroxase were not induced to aggregate, and when, in addition to ADP, was not able to inhibit aggregation. Inflammatory activity has been elucidated, suggesting the participation in edema and hyperalgesia, as well as infiltration of leukocytes. Pharmacological evaluation was observed with participation of pro-inflammatory mediators such as histamine via H1 receptors, serotonin 5-HT1 receptor via, and the synthesis of leukotrienes and histamine on edema via H1 receptors and synthesis of leukotrienes in hyperalgesia. Infiltration of leukocytes was observed mainly mediated by neutrophils in the early hours, followed by the increase of mononuclear cells. Batroxase have absent or very low cytotoxicity on tumor cell lines tested, with significant only for Jurkat analysis, B16-F10, SK-BR3 in high concentrations. In EL-4 cells and PBMC, inducing cell proliferation at low concentrations and inhibiting this growth in higher concentrations as observed in Jurkat cells, A-20 and PBMC. It can stimulate production of proinflammatory and antiinflammatory cytokines, preferentially induces the production of Th1 cytokines such as IFN-γ, which, after addition of polyclonal anti-CD3 stimulation showed activity in suppressing proliferative capacity of T cells, inhibiting the production of Th1 cytokines such as IL-2 and IFN-γ, Th2 cytokines such as IL-4 and Th17 cytokine pattern as IL-17A.

Key words: SVMPs, extracellular matrix, paw edema, inflammatory mediators

LISTA DE ABREVIATURAS

SVMPs Metaloproteases de veneno de serpentes

AMBIC	Bicarbonato de Amônio
B.	Gênero <i>Bothrops</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCM	Dose Coagulante Mínima
DHM	Dose Hemorrágica Mínima
I.PL.	Intra-plantar
S.C.	Sub-cutânea
I.P.	Intra-peritoneal
V.O.	Via oral
LAAO	L-aminoácido oxidase
PBS	Tampão Salina Fosfato
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TEMED	N,N,N',N' - Tetrametiletenodiamina
PRP	Plasma rico em plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
RPM	Rotação por minuto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
FPLC	“Fast Protein Liquid Chromatography”

SUMÁRIO

Resumo		i
Abstract		iii
Lista de figuras		iv
Lista de tabelas		viii
Lista de abreviaturas		ix
1.0 INTRODUÇÃO		
1.1 Peçonhas de serpentes		1
1.2 Inflamação, hiperalgesia e mediadores inflamatórios		5
1.3 Sistema imune		10
1.3.1 Imunidade adaptativa	12	
1.4 Matrix extracelular (MEC) e hemostasia		14
<hr/>		
2.0 OBJETIVOS		19
2.1 Gerais		19
2.2 Específicos		19
<hr/>		
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS		21
3.1 Materias		21
3.1.1 Peçonha	21	
3.1.2 Animais	21	
3.1.3 Sangue	21	
3.1.4 Drogas	21	
3.1.5 Citocinas	21	
3.1.6 Reagentes	21	
3.2. Métodos		22
3.2.1 Purificação da Metaloprotease do veneno de <i>Bothrops atrox</i>		22
3.2.1.1 Exclusão Molecular em Sephacryl S-200		22
3.2.1.2 Exclusão Molecular em Superdex-75		22
3.2.1.3 Cromatografia de Troca Iônica em Shodex EN-502N 7C		22
3.2.1.4 Cromatografia de Fase Reversa C-18-ODS		23
3.2.1.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)		23
3.2.1.6 Quantificação de Proteínas		24
3.2.2 Caracterização Enzimática		24
3.2.2.1 Atividade enzimática sobre substratos		24

3.2.2.1.1 Atividade Fibrinogenolítica	24
3.2.2.1.2 Atividade sobre o Colágeno	25
3.2.2.1.3 Atividade sobre a Fibrina	25
3.2.2.1.4 Atividade sobre a Laminina	25
3.2.2.1.5 Atividade sobre a Fibronectina	25
3.2.3 Atividade Fibrinolítica	25
3.2.4 Atividade Trombolítica	26
3.2.5 Caracterização Biológica	26
3.2.5.1 Atividade Coagulante	26
3.2.5.2 Atividade Hemorrágica	27
3.2.5.3 Avaliação do edema de pata	27
3.2.5.4 Hiperalgisia	27
3.2.5.5 Envolvimento de mediadores inflamatórios	28
3.2.5.6 Efeitos sobre plaquetas	29
3.2.5.7 Citotoxicidade	29
3.2.5.7.1 Meio de cultura celular	29
3.2.5.7.2. Linhagens de células tumorais	29
3.2.5.7.3. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)	29
3.2.5.7.4 Obtenção das células de baço de camundongos	30
3.2.5.7.5. Análise da atividade citotóxica	30
3.2.5.7.6. Análise da atividade proliferativa de células de baço de camundongos	31
3.2.5.7.7. Obtenção dos sobrenadantes de culturas de células do baço de camundongos	31
3.2.5.7.8. Dosagem de citocinas	32

3.2.5.7.9. Ensaio de inibição da adesão celular em placas de cultivo celular “polistireno”	32
3.2.5.8 Análise do exsudato inflamatório na cavidade peritoneal de camundongos	32

4 RESULTADOS	34
4.1 Purificação da Metaloprotease de <i>B. atrox</i> (Batroxase)	35
4.2 Caracterização Enzimática	35
4.2.1 Atividade Proteolítica sobre os substratos	41
4.2.1.1 Fibrinogênio	41
4.2.1.2 Colágeno IV	44
4.2.1.3 Fibrina	45
4.2.1.4 Laminina	46
4.2.1.5 Fibronectina	47
4.2.2 Atividade Fibrinolítica em placa	48
4.2.3 Atividade trombolítica	50
4.3 Caracterização Funcional	52
4.3.1 Atividade Hemorrágica	52
4.3.2 Atividade Edematogênica	54
4.3.3 Hiperalgisia	59
4.3.4 Atividade Coagulante	63
4.3.5 Atividade sobre as plaquetas	63
4.3.6 Avaliação da atividade citotóxica	65
4.3.7 Adesão celular	67

4.3.8	Atividade proliferativa sobre células de baço de camundongos	69
4.3.9	Efeito da Batroxase na indução da produção de citocinas pró/antiinflamatórias pelas células de baço de camundongos	71
4.3.10.	Efeito do tratamento de células do baço com Batroxase para produção de citocinas do padrão Th1/Th2/Th17	73
4.3.11.	Efeito da Batroxase na atividade proliferativa de células T no baço estimuladas com mitógeno, anticorpo monoclonal anti-CD3	75
4.3.12.	Efeito do prétratamento com Batroxase na produção de citocinas pró/antiinflamatórias pelas células T do baço estimuladas com anti-CD3	77
4.3.13.	Efeito do prétratamento com Batroxase na produção de citocinas do padrão Th1/Th2/Th17	79
4.3.14	Avaliação do exsudato inflamatório da cavidade peritoneal de Camundongos	81
<hr/>		
5	DISCUSSÃO	87
<hr/>		
6	CONCLUSÃO	105
<hr/>		
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

INTRODUÇÃO

1.0. INTRODUÇÃO

1.1. Peçonhas de Serpentes

As serpentes são classificadas em cinco famílias, Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae, Crotalidae e Colubridae. A família Elapidae compreende as mambas, cobras e corais, sendo encontradas nas Américas, África, Ásia e Oceania. Já a família Hydrophiidae é formada por serpentes aquáticas, ausentes apenas no canal do Panamá e no Oceano Atlântico, devido à temperatura e salinidade. A família Viperidae, que compreende o gênero *Bothrops*, é a família de serpente mais encontrada. Estas serpentes apresentam a cabeça triangular e dentição característica (HARVEY, 1984), podendo ser representadas pelas jararacas no Brasil. A família Crotalidae é representada pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Sistrurus* (BARRAVIERA, 1994), muitas vezes sendo considerada por alguns autores como uma subfamília da Viperidae. A exceção é a presença de um sensor de calor situado em ambos os lados da cabeça. Este sensor consegue determinar até 2° C de diferença na temperatura ambiente, facilitando o encontro de suas presas durante a noite. A família Colubridae é a maior de todas as famílias e as serpentes pertencentes a esta família, podem ou não serem peçonhentas sendo que, algumas delas possuem peçonhas extremamente perigosas (HARVEY, 1984).

A peçonha é obtida através da compressão da glândula da serpente. A quantidade de peçonha extraída de cada serpente depende não só da espécie a que pertence, mas da alimentação, estresse ao qual é submetida, ambiente no qual vive e da frequência da extração, variando de 0,01mL a 0,6mL (HARVEY, 1984).

Peçonhas são misturas complexas de frações tóxicas e não-tóxicas, compreendendo proteínas, peptídeos (LU et al., 2005; DU et al., 2006), carboidratos, lipídios e compostos inorgânicos (GARCIA et al., 2004), com função de imobilizar sua

presa/inimigo, seja no ataque ou na defesa, além de auxiliar no processo de digestão (LU et al., 2005), e possuem coloração amarelo claro ou incolor (HARVEY, 1984). Entre os componentes da peçonha, podemos destacar as enzimas, as não enzimas, os inibidores enzimáticos e os peptídeos. As enzimas que podem ser encontradas são as acetilcolinesterases, aminotransferases, ADPases, ATPases, fator cobra (CVF), B-glucosaminidase, catalases, fosfoesterases (mono e diesterases), fosfolipases, hialuronidases, L-amino ácido oxidases, NAD nucleosidases, proteases (serinoproteases, metaloproteases, Aspártico/Tiol proteases) (GARCIA et al., 2004). As não enzimas compreendem os fatores de crescimento (NGF), inibidores de formação do complexo protrombinase, lectinas tipo C, precursores de peptídeos bioativos, ligantes do fator de Von Willebrand e proteínas de secreção ricas em cisteína. Os peptídeos podem ser citotóxicos, miotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, natriuréticos e potenciadores de bradicinina. Os compostos orgânicos são representados por amins biogênicas, aminoácidos, carboidratos, citratos e nucleosídeos e os inorgânicos são representados por cálcio, cobalto, cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês, sódio e zinco (LU et al., 2005; DU et al., 2006; BJARNASSON E FOX, 1994; HITE et al., 1994; KAMIGUTTI et al., 1996; MARSH et al., 1994; MATSUI et al., 2000; JUNQUEIRA DE AZEVEDO E HO, 2002).

Entre as principais enzimas, as hialuronidases estão presentes em quase todas as peçonhas, com a função de facilitar a distribuição dos outros componentes da peçonha nos tecidos da presa, através da degradação da matriz extracelular. As fosfolipases são responsáveis pela lise dos fosfolipídeos da membrana das células, contribuindo para a formação de edema pela liberação de mediadores inflamatórios (TEIXEIRA et al., 1994). As L-amino ácido oxidases (LAO) exercem possivelmente seus efeitos tóxicos pela formação de peróxido de hidrogênio, no processo de oxidação de L-aminoácidos (DU E CLEMETSON, 2002). As metaloproteases são responsáveis pelas hemorragias, devido ao caráter proteolítico destas enzimas, capazes de lisar proteínas da membrana dos vasos, permitindo o extravasamento de sangue (FOX E SERRANO, 2005). As serinoproteases possuem atividades sobre as proteínas presentes na cascata de coagulação, sendo responsáveis pela ativação de fatores que resultam na ativação da coagulação do plasma (CASTRO et al., 2004). O papel do fator de crescimento neural (NGF) ainda não está esclarecido no envenenamento, mas acredita-se que potencia a ação de outros componentes do veneno (HARVEY, 1984; KOSTIZA E MEIER, 1996).

O envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por proteólise, hemorragia, necrose, edema, infiltração de leucócitos (FOX E SERRANO, 2009; TEIXEIRA et al., 2009), além de efeitos sistêmicos como coagulopatias, nefrotoxicidade, alterações hemodinâmicas, neurotoxicidade e cardiotoxicidade (ROSENFELD et al., 1971; GUTIÉRREZ et al., 1995, 2005; FERNANDES et al., 2006).

As metaloproteases de venenos de serpentes (SVMP) são responsáveis pela ação hemorrágica do veneno (FOX E SERRANO, 2009; BJARNASSON E FOX, 1994; FERNANDES et al., 2006), sendo classificadas como pertencentes à família das metzincinas e subfamília das reprotisinas (FERNANDES et al., 2006).

As SVMPs foram classificadas em quatro subgrupos de PI a PIV, classificação esta feita através de seu peso molecular, domínios, e intensidade hemorrágica. As SVMP, de classe PI são representadas por metaloproteases que contêm apenas o domínio metaloprotease em sua estrutura, possuindo massa de 20-30 kDa e fraca atividade hemorrágica; a classe PII é composta por metaloproteases que contêm domínio metaloprotease e desintegrina com massa molecular de 30-60 kDa; metaloproteases de classe PIII possuem domínios metaloprotease, possuindo domínios desintegrina ricos em cisteína com massa molecular de 60-90 kDa. Já as metaloproteases de classe PIV possuem massa molecular maior que 90 kDa, contêm domínios metaloprotease, desintegrina, cisteína e lectina like (FOX E SERRANO, 2005; DU et al., 2006; FOX E BJARNASSON, 1995).

FOX E SERRANO (2008) reclassificaram as SVMPs, de acordo com a **Figura 1**, a classe PI, foi substituída pela PIa, representando as SVMPs que possuem somente o domínio metaloprotease HEXXHXXGXXH; a classe PII, foi subdividida em a, b, c, d, e e; a classe PII é aquela que possui além do domínio metaloprotease, o domínio desintegrina (RGD), a PIIa possui o domínio desintegrina livre, a classe PIIb possui o domínio desintegrina como parte da estrutura da proteína, a classe PIIc é a forma dimérica da PIIb, a classe PII d representa um precursor de que libera desintegrinas homodiméricas e a PII e compreende metaloproteases contendo domínio heterodimérico desintegrina (RGD). A classe PIII possui além destes dois domínios, o domínio rico em cisteína, que pode ser subdividido em quatro classes, a PIIIa, cujo domínio desintegrina-like e o rico em cisteína não são processados pela proteinase, fazendo parte dela, já na

PIIIb, estes domínios são processados e considerados livres, a classe PIIIc é a forma dimérica da PIIIa e a PIII d é a classe que compreende as antigas PIV, adicionadas de dois domínios lectina-like ligados por pontes de dissulfeto (MACKESSY, 2009).

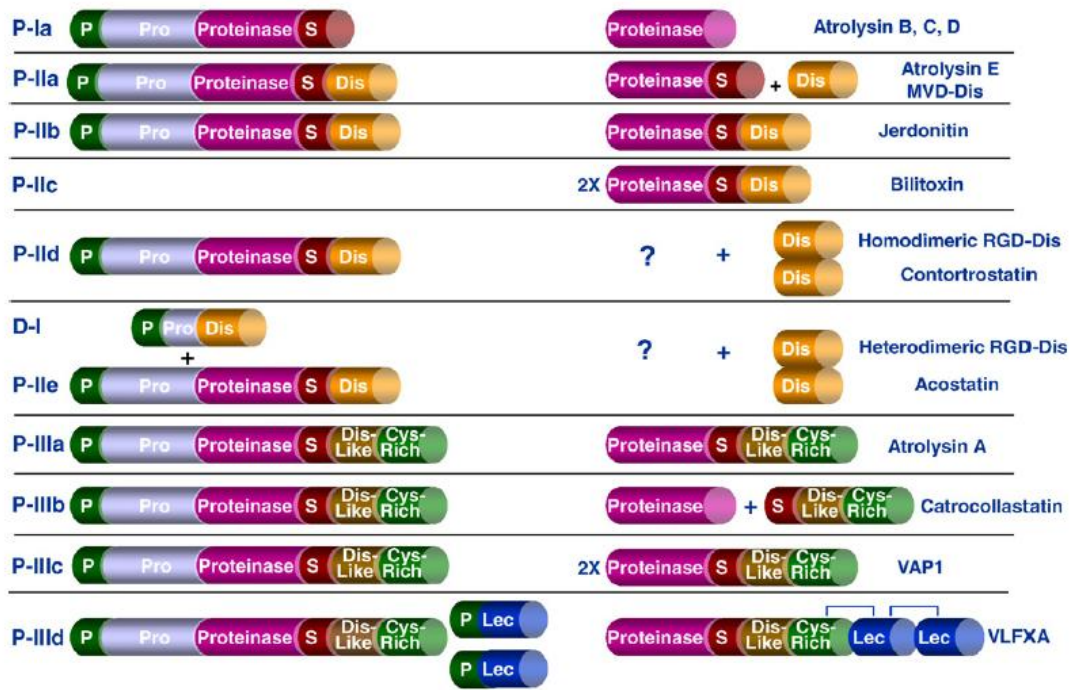


Figura 1: Classificação das SVMPs (Fox e Serrano, 2008).

Várias SVMPs têm sido isoladas e caracterizadas, pertencendo às diferentes classes. Em relação à classe PI foram isoladas a Neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2000), BaPI (GUTIERREZ et al., 2005) e BH2 (BORKOW et al., 1993) de *Bothrops asper*, BlaH1 de *Bothrops lanceolatus* (STROKA et al., 2005), CcH1 de *Cerastes Cerastes* (BOUKHALFA-ABIB et al., 2009), B-JussuMP-II de *Bothrops jararacussu* (MARCUSSE et al., 2007), Agkislysina de *Agkistrodon acutus* (WANG et al., 2004), Bothrojaractivase de *Bothrops jararaca* (BERGER et al., 2008), e do gênero *Crotalus*, as metaloproteases Ht- a, c, d, e (BJARNASSON E FOX, 1994). Da classe PII são conhecidas a Natrahagina de *Naja atra* (ZHU et al., 1999), F1 de *Naja nigricolis* (KINI E EVANS, 1991), Ohagina de *Ophiophagus Hannah* (GUO et al., 2007), B-JussuMP-I de *Bothrops jararacussu* (MAZZI et al., 2006), Stejnitina de *Trimeresurus stejnejeri* (HAN et al., 2007). Da classe PIII foram isoladas a Balteragina

de *Bothrops alternatus* (GAY et al., 2005), Daborhagina-M e Daborhagina-K de Russel's viper (CHEN et al., 2008), Jararhagina de *Bothrops jararaca* (PAINE et al., 1992), Patogoniensis de *Phylodrias patagoniensis* (PEICHOTO et al., 2007), Bothropasina de *Bothrops jararaca* (MANDELBAUM et al., 1982), BaH4 de *Bothrops asper* (FRANCESCHI et al., 2000), Basparina-A de *Bothrops asper* (LORÍA et al., 2003), NN-PF3 de *Naja naja* (KUMAR et al., 2010) e AAV1 de *Agkistrodon acutus* (WANG et al., 2007). Da classe PIV as RVV (TAKEYA et al., 1992) de Russel's viper e VLFXA de *Vipera lebetina* (SIIGUR et al., 2001).

Apesar das SVMPs serem caracterizadas pela atividade hemorrágica, algumas metaloproteases são desprovidas desta atividade, sendo classificadas como não-hemorrágicas. A exemplo desta classe podem ser destacadas a Bm α -I de *Bothrops moojeni* (BERNARDES et al., 2008), Neuwiedase de *Bothrops neuwiedi* (RODRIGUES et al., 2000), Berythraactivase de *Bothrops erythromelas* (SILVA et al., 2003) e Basparina A de *Bothrops asper* (LORÍA et al., 2003).

As diferentes classes de metaloproteases exercem diversas atividades biológicas como proteolítica, fibrinogenolítica, fibrinolítica, apoptótica, ativação de protrombina, ativação de fator X, inibição e ou indução da agregação plaquetária, capacidade de recrutar leucócitos e possuir ou não atividade coagulante, (FOX E SERRANO, 2009; KAMIGUTTI, 2005; JIA et al., 1996; BJARNASSON E FOX, 1994).

As SVMPs estão envolvidas em algumas patologias como edema, dor, necrose e distúrbios de coagulação, podendo ser úteis em estudos de hemostasia e trombose, com aplicações farmacológicas e clínicas (FUJIMURA et al., 1996). A atividade proteolítica ocorre na membrana basal de vasos como Fibronectina, Laminina e Colágeno tipo IV (BOUKHALFA-ABIB et al., 2009).

A atividade hemorrágica provocada pelas SVMPs ocorre devido à lise da integridade dos vasos (FOX E SERRANO, 2009), lesionando os tecidos, o que pode provocar uma reação inflamatória aguda, induzindo a um processo de extravasamento de plasma e leucócitos (TEIXEIRA et al., 2009), iniciando um processo inflamatório, que pode ser acompanhado ou não de edema e dor (GALVÃO NASCIMENTO et al., 2009).

1.2. Inflamação, Hiperalgisia e Mediadores Inflamatórios

A inflamação constitui um processo homeostático desencadeado pelo organismo após uma lesão tecidual ou infecção local, com o objetivo de reduzir a lesão, isolar ou destruir o agente agressor e ainda ativar os mecanismos de reparo necessários para garantir o restabelecimento de suas funções normais. Esta resposta engloba uma seqüência de eventos que podem ser divididos em vasculares e celulares. Os eventos vasculares compreendem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vênula com consequente exsudação plasmática. Estes eventos promovem um aumento local da concentração de mediadores de origem plasmática, entre eles os componentes do sistema complemento, da coagulação, do sistema fibrinolítico e das cininas. Concomitantemente são desencadeados os efeitos celulares, com ativação principalmente de macrófagos residentes nos tecidos. A resposta inflamatória é, portanto, iniciada e conduzida por mediadores de origem celular e também por aqueles de origem plasmática que vão promover os sinais característicos desta resposta: dor, calor, rubor e tumor, que podem vir acompanhados ou não de perda de função do tecido ou órgão afetado (ROCHA E SILVA, 1978).

A dor está associada a uma informação nociceptiva convertida pelos nociceptores, que são receptores sensoriais da dor encontrados em tecidos periféricos, a um estímulo elétrico proveniente das fibras aferentes primárias, que é transmitida aos neurônios de segunda ordem ou secundários na medula espinhal (**Figura 2**) (MILAN, 1999). A dor é dividida em três tipos: passageira, crônica e aguda. A dor passageira à ativação de nociceptores é feita sem lesão tecidual, a crônica é caracterizada pela presença de lesão tecidual e doenças que impeçam o equilíbrio da homeostasia. Na dor aguda há também a presença de lesão tecidual, mas o organismo consegue reestabelecer a homeostasia (LOESER; MELZACK, 1999).

As fibras que conduzem a informação nociceptiva e posteriormente o estímulo elétrico são classificadas em mielinizadas (fibras A) e não mielinizadas (fibras C). As fibras C respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química (LOESER; MELZACK, 1999), com menor velocidade de transmissão (DUBIN E PATAPOUTION, 2010) e as fibras A δ , respondem preferencialmente a estímulos nocivos térmicos e pressóricos e com menor intensidade a estímulos químicos (RANG et

al., 1991), com maior velocidade na transmissão da dor (DUBIN E PATAPOUTION, 2010) (**Figura 3**).

A ativação dos nociceptores é realizada através de substâncias que interagem com receptores e/ou canais iônicos levando a uma modificação na excitabilidade dos neurônios sensoriais primários e centrais mediados por alterações nos sinais, além de alterações na expressão de receptores e canais iônicos intracelulares, induzindo a uma resposta ao estímulo nociceptivo (WOOLF et al., 2000).

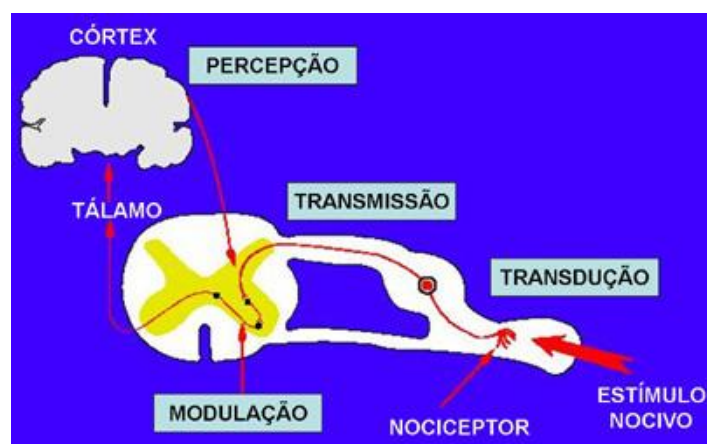


Figura 2. Transmissão da dor. Fonte:www.dol.org.br

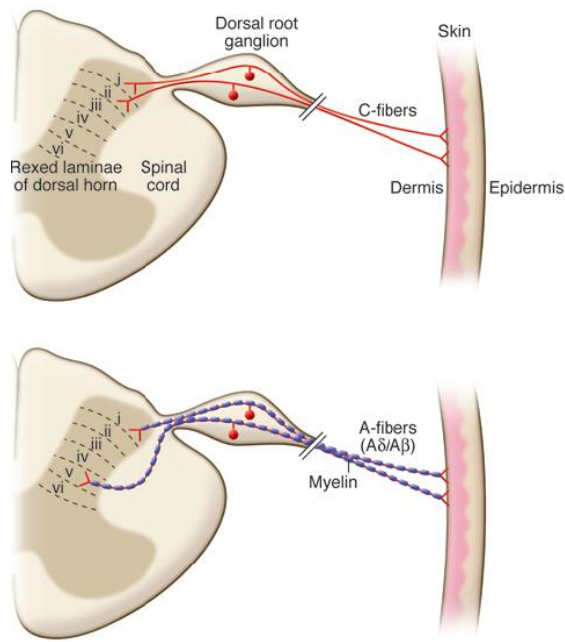


Figura 3. Condução do estímulo doloroso. Fonte: DUBIN E PATAPOUTION (2010).

Após injúria tecidual e inflamação, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios intermediários e finais por diversas células, que agem em diferentes receptores específicos e/ou canais iônicos presentes nos terminais periféricos das fibras (VERRI et al., 2006; COSTIGAN et al., 2000) (**Figura 4**).

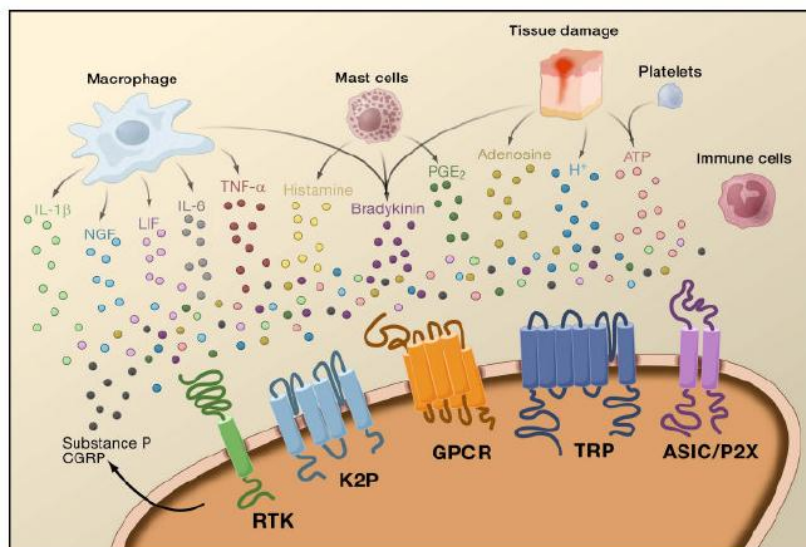


Figura 4. Mediadores inflamatórios envolvidos na dor. Fonte: BAUSMAN (2009).

Os mediadores inflamatórios liberados podem ser divididos em mediadores intermediários e finais. Os mediadores intermediários são liberados no início e durante a inflamação com a função de liberar outros mediadores intermediários e/ou finais, são eles as citocinas e quimiocinas (TNF- α , IL-1 e IL-8) (CUNHA et al., 2008), bradicinina (FERREIRA et al., 1993; TONUSSI et al., 1997) e fatores do complemento C3a e C5a (JANG et al., 2010). O TNF- α é a primeira citocina a ser liberada, que pode levar a produção de IL-1 β , induzindo a produção de prostanóides, ou, estimular quimiocinas induzindo a liberação de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 2008).

Os mediadores finais podem ser representados pelos eicosanóides, prostaglandinas, que são considerados como principal mediador indutor da dor inflamatória (FERREIRA, 1973) e leucotrienos (CUNHA et al., 2003), além das aminas simpintomiméticas (FERREIRA et al., 1979), fator de agregação de plaquetas (PAF), histamina e serotonina (CEVIKBAS et al., 2010).

Estes mediadores interagem com seus receptores específicos nos neurônios aferentes primários levando a sensibilização (VERRI et al., 2006).

Vários métodos são utilizados para avaliar o processo de nocicepção, entre eles podemos citar o método da formalina, retirada da cauda, Randall e Selito, Von Frey filamentos e Von Frey eletrônico. O método de Von Frey eletrônico possui a vantagem de distinguir os dois componentes da dor inflamatória, que pode ser pela sensibilização ou ativação de nociceptores, além de ser mais sensível que Von Frey filamentos (CUNHA et al., 2004).

A histamina é uma amina vasoativa, que interage com vários receptores classificados como H₁, H₂, H₃ e H₄. Os receptores H₁ presentes no endotélio vascular são acoplados à proteína G e promovem efeitos como aumento da permeabilidade vascular e infiltração de leucócitos (GALVÃO NASCIMENTO et al., 2009). A histamina é armazenada nos grânulos de mastócitos (HOFSTRA et al., 2003), células da epiderme, células da mucosa gástrica, neurônios e em células de rápido crescimento ou regeneração. Os receptores H₂ são responsáveis pelo controle da secreção gástrica e os

H₄ estão envolvidos na quimiotaxia e na liberação de mediadores inflamatórios mediados por eosinófilos, mastócitos, células dendríticas e células T (GARTNER et al., 2002; O'REILLY et al., 2002; HOFSTRA et al., 2003). Diferentemente dos outros receptores, os H₃ são moduladores negativos da inflamação, localizados no sistema nervoso central e periférico com papel na atenuação nociceptiva e edematogênica (CANNON, 2007).

A serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT) é uma substância vasoativa encontrada em mastócitos de roedores e nas plaquetas, trato gastrointestinal e SNC de seres humanos. As ações da serotonina são numerosas, incluindo aumento da motilidade gastrointestinal, contração de outros músculos lisos, constrição vascular, agregação plaquetária, estimulação de terminações nervosas nociceptivas e excitação/inibição de neurônios do SNC (RANG E DALE, 2001). São descritos vários subtipos de receptores de serotonina na literatura, entre eles, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₄. O receptor 5-HT₁ está envolvido com termorregulação, ansiedade, vasoconstrição pulmonar e cerebral, bem como vasodilatação de vasos periféricos. O receptor 5-HT₂ é responsável pelo tônus vascular, agregação de plaquetas (SUFKA et al., 1991) e contração de músculo liso. O receptor 5-HT₃ está envolvido com excitação neuronal e efeitos comportamentais como a ansiedade e, finalmente, o 5-HT₄ está relacionado com a motilidade do trato gastrointestinal (RANG E DALE, 2001).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, formado pela ação da NO sintase sobre o aminoácido L-arginina. O óxido nítrico possui um amplo papel fisiológico, incluindo a manutenção do tônus vascular e como neurotransmissor. São conhecidas três isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), a isoforma neuronal (nNOS), a induzida (iNOS) e a endotelial (eNOS). A forma induzida da enzima NO sintase (iNOS) está envolvida na maioria dos processos inflamatórios, incluindo o aumento da permeabilidade venular (KUHR et al., 2010).

A bradicinina é uma cinina plasmática que atua em receptores B₁ e B₂ (REGOLE E BARABÉ, 1980). Após a ocorrência de eventos inflamatórios em resposta à lesão tecidual e a reações alérgicas várias reações proteolíticas são desencadeadas, entre elas a clivagem do cininogênio pela calicreína, levando à formação de bradicinina (WATCHFOGEL et al., 1993). Este mediador, ao interagir com seus receptores, produz

dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma e migração celular (FERREIRA et al., 2000).

A bradicinina é um agonista preferencial do receptor B₂, que é constitutivo e amplamente encontrado nos tecidos. Esse receptor é metabotrópico, acoplado a uma proteína G, e, quando ligado à bradicinina, promove a ativação das fosfolipases A₂ e C, levando a um aumento de Ca²⁺ citosólico com conseqüente aumento da síntese e liberação de NO. A bradicinina, atuando em receptores B₂ localizados em vênulas, induz a separação das junções das células e expõe a membrana basal, permeáveis a proteínas plasmáticas, permitindo o extravasamento de líquidos plasmáticos e levando ao edema. O receptor B₁ é induzido por diversos estímulos inflamatórios, porém estão presentes constitutivamente, com menor freqüência, em todos os tecidos, prevalecendo no músculo liso vascular e são responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios como IL-1 e TNF- α (DRAY E PERKINS, 1993).

A ativação da fosfolipase A₂ por estímulos inflamatórios promove hidrólise dos fosfolipídeos da membrana celular, liberando o ácido araquidônico (SCHROR et al., 1992). O ácido araquidônico sofre ação das enzimas ciclooxigenases (COX), resultando na formação de prostaglandinas e da enzima 5-lipoxigenase, formando leucotrienos (ROCHA et al., 2003).

São conhecidas duas isoformas de COX, a COX-1 (constitutiva) e a COX-2 (induzida). A COX-1 é responsável pela manutenção da perfusão renal e proteção da mucosa gástrica e a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios (OLIVO et al., 2007.)

A 5-lipoxigenase é ativada e transportada pela FLAP à membrana nuclear e converte o ácido araquidônico a LTA₄. O LTA₄ é hidrolisado pela enzima LTA₄ hidrolase formando o LTB₄ (PETERS-GOLDEN E BROCK, 2001). O LTA₄ também é o precursor dos cisteinil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄ e LTF₄), importantes mediadores inflamatórios que induzem broncoconstrição e aumento da permeabilidade venular. Os leucotrienos são formados principalmente por monócitos/mastócitos e células polimorfonucleares (ROCHA et al., 2003).

1.3. SISTEMA IMUNE

O sistema imune é um sistema de defesa contra agentes infecciosos e macromoléculas estranhas. A imunidade contra agentes infecciosos ou não, e pode ser dividida em imunidade inata ou adaptativa (ALAM E GORSKA, 2003; PARKIN E COHEN, 2001).

A imunidade inata é responsável pela primeira linha de defesa, sendo as principais células efetoras os neutrófilos e macrófagos, células NK (*natural killers*), células dendríticas, bem como ativação do sistema complemento, citocinas e liberação de mediadores inflamatórios (CRUVINEL et al., 2010). Este mecanismo é ativado reagindo contra agentes infecciosos e produtos de dano tecidual.

Na superfície celular dos microorganismos existem moléculas como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicóicos, que são conhecidos como PAMPs (Padrões Moleculares Associados à Patógenos) (MEDZHITOV E JANEWAY, 1997). Os PAMPs são reconhecidos diretamente por receptores ou pelos produtos gerados pelos PAMPs como os PRRS (receptores de reconhecimento pattern) e *Tool-like* (TLRs), respectivamente. Esta ligação ativa uma resposta intracelular, desencadeando a resposta imune inata. (MEDZHITOV E JANEWAY, 1997). Estes receptores são encontrados em neutrófilos e macrófagos que após a ligação desencadeiam a eliminação do patógeno através da fagocitose. Estes receptores também podem ser encontrados em células dendríticas, que são responsáveis pela captura e apresentação de antígenos. Após a captura, moléculas de MHC são inseridas à superfície, estimulando linfócitos e células NK (CRUVINEL et al., 2010). Quando estas células se encontram na pele, são conhecidas como células de Langerhans (SHORTMAN et al., 2002).

Após uma agressão, aminas vasoativas são liberadas por mastócitos e monócitos, aumentando a permeabilidade do vaso, permitindo a passagem de proteínas e água, promovendo a marginalização de leucócitos. Macrófagos, residentes no tecido lesado, liberam IL-1 e TNF- α (FUJIWARA et al., 2005), promovendo a ativação do endotélio. O endotélio também pode ser ativado através de produtos do sistema complemento, histamina e leucotrieno B4 (MEDZHITOV E JANEWAY, 1997). Após esta ativação, moléculas de superfície são expressadas para favorecer a adesão de leucócitos (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e P-selectina) a receptores presentes na superfície dos leucócitos, principalmente os neutrófilos (BORREGAARD, 2010). Estas ligações se dissociam

rapidamente, permitindo que o neutrófilo role pelo endotélio e assim, sendo expostos aos fatores quimiotáticos (colágeno, mediadores de mastócitos, produtos do SC e quimiocinas) (CARLOS e HARLAN 1994). As quimiocinas alteram as integrinas na superfície dos leucócitos tornando a ligação mais forte e imobilizando o neutrófilo à parede do vaso. Este é direcionado ao local da inflamação por quimiocinas como IL-8 e migração destes para o tecido (BORREGAARD, 2010).

Os macrófagos são fagócitos responsáveis pela eliminação de patógenos e podem estar presentes no tecido ou no sangue (na forma de monócitos). A função do macrófago no processo inflamatório é ampla. Estes são responsáveis pela secreção de citocinas e mediadores inflamatórios, bem como a apresentação de antígenos aos linfócitos. Quando ativados pela IL-4 são responsáveis pelo reparo tecidual, além de mediar o restabelecimento do equilíbrio liberando IL-10 (citocina antiinflamatória). Na inflamação, os macrófagos apresentam antígenos aos linfócitos (T e B), liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiconas. Estes produzem espécies reativas do oxigênio como o NO. Apesar da iNOS ser ausente em macrófagos em repouso, esta é induzida quando os receptores TLRs são ativados pelas PAMPs na presença de INF- γ (CRUVINEL et al., 2010).

As células NK são responsáveis por lisar as células infectadas, bem como recrutar neutrófilos e macrófagos e ativar células dendríticas, linfócitos T e B. Estas células são ativadas pela IL-15 (produzida por macrófagos) e IL-12 (indutora da produção de INF- γ e ação citolítica). Após serem ativadas realizam a lise das células infectadas e secretam citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-2 e INF- γ) (CRUVINEL et al 2010; ABBAS e LICHTMAN, 2007).

Os mastócitos se distribuem junto aos vasos sanguíneos, nervos e sob o epitélio de pele e mucosas. Estímulos como produtos do sistema complemento, substâncias básicas, alguns venenos de animais e agentes físicos podem ativar os mastócitos pela ligação via IgE ou pela ligação com TLRs ou CD48, levando a liberação de mediadores pré-formados (proteases aminas vasoativas, IL-4, TNF- α e GM-CSF) e neoformados (PAF, metabólitos do ácido araquidônico e outras citocinas). Estes por sua vez, induzem a migração de neutrófilos e macrófagos, aumentam a permeabilidade do vaso, a secreção de muco, a motilidade gastrointestinal e broncoconstrição (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

1.3.1 Imunidade adaptativa

Após exposição a alguns agentes, o antígeno é apresentado e reconhecido pelos linfócitos, que ativam essas células e estimulam a diferenciação das mesmas (PARKIN E COHEN, 2001). É estimulada pela exposição a certos agentes, aumentando a capacidade de defesa a cada exposição sucessiva a um agente particular, sendo capaz de distinguir certas moléculas particulares, que após o contato, serão sempre “lembradas” (LAROSA E ORANGE, 2008). Este tipo de imunidade é compreendido por linfócitos T, células NK e linfócitos B, que irão originar anticorpos (LAROSA E ORANGE, 2008). São encontrados dois tipos de imunidade adaptativa: humoral e mediada por células (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

A imunidade adaptativa humoral é compreendida por anticorpos, secretados pelos linfócitos B, que reconhecem os antígenos e os neutraliza, impedindo que infectem outras células. Este tipo de imunidade serve contra patógenos extracelulares e toxinas. A eliminação dos patógenos pelos anticorpos é feita por diversos mecanismos. A imunidade adaptativa, mediada por células, é composta por linfócitos T, sendo utilizada contra patógenos intracelulares aos quais sobrevivem e se proliferam dentro dos fagócitos, não sendo alcançados pelos anticorpos (MESQUITA et al., 2010).

Segundo ABBAS E LICHTMAN (2007), os linfócitos são as únicas células com receptores específicos para os antígenos e são mediadores chave para a imunidade adaptativa.

Os linfócitos T normalmente são encontrados no timo e na medula óssea, na forma naive ou virgens, que após contato com agentes estranhos através das células apresentadoras de antígenos junto ao MHC, ativam linfócitos CD4+ ou CD8+, que através de seus receptores determinam o tipo da resposta (PARKIN E COHEN, 2001). Quando estes antígenos são complexados com moléculas do MHC I, ativa linfócitos CD8+ citotóxicos e quando complexados a moléculas do MHC II ativam linfócitos CD4+ helper (PARKIN E COHEN, 2001).

Os linfócitos T citotóxicos apresentam um receptor TCR e moléculas CD4 ou CD8. Os linfócitos T CD4 são responsáveis pela erradicação de patógenos, ativação de

linfócitos B e macrófagos e até mesmo, o linfócito T CD8. Já os linfócitos T CD8 estão envolvidos nas respostas antivirais e antitumoral (PARKIN; COHEN, 2001).

Os linfócitos efetores principais são os T helper CD4+ e o linfócito T citotóxico CD8+. Os linfócitos T *helper* ou linfócitos auxiliares (Th) quando ativados, secretam citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação de células T, além de ativar células B, macrófagos e outros leucócitos. Após a apresentação do antígeno pela APC, o linfócito Th0 pode se tornar Th1 ou Th2, dependendo do ambiente de citocinas ao seu redor (MESQUITA et al., 2010).

Os linfócitos Th1 produzem IL-2, induzindo a proliferação de linfócitos e o INF- γ , importante na ativação de macrófagos infectados com patógenos. Os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, o que favorece a produção de anticorpos (PARKIN; COHEN, 2001).

Após o reconhecimento deste antígeno por células apresentadoras de antígeno (células dendríticas e macrófagos), estas são levadas para os linfócitos T *helper* que ao reconhecê-los, via receptores, desencadeia a secreção de citocinas para a produção de linfócitos T, ativando macrófagos, neutrófilos e proliferação e diferenciação de células B e T. O antígeno pode ser reconhecido também pelos linfócitos B, que iniciam a produção de anticorpos, neutralizando o antígeno e ativando fagócitos e sistema complemento. As células infectadas pelos agentes podem ser destruídas pelos linfócitos T citotóxicos e NK, que através de receptores reconhecem a célula infectada e a elimina (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

Na membrana celular dos linfócitos T existem receptores que estão associados ao complexo CD3, responsável pela transmissão de sinais para dentro da célula após ligação do antígeno ao receptor do linfócito. Existem alguns coreceptores responsáveis pela transmissão de sinais intracelulares no caso do receptor já estar conectado a algum ligante. Existem diferentes receptores nos linfócitos, entre eles, receptores CD3 e CD28, que tem por função desencadear a transdução de sinais intracelulares, permitindo a liberação de citocinas, que irão induzir a proliferação de linfócitos T. Para a indução da proliferação destas células são utilizados anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, que se ligam a estes receptores induzindo a proliferação destas células (TRICKETT et al., 2003).

1.4. Matriz Extracelular (MEC) e Hemostasia

A matriz extracelular é formada por um gel de glicosaminoglicanas (ácido hialurônico e heparansulfato) e proteoglicanas, contendo glicoproteínas (laminina e fibronectina) e proteínas (colágeno e elastina) (RUOSIAHTI et al., 1985; BOSMAN et al., 2003). A matriz é secretada localmente e tem por função preencher o espaço intercelular, oferecendo suporte para os tecidos (TANZER, 2005). A composição da MEC varia de acordo com o tecido. No tecido epitelial, se apresenta na forma de lâmina, que juntamente com o colágeno tipo IV formam a lâmina basal, que juntamente com a camada de colágenos fibrilares, formam a membrana basal. O endotélio vascular também se encontra na forma de lâmina, porém uma outra glicoproteína pode ser encontrada, a fibronectina (**Figura 5 A e B**) (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2000).

O colágeno é composto por uma hélice tripla, com três cadeias de polipeptídeos α . Existem 27 tipos de colágeno, sendo que o I, II, III, V e XI são os colágenos presentes na matriz intersticial, entre os espaços das células epiteliais, endoteliais e dos músculos lisos no tecido conjuntivo. Estes tipos de colágenos formam fibras e estas fibras compõem os tendões. O colágeno tipo IV não forma fibras, sendo o principal componente da lâmina basal, em conjunto com a laminina, responsável pela força e elasticidade da membrana basal do tecido epitelial (BOSMAN et al., 2003; TANZER, 2005; VON DER MARCK et al., 1992).

Segundo Tanzer (2005) a fibronectina e a laminina são glicoproteínas imersas no gel de glicosaminoglicanas que possuem a função de aderir componentes da matriz às células. A laminina é uma glicoproteína heterodimérica com cadeias α , β e γ , promovendo a adesão de células mediada por receptores da classe das integrinas (DURBEEJ, 2010). A fibronectina é uma proteína de alto peso que se liga ao colágeno, fibrina, proteoglicanas e receptores de superfície celular, constituída de duas cadeias de glicoproteínas unidas por junção dissulfeto, sendo encontrada na forma tecidual e plasmática (VON DER MARCK et al., 1992). Na forma tecidual, a cicatrização de feridas é realizada pelos agregados fibrilares, enquanto que, na plasmática forma pontes de fibrina formando o coágulo provisional que atua como substrato para deposição da MEC. A fibronectina é essencial para a formação de vasos, podendo causar lesões letais quando na sua ausência em vasos sanguíneos (ASTROF E HYNES, 2009).

As integrinas são receptores que reconhecem a fibronectina e a laminina presentes na matriz extracelular dos tecidos, mediando a adesão das células à MEC ou em outras células (BOSMAN et al., 2003 ; VON DER MARCK et al., 1992).

A hemostasia é um processo regulado pela parede vascular, plaquetas e fatores de coagulação, mantendo o sangue em um estado líquido livre de coágulos e induzindo a formação de um tampão rápido que se localiza na lesão vascular (KAMIGUTTI, 2005).

Os vasos sanguíneos são formados por três camadas estruturais denominadas túnicas. Esta composição é variável de acordo com o tipo de vaso (**Tabela 1**), mas em sua maioria é composta por colágeno, elastina, fibronectina e fibrilina (BOU-GHARIOS, et al., 2004).

Tabela 1: Composição dos vasos sanguíneos.

Tipos de vasos	Composição da MEC
Artérias elásticas	Elastina, Fibronectina, fibrilina, fibulina, colágenos I, II, III, IV, V, VI e proteoglicanas.
Artérias musculares	Elastina, fibronectina, fibulina, colágeno tipo I, III, IV, V, VI e proteoglicanas.
Veias	Elastina, fibronectina Colágeno I, II, III, IV, VI, XII, XIV e proteoglicanas.
Arteriolas	Elastina, colágeno I, III e fibrilina.
Vênulas	Laninina, colágeno IV e fibronectina
Capilares	Colágeno IV, laminina, fibronectina e proteoglicana.

Fonte: BOU-GHARIOS et al. (2004)

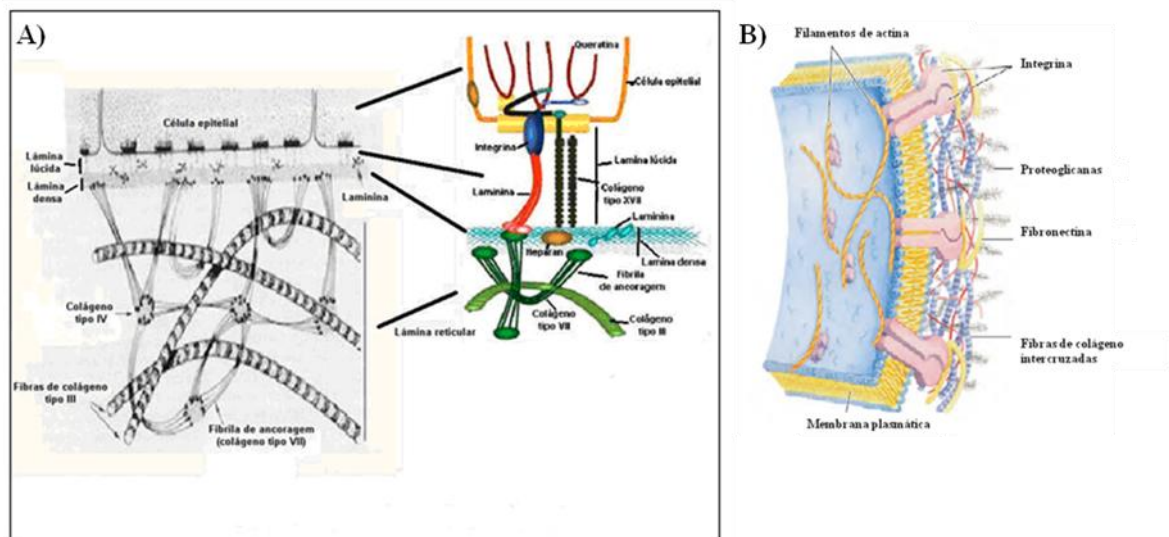


Figura 5: Principais constituintes da membrana basal. **A)** Tecido epitelial (www.unifesp.br/ensino/laringe/membrana.htm) **B)** Tecido não epitelial (COX E NELSON, 2002).

Todos os componentes dos vasos são responsáveis pela função e integridade do mesmo (BOU-GHARIOUS et al., 2004). Após uma lesão a matriz extracelular é exposta, induzindo a formação de trombos pela ligação entre o colágeno exposto e as plaquetas ao local lesado, que por sua vez irão liberar de seus grânulos secretórios, o ADP e o Tromboxano A_2 , que são potentes mediadores da agregação plaquetária, recrutando plaquetas adicionais para formar o tampão hemostático. A lesão expõe um fator pró-coagulante sintetizado pelo endotélio, que atua na cascata de coagulação ativando a trombina, que converte fibrinogênio em fibrina (**Figura 6**), sendo esta última depositada no local da lesão. A fibrina induz a agregação plaquetária e a liberação dos grânulos das plaquetas. Este conjunto formado por fibrina e plaquetas forma o tampão permanente, impedindo a hemorragia. Para limitar o crescimento deste tampão os mecanismos contra regulatórios são ativados (MITCHELL, 1999).

A trombose é o oposto patológico da hemostasia, que sofre três influências principais para a sua formação: **lesão endotelial**, expondo os componentes da matriz extracelular, **turbulência no fluxo sanguíneo** permitindo o contato das plaquetas com o endotélio e **hipercoagulabilidade** sanguínea, que podem ser genéticas ou adquiridas compreendidas por trauma, síntese aumentada de fatores de coagulação ou reduzida de

antitrombinas. Estes três fatores formam a **tríade de Virchow** (KUMAR, ABBAS E FAUSTO, 1999). O trombo pode ser propagado com acúmulo de plaquetas e fibrina; podendo deslocar-se para outros locais, processo conhecido como embolização; induzir a inflamação e fibrose incorporando-se na parede vascular e dissolvido pela atividade fibrinolítica (MITCHELL, 1999).

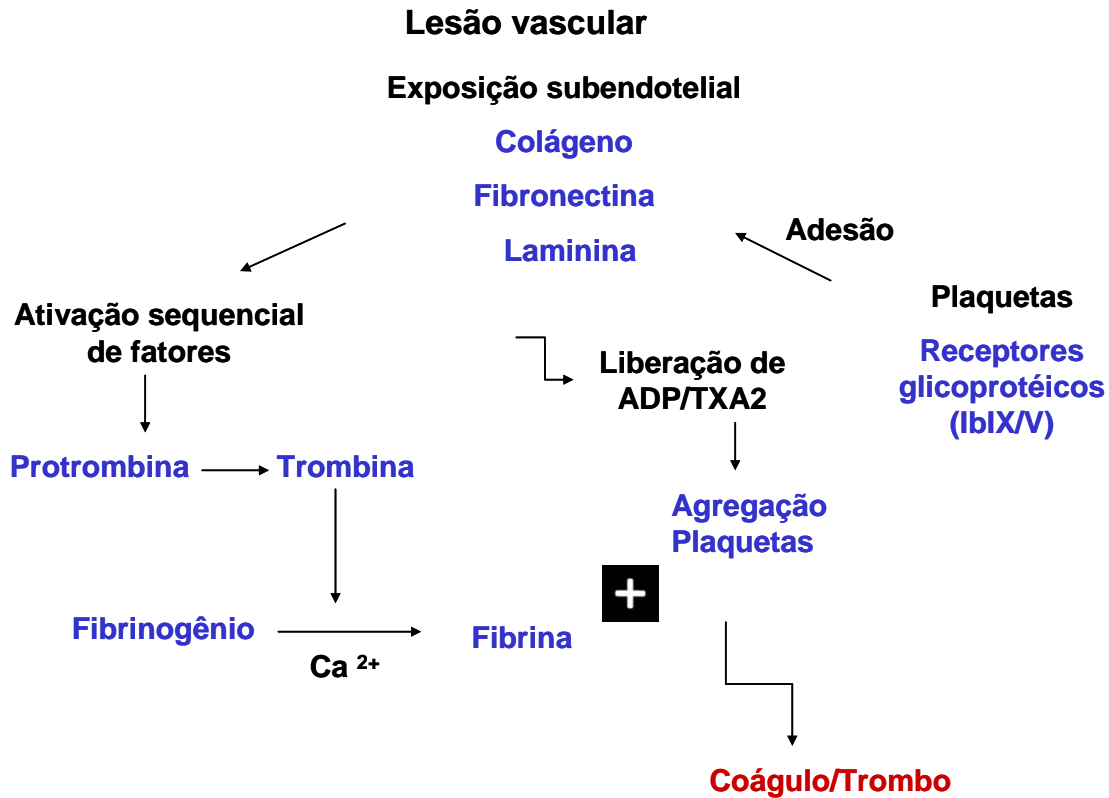


Figura 6: Formação do coágulo

Devido às suas alterações hemostáticas predominantes, as SVMPS têm sido amplamente estudadas (RODRIGUES et al., 2004; GUTIÉRREZ E RUCAVADO, 2000; JIA et al., 2009) e seu potencial terapêutico como agente trombolítico, apoptótico e para uso em diagnósticos tem sido discutido atualmente (TOOMBS, 2001 e SWENSON, 2004), sendo necessário investigar as atividades inerentes às SVMPS.

CONCLUSÃO

6.0. CONCLUSÃO

A Batroxase é uma metaloprotease de classe PI, com 27 kDa, com atividade hemorrágica e DHM de 10 μ g.

Sua ação sobre componentes da cascata de coagulação como o fibrinogênio e a fibrina, impossibilita a formação de coágulos, dissolve trombos e facilita o aparecimento de hemorragias.

A falta de capacidade em coagular o plasma pode ser proveniente da degradação do fibrinogênio e da fibrina.

A incapacidade de inibir/induzir a atividade das plaquetas colabora para a dissolução dos trombos e para o aparecimento de processos hemorrágicos, respectivamente.

A ação sobre componentes de matriz extracelular, principalmente de vasos sanguíneos, como o colágeno tipo IV e a fibronectina, colaboram para o extravasamento de sangue dos vasos.

A Batroxase apresenta baixa ou ausência de atividade citotóxica sobre as linhagens tumorais testadas, com análise significativa apenas para JURKAT, B16-F10, SK-BR3 em altas concentrações. Estudos em células de origem hematopoiéticas “células do sistema imunológico” como EL-4 e PBMC sugerem fortemente que a Batroxase apresenta atividade imunorregulatória, induzindo proliferação celular em baixas concentrações ou inibi-las causando citotoxicidade em concentrações mais altas como verificado em células JURKAT, A-20 e PBMC.

A Batroxase nas concentrações de, 10 ou 100 μ g/mL, é capaz de induzir significativa atividade proliferativa sobre as células presentes no baço de camundongos e é capaz de estimular a produção de citocinas próinflamatórias e antiinflamatórias de maneira distinta, e induzem preferencialmente a produção de citocinas do padrão Th1 como IFN- γ . Após adição de estímulo policlonal anti-CD3, a Batroxase apresentou atividade supressora na capacidade proliferativa de células T, e é capaz de inibir significativamente a habilidade das células T para produção de citocinas do padrão Th1 como a IL-2 e IFN- γ , citocinas do padrão Th2 como a IL-4 e citocinas do padrão Th17 como a IL-17A, o que sugere que a Batroxase potencialmente seria capaz de inibir

respostas imunes aberrantes do padrão Th1 (doenças autoimunes), do padrão Th2 (reações alérgicas), bem como do padrão Th17 (doenças inflamatórias crônicas).

A Batroxase é capaz de induzir a migração de neutrófilos de forma dose e tempo-dependente principalmente, nas 6 primeiras horas após a injeção, com aumento da migração de células mononucleares em 24, 48 e 72 horas. Indicando ser uma proteína pró-inflamatória.

A Batroxase é capaz de induzir a formação do edema dose e tempo-dependente de início rápido. Este evento é mediado por leucotrienos, serotonina via ativação dos receptores 5-HT₁ e histamina via ativação de receptores H₁, sugerindo a degranulação de mastócitos e um possível envolvimento de citocinas. Sendo assim, a formação do edema pela Batroxase envolve principalmente, mediadores que aumentam a permeabilidade vascular.

É capaz de induzir a hiperalgesia dose e tempo-dependente, com pico máximo em 1 hora, com participação de histamina e leucotrienos, com uma possível participação de citocinas nesta resposta.

Portanto a Batroxase é uma molécula promissora para o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação em patologias com distúrbios da coagulação sanguínea.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLCI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6ª Ed. Elsevier. 2007.

ALAM, R.; GORSKA, M. 3.Lymphocytes. **J Allergy Clin Immunol**. v.111 (2), p.S476-S485, 2003.

ARAÚJO, S.D.; DE SOUZA, A.; NUNES, F.P.; GONÇALVES, L.R. Effect of dexamethasone associated with serum therapy on treatment of *Bothrops jararaca* venom-induced paw edema in mice. **Inflamm Res**. v.56, p.409-413, 2007.

ASTROF, S.; HYNES, R.O. Fibronectins in vascular morphogenesis. **Angiogenesis**. v. 12, p. 165-175, 2009.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I. R.; BATISTA, I. F.; 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-DASILVA, 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.; DO 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.

BARNES, P.J. Nuclear factor-kappa B. **Int J Biochem Cell Biol**. v. 29, p. 867-870, 1997.

BARRAVIERA, B. **Venenos Animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUB, cap.6, 9,14 e 19, p.81-90, 109-134, 205-224, 267-280, 1994.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, p. 267-284, 2009.

BECK, P.W.; HANDWERKER, H.O. Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibers. **Pflugers Arch**. v. 347, p. 209-222, 1974.

BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**. v. 88, p. 189-200, 2006.

BERGER, M.; PINTO, A.F.; GUIMARÃES, J.A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. v. 51, p. 488-501, 2008.

BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; COSTA, T.R.; GOMES, M.S.; TORRES, F.S.; COSTA, J.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; DOS SANTOS, D.M.; DE CASTRO PIMENTA, A.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; DE 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 Ther**. v. 62, p. 325-372, 1994.

BONAVITA, A.G.; DA COSTA, A.S.; PIRES, A.L.; NEVES-FERREIRA, A.G.; PERALES, J.; CORDEIRO, R.S.; MARTINS, M.A.; SILVA, P.M. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**. v. 47(8), p.885-893, 2006.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**. v. 31, 1137-1150, 1993.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**. v. 33, p. 657-670, 2010.

BOSMAN, F.T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **J Pathol**. v. 200, p. 423-428, 2003.

BOU-GHARIOS, G.; PONTICOS, M.; RAJKUMAR, V.; ABRAHAM D. Extra-cellular matrix in vascular networks. **Cell Prolif**. v. 37, p. 207-220, 2004.

BOUKHALFA-ABIB, H.; MEKSEM, A.; LARABA-DJEBARI, F. Purification and biochemical characterization of a novel hemorrhagic metalloproteinase from horned viper (*Cerastes cerastes*) venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 150, p. 285-290, 2009.

BRENES, O.; MUÑOZ, E.; ROLDÁN-RODRÍGUEZ, R.; DÍAZ, C.; Cell death induced by *Bothrops asper* snake venom metalloproteinase on endothelial and other cell lines. **Exp Mol Pathol**. v. 88 (3), p. 424-432, 2010.

CALIXTO, M.C.; TRICHÊS, K.M.; CALIXTO, J.B. Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis mellifera* bee. **Inflamm Res**. v. 52, p. 132-139, 2003.

CALVETTE, J. J.; SCHAFER, W.; SOSKA, T.; LU, W. Q.; COOK, J. J.; JAMESON, B. A.; NIEWIAROWSKI, S. Identification of the disulfide bond pattern in albolabrin, an RGD-containing peptide from the venom of *Trimeresurus albolabris*: significance for the expression of platelet aggregation inhibitory activity. **Biochemistry**. v. 30, p. 5225-5229, 1991.

CANNON, K.E.; LEURS, R.; HOUGH, L.B. Activation of peripheral and spinal histamine H₃ receptors inhibits formalin-induced inflammation and nociception, respectively. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 88, p. 122-129, 2007.

CARLOS, T.M.; HARLAN, J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood.** v. 84 (7), p.2068-2101, 1994.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from Reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences.** V. 61, p. 843-856, 2004.

CEVIKBAS, F.; STEINHOFF, N.; IKOMA, A. Role of Spinal Neurotransmitter Receptors in Itch: New Insights into Therapies and Drug Development. **CNS Neurosci Ther.** 2010.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; GUERRA, J.L.; TEIXEIRA, C.F.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. **Toxicon.** v. 41(6), p.667-678, 2003.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon.** v. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C.F.; GUTIÉRREZ, J.M. Role of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon.** v. 45, p. 171-178, 2005.

CHEN, H. S.; TSAI, H. Y.; WANG, Y. M.; TSAI, I. H. P-III hemorrhagic metalloproteinases from Russell's viper venom: cloning, characterization, phylogenetic and functional site analyses. **Biochimie.** v. 90, p. 1846-1498, 2008.

CHEN, J. Spinal processing of bee venom-induced pain and hyperalgesia. **Acta Physiologica Sinica**. v. 60, p. 645-652, 2008.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C.J. Pain: molecular mechanisms. **The Journal of Pain**. v 1, Suppl 1, p. 35-44, 2000.

COX, M.M.; NELSON, D.L. Leningher-Princípios de Bioquímica. 3ª edição. Sarvier, São Paulo, 2002.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA, D. Jr.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**. v. 50 (4), p. 434- 461, 2010.

CUNHA, J.M.; SACHS, D.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. CUNHA, F.Q. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 139, p. 1135–1145, 2003.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. Jr.; VIVANCOS, G.G.; MOREIRA, I.F.; REIS, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res**. v.37, p. 401-407, 2004.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.Jr.; VALÉRIO, D.A.; GUERRERO, A.T.; NOGUEIRA, L.G.; VIEIRA, S.M.; SOUZA, D.G.; TEIXEIRA, M.M.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. **European Journal of Pain**. v. 12, p. 1059-1068, 2008.

DALE, C.S.; GONÇALVES, L.R.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; DA SILVA, A.M.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. **Peptides**. v. 25, p. 81-89, 2004.

DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. **Nature**. v. 379, p. 537-540, 1996.

DE FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; DE ARAÚJO, A.L. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon**. v. 39, p.825-830, 2001.

DOUBIN, A.E.; PAPAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, p. 3760-3772, 2010.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Jour of Anaesthesia**. v. 75, p. 125-131, 1995.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**. v. 16, p. 99-104, 1993.

DU, X. Y.; SIM, D. S.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells Mol Dis**. v. 36, p. 414-421, 2006.

DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**. v. 40, p.659-665, 2002.

DURBEEJ, M. Laminins. **Cell Tissue Res**. v. 339, p. 259-268, 2010.

EDGAR, W.; PRENTICE, C.R.M.. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.** p 85 - 95, 1973.

FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; CORREA, A.P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D.V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm.** v. 9, p. 213-221, 2000.

FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C DE F. 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.

FERREIRA, S.H. Inflammation, prostaglandins and aspirin-like drugs. **Trans Med Soc Lond.** v.89, p. 20-31, 1973.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. III - Prostaglandin hyperalgesia: relevance of the peripheral effect for the analgesic action of opioid-antagonists. **Prostaglandins.** v. 18, p. 201-208, 1979.

FERREIRA, J., CAMPOS, M. M.; ARAÚJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J. B.; CALIXTO, J. B. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology.** v.43, p.1188-1197, 2002.

FERREIRA, P. K.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B1 agonist des-Arg⁹-BK in rats pre-treated with LPS. **Regulatory Peptides.** v. 89, p. 29-35, 2000.

FERREIRA, S.H.; FERRARI, L.F.; CUNHA, T.M.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; VERRI, V.A.; CUNHA, F.Q. Apostila Dor Inflamatória. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-FMRP-USP. p. 9-11. 2010.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents Actions**. v. 38, p. C7-9, 1993.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br.J.Pharmacol.** v.110, p. 1227-1231, 1993.

FERREIRA, T.; CAMARGO, E. A.; RIBELA, M. T.; DAMICO, D. C.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; LANDUCCI, E.C. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. **Toxicon**. v. 53, p. 69-77, 2009.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**. v.31, p. 1551-1559, 1993.

FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods Enzymol.** v. 248, p. 368-387, 1995.

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

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

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J Proteomics**. v. 72, p. 200-209, 2009.

FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**. v. 38, p. 63-77, 2000.

FUJIMURA, Y.; KAWASAKI, T.; TITANI, K. Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. **Thromb Haemost**. v. 76, p. 633-639, 1996.

GALVÃO NASCIMENTO, N.; SAMPAIO, M. C.; AMARAL OLIVO, R.; 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, 2009.

GARCIA, L.T.; PARREIRAS E SILVA, L.T.; RAMOS, O.H.; CARMONA, A.K.; BERSANETTI, P.A.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 138, p. 23-32, 2004.

GARTNER, R.; GRIFFE, O.; CAPTIER, G.; SELLOUMI, D.; OTMAN, S.; BRABET, M.; BARO, B. Acute respiratory insufficiency in burn patients from smoke inhalation. **Pathol Biol (Paris)**. v. 50, p. 118-126, 2002.

GAY, C.C.; LEIVA, L.C.; MARUÑAK, S.; 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.

GREMSKI, L.H.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SADE, Y.B.; OTUKI, M.F.; RICHARDSON, M.; GREMSKI, W.; SANCHEZ, E.F.; VEIGA, S.S. Cytotoxic,

thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**. v. 50, p. 120-134, 2007.

GUIMARÃES, A.Q.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FERREIRA, D.E.; ARAÚJO, P.M.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological and histopathological characterization of *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom-induced edema. **Inflamm Res**. v. 53, p. 284-291, 2004.

GUO, X. X.; ZENG, L.; LEE, W. H.; ZHANG, Y.; JIN, Y. Isolation and cloning of a metalloproteinase from king cobra snake venom. **Toxicon**. v. 49, p. 354-365, 2007

GUPTA, R.M.; BHIDE, M. B. Role of 5-HT in acute inflammation and anaphylaxis. **Indian J. Med. Res**. v. 69, p. 657-658, 1979.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: 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.; ROMERO, M.; NÚÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp Mol Pathol**. v. 62, p. 28-41, 1995.

GUZZO, M.L.; FARSKY, S.H.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E.; SILVA, M.A.; MELLO, S.B. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**. v. 38, p. 1535-1546, 2000.

HAMZA, L.; GARGIOLI, C.; CASTELLI, S.; RUFINI, S.; LARABA-DJEBARI F. Purification and characterization of a fibrinogenolytic and hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Vipera lebetina* venom. **Biochimie**. 2010.

HAN, Y. P.; LU, X. Y.; WANG, X. F.; XU, J. Isolation and characterization of a novel P-II class snake venom metalloproteinase from *Trimeresurus stejnegeri*. **Toxicon**. v. 49, p. 889-898, 2007.

HARJANTO, D.; ZAMAN, M. H. Matrix mechanics and receptor-ligand interactions in cell adhesion. **Org Biomol Chem**. v. 8, p. 299-304, 2010.

HARVEY, A. Snake Toxins, 3a ed, **Pergamon press**, 1984.

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.

HOFSTRA, C.L.; DEASI, 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.

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal Biochem**. v. 9, p. 401-410, 1964.

JAZAYERI, A.; MEYER, W.J.; KENT, T.A. 5-HT_{1B} and 5-HT₂ serotonin binding sites in cultures Wistar-Kyoto aortic smooth muscle cells. **Eur. J. Pharmacol**. v. 169, p. 183-187, 1989.

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.

JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon.** v. 34, p. 1269-1276, 1996.

JIA, Y.; LUCENA, S.; CANTU, E. Jr.; SANCHEZ, E. E.; PÉREZ, J. C. cDNA cloning, expression and fibrin(ogen)olytic activity of two low-molecular weight snake venom metalloproteinases. **Toxicon.** v. 54, p. 233-243, 2009.

JUNQUEIRA, L.C. E CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7ª edição, Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2000.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I de L.; HO, P.L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene.** v. 299, p. 279-291, 2002.

KAMIGUTTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon.** v. 45, p. 1041-1049, 2005.

KAMIGUTTI, A. S.; HAY, C.R.; THEAKSTON, R.D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon.** V. 34, p. 627-642, 1996.

KAMIGUTTI, A.S.; HAY, C.R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem J.** v. 320, p. 635-641, 1996.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from *Naja nigricollis* venom is independent of fibrinogen degradation. **Biochim Biophys Acta**. v.1095, p. 117-121, 1991.

KOSTIZA, T.; MEIER, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**. v. 34, p. 787-806, 1996.

KUBES, P. Nitric oxide affects microvascular permeability in the intact and inflamed vasculature. **Microcirculation**. v. 2, p. 235-244, 1995.

KUHR, F.; LOWRY, J.; ZHANG, Y.; BROVKOVYCH, V.; SKIDGEL, R.A. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. **Neuropeptides**. v. 44, p. 145-154, 2010.

KUMAR, M.S.; DEVARAJ, V.R.; VISHWANATH, B.S.; KEMPARAJU, K. Anti-coagulant activity of a metalloprotease: further characterization from the Indian cobra (*Naja naja*) venom. **J Thromb Thrombolysis**. v. 29, p. 340-348, 2010.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A. K. Bases Patológicas das Doenças Robbins & Cotran. 7ª Ed., Elsevier, 1999.

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

LAROSA, D.F.; ORANGE, J.S. 1.Lymphocytes. **J Allergy Clin Immunol**. v.121 (2), p. S364-S369, 2007.

LEITÃO, D. P.; POLIZELLO, A. C.; ROTHSCHILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a close relative of the guinea-pig (*Cavia porcellus*) **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v. 125, p. 113-120, 2000.

LEWIS, R.A.; AUSTEN, K. F.; SOBERMAN, R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **N Engl J Med.** v. 323, p. 645-655, 1990.

LIMA, A.C.; CAMPOS, C. E.; RIBEIRO, J. R. Epidemiological profile of snake poisoning accidents in the State of Amapá. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 42, p. 329-335, 2009.

LIMA, C.; CLISSA, P.B.; PIRAN-SOARES, A.A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response induced of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon.** v.50, p. 270-277, 2007.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet.** v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOPES, D. S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C de F, DE ALCÂNTARA, T. M.; OLIVEIRA, J. D.; GOULART, L. R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon.** v. 54, p. 42-49, 2009.

LORÍA, G. D.; RUCAVADO, A.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. FOX, J. W.; ALAPE, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of 'basparin A,' a prothrombin-activating metalloproteinase, from the venom of the snake *Bothrops asper* that inhibits

platelet aggregation and induces defibrination and thrombosis. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 418, p. 13-24, 2003.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **J Thromb Haemost.** v. 3, p. 1791-1799, 2005.

MA, B.; ZHANG, Y.; WU, D.; JIA, J.; XU, W.; LUO, Y. Affinity-purification of fibrinogenase with high proteolytic activity from *Agkistrodon halys* (Chinese) Venom. **Arch Pharm Res.** v. 31, p. 1129-1136, 2008.

MACKESSY, S. P. Handbook of venoms and toxins of reptiles, 1a ed, CRC Press., 2009.

MANDELBAUM, F. R.; REICHEL, A. P.; ASSAKURA, M. T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon.** V.20 , p.955-972, 1982.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; MAZZI, M.V.; OLIVEIRA, C.Z.; IZIDORO, L.F.; FULY, A.L.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.; FONTES, M.R.; 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.

MARSH, N.A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism--a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. **Blood Coagul Fibrinolysis.** v. 5, p. 399-410, 1994.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta.** v. 1477, p. 146-156, 2000.

MAZZI, M.V.; MAGRO, A.J.; AMUI, S.F.; OLIVEIRA, C.Z.; TICLI, F.K.; STÁBELI, R.G.; FULY, A.L.; ROSA, J.C.; BRAZ, A.S.; FONTES, M.R.; SAMPAIO, S.V.;

SOARES, A.M. Molecular characterization and phylogenetic analysis of BjuMP-I: a RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J Mol Graph Model**. v. 26, p. 69-85, 2006.

MEBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nature**. v. 5, p. 606-616, 2005.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: impact of the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p. 4-9, 1997.

MESQUITA, D. Jr.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; CRUVINEL, W.M.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N.P. Sistema Imunitário – Parte II: Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev Bras Reumatol**. v.50 (5), p. 552-580, 2010.

MILAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology** . v. 57, p. 1 -164, 1999.

MITCHELL, R N em KUMAR, ABBAS E FAUSTO. Bases Patológicas das Doenças Robbins & Cotran Patologia, 7ª edição, editora Elsevier, 1999.

MOLLAY, C.; WECHSELBERGER, C.; MIGNONGNA, G.; NEGRI, L.; MELCHIORRI, P.; BARRA, D.; KREIL, G. Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. **Eur J Pharmacol**. v.374, p. 189-96, 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur J Clin Invest**. v. 21, p. 361-374, 1991.

MOSESSON, M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J Thromb Haemost.** v. 3, p. 1894-4904, 2005.

MUNDER, M.; CHOI, B.S.; ROGERS, M.; KROPP, P. L-arginine deprivation impairs Leishmania major-specific T-cell responses. **Eur J Immunol.** v. 39, p. 2161-2179, 2009.

MUNIZ, J. R.; AMBROSIO, A. L.; SELISTRE, H. S. A.; COMINETTI, M. R.; MOURA DA SILVA, A.M.; OLIVA, G.; GARRAT, R.C.; SOUZA, D.H. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. **Toxicon.** v.52, p. 807-816, 2008.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). **Arch Biochem Biophys.** v.231, p. 309-319, 1984.

O'REILLY, M.; ALPERT, R.; JENKINSON, S.; GLADUE, R.P.; FOO, S.; TRIM, S.; PETER, B.; TREVENTHICK, M.; FIDOCK, M. Identification of histamine H4 receptor on human eosinophils-role in eosinophil chemotaxis. **J.Recept.SignalTransduct.** v. 22, p.431-44, 2002.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Fundamentos de Toxicologia. São Paulo, 3ª Ed., Atheneu, 2008.

OLIVO, R.DO A.; TEIXEIRA, C.F.; WALLACE, J.L.; GUTIERREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. **Toxicon.** v. 49, p. 670-677, 2007.

PAINE MJ, DESMOND HP, THEAKSTON RD, CRAMPTON JM. 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.

PAREJA-SANTOS, A.; SARAIVA, T.C.; COSTA, E.P.; SANTOS, M.F.; ZORN, T.T.; SOUZA, V.M.A.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. **Int. J. Exp. Path.** v. 90, p. 34-43, 2009.

PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet.** v.357, p. 1777-1789, 2001.

PEICHOTO, M. E.; TEIBLER, P.; MACKESSEY, S. P.; LEIVA, L.; ACOSTA, O.; GONÇALVES, L. R.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; SANTORO, M. L. Purification and characterization of patagonfibrase, a metalloproteinase showing alpha-fibrinogenolytic and hemorrhagic activities, from *Philodryas patagoniensis* snake venom. **Biochim Biophys Acta.** v. 1770, p. 810-819, 2007.

PERALES, J.; AMORIM, C.Z.; ROCHA, S.L.; DOMONT, G.B.; MOUSSATCHÉ, H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antithropic fraction isolated from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Agents Actions.** v. 37, p. 250-259, 1992.

PESSINI, A. C.; KANASHIRO, A.; MALVAR, D do C.; MACHADO, R. R.; SOARES, D. M.; FIGUEIREDO, M. J.; KALAPOTHAKIS, E.; SOUZA, G. E. Inflammatory mediators involved in the nociceptive and oedematogenic responses induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom injected into rat paws. **Toxicon.** v. 52, p. 729-736, 2008.

PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T.G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. **FEBS LETT.** v. 487, p. 323-326, 2001.

PINHEIRO, R.M.; CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflamm Res.** v. 51, p. 603-610, 2002.

PORTO, B.N.; TELLI, C.A.; DUTRA, T.P.; ALVES, L.S.; BOZZA, M.T.; FIN, C.A.; THIESEN, F.V.; RENNER, M.F. Biochemical and biological characterization of the venoms

RANG, H.P.; DALE, M.M. Farmacologia. 4a edição, Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2001.

RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **Br Med Bull.** v.47, p. 534-548.

REGOLI, D. BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacol.** v. 32, p. 1-46, 1980.

RIBEIRO, L. A.; ALBUQUERQUE, M. J. DE CAMPOS, V. A.; KATZ, G.; TAKAYOKA, N. Y.; LEBRÃO, M. L.; JORGE, M. T. Deaths caused by venomous snakes in the State of São Paulo: evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. **Rev Assoc Med Bras.** v. 44, p. 312-318, 1998.

ROCHA E SILVA M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions.** v.8, p. 45-49, 1978.

ROCHA, P.N.; PLUMB, T.J.; COFFMAN, T.M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. **Springer Semin Immunopathol.** v. 25, p. 215-217, 2003.

ROCHA, P.N.; PLUMB, T. P.; COFFMAN, T. M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation. **Springer Seminars in Immunopathology.** v. 25, p. 215-227, 2003.

ROCHA, T.; BARROS, L.L.S.; FONTANA, K.; SOUZA, B.M.; PALMA, M.S.; CRUZ-HOFLING, M.A. Inflammation and apoptosis induced by mastoparan Polybia-MPII on skeletal muscle. **Toxicon.** v. 55, p. 1213-1221, 2010.

RODRIGUES, F. G.; PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M. M.; LEMOS, L.; DA SILVA, W.D.; KIPNIS, T. L. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. **Mol Immunol.** v. 40, p. 1149-1156, 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.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.; 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.

ROSENFELD, G.; KALEN, E.M. Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application. **Rev Paul Med.** V. 77, p. 149-150, 1971.

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Int J Exp Pathol.** v. 79, p. 245-254, 1998.

RUOSIAHTI, E.; HAYMAN, E.G.; PIERSCHBACHER, M.D. Extracellular matrices and cell adhesion. **Arteriosclerosis.** v. 5, p. 581-594, 1985.

SANCHEZ, E. F.; SCHNEIDER, F. S.; YARLENQUE, A.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G.; EVANGELISTA, K. S.; EBLE, J. A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. **Arch Biochem Biophys.** v. 496, p. 9-20, 2010.

SCHROR, K. Role of prostaglandins in the cardiovascular effects of bradykinin and angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. suppl 9, p. S68-73, 1992.

SELISTRE, H.S.; GIGLIO, J.R.; HAMSI-BRANDEBURGO, M.I. Atividade anticoagulante de toxinas de venenos de *Bothrops insularis* e *B. jararacussu*. **M. Inst. Butantan** v. 52, p.73-74, 1990.

SERRANO, S.M.; SHANNON, J.D.; WANG, D.; CAMARGO, A.C.; FOX, J.W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics.** v. 5, p. 501-510, 2005.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Rev Immunol.** v. 2 (3), p. 151-161, 2002.

SIIGUR, J.; AASPÖLLU, A.; TÕNISMÄGI, K.; TRUMMAL, K.; SAMEL, M.; VIJA, H.; SUBBI, J.; SIIGUR, E. Proteases from *Vipera lebetina* venom affecting coagulation and fibrinolysis. **Haemostasis**. v. 31, p. 123-132, 2001.

SILVA, M.B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem J**. v. 369, p. 129-139, 2003.

SILVA, M.B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C.R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.; POZNER, R.G.; VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem J**. v. 369, p. 129-139, 2003.

SILVAN, G.; VENKETASVARAN, K.; RADHAKRISHNAM, C.K. Characterization of biological activity of *Scatophagus argus* venom. **Toxicon**. v. 56, p. 914-925, 2010.

SOARES DE MOURA, R.; AGUIAR, A.S.; MELGAREJO, A.R.; DE CARVALHO, L.C. Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**. v. 36, p. 771-780, 1998.

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

SUFKA, K. J.; FRITZ, M. S.; GIORDANO, J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v. 41, p. 53-56, 1991.

SWENSON, S.; TOOMBS, C. F.; PENA, L.; JOHANSSON, J.; MARKLAND, F. S. Jr. Alpha-fibrinogenases. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**. v. 4, p. 417-435, 2004 Dec;4(4):417-35.

TANZER, M.L. Current concepts of extracellular matrix. **Jornal of orthopaedic science**. v. 11, p. 326-331, 2005.

TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; MIYATA, T.; KAWADA, S.; SAISAKA, Y.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. **J Biol Chem**. v. 267, p. 14109-14117, 1992.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by Bothrops asper venom. **Toxicon**. v.154, p. 988-997, 2009.

TEIXEIRA, C.F.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Hyperalgesia induced by Bothrops jararaca venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**. v. 32, p. 419-426, 1994.

TEIXEIRA, C.F.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.100 Suppl 1:181-184, 2005.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B₂ receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B₁ receptor-mediated nociceptin. **European Journal of Pharmacology**. v. 326, p. 61-65, 1997.

TOOMBS, C.F. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. **Haemostasis**. v. 31, p. 141-147, 2001.

TRACY, R.P. The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor . . . and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). **Journal of Gerontology: Medical sciences**. v. 61A (10), p. 1051-1052, 2006.

TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by Bothrops jararaca venom. **Agents Actions**. v. 26, p. 292-300, 1989.

TRICKETT, A.; KWAN, Y.L. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. **J Immunol Methods**. v. 275, p.251-255, 2003.

VERRI, W.A. Jr.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development?. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 112, p. 116-138, 2006.

VON DER MARK, K.; VON DER MARK, H., GOODMAN, S. Cellular responses to extracellular matrix. **Kidney Int**. v. 41, p. 632-640, 1992.

WANG, W. J.; SHIH, C. H.; HUANG, T.F. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 324, p. 224-230, 2004.

WANG, W.J. Purification and functional characterization of AAV1, a novel P-III metalloproteinase, from *Formosan Agkistrodon acutus* venom. **Biochimie**. v. 89, p. 105-115, 2007.

WEI, J.F.; WEI, X.L.; CHEN, Q.Y.; HE, S.H. Induction of inflammatory cell accumulation by TM-N49 and promutoxin, two novel phospholipase A2. **Toxicon**. v. 56, p. 580-588, 2010.

ZHU, Z. G.; WU, S. G. Fibrinogenolytic properties of natrahagin (a proteinase from cobra venom) and its effect on human platelet aggregation. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**. v. 20, p. 944-947, 1999.

WOOLF, C.J. Pain. **Neurobiology of Disease**. v. 7, p. 504–510, 2000.

ZYCHAR, B.C.; DALE, C.S.; DEMARCHI, D.S.; GONÇALVES, L.R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by Bothrops jararaca crude venom in mice. **Toxicon**. v. 55, p. 227-234, 2010.