KAREN DE MORAIS ZANI

Estudo da atividade anti-inflamatória da antitrombina nativa da serpente

***Bothrops jararaca*. Clonagem da antitrombina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2013

KAREN DE MORAIS ZANI

Estudo da atividade anti-inflamatória da antitrombina nativa da serpente

***Bothrops jararaca*. Clonagem de antitrombina**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador(a): Dra. Anita Mitico Tanaka-Azevedo

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Zani, Karen de Moraes.

Estudo da atividade anti-inflamatória da antitrombina nativa da serpente *Bothrops jararaca*: clonagem da antitrombina / Karen de Moraes Zani. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Avaliação da atividade anti-inflamatória da antitrombina da serpente *B. jararaca*.

Versão do título para o inglês: Study of anti-inflammatory activity of *Bothrops jararaca* native antithrombin: antithrombin cloning.

1. Antitrombina 2. *Bothrops jararaca* 3. Atividade anti-inflamatória
4. Análise proteômica 5. Clonagem I. Azevedo, Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB061/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karen de Moraes Zani.

Título da Tese: Estudo da atividade anti-inflamatória da antitrombina nativa da serpente *Bothrops jararaca*: clonagem da antitrombina.

Orientador(a): Profa. Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da atividade antiinflamatória da antitrombina nativa da serpente *B. jararaca*. Clonagem e expressão da antitrombina", protocolo nº 578/09, sob a responsabilidade de Anita Mítico Tanaka Azevedo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 11/02/2009.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
06/2009 – 05/2012	15/ serpentes <i>B. jararaca</i>
Laboratório de Fisiopatologia	708 camundongos Swiss (machos)

São Paulo, 11 de Fevereiro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Ao meu marido Guilherme e aos meus pais,
Fábio e Déa, pelo incentivo e pelo apoio
constante.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Anita Mitico Tanaka-Azevedo, pelos nove anos de orientação, dedicação, incentivo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, Benedito Moura, Caroline Serino Silva, Cintia Yumi Fugiwara, Daniela Miki Hatakeyama, Iasmim Baptista de Farias, Jacilene Barbosa da Silva, Juliana Feitosa e Renato Moterani, pela ajuda constante. De maneira especial à Iasmim, pelas sugestões e pela ajuda na elaboração das figuras.

À Dra. Aparecida Sadae Tanaka, pela co-orientação, e ao seu grupo, especialmente à Cícera Maria Gomes, da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração nos experimentos de Biologia Molecular.

À Dra. Kathleen Fernandes Grego, Diretora do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por permitir a realização deste trabalho e pela sangria e coleta do fígado das serpentes.

À Dra. Mônica Lopes-Ferreira e ao Dr. Márcio José Ferreira, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, pela colaboração nos experimentos de microcirculação.

Ao Dr. Ricardo José Soares Torquato, da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração nos experimentos de ressonância plasmônica de superfície e na modelagem molecular.

À Dra. Caroline Tokarski, da Université de Lille 1 (Lille, França), pela colaboração nos experimentos de espectrometria de massas e por me receber em seu laboratório.

À Dra. Fernanda Peixoto Barbosa Nunes, pelo auxílio nos ensaios biológicos.

Ao grupo da Profa. Dra. Helena Bonciane Nader, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo, por ceder a heparina biotinilada utilizada nos experimentos de ressonância plasmônica de superfície.

À Dra. Elisabeth Cheng, Dra. Maria de Fátima Magalhães Lázari e Dra. Nancy Oguiura, pela participação no meu exame de qualificação e pelas valiosas sugestões.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) (CNPEM-ABTLuS) (Campinas, Brasil) pelo suporte nas análises de espectrometria de massas.

A todos do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pelo companheirismo e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

MORAIS-ZANI, K. **Estudo da atividade anti-inflamatória da antitrombina nativa da serpente *Bothrops jararaca*. Clonagem da antitrombina.** 2013. 134 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O mecanismo pelo qual a antitrombina exerce seu efeito anticoagulante é bastante estudado. Os mecanismos de sua atividade anti-inflamatória são, no entanto, menos caracterizados. Considerando-se a importância do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da sepse, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da atividade anti-inflamatória da antitrombina da serpente *B. jararaca*. A antitrombina de *B. jararaca* foi isolada por meio de cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) e a identidade da molécula foi confirmada por espectrometria de massas (nanoESI-qTOF) (Waters). A interação da antitrombina humana ou de *B. jararaca* com a heparina foi avaliada por meio de ressonância plasmônica de superfície em sistema BIAcore T200 (GE Healthcare). Os valores de k_a , k_d e K_D calculados para a antitrombina humana foram $4.336 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,041 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $2,085 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, respectivamente. Para a antitrombina de *B. jararaca* esses valores foram $7.054 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,476 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $6,316 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ para os valores de k_a , k_d e K_D , respectivamente, sugerindo que a antitrombina de *B. jararaca* apresenta maior afinidade pela heparina que a antitrombina humana. Com relação à atividade anti-inflamatória da antitrombina desta serpente, os resultados obtidos evidenciaram o efeito anti-inflamatório do tratamento com esta molécula na resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina, nos modelos de formação de edema de pata, migração celular para a cavidade peritoneal e interação leucócito endotélio. A atividade anti-inflamatória da antitrombina humana também foi avaliada utilizando-se o modelo de formação de edema de pata. Entretanto, o tratamento com a antitrombina de *B. jararaca* mostrou-se mais eficiente na inibição da formação do edema. A administração de indometacina inibiu o efeito anti-inflamatório da antitrombina, confirmando o envolvimento da prostaciclina neste evento. Com o objetivo de elucidar o mecanismo de inibição da inflamação pela antitrombina, o exsudato peritoneal dos camundongos dos grupos “carragenina+salina” e “carragenina+antitrombina” foi analisado através de eletroforese bidimensional. Os 29 spots que apresentaram variação quantitativa entre os grupos analisados foram identificados através de espectrometria de massas (nanoESI-FTICR) (Bruker). Dentre as proteínas identificadas estão a enzima C3 do sistema complemento, a sorotransferrina, a $\alpha 1$ -antitripsina, a apolipoproteína AI, o fibrinogênio, o cininogênio e a albumina. O processo de clonagem permitiu a obtenção da sequência praticamente completa da antitrombina de *B. jararaca*, a qual foi alinhada à sequência da antitrombina humana e apresentou similaridade de cerca de 65%. Apesar da longa distância evolutiva entre serpentes e humanos, diversas características da antitrombina encontram-se conservadas, como o sítio reativo composto por uma arginina e uma serina e os resíduos de lisina e arginina responsáveis pela interação com a heparina. Entretanto, um dos sítios de glicosilação presente na antitrombina humana não foi identificado na antitrombina de *B. jararaca*. Dessa forma, é possível que a ausência de um sítio de glicosilação confira à antitrombina dessa serpente maior afinidade pela heparina, como demonstrado pelos resultados de ressonância plasmônica de superfície. Além disso, essa diferença pode ser responsável pela maior atividade anti-inflamatória da antitrombina dessa serpente, considerando-se que o receptor celular envolvido nesse mecanismo, Syndecan-4, é um receptor tipo heparina.

Palavras-chave: Antitrombina. *Bothrops jararaca*. Atividade anti-inflamatória. Análise proteômica. Clonagem.

ABSTRACT

MORAIS-ZANI, K. **Study of anti-inflammatory activity of *Bothrops jararaca* native antithrombin. Antithrombin cloning.** 2013. 134 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The mechanism by which antithrombin exerts its anticoagulant effect is a well studied event. However, the mechanisms involved in its anti-inflammatory activity are less characterized. Considering the importance of developing novel therapeutic agents for the treatment of sepsis, the present study aimed to evaluate the anti-inflammatory activity of antithrombin from *B. jararaca* snake. Antithrombin was isolated from *B. jararaca* plasma by affinity chromatography using HiTrap Heparin HP column (GE Healthcare), and the identity of the molecule obtained was confirmed by mass spectrometry (nanoESI-QToF) (Waters). The interaction of human or *B. jararaca* antithrombin with heparin was evaluated by surface plasmon resonance using a BIAcore T200 system (GE Healthcare). The values of k_a , k_d and K_D calculated for human antithrombin were $4.336 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,041^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $2,085^{-7} \text{ M}$, respectively. For *B. jararaca* antithrombin these values were $7.054 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,476^{-4} \text{ s}^{-1}$ and $6,316^{-8} \text{ M}$ for k_a , k_d and K_D , respectively, suggesting that the affinity of *B. jararaca* antithrombin for heparin is higher when compared to human antithrombin. Regarding the anti-inflammatory activity of *B. jararaca* antithrombin, the results showed the anti-inflammatory effect of pre- and post-treatment with this molecule in acute inflammation induced by carrageenan, assessed by paw edema formation, cell migration to the peritoneal cavity and leukocyte-endothelium interaction models. The anti-inflammatory activity of human antithrombin was also evaluated by the paw edema model. However, treatment with *B. jararaca* antithrombin was more efficient in inhibiting edema formation. On the other hand, the administration of indomethacin completely abrogates the anti-inflammatory activity of antithrombin, confirming the involvement of prostacyclin in this event. Aiming to elucidate the mechanism of inflammation inhibition by *B. jararaca* antithrombin, the peritoneal exudate of mice of “carrageenan+saline” and “carrageenan+antithrombin” groups was analyzed by two-dimensional electrophoresis. The 29 spots showing quantitative variation between the two experimental groups analyzed were identified by mass spectrometry (nanoESI-FTICR). Among the identified proteins are C3 complement, serum transferrin, $\alpha 1$ -antitrypsin, apolipoprotein AI, fibrinogen, albumin and kininogen. The complete sequence of *B. jararaca* antithrombin was obtained by molecular cloning, which was aligned to the sequence of human antithrombin and showed about 65% of similarity. Despite the evolutionary distance between snakes and human, a number of characteristics are preserved in antithrombin molecule, as the serine and arginine amino acid residues in the reactive center loop, and lysine and arginine residues in the N-terminal region of the molecule, which are responsible for heparin interaction. However, one of the glycosylation sites present in human antithrombin has not been identified in *B. jararaca* antithrombin. Therefore, it is possible that the absence of a glycosylation site confers to antithrombin of this snake a higher affinity for heparin when compared to human antithrombin, as shown by surface plasmon resonance results. Moreover, this difference may be responsible for the higher anti-inflammatory activity of *B. jararaca* antithrombin, considering that the cellular receptor involved in this mechanism, Syndecan-4, is a heparin-like receptor.

Keywords: Antitrombin. *Bothrops jararaca*. Anti-inflammatory activity. Proteomic anlysis. Cloning.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$A\lambda$ – absorbância no comprimento de onda λ (nm)

AMPc – monofosfato cíclico de adenosina

AT – antitrombina

cDNA – DNA complementar

CEUAIB – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan

CID – coagulação intravascular disseminada

CO₂ – dióxido de carbono

COX – ciclooxigenase

CuSO₄ – sulfato de cobre

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfatados (A, T, C e G)

DTT – dithiothreitol

EDTA – ácido etilenodiaminoetracético

ESI – electrospray ionization

FTICR - *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

g – aceleração da gravidade

HCl – ácido clorídrico

HDL – lipoproteína de alta densidade

HEPES – N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácidoetanossulfônico)

HMGB1 – *high mobility group box 1*

ICAM1 – molécula de adesão intercelular 1

IEF – focalização isoeletrica

IL-1 – interleucina 1

IL-3 – interleucina 3

IL-6 – interleucina 6

IL-10 – interleucina 10

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

LPS – lipopolissacarídeos bacterianos

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – cloreto de sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NF κ B – fator nuclear kappa B

NO – óxido nítrico

p/v – concentração expressa pela relação entre peso e volume de substâncias

PAF – fator de ativação plaque

tário

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato de sódio

PCR – reação em cadeia da polimerase

pI – ponto isoelétrico

PLA₂ – fosfolipase A₂

pfu – unidade formadora de plaque

qTOF – quadrupolo - *Time of Flight*

RCL – *reactive center loop* ou sítio reativo

RP-UPLC – *reverse phase ultra performance liquid chromatography*

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Serpinas – inibidores de serinoproteases

SPR – ressonância plasmônica de superfície

TAT – complexo trombina-antitrombina

TFMS – trifluorometanossulfônico

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

Tris – tris(hidroximetil)-aminometano

U - unidade

v/v - concentração expressa pela relação de volumes entre substâncias

Vh – volts hora

LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos

Alanina (Ala) – A

Arginina (Arg) – R

Asparagina (Asn) – N

Ácido aspártico (Asp) – D

Asparagina ou ácido aspártico (Asx) – B

Cisteína (Cys) – C

Glutamina (Gln) – Q

Ácido glutâmico (Glu) – E

Glutamina ou ácido glutâmico (Glx) – Z

Glicina (Gly) – G

Histidina (His) – H

Isoleucina (Ile) – I

Leucina (Leu) – L

Lisina (Lys) – K

Metionina (Met) – M

Fenilalanina (Phe) – F

Prolina (Pro) – P

Sernina (Ser) – S

Treonina (Thr) – T

Triptofano (Trp) – W

Tirosina (Tyr) – Y

Valina (Val) – V

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenosina – A

Citosina – C

Guanina – G

Timina – T

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema resumido da cascata de coagulação sanguínea e ação inibitória da antitrombina (AT).	21
Figura 2 – Sítios funcionalmente importantes da antitrombina.	22
Figura 3 – Estruturas da antitrombina e da antitrombina complexada com a heparina.	23
Figura 4 – Metabolismo do ácido araquidônico.	27
Figura 5 – Distribuição geográfica da serpente <i>B. jararaca</i>	35
Figura 6 – Sequência amino-terminal da antitrombina de <i>B. jararaca</i> comparada às sequências das antitrombins de outros animais.	38
Figura 7 – Cromatografia de afinidade do processo de purificação da antitrombina do plasma da serpente <i>B. jararaca</i>	55
Figura 8 – SDS-PAGE (10%) da antitrombina isolada do plasma da serpente <i>B. jararaca</i> ...	56
Figura 9 – Sequências peptídicas da antitrombina isolada de <i>B.jararaca</i> comparadas à sequência da antitrombina humana.	58
Figura 10 – Cromatografia de afinidade do processo de purificação da antitrombina do plasma humano.	59
Figura 11 – SDS-PAGE (10%) da antitrombina isolada do plasma humano.....	60
Figura 12 – Efeito de pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	62
Figura 13 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	65
Figura 14 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina humana na formação do edema de pata induzido por carragenina.	67
Figura 15 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	69
Figura 16 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	70
Figura 17 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	72

Figura 18 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	73
Figura 19 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina de <i>B. jararaca</i> na interação leucócito-endotélio induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	75
Figura 20 – Concentração proteica do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos “salina + salina” (sal+sal), “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).....	77
Figura 21 – SDS-PAGE (10%) do sobrenadante do exsudato peritoneal de camundongos...	78
Figura 22 – 2D SDS-PAGE do exsudato peritoneal de camundongos do grupo “salina + salina”.....	80
Figura 23 – 2D SDS-PAGE do exsudato peritoneal de camundongos do grupo “carragenina + salina”.....	81
Figura 24 – 2D SDS-PAGE do exsudato peritoneal de camundongos do grupo “carragenina + antitrombina”.....	82
Figura 25 – <i>Spots</i> com variação quantitativa identificados por espectrometria de massas (nanoESI-FTICR).	85
Figura 26 – Sensorgrama da interação entre a antitrombina humana e a heparina, avaliada em sistema BIAcore T200.....	88
Figura 27 – Sensorgrama da interação entre a antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> e a heparina, avaliada em sistema BIAcore T200.....	89
Figura 28 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da antitrombina humana (AT _{hum}) e das sequências peptídicas internas conservadas entre as antitrombins já descritas para outras espécies utilizadas para a construção de oligonucleotídeos degenerados.	92
Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR utilizando-se a biblioteca de cDNA do fígado da serpente <i>B. jararaca</i> como molde e os oligonucleotídeos degenerados correspondentes à região N-terminal (<i>forward</i>) e ao aminoácidos 122-129 (<i>reverse</i>).	93
Figura 30 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR para identificação dos clones contendo o fragmento de interesse, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 <i>forward</i> e M13 <i>reverse</i>	93
Figura 31 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da antitrombina humana (AT _{hum}) e de parte da sequência peptídica da antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> (AT _{Bj}).	94
Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR utilizando-se a biblioteca de cDNA do fígado da serpente <i>B. jararaca</i> como molde e os oligonucleotídeos específicos construídos com base na sequência interna de nucleotídeos da antitrombina desta serpente.	95

Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR para identificação dos clones contendo o fragmento de interesse, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *forward* e *reverse*. 96

Figura 34 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da antitrombina humana (AT_{hum}) e de parte da sequência peptídica da antitrombina da serpente *B. jararaca* (AT_{Bj}). 97

Figura 35 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da antitrombina humana (AT_{hum}) e da sequência de aminoácidos da antitrombina da serpente *B. jararaca* (AT_{Bj}). 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediadores químicos, eventos do processo inflamatório e outras moléculas inibidas pela antitrombina.	33
Tabela 2 – Massa molecular da antitrombina de diversos animais.....	37
Tabela 3 – Oligonucleotídeos específicos construídos com base na sequência interna de nucleotídeos da antitrombina de <i>B. jararaca</i>	52
Tabela 4 – Oligonucleotídeos específicos construídos com base na sequência interna de nucleotídeos da antitrombina de <i>B. jararaca</i>	54
Tabela 5 – Peptídeos identificados por espectrometria de massas (nanoESI-qTOF) resultantes da tripsinização da antitrombina isolada do plasma da serpente <i>B. jararaca</i>	57
Tabela 6 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	61
Tabela 7 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	64
Tabela 8 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina humana na formação do edema de pata induzido por carragenina.	66
Tabela 9 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	68
Tabela 10 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	71
Tabela 11 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina de <i>B. jararaca</i> na interação leucócito-endotélio induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.	74
Tabela 12 – Concentração proteica do sobrenadante do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos “salina + salina” (sal+sal), “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).....	76
Tabela 13 – Número de <i>matches</i> e <i>spots</i> com variação quantitativa do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos experimentais “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).....	83
Tabela 14 – Número de <i>matches</i> e <i>spots</i> com variação quantitativa do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos experimentais “salina + salina” (sal+sal), “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).....	84

Tabela 15 – Identificação dos <i>spots</i> de interesse, que apresentaram variação quantitativa, por espectrometria de massas (nanoESI-FTICR).	86
Tabela 16 – Parâmetros cinéticos obtidos por meio de ressonância plasmônica de superfície em sistema BIAcore T200 (GE Healthcare) para a antitrombina humana e de <i>B. jararaca</i>	90
Tabela 17 – Comparação entre a inibição da formação do edema de pata induzido por carragenina pelo pré e pós-tratamento com antitrombina de <i>B. jararaca</i>	102
Tabela 18 – Comparação entre a inibição da formação do edema de pata induzido por carragenina pelo pós-tratamento com antitrombina de <i>B. jararaca</i> e com a antitrombina humana.	104
Tabela 19 – Comparação entre a inibição pelo pré e pós-tratamento com antitrombina de <i>B. jararaca</i> na migração de células para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.	105

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Antitrombina	20
1.2 Inflamação	25
1.3 Antitrombina e inflamação	28
1.4 Serpente <i>Bothrops jararaca</i> e antitrombina	34
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Animais	41
3.1.1 Camundongos	41
3.1.2 Serpentes	41
3.2 Métodos	41
3.2.1. Coleta de sangue	41
3.2.2 Isolamento e caracterização da antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i> e da antitrombina humana	42
3.2.2.1 Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin HP	42
3.2.2.2 Dosagem de proteínas	43
3.2.2.3 Dosagem de antitrombina	43
3.2.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	44
3.2.2.5 Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)	44
3.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória da antitrombina sobre o processo inflamatório agudo	45
3.2.3.1 Tratamento com a antitrombina	45
3.2.3.2. Tratamento com a indometacina	45
3.2.3.3 Desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina	46
3.2.3.4 Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina	46
3.2.3.5 Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster	47
3.2.3.6 Análises estatísticas	47
3.2.3.7 Dosagem de proteínas	48
3.2.3.8. SDS-PAGE	48
3.2.3.9 Eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE)	48
3.2.4 Ressonância plasmônica de superfície	50
3.2.4.1 Imobilização de heparina biotinizada ao sensor chip SA – streptavidin	50

3.2.4.2 SPR	51
3.2.5 Clonagem da antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i>	51
3.2.5.1. Coleta do fígado de <i>B. jararaca</i> e extração do RNA total.....	51
3.2.5.2. Construção da biblioteca de cDNA do fígado de <i>B. jararaca</i>	51
3.2.5.3 Amplificação do fragmento de DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR)	52
3.2.5.4 Transformação de <i>E. coli</i> cepa DH5- α por eletroporação	53
3.2.5.5 Detecção dos clones positivos por PCR e mini-preparação plasmidial	53
3.2.5.6 Reação de sequenciamento do fragmento de DNA amplificado	53
3.2.5.7 Clonagem do fragmento de DNA que codifica a antitrombina de <i>B. jararaca</i>	53
4 RESULTADOS	55
4.1 Isolamento e caracterização da antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i>	55
4.2 Isolamento e caracterização da antitrombina humana	58
4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória da antitrombina sobre o processo inflamatório agudo	60
4.3.1 Desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina	60
4.3.1.1 Pré-tratamento com a antitrombina de <i>B. jararaca</i>	60
4.3.1.2 Pós-tratamento com a antitrombina de <i>B. jararaca</i>	63
4.3.1.3 Pós-tratamento com a antitrombina humana	66
4.3.2 Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina	68
4.3.2.1 Pré-tratamento com a antitrombina de <i>B. jararaca</i>	68
4.3.2.2 Pós-tratamento com a antitrombina de <i>B. jararaca</i>	71
4.3.3 Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster	73
4.3.4 Análise proteômica do exsudato peritoneal	75
4.3.4.1 Dosagem de proteínas	76
4.3.4.2 SDS-PAGE	77
4.3.4.3 2D SDS-PAGE	79
4.3.4.4 Identificação dos spots de interesse por espectrometria de massas (nanoESI-FTICR)	84
4.4 SPR	87
4.5 Clonagem e expressão da antitrombina da serpente <i>B. jararaca</i>	90
5 DISCUSSÃO	99
6 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antitrombina

A antitrombina humana é uma glicoproteína plasmática de cadeia única com massa molecular de 58 kDa, membro da família das serpinas. O nome da família é um acrônimo para “**ser**ine **p**roteinase **in**hibitor”, mas atualmente sabe-se que as serpinas inibem tanto proteases da classe serino quanto da classe cisteíno (IRVING et al., 2002). Cabe ainda salientar que existem inibidores de serinoproteases que não pertencem a essa família, assim como existem serpinas que não são inibidores de proteases, porque a classificação desta família foi estabelecida segundo a homologia da estrutura primária das proteínas (ROBERTS et al., 1995).

A antitrombina é um dos mais importantes inibidores endógenos da coagulação sanguínea. Essa serpina é o principal inibidor fisiológico da trombina, responsável por aproximadamente 80% da atividade inibitória sobre essa enzima (PERRY, 1994). Além da trombina, a antitrombina é responsável também pela inibição dos fatores VIIa, IXa, Xa, XIa e XIIa, da calicreína plasmática e da enzima C1 do sistema complemento (KURACHI et al., 1976; ROSENBERG; MCKENNA; ROSENBERG, 1975; SUMMARIA et al., 1977). Na figura 1 podemos observar um esquema resumido da cascata de coagulação bem como a ação inibitória da antitrombina.

Figura 1 – Esquema resumido da cascata de coagulação sanguínea e ação inibitória da antitrombina (AT).

(PK) pré-caliceína e (HMWK) cininogênio de alto peso molecular.

Esta proteína é sintetizada pelo fígado (LEON et al., 1983) e em condições normais está presente no plasma humano em uma concentração de cerca de 150 µg/mL (CONARD et al., 1983) correspondentes a 1 UI/mL (MAMMEN, 1998), com meia vida de 3 dias (COLLEN et al., 1977).

A estrutura primária da antitrombina humana é composta por 432 resíduos de aminoácidos, dos quais seis são cisteínas que formam três pontes dissulfeto (figura 2) (PETERSEN, 1979). A molécula contém quatro sítios de glicosilação, podendo ser glicosilada em todos esses sítios (antitrombina α – cerca de 90% das moléculas) ou em apenas três desses

sítios (antitrombina β – cerca de 10% das moléculas) (STEIN; CARRELL, 1995). A antitrombina β não possui a cadeia de carboidratos no resíduo Asn135, o qual está situado próximo ao sítio de ligação à heparina, o que resulta em uma maior afinidade pela heparina do que a encontrada para a antitrombina α (BRENNAN; GEORGE; JORDAN, 1987). As serpinas apresentam uma estrutura altamente conservada, constituída por três estruturas tipo folha β (A – C) e nove estruturas tipo α -hélice (A – I) (figura 3) (CARRELL et al., 1995; STEIN; CARRELL, 1995; WHISSTOCK; SKINNER; LESK, 1998).

Figura 2 – Sítios funcionalmente importantes da antitrombina.

O sítio reativo é composto pelos resíduos Arg393 – Ser394 e os resíduos de lisina e arginina são os sítios de ligação à heparina.
Fonte: Rosenberg (1994).

Figura 3 – Estruturas da antitrombina e da antitrombina complexada com a heparina.

A antitrombina é ilustrada sozinha à esquerda, sendo que em vermelho podemos observar sua estrutura folha β A, em verde sua folha β B e em amarelo sua folha β C. O centro reativo (RCL) é mostrado em magenta. À direita podemos observar a antitrombina complexada com a heparina (pentassacarídeo), com uma estrutura α -hélice destacada em azul.

Fonte: Quinsey et al. (2004).

A inibição pela antitrombina envolve a formação de um complexo estável 1:1 entre o sítio ativo da serinoprotease e o sítio reativo da antitrombina, o qual a protease reconhece inicialmente como um substrato. O resíduo de Arg na posição P1 e os resíduos de aminoácidos adjacentes compõem uma sequência que é reconhecida pelas serinoproteases do tipo tripsina que constituem a cascata de coagulação. Com a clivagem de uma ligação peptídica do sítio reativo da antitrombina (Arg393-Ser394) pela sua enzima alvo, ocorre uma mudança conformacional no inibidor que captura a protease, inativando-a através de sua deformação conformacional e causando uma inibição irreversível (DEMENTIEV; DOBO; GETTINS, 2006; HUNTINGTON; READ; CARRELL, 2000; ROSENBERG; DAMUS, 1973; STRATIKOS; GETTINS, 1999). Assim que o complexo trombina-antitrombina (TAT) é formado as duas moléculas são inativadas. Esse complexo apresenta uma curta meia vida plasmática, de apenas 5 minutos, e é removido pelo fígado (PERLMUTTER et al., 1990; PIZZO, 1989).

Ao contrário da alta reatividade com relação a sua protease alvo apresentada pelas serpinas independentes de cofatores, como a $\alpha 1$ -antitripsina e a $\alpha 1$ -antiquimotripsina, a antitrombina, em concentrações plasmáticas fisiológicas, inibe as proteases da coagulação muito lentamente. Entretanto, as interações protease-inibidor aumentam dramaticamente na presença de certas glicosaminoglicanas (BOURIN; LINDAHL, 1993), como a heparina e o heparansulfato. Os grupos sulfato e carboxilato das glicosaminoglicanas, carregados negativamente, se ligam aos resíduos de lisina e arginina positivamente carregados localizados na região amino-terminal da antitrombina (figuras 2 e 3) (GETTINS et al., 1993). Estudos envolvendo mutagênese indicaram que, dentre os resíduos que compõem o sítio de ligação à heparina, dois resíduos de lisina nas posições 114 e 125 desempenham um papel crítico na interação da antitrombina com a heparina (SCHEDIN-WEISS et al., 2002). Essa interação acelera a geração do complexo enzima-inibidor através da indução de mudanças conformacionais no sítio reativo da molécula de antitrombina (GETTINS et al., 1993), o que torna o inibidor mais acessível à interação com a trombina ou com outras enzimas da coagulação (ROSENBERG, 1989). Além disso, a ligação de glicosaminoglicanas à antitrombina causa uma alteração eletrostática na superfície do inibidor necessária para a sua ativação (HUNTINGTON et al., 2000).

As moléculas de heparansulfato presentes na superfície das células endoteliais ativam a antitrombina circulante, conferindo propriedades antitrombogênicas à parede vascular (DE AGOSTINI et al., 1990; MARCUM et al., 1986). É estimado que existam cerca de 500.000 sítios de ligação para a antitrombina em cada célula endotelial (BOMBELI; MUELLER; HAEBERLI, 1997).

Uma vez que a coagulação sanguínea é ativada e localizada no sítio da injúria vascular, as moléculas de heparansulfato ativam a função anticoagulante da antitrombina nesta região. A heparina liberada pelos mastócitos intimamente associados aos vasos sanguíneos podem adicionalmente ativar a antitrombina. Dessa forma, a antitrombina é seletivamente ativada na interface endotélio-sangue, onde as enzimas da coagulação sanguínea são normalmente geradas, e inativa rapidamente essas proteases que escapam do local da injúria vascular, prevenindo a disseminação de trombos intravasculares (OLSON et al., 2010). A ligação da heparina e do heparansulfato à antitrombina é responsável por uma aceleração de aproximadamente 1.000 vezes na formação do complexo enzima-inibidor (BROZE; MAJERUS, 1980; JORDAN et al., 1980). Trata-se de uma ligação de alta afinidade, com uma constante de dissociação de aproximadamente 50 nM em força iônica e pH fisiológicos (OLSON et al., 1992).

Entretanto, frente à ativação excessiva de trombina, como observado nos casos de sepse, ocorre uma queda da atividade da antitrombina e a perda do equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e inibidores fisiológicos da inflamação (LAMY; DEBY-DUPONT, 1995). De fato, a interação entre a coagulação e a inflamação (*cross-talk*) no desenvolvimento da sepse se tornou um tema de destaque na área da medicina intensiva (SUN et al., 2009).

1.2 Inflamação

A inflamação por definição é uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado frente a uma injúria, que ocorre de maneira estereotipada, independente da natureza do estímulo lesivo. Essa resposta compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos (CARLOS; HARLAN, 1990), cuja finalidade é a eliminação do agente lesivo, o restabelecimento da funcionalidade tecidual e a manutenção da homeostasia do organismo (RANKIN, 2004).

Os eventos vasculares da resposta inflamatória compreendem alterações hemodinâmicas, que levam ao aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (KOWAL-VERN et al., 1997; RANKIN, 2004), o qual caracteriza o edema inflamatório (TEDGUI; MALLAT, 2001). O extravasamento de proteínas para o tecido intersticial causa ainda o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à estase sanguínea e à consequente alteração da orientação das células sanguíneas, isto é, essas células, que antes se localizavam na região central do vaso, passam para a periferia deste. Essa alteração propicia o contato dos leucócitos com as células endoteliais, fenômeno este denominado marginação leucocitária (MAYADAS; ROSENKRANZ; COTRAN, 1999).

Na periferia do vaso a interação dos leucócitos com as células endoteliais ocorre em diferentes fases. Inicialmente os leucócitos rolam sobre o endotélio e em seguida aderem-se firmemente à superfície vascular. Posteriormente, migram em direção ao foco inflamatório. Esses eventos, denominados respectivamente de *rolling*, adesão e migração de leucócitos, envolvem a expressão de moléculas de adesão, entre elas as selectinas, as integrinas e seus ligantes (RANKIN, 2004). As selectinas são expressas na superfície dos leucócitos, plaquetas e células endoteliais e são as principais responsáveis pelo *rolling* dos leucócitos (BUTCHER, 1991). A P-selectina, a principal selectina, é constitutivamente expressa em plaquetas ativadas e em células endoteliais. A E-selectina é expressa no endotélio ativado por citocinas

inflamatórias, enquanto que a L-selectina é encontrada na maioria dos leucócitos (RANKIN, 2004).

O *rolling* e a adesão de leucócitos durante a resposta inflamatória são mediados pela regulação diferencial dessas moléculas de adesão. Esse processo é iniciado pelas moléculas de adesão da família das selectinas, responsáveis pela interação transiente entre leucócito e endotélio, que caracteriza o *rolling* (JOHNSTON et al., 1997). Em contraste, a firme adesão dos leucócitos ao endotélio envolve a participação de moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e integrina β_2 (GRANGER; KUBES, 1994).

Imediatamente após a adesão ao endotélio, os leucócitos emitem pseudópodes entre as junções das células endoteliais, atravessam a membrana basal e finalmente migram para o espaço extravascular, em direção ao foco da lesão. A migração direcionada dos leucócitos é um processo denominado quimiotaxia (ODA et al., 1995). Cabe ressaltar que os eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, descritos acima de forma sequencial, acontecem simultaneamente durante essa resposta.

As manifestações uniformes que caracterizam a resposta inflamatória são decorrentes da ação de substâncias endógenas liberadas após o estímulo lesivo, denominadas mediadores químicos da inflamação. Esses mediadores podem ser originados no plasma, tais como os componentes do sistema complemento, do sistema de coagulação e as cininas ou ainda originados nas células e tecidos, tais como a histamina, a serotonina, os metabólitos do ácido araquidônico, o fator de ativação plaquetário (PAF), o óxido nítrico (NO) e as interleucinas (MAJNO; JORIS, 2004; RANKIN, 2004).

Particularmente, os metabólitos do ácido araquidônico são gerados após um estímulo lesivo por ação da enzima fosfolipase A_2 (PLA₂), a qual degrada os fosfolípidos da membrana celular gerando o ácido araquidônico (CROWLEY, 1996). Este, por sua vez, é degradado pela ação das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases. Existem duas isoformas da enzima COX, uma constitutiva (COX-1), presente nas células endoteliais, e outra induzível (COX-2), presente em macrófagos (MITCHELL et al., 1993). As prostaglandinas, as prostaciclinas e os tromboxanos são os metabólitos gerados pela via das ciclooxigenases enquanto os leucotrienos e as lipoxinas são gerados pela via das lipoxigenases (RANKIN, 2004) (figura 4).

Figura 4 – Metabolismo do ácido araquidônico.

Em relação à atuação desses metabólitos na resposta inflamatória, os leucotrienos causam vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e atuam ainda como agentes quimiotáticos (LEWIS; AUSTEN; SOBERMAN, 1990) e as lipoxinas possuem atividade anti-inflamatória (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). As prostaglandinas e as prostaciclina, por sua vez, causam vasodilatação e potencializam a formação do edema inflamatório (MAJNO; JORIS, 2004).

As prostaciclina, no entanto, têm sido descritas, a partir da década de 90, como mediadores com papel anti-inflamatório. Estes mediadores são fisiologicamente produzidos pelas células endoteliais, sendo responsáveis pela manutenção da permeabilidade seletiva do endotélio e pela regulação das interações entre os componentes do sangue circulante (CINES et al., 1998). As prostaciclina e seus análogos reduzem os níveis de citocinas e fatores de crescimento, diminuem a quimiotaxia, reduzem ou modulam a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, neutrófilos e monócitos através de um mecanismo dependente de AMPc e diminuem a adesão dos leucócitos ao endotélio (BRAUN et al., 1997; DELLA BELLA et al., 2001; NICOLINI et al., 1990; RIVA et al., 1990). Além disso, os análogos das prostaciclina reduzem a formação dos produtos finais da cascata de coagulação

(MAZZONE et al., 1999), são capazes de regular a síntese de TNF- α pelos leucócitos e macrófagos (EISENHUT et al., 1993; GRUNDMANN et al., 1992; JORRES et al., 1997) e diminuem a expressão de fator tissular pelos monócitos e pelas células endoteliais, novamente via a elevação dos níveis intracelulares de AMPc (CRUTCHLEY et al., 1993; CRUTCHLEY; SOLOMON; CONANAN, 1992). Dessa forma, esses mediadores atuam como agentes anti-inflamatórios e reguladores da função endotelial com papel crítico na manutenção da homeostase vascular da microcirculação, no controle da adesão, quimiotaxia e ativação das células sanguíneas e inibição de trombose vascular local (ZARDI et al., 2007).

A sepse é uma das principais causas de morte do mundo ocidental e a incidência dessa condição fatal aumenta continuamente (SOUTER et al., 2001). Mais de 50% dos pacientes diagnosticados com sepse associada à coagulação intravascular disseminada (CID) não sobrevive. Dessa forma, é vital que novos agentes terapêuticos tornem-se disponíveis para o tratamento desta condição. A fisiopatologia da sepse tem sido estudada intensamente, revelando uma cadeia complexa de interações, incluindo a via extrínseca da coagulação, o sistema complemento e a cascata de citocinas (DE BOER et al., 1993; HACK; AARDEN; THIJIS, 1997; LEVI et al., 1994). Apesar da introdução de terapias anti-lipopolissacarídeos e anti-citocinas, como anti-TNF- α , anti-IL-6 ou antagonistas recombinantes para o receptor de IL-1 (FISCHER et al., 1992; VAN DER POLL et al., 1994a, b), um tratamento efetivo para o tratamento da sepse e eventos associados continua elusivo (SOUTER et al., 2001).

Considerando-se que a ativação do sistema de coagulação mediada por citocinas constitui um evento importante para o desenvolvimento da sepse (VAN DEVENTER et al., 1990), o tratamento dessa condição com agentes anticoagulantes que também modulam as reações inflamatórias tem sido foco de interesse (FREEMAN; ZEHNBauer; BUCHMAN, 2003; MATTHAY, 2001), sendo a antitrombina um desses agentes.

1.3 Antitrombina e inflamação

Um grande número de estudos demonstrou que, além de participar como o principal inibidor fisiológico da coagulação, a antitrombina possui ação anti-inflamatória, a qual é independente da sua ação anticoagulante. Essa serpina desempenha seu papel anti-inflamatório através da interação com células, reduzindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios e modulando a ativação de leucócitos e sua interação com a parede vascular (WIEDERMANN CH; ROMISCH, 2002).

No final dos anos 80 surgiram os primeiros trabalhos reportando a propriedade da antitrombina de estimular a liberação de prostaciclina pelas células endoteliais independentemente da interação com a trombina. Apesar de estudos mais recentes questionarem esse mecanismo *in vitro*, a liberação de prostaciclina é destacada como parte do mecanismo de inibição da inflamação pela antitrombina *in vivo* (UCHIBA; OKAJIMA, 2001).

Taylor et al. (1988) foram os primeiros a postular esses efeitos, baseados em experimentos envolvendo CID. Esses autores constataram que infusões de antitrombina reduziram significativamente a mortalidade de macacos tratados previamente com doses letais de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Independentemente de sua atividade anticoagulante em diversos estágios da cascata de coagulação, uma grande variedade de estudos forneceu evidências de um potente efeito anti-inflamatório da antitrombina, o qual pode ser induzido por altas concentrações plasmáticas deste inibidor (entre 150 e 200%) (HARADA et al., 1999; HOFFMANN et al., 2000; OKAJIMA; UCHIBA, 1998; UCHIBA; OKAJIMA; MURAKAMI, 1998; UCHIBA et al., 1996). Entretanto, segundo Duzendorfer et al. (2001), os efeitos da antitrombina sobre neutrófilos ocorrem mesmo em concentrações plasmáticas normais deste inibidor, apresentando assim relevância fisiológica.

Okajima e Uchiba (1998) verificaram que a antitrombina previne a ocorrência de injúria vascular nos pulmões de ratos em que foram injetados lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) através da inibição da ativação de leucócitos. Esses autores demonstraram que a interação da antitrombina com as glicosaminoglicanas da superfície endotelial estimula a liberação de prostaciclina, inibindo assim a liberação de espécies reativas de oxigênio e proteases pelos neutrófilos. Tendo em vista que a prostaciclina tem o potencial de atenuar a resposta dos leucócitos e contribuir para a perfusão microvascular (BOUSKELA; RUBANYI, 1995; GRANGER; KUBES, 1994), Hoffmann et al. (2000) propuseram que a antitrombina reduz a interação leucócito-endotélio e melhora a perfusão dos capilares sanguíneos através das propriedades anti-inflamatórias e vasoativas da prostaciclina.

Além disso, Okajima e Uchiba (1998) sugeriram também que a antitrombina poderia apresentar um efeito protetor mesmo em células que não estão associadas à liberação de prostaciclina, o que envolveria a inibição de leucócitos ativados e sua interação com o endotélio, reduzindo assim a transmigração da parede vascular e o subsequente dano tecidual. No interior dos vasos sanguíneos, os leucócitos são continuamente expostos à antitrombina

plasmática e, dessa forma, essa serpina poderia prevenir a ativação prematura dessas células sob condições fisiológicas (DUNZENDORFER et al., 2001).

A antitrombina possui a habilidade de inibir o *rolling* e a adesão de leucócitos, eventos centrais da inflamação. Ostrovsky et al. (1997) verificaram que a administração de antitrombina reduz o *rolling* e a adesão de neutrófilos aos níveis basais em modelo de isquemia-reperfusão em mesentério de felinos e Nevière et al. (2001) utilizaram videomicroscopia intravital para mostrar que a antitrombina inibe significativamente a adesão de leucócitos em ratos endotoxêmicos. Os resultados sugerem que esse efeito é decorrente da diminuição da interação entre os leucócitos e o endotélio.

Yamashiro et al. (2001) sugeriram o efeito direto da antitrombina nos leucócitos e no endotélio, demonstrando que este inibidor diminui a expressão de P-selectina pelo endotélio estimulado por LPS, diminuindo assim o *rolling* e a migração de leucócitos. A antitrombina também é capaz de inibir a expressão de integrina β_2 (GRITTI et al., 2004), de ICAM-1 (INTHORN et al., 1998) e de E-selectina (INTHORN et al., 1998).

Souter et al. (2001) verificaram que a antitrombina inibe a produção de IL-6 e fator tissular, sendo que a administração de hirudina recombinante não reduz a produção dessas moléculas, sugerindo que a inibição observada para a antitrombina não é decorrente da sua capacidade de inibir a trombina. Frente aos resultados observados, esses autores propuseram que a antitrombina não atua somente como anticoagulante, mas pode também interferir no mecanismo de sinalização para a síntese de citocinas próinflamatórias induzida durante a sepse associada à CID.

Oelschläger et al. (2002) demonstraram que a antitrombina inibe a ativação do fator nuclear κB (NF- κB) em cultura de monócitos humanos e células endoteliais e Bae e Rezaie (2009) demonstraram que essa inibição é dependente do aumento da síntese de prostaciclina. Cabe ressaltar que este fator de transcrição ativa diversos genes que codificam mediadores relacionados ao estímulo inflamatório (HATADA; KRAPPMANN; SCHEIDEREIT, 2000).

Hagiwara et al. (2008) revelaram que a antitrombina inibe a secreção de HMGB1 (*high mobility group box 1*) estimulada por LPS em macrófagos murinos. O mesmo estudo evidenciou também uma redução nos níveis de TNF- α e IL-6 no grupo tratado com antitrombina, decorrente da inibição de HMGB1. Além disso, os mesmos autores propuseram que a antitrombina diminui a produção de NO, que contribui para a citotoxicidade de neutrófilos e macrófagos durante a resposta inflamatória, e IL-1 β (HAGIWARA et al., 2010). De fato, estudos demonstraram que a antitrombina inibe a produção de NO e iNOS (óxido

nítrico sintase induzível) durante a inflamação, mas os mecanismos envolvidos nessa inibição ainda não foram elucidados (HAGIWARA et al., 2009).

Totzke et al. (2001) demonstraram que a antitrombina inibe a produção de IL-1 β e TNF- α induzida por LPS ao nível transcricional e traducional. Estudos demonstraram também que a antitrombina inibe significativamente a expressão de PLA₂ estimulada por TNF- α (KIM; BAE, 2010).

Considerando-se a presença de receptores celulares para a antitrombina e os eventos celulares modulados por essa interação, os resultados experimentais obtidos indicam uma importante contribuição dessa serpina na fisiologia das células endoteliais e dos leucócitos (WIEDERMANN CH; ROMISCH, 2002).

Gray *et al.* (2000) verificaram que a ligação da antitrombina a superfícies celulares ocorre através do receptor syndecan-4 e que essa interação é crucial para a inibição da síntese de IL-6 e fator tissular. Syndecans são proteoglicanas constituídas por um núcleo proteico ao qual polímeros de carboidratos não ramificados (glicosaminoglicanas) são ligados covalentemente (CAREY, 1997). Os syndecans contêm dois tipos de glicosaminoglicanas, o heparansulfato e o sulfato de condroitina, sendo classificados como proteoglicanas híbridas (SALMIVIRTA; LIDHOLT; LINDAHL, 1996). O syndecan-4 é expresso pelos leucócitos e, dessa forma, a antitrombina tem a capacidade de regular o comportamento migratório de neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos (DUNZENDORFER et al., 2001; FEISTRITZER et al., 2004; KANEIDER et al., 2002). O ectodomínio deste receptor apresenta arranjos de pentassacarídeos que são reconhecidos pelo sítio de ligação à heparina presente na antitrombina (HORIE; ISHII; KAZAMA, 1990; KOUNTCHEV et al., 2005; OLSON et al., 1992).

A utilização de antitrombina recombinante (Trp49), que perdeu a capacidade de ligação à heparina, não apresenta nenhuma atividade anti-inflamatória (WIEDERMANN, 2006). Além disso, a presença de heparina impede a ligação da antitrombina ao syndecan-4 e bloqueia, consequentemente, a síntese de prostaciclina induzida pela antitrombina (HORIE; ISHII; KAZAMA, 1990; YAMAUCHI et al., 1989). Assim, a heparina interfere na atividade anti-inflamatória da antitrombina, competindo com o syndecan-4 pelos sítios de ligação presentes nesta serpina, o que prejudica sua interação com a superfície celular (PULLETZ et al., 2000).

A antitrombina liga-se ao syndecan-4 de leucócitos e ativa diversas vias de transdução de sinal e, assim, influencia o comportamento deste tipo celular (KANEIDER et al., 2001; KANEIDER et al., 2002). As enzimas de transdução de sinal envolvidas neste fenômeno, em monócitos, incluem a proteína quinase C (KANEIDER et al., 2001), as quinases associadas ao

Rho-GTP (DUNZENDORFER et al., 2001), as tirosinoquinases (FEISTRITZER et al., 2005) e as esfingosinoquinases (KANEIDER et al., 2001).

A ação anti-inflamatória da antitrombina envolvendo a liberação de prostaciclina sugere o envolvimento da via da COX (YAMAUCHI et al., 1989). Tanto Ostrovsky *et al.* (1997) quanto Nevière *et al.* (2001) demonstraram que os efeitos benéficos resultantes da administração da antitrombina são eliminados quando a indometacina, um inibidor não seletivo da enzima COX que bloqueia a produção de prostaciclina, é adicionada ao tratamento. Harada et al. (1999) demonstraram que a antitrombina induz a produção de prostaciclina através da ativação da via da COX-1 e não do aumento da expressão dessa enzima, considerando-se que não ocorre o aumento da expressão do seu RNAm. Esse autor demonstrou também que a antitrombina inibe a expressão do RNAm da COX-2 através da inibição da produção do TNF- α . Corroborando esses resultados, Tetzke et al. (2001) demonstraram que a inibição específica da enzima COX-2 não interfere na inibição da síntese de IL-1 β e TNF- α pela antitrombina.

Os mediadores químicos e os eventos da inflamação, bem como outras moléculas inibidas pela antitrombina, estão reunidos na tabela 1.

Tabela 1 – Mediadores químicos, eventos do processo inflamatório e outras moléculas inibidas pela antitrombina.

	Referências
Ativação de leucócitos	(OKAJIMA; UCHIBA, 1998)
Interação leucócito-endotélio	(HOFFMANN et al., 2000)
<i>Rolling</i> de leucócitos	(OSTROVSKY et al., 1997)
Adesão de leucócitos	(OSTROVSKY et al., 1997)
E-selectina	(INTHORN et al., 1998)
P-selectina	(YAMASHIRO et al., 2001)
ICAM-1	(INTHORN et al., 1998)
Integrina β_2	(GRITTI et al., 2004)
IL-1 β	(TOTZKE et al., 2001)
IL-6	(SOUTER et al., 2001)
TNF- α	(TOTZKE et al., 2001)
NO	(HAGIWARA et al., 2008)
iNOS	(HAGIWARA et al., 2009)
NF- κ B	(OELSCHLAGER et al., 2002)
HMGB1	(HAGIWARA et al., 2008)
PLA2	(KIM; BAE, 2010)
COX-2	(HARADA et al., 1999)
Fator tissular	(SOUTER et al., 2001)

Apesar das evidências do papel anti-inflamatório da antitrombina, um estudo clínico em larga escala não conseguiu demonstrar a eficácia desta molécula em pacientes com sepse (WARREN et al., 2001). Entretanto, a análise de um subgrupo revelou que os pacientes tratados com antitrombina, sem administração concomitante de heparina, apresentaram

melhora significativa (IBA; KIDOKORO, 2004). Adicionalmente, estudos clínicos demonstraram que a administração de antitrombina em pacientes com sepse reduz a falência de órgãos e aumenta a sobrevivência em casos de alto risco de morte (WIEDERMANN et al., 2006). Esses resultados conflitantes refletem a necessidade de compreender de maneira aprofundada o envolvimento da antitrombina na sepse.

1.4 Serpente *Bothrops jararaca* e antitrombina

Acredita-se que as serpentes originaram-se de lagartos fossoriais ou aquáticos durante o período Cretáceo e os primeiros fósseis identificados como pertencentes às serpentes datam do Albiano ou Cenomaniano, há 94-112 milhões de anos. A diversidade das serpentes modernas surgiu durante o período Paleoceno da Era Cenozóica, há aproximadamente 54-64 milhões de anos (VIDAL et al., 2009).

Existem cerca de 3.000 espécies de serpentes, sendo que destas aproximadamente 600 são peçonhentas. Esses animais são encontrados principalmente nas regiões tropical e equatorial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). No Brasil foram descritas 386 espécies de serpentes, sendo 60 peçonhentas, 30 da família Elapidae e 30 da família Viperidae (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2013).

A família Viperidae representa o mais importante grupo de serpentes para a saúde pública nas Américas, pois é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos registrados (MELGAREJO, 2003). O gênero *Bothrops*, que pertence a esta família, possui mais de 30 espécies e subespécies de serpentes distribuídas entre a América Central e a América do Sul (CIDADE et al., 2006).

A espécie *Bothrops jararaca* (*B. jararaca*) ocorre no Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil, esta espécie é encontrada desde o sudeste da Bahia até o nordeste do Rio Grande do Sul (figura 5) (MELGAREJO, 2003), sendo uma das espécies brasileiras com mais ampla distribuição geográfica e responsável por cerca de 90% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais que o Brasil registra (CAMPBELL; LAMAR, 1989; RIBEIRO; JORGE, 1997; SANTORO et al., 2008).

Figura 5 – Distribuição geográfica da serpente *B. jararaca*.

De modo didático, são descritas três atividades fisiopatológicas do veneno botrópico: proteolítica, mais bem definida como inflamatória aguda, coagulante e hemorrágica (ROSENFELD, 1971). Essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente e uma única toxina pode apresentar diversas atividades (FRANÇA; MALAQUE, 2003).

Em contraste com a extensa literatura acerca da composição e atividade do veneno de serpentes, pouco se conhece sobre a composição plasmática desses animais. Sabe-se que as serpentes, especialmente as peçonhentas apresentam o tempo de coagulação mais longo quando comprado ao de mamíferos. Além da ausência de alguns fatores de coagulação sanguínea nesses animais, como os fatores VIII, IX e XII, outro fator que pode contribuir para uma coagulação mais lenta é a presença de anticoagulantes naturais, como já observado no sangue das serpentes *B. jararaca* (NAHAS et al., 1981; NAHAS et al., 1973; TANAKA-AZEVEDO; TANAKA; SANO-MARTINS, 2003), *B. jararacussu*, *B. alternatus* e *Crotalus durissus terrificus* (MORAIS; FERNANDES GREGO; TANAKA-AZEVEDO, 2008).

Tanaka-Azevedo et al. (2003) descreveram um inibidor no plasma da serpente *B. jararaca*, chamado BJI, que interfere na atividade coagulante da trombina, medido pelo tempo de trombina, que, no entanto, não bloqueia a ativação da via extrínseca da coagulação, permitindo assim a oclusão de vasos lesados. Além disso, os autores propuseram um possível papel desse inibidor na proteção desse animal contra seu próprio veneno.

Outro fenômeno interessante é a “imunidade natural” das serpentes contra seu próprio veneno. Estudos demonstraram que essa imunidade pode ser decorrente de uma mutação no alvo da toxina, tornando-a resistente à sua ação, e da presença de proteínas no plasma desses animais que neutralizam a atividade tóxica do veneno (FAURE, 2000).

Nesse contexto, Vieira et al. (2008) purificaram o fibrinogênio da serpente *B. jararaca*. Essa molécula apresentou resistência contra a hidrólise provocada pelo veneno da mesma espécie e pelo veneno das serpentes *C. durissus terrificus* e *Lachesis* sp. Entretanto, esses mesmos venenos foram capazes de coagular o fibrinogênio humano e, de maneira inversa, a trombina bovina foi capaz de coagular o fibrinogênio de *B. jararaca*, sugerindo um papel dessa molécula na proteção do animal contra o próprio veneno.

Desta forma, o plasma da serpente *B. jararaca* apresenta-se como uma fonte rica de material, não somente para estudo da relação entre a composição do veneno e do plasma das serpentes, mas também como fonte de biomoléculas com possível interesse médico e biotecnológico.

Recentemente, a antitrombina do plasma da serpente *B. jararaca* foi isolada e caracterizada (MORAIS et al., 2009).

Através de eletroforese em gel de poliacrilamida, a antitrombina purificada de *B. jararaca* apresentou massa molecular de 61 kDa composta por uma única cadeia polipeptídica (MORAIS, 2009), sendo favoravelmente comparada às massas descritas para outras espécies (tabela 2) .

Tabela 2 – Massa molecular da antitrombina de diversos animais.

Antitrombina	Massa Molecular (kDa)	Referência
<i>B. jararaca</i>	61	(MORAIS et al., 2009)
Cavalo	52,5	(KURACHI et al., 1976)
Boi	56,6	(KURACHI et al., 1976)
Ovelha	57	(JORDAN, 1983)
Sapo	58	(JORDAN, 1983)
Homem	58	(KOIDE, 1979; THALER; SCHMER, 1975)
Chimpanzé	59	(JORDAN, 1983)
Avestruz	59,2	(FROST; NAUDE; MURAMOTO, 2002)
Coelho	59,5	(KOIDE, 1979)
Galinha	60	(KOIDE, 1979; KOIDE et al., 1982)
Tartaruga	62	(JORDAN, 1983)
Hamster	62,5	(MAK; ENGHILD; DUBIN, 1996)
Cachorro	77	(DAMUS; WALLACE, 1974)

A focalização isoeétrica da antitrombina de *B. jararaca* indicou um pI ácido, de 4,5 (MORAIS, 2009), sendo este valor, também, favoravelmente comparado aos outros valores de pI previamente descritos para este inibidor – 5,4-5,2 para a antitrombina humana (REIF; FREITAG, 1994), 4,95-5,25 para a de hamster (MAK; ENGHILD; DUBIN, 1996), 4,5-5,0 para a bovina (NORDENMAN; NYSTROM; BJORK, 1977) 5,2-6,0 para a de avestruz (FROST; NAUDE; MURAMOTO, 2002) e 4,7-6,0 para a de salmão (ANDERSEN et al., 2000).

A deglicosilação através de ácido trifluorometanossulfônico (TFMS) resultou em uma mudança da massa molecular desse inibidor de 61 para 50 kDa, sendo seu conteúdo total de carboidrato estimado em 18% (MORAIS, 2009). Este valor é maior que o de humanos (9%), bovinos (12%) e equinos (16%) (KURACHI et al., 1976). Entretanto, o conteúdo de

carboidrato estimado para galinha (17,5%) (KOIDE et al., 1982) é similar ao de *B. jararaca*, enquanto o de salmão é maior (19,7%) (ANDERSEN et al., 2000).

O teste de coagulação *in vitro* revelou que a antitrombina de *B. jararaca* tem comportamento semelhante às demais antitrombins já descritas: inibe a trombina quase que instantaneamente na presença de heparina, mas na sua ausência essa inibição é muito lenta. A antitrombina de *B. jararaca* apresentou atividade inibitória sobre a coagulação do fibrinogênio desta serpente e de bovinos e sobre o substrato cromogênico S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA) (Chromogenix) (MORAIS, 2009).

Os aminoácidos da região amino-terminal da antitrombina dessa serpente foram analisados por degradação de Edman e a sequência obtida (His-Glu-Ser-Ser-Val-Gln-Asp-Ile-Ile-Thr) mostrou-se similar às previamente descritas para outros animais (figura 6) (MORAIS, 2009).

Figura 6 – Sequência amino-terminal da antitrombina de *B. jararaca* comparada às sequências das antitrombins de outros animais.

Fonte: Moraes (2009).

Ensaio imunológico demonstraram que anticorpos policlonais anti-antitrombina de *B. jararaca* produzidos em camundongos reconhecem este inibidor presente em peixes (*Salminus hilarii*), anfíbios (*Rana catesbeiana*), répteis (*Oxyrhopus guibei*), aves (*Gallus gallus*) e mamíferos (*Homo sapiens sapiens*) (MORAIS, 2009).

Utilizando-se os dados obtidos através da tabela de purificação da antitrombina de *B. jararaca*, a concentração de antitrombina circulante dessa serpente foi estimada em 188 µg/mL de plasma (MORAIS, 2009), sendo este valor comparável à concentração de antitrombina no plasma humano (150 µg/mL) (CONARD et al., 1983).

Os resultados obtidos sugerem que a antitrombina de *B. jararaca*, devido às suas características bioquímicas e imunológicas, apresenta semelhanças às antitrombinas descritas em outras espécies, confirmando a importante função deste inibidor na hemostasia das serpentes.

2 OBJETIVOS

O presente estudo teve objetivo geral avaliar a atividade anti-inflamatória da antitrombina da serpente *B. jararaca* sobre a resposta inflamatória aguda. Para isso, foram propostos como objetivos específicos:

- a. Investigar os efeitos do pré e pós-tratamento com a antitrombina da serpente *B. jararaca* sobre os principais eventos da resposta inflamatória aguda, sendo estes o desenvolvimento do edema, a migração celular e a interação leucócito-endotélio na microvasculatura.
- b. Analisar o conteúdo proteico do exsudato peritoneal de camundongos tratados e não tratados com antitrombina de *B. jararaca* através de eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE) e espectrometria de massas (MS) para a elucidação dos seu mecanismo de inibição.
- c. Clonar a antitrombina da serpente *B. jararaca*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 18-22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (protocolo nº 578/09).

3.1.2 Serpentes

Foram utilizadas serpentes *B. jararaca*, fornecidas pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (protocolo nº 578/09).

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta de sangue

As serpentes *B. jararaca* foram anestesiadas com pentobarbital (30 mg kg^{-1} , via subcutânea) e submetidas a laparotomia. O sangue foi coletado pela artéria aorta abdominal e imediatamente colocado em presença do anticoagulante citrato de sódio a 3,8% (p/v), na proporção de 9 partes de sangue e 1 parte de anticoagulante. O plasma foi obtido por centrifugação a 1200 g por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo em seguida armazenado a -70°C .

3.2.2 Isolamento e caracterização da antitrombina da serpente *B. jararaca* e da antitrombina humana

3.2.2.1 Cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin HP

a. Purificação da antitrombina de B. jararaca

A antitrombina do plasma da serpente *B. jararaca* foi purificada de acordo com Morais et al. (2009). O plasma de *B. jararaca* (35 mL por processo) foi diluído em tampão Tris 100 mM, ácido cítrico 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 (17,5 mL) e aplicado em coluna HiTrap Heparin HP (5 mL) (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), previamente equilibrada com tampão Tris 100 mM, ácido cítrico 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 em fluxo de 1 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com o mesmo tampão até atingir leituras de A_{280} inferiores a 0,2. A antitrombina foi então eluída através de um gradiente descontínuo de sal, utilizando-se o mesmo tampão contendo 2 M de NaCl. Foram coletadas frações de 5 mL. A dessalinização das amostras foi feita por diálise em água destilada durante 15 horas a 4 °C.

b. Purificação da antitrombina humana

A antitrombina do plasma humano foi purificada de acordo com Morais et al. (2009), com algumas modificações. O plasma humano (35 mL por processo) foi diluído em tampão Tris 100 mM, ácido cítrico 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 (17,5 mL) e aplicado em coluna HiTrap Heparin HP (5 mL) (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão Tris 100 mM, ácido cítrico 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 em fluxo de 1 mL/min. Em seguida, a coluna foi lavada com o mesmo tampão até atingir leituras de A_{280} inferiores a 0,2. A antitrombina foi então eluída através dois gradientes descontínuos de sal, utilizando-se o mesmo tampão contendo 500 mM e 2M de NaCl. Foram coletadas frações de 5 mL. A dessalinização das amostras foi feita por diálise em água destilada durante 15 horas a 4°C.

3.2.2.2 Dosagem de proteínas

a. Dosagem de proteínas por A_{280}

Durante o processo de purificação da antitrombina as proteínas de todas as frações foram quantificadas diretamente por A_{280} (STOSCHECK, 1990) em leitor de placas Epoch (Biotek, Winooski, Estados Unidos).

b. Dosagem de proteínas utilizando-se ácido bicinconínico

As frações de interesse foram quantificadas utilizando-se ácido bicinconínico, de acordo com Smith et al. (1985). Em uma placa de microtitulação, 10 μ L de amostra foram incubados com 200 μ L de mistura reativa, composta por 1 volume de solução de CuSO_4 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) e 49 volumes de solução de ácido bicinconínico (Sigma), por 25 segundos em microondas, em potência máxima. A leitura foi feita a 570 nm em leitor de placas Epoch (Biotek). O cálculo concentração de proteínas foi feito através de uma curva-padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (Sigma-Aldrich) como padrão.

3.2.2.3 Dosagem de antitrombina

A dosagem da antitrombina foi realizada de acordo com o método colorimétrico descrito pelo fabricante do substrato cromogênico S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA) (Chromogenix, Milão, Itália). Assim, foram incubados 100 μ L da amostra diluída 1:50 em tampão Tris-heparina (Tris 50 mM, NaCl 175 mM, EDTA 7,5 mM, heparina 3 U, pH 8,4) por 5 minutos a 37 °C e, em seguida, foram adicionados 25 μ L de trombina bovina (2 U/mL) (Sigma), incubando-se novamente a 37 °C por 30 segundos. Foram adicionados então 15 μ L de substrato cromogênico S-2238 (4 mM) e após 5 minutos a 37 °C, a leitura foi feita a 405 nm. O cálculo da dosagem de antitrombina foi realizado através de uma curva-padrão, utilizando-se plasma de *B. jararaca* ou humano como padrão.

3.2.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A purificação da antitrombina foi acompanhada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) a 10%, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Coomassie Blue R-350, de acordo com as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

3.2.2.5 Espectrometria de massas (*nanoESI-qTOF*)

Com o objetivo de confirmar a identidade da proteína isolada do plasma de *B. jararaca*, a antitrombina foi submetida à espectrometria de massas (*nanoESI-qTOF*) (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Estados Unidos).

Trinta microgramas de antitrombina purificada foram aplicados em SDS-PAGE 10%, segundo Laemmli (1970), o qual foi corado utilizando-se Coomassie Blue R-350 (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. A banda visualizada foi excisada do gel e digerida *in gel* com tripsina (10 ng/μL) (Sigma-Aldrich), segundo Shevchenko et al. (1996). Brevemente, o fragmento de gel excisado foi descorado com solução de metanol 25% e ácido acético 2,5% por 3 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foi desidratado com acetonitrila (100%) (Sigma-Aldrich) por 5 minutos, reduzido com DTT (10 mM) e alquilado com iodoacetamida (50 mM). O gel foi então reidratado com solução de bicarbonato de amônio 100 mM por 10 minutos e desidratado com acetonitrila (100%) por 5 minutos. Estes dois últimos passos foram repetidos e o gel foi desidratado mais uma vez com acetonitrila (100%) por 5 minutos. Em seguida o fragmento de gel foi incubado com tripsina 10 ng/μL (Sigma) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM por 30 minutos a 0 °C. O excesso de solução foi removido e foi adicionado bicarbonato de amônio 50 mM por 16 horas a 37 °C. Os peptídeos foram extraídos do gel através de uma incubação com solução de ácido fórmico 5% por 10 minutos e duas incubações com solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50% por 10 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram secos em concentrador (miVac – GeneVac, Ipswich Suffolk, Inglaterra) e armazenados a -20 °C até a realização da análise.

Os peptídeos foram então ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e uma alíquota (4,5 μL) da mistura de peptídeos foi separada através de RP-UPLC (*nanoAcquity UPLC*, Waters) utilizando-se uma coluna cromatográfica C₁₈ (100 μm x 100 mm) acoplada a um *nanoelectrospray* e a um espectrômetro de massas Q-ToF Ultima API (MicroMass/Waters), com fluxo de 600 nL/min. Foi realizado um gradiente de acetonitrila de 0 a 80% em ácido

fórmico 0,1% por 40 minutos. O instrumento foi operado em modo *top three*, em que os três picos mais intensos obtidos no primeiro espectro (MS) foram submetidos a uma segunda análise de massas (MS/MS). O espectro resultante foi processado utilizando-se o programa Mascot Distiller 2.2.1.0, 2008, Matrix Science (MassLynx V4.1) (Matrix Science Corporation, Torrance, Califórnia, Estados Unidos) e a identificação da proteína foi realizada através do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando-se o programa Mascot.

3.2.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória da antitrombina sobre o processo inflamatório agudo

3.2.3.1 Tratamento com a antitrombina

Os camundongos foram pré ou pós-tratados com uma única dose de 1 mg kg⁻¹ de antitrombina de *B. jararaca* ou humana, injetada pela veia caudal. Os animais do grupo controle foram tratados com o mesmo volume de solução salina nas mesmas condições experimentais. O pré-tratamento foi realizado 1 hora antes da injeção de carragenina (15 mg kg⁻¹) (Sigma-Aldrich) e o pós-tratamento foi realizado 1 hora após a injeção de carragenina.

3.2.3.2 Tratamento com a indometacina

Este tratamento foi realizado com a finalidade de avaliar o efeito da antitrombina associada à indometacina (Sigma-Aldrich), um inibidor não seletivo da síntese de prostaglandinas, na dose de 4 mg kg⁻¹, via endovenosa.

A indometacina foi administrada sozinha ou associada à antitrombina, 30 minutos antes ou após a injeção da antitrombina. Os animais do grupo controle foram tratados com o mesmo volume de solução salina nas mesmas condições experimentais.

3.2.3.3 Desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata foi induzido pela injeção de carragenina (15 mg kg^{-1}), diluída em $50 \mu\text{L}$ de solução salina estéril, no tecido subcutâneo do coxim plantar da pata posterior direita dos camundongos. Como controle, a pata contralateral foi injetada com $50 \mu\text{L}$ de solução salina estéril. O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da carragenina. Para cada tempo avaliado, o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata, calculada pela fórmula:

$$E\% = \frac{EF - EI}{EI} \times 100, \text{ sendo:}$$

E%: aumento percentual da espessura da pata;

EI: espessura inicial da pata;

EF: espessura da pata após os animais receberem os tratamentos.

O resultado final foi obtido pela diferença entre a espessura da pata injetada com carragenina e a espessura da pata controle, injetada com solução salina estéril.

3.2.3.4 Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina

A migração das células para a cavidade peritoneal foi induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina (15 mg kg^{-1}), diluída em $200 \mu\text{L}$ de solução salina estéril. Os animais do grupo controle foram tratados com o mesmo volume de solução salina estéril, nas mesmas condições experimentais. Após 4 horas da injeção de carragenina, os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e a cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS). Após a massagem do abdômen, o exsudato peritoneal foi coletado e as contagens total e diferencial das células foram realizadas.

A suspensão de células peritoneais foi diluída na proporção 1/2 (v/v) com líquido de Thoma e a contagem total de células foi determinada em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em lâminas preparadas em citocentrífuga Serocito 2400 (Fanem, São

Paulo, São Paulo, Brasil) coradas pelo método de Rosenfeld (1947). Um total de 100 células foi contado por microscopia óptica de luz, utilizando-se objetiva de imersão.

3.2.3.5 *Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster*

Para avaliar o efeito da antitrombina sobre a interação leucócito-endotélio da microcirculação do músculo cremaster, os animais foram tratados com antitrombina 1 hora antes da aplicação tópica de carragenina (15 mg kg^{-1}), diretamente sobre o músculo cremaster exposto. Como controle, os animais foram tratados com o mesmo volume de solução salina estéril. Para a exposição do músculo cremaster, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 0,4% e cloridrato de quetamina ($0,2 \text{ g kg}^{-1}$, via subcutânea) e com o auxílio de uma tesoura de ponta fina foi realizada a exposição do músculo cremaster e a secção do epidídimo para o desprendimento do músculo cremaster. Após esse procedimento, a preparação foi mantida aquecida em uma placa com temperatura controlada (37°C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular do músculo cremaster foi visualizado (BAEZ, 1973). Na microcirculação desse músculo foi selecionada, aleatoriamente, uma vênula pós-capilar com comprimento de $100 \mu\text{m}$ e diâmetro entre 20 e $40 \mu\text{m}$. Em cada segmento selecionado foram avaliados os fenômenos de *rolling* e adesão dos leucócitos ao endotélio, contados por um período de 1 minuto, após 10, 20 e 30 minutos da aplicação da carragenina. A migração das células para o tecido conjuntivo adjacente foi determinada pela contagem dos leucócitos presentes em até $50 \mu\text{m}$ de distância de cada lado do segmento analisado. Essa análise foi realizada em microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado a uma câmera (AxioCam ICc1, Carl Zeiss) para captação das imagens, em objetiva de 10x.

3.2.3.6 *Análises estatísticas*

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (S.E.M.). Para as análises estatísticas do desenvolvimento do edema de pata e da interação leucócito-endotélio foi realizado o teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Tukey. A migração celular foi analisada estatisticamente pelo ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. As análises estatísticas foram determinadas com o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

3.2.3.7 Dosagem de Proteínas

As proteínas presentes no sobrenadante do exsudato peritoneal, obtido por centrifugação a 130 g por 10 minutos a 4 °C, foram quantificadas utilizando-se ácido bicinonínico de acordo com Smith *et al.* (1985), conforme descrito na seção 3.2.2.2.b.

3.2.3.8 SDS-PAGE

O perfil proteico do exsudato peritoneal foi avaliado por meio de SDS-PAGE 10%, de acordo com Laemmli (1970), como descrito na seção 3.2.2.4.

3.2.3.9 Eletroforese bidimensional (2D SDS-PAGE)

a. Focalização isoeletrica (1ª dimensão)

Sessenta microgramas de proteínas do sobrenadante do exsudato peritoneal foram precipitados com acetona para a dessalinização e concentração da amostra. Assim, foi adicionada acetona gelada à amostra até uma concentração final de 80%. A amostra foi então mantida a -20 °C por 10 minutos e centrifugada a 6300 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi centrifugado novamente a 6300 g por 2 minutos com a tampa do microtubo aberta para evaporação da acetona.

O precipitado foi ressuspenso em 125 µL de *DeStreak Rehydration Solution* (GE Healthcare) e tampão IPG 3-10 0,9% (GE Healthcare). Em seguida, a amostra foi aplicada em uma fita Immobiline DryStrip de 7 cm com pH variando 3-10 (GE Healthcare). A fita foi então reidratada por 14 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, submetida à focalização isoeletrica (IEF) em IPGphor Manifold System (GE Healthcare), separando as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico. Inicialmente, foi aplicada uma voltagem constante de 100 V por 4 horas, seguida de uma voltagem de 300 V até acumular 200 volts hora (Vh), seguida de um gradiente de 300 a 1000 V até acumular 300 Vh e novamente um gradiente foi realizado até acumular 4000 Vh. Finalmente, foi aplicada uma voltagem constante de 5000 V até acumular 1250 Vh.

b. SDS-PAGE (2ª dimensão)

Antes de ser aplicada à segunda dimensão, as fitas foram equilibradas em 2,5 mL de tampão tris-HCl 50 mM, pH 8,8, contendo DTT 0,26 mM, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2% e azul de bromofenol 0,002%, sob agitação, durante 15 minutos. Após esse período, as fitas foram transferidas para uma segunda solução (composta pela mesma solução de equilíbrio), sem DTT, mas contendo iodoacetamida 0,54 mM e agitadas por 15 minutos. Na segunda dimensão, as fitas contendo as proteínas separadas pela IEF foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com 1,5 mm de espessura, de acordo com Laemmli (1970). As fitas foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida polimerizado, juntamente com um padrão proteico de massa molecular de 25 a 250 kDa, Dual Color Precision Plus (Bio-Rad, Filadélfia, Pensilvânia, Estados Unidos). Os géis de poliacrilamida foram corados utilizando-se Comassie Blue R-350 (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

c. Análise dos spots

A aquisição de imagem dos géis foi realizada utilizando-se o ImageScanner III (GE Healthcare). Após esse processo, os géis foram analisados pelo programa ImageMaster Platinum 7.0 (GE Healthcare), em que as imagens foram tratadas e os *spots* de interesse detectados, marcados e analisados. Os *spots* foram quantificados através do critério de % de volume, o qual é automaticamente calculado pelo programa ImageMaster Platinum 7.0.

d. Extração dos spots de interesse e identificação das proteínas

Após a identificação dos *spots* de interesse, os mesmos foram excisados dos géis bidimensionais e digeridos *in gel* com tripsina (10 ng/ μ L), de acordo com Shevchenko *et al.* (1996), como descrito na seção 3.2.2.5.

Os peptídeos foram então identificados através de espectrometria de massas. O espectro da sequência peptídica foi obtido através de nanocromatografia (Ultimate LC system, Dionex, LC-Packings) em linha com um espectrômetro de massas Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FTICR) Apex Qe 9.4 T (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos). A solução de peptídeos (1 μ L) foi dessalinizada e concentrada em coluna de pré-concentração C₁₈ (5 cm x 300 μ m) e fracionada em coluna Pepmap C₁₈ (15 cm x 75 μ m) em

fluxo de 200 nL/min. A eluição dos peptídeos foi realizada através de um gradiente de acetonitrila de 0 a 80% em ácido fórmico 0,1% por 130 minutos. A detecção foi realizada em modo positivo e o espectro resultante foi processado utilizando-se o programa DataAnalysis (Bruker Daltonics). A identificação das proteínas foi realizada através do banco de dados do NCBI utilizando-se o programa Mascot.

3.2.4 Ressonância plasmônica de superfície

3.2.4.1 Imobilização de heparina biotinizada ao sensor chip SA – streptavidin

A análise da interação entre a antitrombina humana ou de *B. jararaca* e a heparina foi realizada por meio de ressonância plasmônica de superfície (SPR) em sistema BIAcore T200 (GE Healthcare).

Inicialmente, a heparina biotinizada foi imobilizada em um *sensor chip* SA (GE Healthcare), que possui moléculas de estreptavidina ligadas covalentemente à sua superfície. A afinidade da estreptavidina pela biotina é extremamente alta, com uma constante de dissociação de aproximadamente 10^{-15} M. Assim, praticamente não ocorre a dissociação de ligantes biotinizados da superfície *do sensor chip* durante a análise (GE, 2005).

A heparina utilizada nesse procedimento possui cerca de 15% dos seus grupos SH₄ substituídos por biotina e foi produzida pelo grupo da Profa. Dra. Helena Bonciane Nader, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

A imobilização da heparina biotinizada (50 µg/mL) ao *sensor chip* SA foi realizada utilizando-se tampão HBS-EP (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM e surfactante P20 0,005%) (GE Healthcare), em fluxo de 5 µL/ min e tempo de contato de 300 segundos, a 25 °C. O volume total de heparina biotinizada utilizado na imobilização foi 58 µL (2,9 µg).

3.2.4.2 SPR

Os parâmetros cinéticos da interação entre a antitrombina humana ou de *B. jararaca* e a heparina foram determinados utilizando-se o *sensor chip* SA preparado como descrito na seção 3.2.4.1. Diferentes concentrações de antitrombina (1-300 µg/mL) diluída em tampão HBS-EP foram aplicadas por 300 segundos durante a fase de associação (tempo de contato) em fluxo constante de 5 µL/min, a 37 °C. A dissociação foi realizada por 900 segundos em fluxo constante de 5 µL/min. A superfície do *sensor chip* foi regenerada após a ligação da antitrombina utilizando-se NaCl 2M, em fluxo de 10 µL/min, durante 60 segundos. Os sensorgramas resultantes foram utilizados para o cálculo das constantes de afinidade pelo programa BIAEvaluation 4.1 (GE Healthcare).

3.2.5 Clonagem da antitrombina da serpente *B. jararaca*

3.2.5.1 Coleta do fígado de *B. jararaca* e extração do RNA total

Foi coletado o fígado de uma serpente *B. jararaca* anestesiada com pentobarbital (30 mg kg⁻¹, via subcutânea). Este fígado foi fragmentado (fragmentos de aproximadamente 100 mg) e colocado imediatamente em solução TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). Os fragmentos foram armazenados em nitrogênio líquido até a extração do RNA total, utilizado na construção da biblioteca de cDNA, segundo instruções do fabricante (Invitrogen).

3.2.5.2. Construção da biblioteca de cDNA do fígado de *B. jararaca*

A biblioteca de cDNA foi construída utilizando-se o *kit Smart PCR cDNA Synthesis* (Clontech, Mountain View, Califórnia, Estados Unidos). O RNA total foi isolado do fígado de *B. jararaca* e o mRNA foi transcrito para cDNA utilizando-se o *kit ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega, Fitchburg, Massachusetts, Estados Unidos) e ligado a adaptadores contendo o sítio para a enzima de restrição *Sfi*I em ambas as extremidades. O cDNA foi amplificado por PCR, digerido com enzima *Sfi*I e fracionado em coluna Chromaspin 400. Os cDNAs com tamanhos acima de 500 bp foram coletados e ligados em vetor λTriplEx2 utilizando-se o *kit Gigapack III Gold Packaging Extract* (Stratagene, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). A ligação foi misturada com 50 µL de extrato de

empacotamento de fago e incubada por 3 horas a 25 °C para obter a biblioteca de fagos. À biblioteca resultante foi adicionado top-ágar e em seguida esta foi espalhada em placas contendo meio LB-ágar contendo ampicilina (200 µg/mL) que foram incubadas por 12 horas a 37 °C. Os plasmídeos foram excisados do genoma do fago λ utilizando as cepas de bactéria *E. coli* XL1 blue.

3.2.5.3 Amplificação do fragmento de DNA por reação de polimerase em cadeia (PCR)

Oligonucleotídeos degenerados foram construídos com base em sequências de nucleotídeos internas conservadas entre as antitrombinas previamente descritas para outras espécies, as quais foram obtidas através do banco de dados do NCBI, e na sequência N-terminal da antitrombina de *B. jararaca* obtida por degradação de Edman (His-Glu-Ser-Ser-Val-Gln-Asp-Ile-Ile-Thr) (MORAIS et al., 2009) (tabela 3).

Tabela 3 – Oligonucleotídeos específicos construídos com base na sequência interna de nucleotídeos da antitrombina de *B. jararaca*.

BjAT1.Nter.fw [*] – 5'-CAYGARWSNWSNGTNCARGAYATHATHAC-3'
BjAT1.122-129fw – 5'-TTYTTYGCNAARYTNAAYTGYCG-3'
BjAT1.216-223fw – 5'- GTNAAYRCNATHHTAYTTYAARGG-3'
BjAT1.122-129rv ^{**} – 5'-CGRCARTTNARYTTNGCRAARAA-3'

^{*}forward
^{**}reverse

Utilizando-se os oligonucleotídeos degenerados construídos e, como molde, a biblioteca de cDNA de fígado da serpente *B. jararaca*, foi amplificado um fragmento de DNA interno do gene da antitrombina dessa serpente. O produto da PCR foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1%. Este fragmento de DNA foi clonado em vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega), seguindo as instruções do fabricante, e utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5-α por eletroporação.

3.2.5.4 Transformação de *E. coli* cepa DH5- α por eletroporação

As bactérias competentes foram retiradas do freezer -70 °C e mantidas no gelo por 15 minutos. Aos 60 μ L de células, foram adicionados aproximadamente 5 μ L da solução de ligação e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação. A eletroporação foi realizada utilizando os parâmetros: 2,5 kV, 200 Ohms e 25 μ F. Após a eletroporação foram adicionados 950 μ L de meio SOC ao material (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), o qual foi incubado por 45 minutos a 37 °C em termomixer (4500 g). As bactérias transformadas foram então plaqueadas em meio LB contendo ampicilina e mantidas a 37 °C por 15 horas.

3.2.5.5 Detecção dos clones positivos por PCR e mini-preparação plasmidial

Para detecção dos clones positivos, foram utilizados os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*, tampão para PCR, MgCl₂, dNTPs e Taq polimerase. Os clones positivos foram selecionados para extração de DNA plasmidial em pequena escala (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). O DNA purificado foi então utilizado em reação de sequenciamento.

3.2.5.6 Reação de sequenciamento do fragmento de DNA amplificado

O sequenciamento automático de DNA foi realizado utilizando-se o *kit DYEnamic ET* Terminator Cycle Sequencing* (Amersham – Biosciences, Uppsala, Suécia), seguindo as instruções do fabricante. O fragmento de DNA plasmidial foi sequenciado em sequenciador automático de DNA ABI-Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, Estados Unidos).

3.2.5.7 Clonagem do fragmento de DNA que codifica a antitrombina de *B. jararaca*

De posse da sequência interna de nucleotídeos da antitrombina, foram construídos dois oligonucleotídeos específicos (tabela 4).

Tabela 4 – Oligonucleotídeos específicos construídos com base na sequência interna de nucleotídeos da antitrombina de *B. jararaca*.

BjAT2fw [*]	– 5'-GATCAAATCCACTTCTTCTTCGCCAAAC-3'
BjAT2rv ^{**}	– 5'-GTTTGGCGAAGAAGAAGTGGATTTGATC-3'

^{*}*forward*
^{**}*reverse*

Estes oligonucleotídeos foram utilizados em reações de PCR contendo também os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* do vetor λTriplEx2 e a biblioteca de cDNA de fígado de serpente.

O produto da PCR foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1%. Este fragmento de DNA foi clonado em vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega), seguindo as instruções do fabricante, e utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5-α por eletroporação, como descrito na seção 3.2.5.4. Os clones positivos foram identificados conforme descrito na seção 3.2.5.5 e o sequenciamento do DNA foi realizado como descrito na seção 3.2.5.6.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento e caracterização da antitrombina da serpente *B. jararaca*

O plasma da serpente *B. jararaca* (35 mL) foi inicialmente diluído em tampão Tris 100 mM, citrato de sódio 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 (17,5 mL) e submetido à cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin HP. A figura 7 mostra o perfil cromatográfico do processo de purificação.

Figura 7 – Cromatografia de afinidade do processo de purificação da antitrombina do plasma da serpente *B. jararaca*.

O plasma de *B. jararaca* (35 mL) foi diluído em tampão Tris 100 mM, citrato de sódio 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 (17,5 mL) e aplicado em coluna HiTrap Heparin HP (5 mL) (GE Healthcare) previamente equilibrada com o mesmo tampão contendo 500 mM de NaCl, em fluxo de 1 mL/min. A eluição da antitrombina foi realizada através de um gradiente descontínuo de sal, utilizando-se o mesmo tampão de equilíbrio contendo 2 M de NaCl. O processo cromatográfico foi acompanhado por leitura A_{280} . (-) frações com atividade inibitória sobre a trombina bovina.

A dosagem da antitrombina foi realizada através de ensaio colorimétrico, utilizando-se o substrato cromogênico S-2238, conforme descrito na seção 3.2.2.3. As frações contendo atividade inibitória sobre a trombina bovina foram então reunidas, dialisadas contra água destilada e aliquotadas.

A purificação da antitrombina foi acompanhada por SDS-PAGE 10%, com e sem redução por β -mercaptoetanol. Pode-se observar na figura 8 que, após a cromatografia de afinidade, a antitrombina está livre de contaminantes, apresentando uma única banda de aproximadamente 61 kDa, tanto na ausência quanto na presença de β -mercaptoetanol.

Figura 8 – SDS-PAGE (10%) da antitrombina isolada do plasma da serpente *B. jararaca*.

Antitrombina de *B. jararaca* em condições não reduzidas (1) e reduzidas (2) e marcador de massa molecular (3) (Dual Color Precision Plus – BioRad) (9 μ L). As proteínas (3 μ g) foram coradas com Coomassie Blue R-350 (GE Healthcare).

A antitrombina isolada do plasma da serpente *B. jararaca* foi submetida à análise por espectrometria de massas (nanoESI-qTOF). Os peptídeos identificados confirmaram sua identidade e apresentaram similaridade a antitrombina de camundongo (*Mus musculus*), avestruz (*Struthio camelus*) e tartaruga (*Chelydra serpentina*) (tabela 5).

Tabela 5 – Peptídeos identificados por espectrometria de massas (nanoESI-qTOF) resultantes da tripsinização da antitrombina isolada do plasma da serpente *B. jararaca*.

Proteína [organismo]	Score	Número de acesso *	Sequências peptídicas
Precursor de antitrombina [<i>Mus musculus</i>]	269	gi 18252782	TSDQIHFFFAK DIPVNPLCIYR AFLEVNEEGSEAAASTSVVITGR
Antitrombina [<i>Struthio camelus</i>]	242	gi 18140913	LWPLNFK SSELVSANR TSDQIHFFFAK
Antitrombina [<i>Chelydra serpentina</i>]	130	gi 18140915	LWPLNFK SSELVSANR VWELSKANTR

*Obtido no site www.ncbi.nlm.nih.gov.

As sequências peptídicas obtidas foram então alinhadas à sequência de peptídeos da antitrombina humana, como podemos observar na figura 9.

Figura 9 – Sequências peptídicas da antitrombina isolada de *B.jararaca* comparadas à sequência da antitrombina humana.

ATHum	HGSPVDICTAKPRDIPMNPNCIYRSPEKKATEDEGSEQKIPEATNRRVWELSKANSRFAT	60
ATBj	-----DIPVNPLCIYR-----VWELSKANTR---	21
	;*:;*****;*	
ATHum	TFYQHLADSKNDNDNIFLSPLSISTAFAMTKLGACNDTLQQLMEVFKFDITSEKTSQDIH	120
ATBj	-----TSDQIH	27

ATHum	FFFAKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDKSLTFNETYQDISELVYGAKLQPLDFKENAE	180
ATBj	FFFAK-----SSELV SANRLW-----PLNF-----	47
	***** **;*****; **;*	
ATHum	QSRAAINKWVSNKTEGRITDVIPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSFKSPENTRKELFY	240
ATBj	-----	
ATHum	KADGESCSASMMYQEGKFRYRRVAEGTQVLELPFKGDDITMVLILPKPEKSLAKVEKELT	300
ATBj	-----	
ATHum	PEVLQEWLDELEEMMLVVHMPRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDLFSPEKSKLPGIVAEGRD	360
ATBj	-----	
ATHum	DLYVSDAFHKAFLEVNEEGSEAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTI	420
ATBj	-----KAFLEVNEEGSEAAASTSVITGR-----	71
	*****;***;*	
ATHum	IFMGRVANPCVK	432
ATBj	-----	

(*) Resíduos idênticos e (:) substituições conservadas. As sequências peptídicas da antitrombina de *B.jararaca* foram obtidas por espectrometria de massas (nanoESI-qTOF).

4.2 Isolamento e caracterização da antitrombina humana

O plasma humano (35 mL) foi inicialmente diluído em tampão Tris 100 mM, citrato de sódio 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 (17,5 mL) e submetido à cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Heparin HP. A figura 10 mostra o perfil cromatográfico do processo de purificação.

Figura 10 – Cromatografia de afinidade do processo de purificação da antitrombina do plasma humano.

O plasma humano (35 mL) foi diluído em tampão Tris 100 mM, citrato de sódio 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,4 (17,5 mL) e aplicado em coluna HiTrap Heparin HP (5 mL) (GE Healthcare) previamente equilibrada com o mesmo tampão contendo 250 mM de NaCl, em fluxo de 1 mL/min. A eluição das proteínas foi realizada através de dois gradientes descontínuos de sal, utilizando-se o mesmo tampão de equilíbrio contendo 500 mM e 2 M de NaCl. O processo cromatográfico foi acompanhado por leitura A_{280} . (-) frações com atividade inibitória sobre a trombina bovina.

A dosagem da antitrombina foi realizada através de ensaio colorimétrico, utilizando-se o substrato cromogênico S-2238, conforme descrito na seção 3.2.2.3. As frações contendo atividade inibitória sobre a trombina bovina foram então reunidas, dialisadas contra água destilada e aliquotadas.

A purificação da antitrombina foi acompanhada por SDS-PAGE 10%, com e sem redução por β -mercaptoetanol. Na figura 11 pode-se observar que após o processo cromatográfico a antitrombina está livre de contaminantes e apresenta uma única banda de aproximadamente 58 kDa, tanto na ausência quanto na presença de β -mercaptoetanol. Na

ausência do agente redutor, podem-se observar algumas bandas de alta massa molecular (figura 11, canaleta 1), as quais podem ser decorrentes da presença de agregados proteicos formados por moléculas de antitrombina.

Figura 11 – SDS-PAGE (10%) da antitrombina isolada do plasma humano.

Antitrombina humana em condições não reduzidas (1) e reduzidas (2) e marcador de massa molecular (3) (Dual Color Precision Plus – BioRad) (9 μ L). As proteínas (3 μ g) foram coradas com Coomassie Blue R-350 (GE Healthcare).

4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória da antitrombina sobre o processo inflamatório agudo

4.3.1 Desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina

4.3.1.1 Pré-tratamento com a antitrombina de *B. jararaca*

O pré-tratamento de 1 hora com a antitrombina de *B. jararaca* reduziu o edema de pata significativamente quando comparado ao grupo tratado com solução salina (tabela 6 e figura 12). Esta redução foi observada nos intervalos de tempo de 4, 6, 24 e 48 horas após a injeção de carragenina. A administração de indometacina 30 minutos antes da injeção de carragenina

bloqueou a ação anti-inflamatória da antitrombina nos intervalos de tempo avaliados, exceto no intervalo de 4 horas.

Tabela 6 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

Grupo (n = 5)	Porcentagem de edema						
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
AT+sal+cg	51,28±1,45	56,27±0,61*	56,27±0,62*	37,35±0,79*	25,32±2,03*	28,54±2,20	21,03±4,32
AT+sal+sal	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Sal+sal+cg	58,79±3,45	69,49±5,15	70,21±5,65	51,80±3,66	52,47±1,41	33,87±5,44	30,92±2,79
Sal+sal+sal	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Sal+indo+cg	46,45±5,43	50,81±4,07*	64,04±1,14*	37,79±2,78*	50,05±0,96	47,87±5,26	39,61±3,78
Sal+indo+sal	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
AT+indo+sal	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
AT+indo+cg	53,80±4,80	59,69±1,35*	61,39±3,30	33,74±1,43	47,29±7,1	30,81±7,10	29,87±5,20

Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 50 µL de solução salina) ou solução salina (50 µL). A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. A indometacina (4 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) foi administrada 30 minutos antes da injeção de carragenina ou de solução salina (controle). O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da carragenina. Os resultados foram calculados através da diferença de espessura entre as duas patas e o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 5 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

Figura 12 – Efeito de pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($100 \mu\text{L}$) 1 hora antes da injeção intraplantar de carragenina (15 mg kg^{-1} em $50 \mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($50 \mu\text{L}$). A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. A indometacina (4 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) foi administrada 30 minutos antes da injeção de carragenina ou de solução salina (controle). O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da carragenina. Os resultados foram calculados através da diferença de espessura entre as duas patas e o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata. Os resultados são expressos como a média $\pm$ erro padrão ($n = 5$ animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

* $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

O pré-tratamento com antitrombina inibiu a formação do edema em 19,0% em 4 horas (AT+sal+cg: $56,27 \pm 0,61$; sal+sal+cg: $69,49 \pm 5,15$; $p < 0,05$), 20% em 6 horas (AT+sal+cg: $56,27 \pm 0,62$; sal+sal+cg: $70,21 \pm 5,65$; $p < 0,05$), 28% em 24 horas (AT+sal+cg: $37,35 \pm 0,79$; sal+sal+cg: $51,80 \pm 3,66$; $p < 0,05$) e 51,7% em 48 horas (AT+sal+cg: $25,32 \pm 2,03$; sal+sal+cg: $52,47 \pm 1,41$; $p < 0,05$).

Não foi observada inibição da formação do edema nos intervalos de tempo de 2 (AT+sal+cg: $51,28 \pm 1,45$; sal+sal+cg: $58,79 \pm 3,45$; $p > 0,05$), 72 (AT+sal+cg: $28,54 \pm 2,20$; sal+sal+cg: $33,87 \pm 5,44$; $p > 0,05$) e 96 horas (AT+sal+cg: $21,03 \pm 4,32$; sal+sal+cg: $30,92 \pm 2,79$; $p > 0,05$).

Além disso, também não foi observada inibição quando a indometacina foi administrada 30 minutos antes da injeção de carragenina nos intervalos de tempo de 2 (AT+indo+cg: $53,80 \pm 4,80$; sal+sal+cg: $58,79 \pm 3,45$; $p > 0,05$), 6 (AT+indo+cg: $61,39 \pm 3,30$; sal+sal+cg: $70,21 \pm 5,65$; $p > 0,05$), 24 (AT+indo+cg: $33,74 \pm 1,43$; sal+sal+cg: $51,80 \pm 3,66$; $p > 0,05$) e 48 (AT+indo+cg: $47,29 \pm 7,1$; sal+sal+cg: $52,47 \pm 1,41$; $p > 0,05$).

4.3.1.2 Pós-tratamento com a antitrombina de B. jararaca

O pós-tratamento de 1 hora com a antitrombina de *B. jararaca* reduziu o edema de pata significativamente quando comparado ao grupo tratado com solução salina (tabela 7 e figura 13). Esta redução foi observada em todos os intervalos de tempo avaliados após a injeção de carragenina (2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas). A administração de indometacina 30 minutos após a injeção de carragenina bloqueou a ação anti-inflamatória da antitrombina nos intervalos de tempo avaliados, exceto no intervalo de 2 horas.

Tabela 7 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

Grupo (n = 5)	Porcentagem de edema						
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Cg+sal+AT	24,77±2,88*	30,67±3,80*	19,86±2,85*	9,75±1,89*	16,54±2,81*	12,80±1,95*	7,64±2,15*
Sal+sal+AT	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Cg+sal+sal	38,12±1,49	42,64±2,02	32,96±1,91	23,31±1,44	30,37±1,74	22,44±2,18	19,39±2,15
Sal+sal+sal	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Cg+indo+sal	34,40±1,61	36,71±1,94	27,68±1,35	22,48±0,69	25,61±1,65	18,47±0,82	14,62±1,47
Sal+indo+sal	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Sal+indo+AT	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Cg+indo+AT	29,15±2,76*	40,26±2,00	29,12±2,23	18,66±2,01	26,71±1,51	21,65±2,22	16,41±1,48

Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora após a injeção intraplantar de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 50 µL de solução salina) ou solução salina (50 µL). A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. A indometacina (4 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) foi administrada 30 minutos após a injeção de carragenina ou de solução salina (controle). O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da carragenina. Os resultados foram calculados através da diferença de espessura entre as duas patas e o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 5 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (cg+sal+sal).

Figura 13 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na formação do edema de pata induzido por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($100 \mu\text{L}$) 1 hora após a injeção intraplantar de carragenina (15 mg kg^{-1} em $50 \mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($50 \mu\text{L}$). A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. A indometacina (4 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) foi administrada 30 minutos após a injeção de carragenina ou de solução salina (controle). O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da carragenina. Os resultados foram calculados através da diferença de espessura entre as duas patas e o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata. Os resultados são expressos como a média $\pm$ erro padrão ($n = 5$ animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

* $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

O pós-tratamento com antitrombina de *B. jararaca* inibiu a formação do edema em 35% em 2 horas (cg+sal+AT: $24,77 \pm 2,88$; cg+sal+sal: $38,12 \pm 1,49$; $p < 0,05$), 28,1% em 4 horas (cg+sal+AT: $30,67 \pm 3,80$; cg+sal+sal: $42,64 \pm 2,02$; $p < 0,05$), 39,8% em 6 horas (cg+sal+AT: $19,86 \pm 2,85$; cg+sal+sal: $32,96 \pm 1,21$; $p < 0,05$), 58,2% em 24 horas (cg+sal+AT: $9,75 \pm 1,89$; cg+sal+sal: $22,31 \pm 1,44$; $p < 0,05$), 45,5% em 48 horas (cg+sal+AT: $16,54 \pm 2,81$; cg+sal+sal: $30,37 \pm 1,74$; $p < 0,05$), 43% em 72 horas (cg+sal+AT: $12,80 \pm 1,95$; cg+sal+sal: $22,44 \pm 2,18$; $p < 0,05$) e 60,6% em 96 horas (cg+sal+AT: $7,64 \pm 2,15$; cg+sal+sal: $19,39 \pm 2,15$; $p < 0,05$).

Não foi observada inibição da formação do edema quando a indometacina foi administrada 30 minutos após a injeção de carragenina nos intervalos de tempo de 4 (cg+indo+AT: $40,26 \pm 2,00$; cg+sal+sal: $42,64 \pm 2,02$; $p > 0,05$), 6 (cg+indo+AT: $29,12 \pm 2,23$; cg+sal+sal: $32,96 \pm 1,21$; $p > 0,05$), 24 (cg+indo+AT: $18,66 \pm 2,01$; cg+sal+sal: $22,31 \pm 1,44$; $p > 0,05$), 48 (cg+indo+AT: $26,71 \pm 1,51$; cg+sal+sal: $30,37 \pm 1,74$; $p > 0,05$), 72 (cg+indo+AT: $21,65 \pm 2,22$; cg+sal+sal: $22,44 \pm 2,18$; $p > 0,05$) e 96 horas (cg+indo+AT: $16,41 \pm 1,48$; cg+sal+sal: $19,39 \pm 2,15$; $p > 0,05$).

4.3.1.3 Pós-tratamento com a antitrombina humana

O pós-tratamento de 1 hora com a antitrombina humana reduziu o edema de pata significativamente quando comparado ao grupo tratado com solução salina nos intervalos de tempo de 4 e 6 horas após a injeção de carragenina (tabela 8 e figura 14).

Tabela 8 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina humana na formação do edema de pata induzido por carragenina.

Grupo (n = 5)	Porcentagem de edema						
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Cg + sal	44,05±3,67	49,58±3,75	48,24±7,85	16,43±4,54	26,79±4,71	23,78±2,55	20,39±3,28
Cg + AThum	36,13±2,00	26,17±6,31*	20,99±3,33*	14,56±2,41	15,71±7,16	19,78±4,42	16,14±3,50
Sal + AThum	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
Sal + sal	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*

Os animais foram tratados com antitrombina humana (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora após a injeção intraplantar de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 50 µL de solução salina) ou solução salina (50 µL). A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da carragenina. Os resultados foram calculados através da diferença de espessura entre as duas patas e o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 5 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AThum) antitrombina humana e (cg) carragenina.

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (cg+sal).

Figura 14 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina humana na formação do edema de pata induzido por carragenina.

Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora após a injeção intraplantar de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 50 µL de solução salina) ou solução salina (50 µL). A pata contralateral recebeu o mesmo volume de solução salina. O aumento da espessura da pata foi determinado com o auxílio de um paquímetro, antes e 2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da carragenina. Os resultados foram calculados através da diferença de espessura entre as duas patas e o edema foi expresso em porcentagem de aumento da espessura da pata. Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 5 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AThum) antitrombina humana e (cg) carragenina.

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (cg+sal).

O pós-tratamento com antitrombina humana inibiu a formação do edema em 47,2% em 4 horas (cg+AThum: 26,17±6,31; cg+sal: 49,58±3,75; p<0,05) e 56,5% em 6 horas (cg+AThum: 20,99±3,33; cg+sal: 48,24±7,85; p<0,05).

Não foi observada inibição da formação nos intervalos de tempo de 2 (cg+AThum: 36,13±2,00; cg+sal: 44,05±3,67; p>0,05), 24 (cg+AThum: 14,56±2,41; cg+sal: 16,43±4,54; p>0,05), 48 (cg+AThum: 15,71±7,16; cg+sal: 26,79±4,71; p>0,05), 72 (cg+AThum: 19,78±4,42; cg+sal: 23,78±2,55; p>0,05) e 96 horas (cg+AThum: 16,14±3,50; cg+sal: 20,39±3,28; p>0,05).

4.3.2 Migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina

4.3.2.1 Pré-tratamento com a antitrombina de *B. jararaca*

Após 4 horas da injeção intraperitoneal da carragenina foi verificado um aumento no influxo de células para a cavidade peritoneal. O pré-tratamento dos animais com antitrombina de *B. jararaca* diminuiu significativamente o influxo de células para a cavidade peritoneal induzido por carragenina quando comparado ao grupo controle (pré-tratado com solução salina) (tabela 9 e figura 15). A diminuição da migração celular dos animais pré-tratados com antitrombina de *B. jararaca* foi de 48% (AT+sal+cg: $2,53 \pm 0,46$; sal+sal+cg: $4,86 \pm 0,64$; $p < 0,05$).

Tabela 9 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

Grupo (n = 6)	Contagem total de células (x 10^6 mL ⁻¹)	Contagem de células mononucleares (x 10^6 mL ⁻¹)	Contagem de células polimorfonucleares (x 10^6 mL ⁻¹)
AT+sal+cg	$2,53 \pm 0,46^*$	$1,96 \pm 0,32^*$	$1,01 \pm 0,50^*$
AT+sal+sal	$1,03 \pm 0,24^*$	$1,17 \pm 0,32^*$	$0,16 \pm 0,04^*$
Sal+sal+cg	$4,86 \pm 0,64$	$0,97 \pm 0,19$	$3,88 \pm 0,59$
Sal+sal+sal	$1,88 \pm 0,24^*$	$1,74 \pm 0,25^*$	$0,58 \pm 0,27^*$
Sal+indo+cg	$1,73 \pm 0,45^*$	$0,50 \pm 0,12^*$	$2,02 \pm 0,48^*$
Sal+indo+sal	$1,13 \pm 0,09^*$	$0,93 \pm 0,08^*$	$0,19 \pm 0,01^*$
AT+indo+sal	$1,20 \pm 0,07^*$	$1,16 \pm 0,17^*$	$0,24 \pm 0,04^*$
AT+indo+cg	$3,40 \pm 0,51$	$0,67 \pm 0,11$	$2,73 \pm 0,40$

As contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal foram realizadas 4 horas após a injeção intraperitoneal de carragenina (15 mg kg^{-1} em $200 \mu\text{L}$ de solução salina). Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($100 \mu\text{L}$) 1 hora antes da injeção intraperitoneal de carragenina ou solução salina ($200 \mu\text{L}$). A indometacina (4 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) foi administrada 30 minutos antes da injeção da carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média $\pm$ erro padrão (n = 6 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

* $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

Figura 15 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

As contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal foram realizadas 4 horas após a injeção intraperitoneal de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 200 µL de solução salina). Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora antes da injeção intraperitoneal de carragenina ou solução salina (200 µL). A indometacina (4 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) foi administrada 30 minutos antes da injeção da carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 6 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

Também foi observada uma diminuição do número de células polimorfonucleares nos animais tratados com a antitrombina desta serpente (tabela 9 e figura 16). A diminuição da migração de células polimorfonucleares dos animais pré-tratados com antitrombina de *B. jararaca* foi de 74% (AT+sal+cg: 1,01±0,50; sal+sal+cg: 3,88±0,59; p<0,05).

Figura 16 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

As contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal foram realizadas 4 horas após a injeção intraperitoneal de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 200 µL de solução salina). Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora antes da injeção intraperitoneal de carragenina ou solução salina (200 µL). A indometacina (4 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) foi administrada 30 minutos antes da injeção da carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 6 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina. *p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

A administração de indometacina 30 minutos antes da injeção de carragenina bloqueou a ação anti-inflamatória da antitrombina (tabela 9 e figuras 15 e 16), tanto em relação ao número total de células (AT+indo+cg: 3,40±0,51; sal+sal+cg: 4,86±0,64; p>0,05) quanto em relação ao número de células polimorfonucleares migradas (AT+indo+cg: 2,73±0,40; sal+sal+cg: 3,88±0,59; p>0,05).

4.3.2.2 Pós-tratamento com a antitrombina de *B. jararaca*

O pós-tratamento dos animais com antitrombina de *B. jararaca* diminuiu significativamente o influxo de células para a cavidade peritoneal induzido por carragenina quando comparado ao grupo controle (pós-tratado com solução salina) (tabela 10 e figura 17). A diminuição da migração celular dos animais pós-tratados com antitrombina de *B. jararaca* foi de 34 % (cg+sal+AT: $1,72 \pm 0,10$; cg+sal+sal: $2,67 \pm 0,10$; $p < 0,05$).

Tabela 10 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

Grupo (n = 6)	Contagem total de células (x 10^6 mL ⁻¹)	Contagem de células mononucleares (x 10^6 mL ⁻¹)	Contagem de células polimorfonucleares (x 10^6 mL ⁻¹)
Cg+sal+AT	$1,71 \pm 0,10^*$	$0,53 \pm 0,07$	$1,19 \pm 0,10^*$
Sal+sal+AT	$1,02 \pm 0,08^*$	$0,49 \pm 0,06$	$0,53 \pm 0,04^*$
Cg+sal+sal	$2,67 \pm 0,10$	$0,59 \pm 0,04$	$2,08 \pm 0,07$
Sal+sal+sal	$1,20 \pm 0,10^*$	$0,55 \pm 0,05$	$0,65 \pm 0,08^*$
Cg+indo+sal	$1,56 \pm 0,10^*$	$0,54 \pm 0,05$	$0,85 \pm 0,10^*$
Sal+indo+sal	$1,48 \pm 0,06^*$	$0,80 \pm 0,07$	$0,53 \pm 0,08^*$
Sal+indo+AT	$2,55 \pm 0,12^*$	$0,83 \pm 0,06$	$1,86 \pm 0,06^*$
Cg+indo+AT	$1,36 \pm 0,12$	$0,90 \pm 0,15$	$0,73 \pm 0,12$

As contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal foram realizadas 4 horas após a injeção intraperitoneal de carragenina (15 mg kg^{-1} em $200 \mu\text{L}$ de solução salina). Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($100 \mu\text{L}$) 1 hora após a injeção intraperitoneal de carragenina ou solução salina ($200 \mu\text{L}$). A indometacina (4 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) foi administrada 30 minutos após a injeção da carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média $\pm$ erro padrão (n = 6 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

* $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (cg+sal+sal).

Figura 17 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

As contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal foram realizadas 4 horas após a injeção intraperitoneal de carragenina (15 mg kg^{-1} em $200 \mu\text{L}$ de solução salina). Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($100 \mu\text{L}$) 1 hora após a injeção intraperitoneal de carragenina ou solução salina ($200 \mu\text{L}$). A indometacina (4 mg kg^{-1} em $100 \mu\text{L}$ de solução salina) foi administrada 30 minutos após a injeção da carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média $\pm$ erro padrão ($n = 6$ animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

* $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (cg+sal+sal).

Também foi observada uma diminuição do número de células polimorfonucleares nos animais tratados com a antitrombina desta serpente (tabela 8 e figura 18). A diminuição da migração de células polimorfonucleares dos animais pós-tratados com antitrombina de *B. jararaca* foi de 43% (cg+sal+AT: $1,19 \pm 0,10$; cg+sal+sal: $2,08 \pm 0,07$; $p < 0,05$).

Figura 18 – Efeito do pós-tratamento de 1 hora com antitrombina da serpente *B. jararaca* na migração celular para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

As contagens total e diferencial de células presentes no exsudato peritoneal foram realizadas 4 horas após a injeção intraperitoneal de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 200 µL de solução salina). Os animais foram tratados com antitrombina (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora após a injeção intraperitoneal de carragenina ou solução salina (200 µL). A indometacina (4 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) foi administrada 30 minutos após a injeção da carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 6 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (cg+sal+sal).

A administração de indometacina 30 minutos após a injeção de carragenina bloqueou a ação anti-inflamatória da antitrombina (tabela 10 e figuras 17 e 18), tanto em relação ao número total de células (cg+indo+AT: 2,55±0,12; cg+sal+sal: 2,67±0,10; p>0,05) quanto ao número de células polimorfonucleares migradas (cg+indo+AT: 1,86±0,06; cg+sal+sal: 2,08±0,07; p>0,05).

4.3.3 Interação leucócito-endotélio na microcirculação do músculo cremaster

A interação leucócito-endotélio foi determinada através da avaliação dos fenômenos de *rolling* e adesão dos leucócitos ao endotélio, 10, 20 e 30 minutos após a aplicação tópica da carragenina.

O pré-tratamento de 1 hora com a antitrombina de *B. jararaca* reduziu significativamente o *rolling* dos leucócitos quando comparado ao grupo tratado com solução salina em todos os intervalos de tempo avaliados (10, 20 e 30 minutos após a aplicação de

carragenina) (tabela 11 e figura 19). Não foram observadas células aderidas ao endotélio nos grupos experimentais avaliados.

Tabela 11 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina de *B. jararaca* na interação leucócito-endotélio induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

Grupo (n = 5)	Número de leucócitos rolantes (células/minuto)		
	10 minutos	20 minutos	30 minutos
Sal+sal+sal	20±2,45*	16±1,36*	18±0,90*
Sal+sal+cg	73±2,38	44±4,00	28±3,86
AT+sal+cg	25±4,45*	11±0,34*	11±0,59*
AT+sal+sal	50±1,48	48±3,78	37±0,90
AT+indo+cg	98±1,56	86±2,94	82±2,90
Sal+indo+sal	26±1,02*	20±0,34*	25±2,23
AT+indo+sal	76±3,78	45±0,34	41±0,90
Sal+indo+cg	37±3,02*	26±0,90*	18±2,12

A interação leucócito-endotélio foi avaliada 10, 20 e 30 minutos após a aplicação de carragenina (15 mg kg⁻¹ em 30 µL de solução salina) sobre o músculo cremaster. Os animais foram tratados com antitrombina de *B. jararaca* (1 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) ou solução salina (100 µL) 1 hora antes da aplicação tópica de carragenina ou solução salina (30 µL). A indometacina (4 mg kg⁻¹ em 100 µL de solução salina) foi administrada 30 minutos antes da aplicação de carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média ± erro padrão (n = 5 animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

Figura 19 – Efeito do pré-tratamento de 1 hora com antitrombina de *B. jararaca* na interação leucócito-endotélio induzida por carragenina e ação da indometacina sobre a atividade anti-inflamatória da antitrombina.

A interação leucócito-endotélio foi avaliada 10, 20 e 30 minutos após a aplicação de carragenina (15 mg kg^{-1} em $30 \text{ }\mu\text{L}$ de solução salina) sobre o músculo cremaster. Os animais foram tratados com antitrombina de *B. jararaca* (1 mg kg^{-1} em $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solução salina) ou solução salina ($100 \text{ }\mu\text{L}$) 1 hora antes da aplicação tópica de carragenina ou solução salina ($30 \text{ }\mu\text{L}$). A indometacina (4 mg kg^{-1} em $100 \text{ }\mu\text{L}$ de solução salina) foi administrada 30 minutos antes da aplicação de carragenina ou de solução salina (controle). Os resultados são expressos como a média $\pm$ erro padrão ($n = 5$ animais por grupo). (Sal) solução salina, (AT) antitrombina, (cg) carragenina e (indo) indometacina.

* $p < 0,05$, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

A diminuição do *rolling* dos leucócitos nos animais pré-tratados com antitrombina de *B. jararaca* foi de 65,8% (AT+sal+cg: $25 \pm 4,45$; sal+sal+cg: $73 \pm 2,38$; $p < 0,05$), 75% (AT+sal+cg: $11 \pm 0,34$; sal+sal+cg: $44 \pm 4,00$; $p < 0,05$) e 60,7% (AT+sal+cg: $11 \pm 0,59$; sal+sal+cg: $28 \pm 3,86$; $p < 0,05$) após 10, 20 e 30 minutos da aplicação tópica de carragenina, respectivamente.

A administração de indometacina 30 minutos antes da aplicação tópica de carragenina bloqueou a ação anti-inflamatória da antitrombina nos três intervalos de tempo avaliados (tabela 11 e figura 19), 10 (AT+indo+cg: $98 \pm 1,56$; sal+sal+cg: $73 \pm 2,38$; $p > 0,05$), 20 (AT+indo+cg: $86 \pm 2,94$; sal+sal+cg: $44 \pm 4,00$; $p > 0,05$) e 30 minutos (AT+indo+cg: $82 \pm 2,90$; sal+sal+cg: $28 \pm 3,86$; $p > 0,05$).

4.3.4 Análise proteômica do exsudato peritoneal

4.3.4.1 Dosagem de proteínas

O conteúdo proteico do sobrenadante do exsudato peritoneal de três espécimes dos grupos “salina + salina” (sal+sal), “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT), pós-tratados com antitrombina de *B. jararaca* ou com solução salina (controle), foi determinado utilizando-se ácido bicinconínico, conforme descrito na seção 3.2.2.2b (tabela 12 e figura 20).

Tabela 12 – Concentração proteica do sobrenadante do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos “salina + salina” (sal+sal), “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).

Grupos	Concentração proteica (mg/mL)	Média
Sal + sal 1	0,495	0,813±0,276*
Sal + sal 2	0,949	
Sal + sal 3	0,994	
Cg + sal 1	2,932	2,361±0,494
Cg + sal 2	2,077	
Cg + sal 3	2,075	
Cg + AT 1	1,062	1,315±0,341*
Cg + AT 2	1,180	
Cg + AT 3	1,702	

A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se ácido bicinconínico de acordo com Smith *et al.* (1985). O cálculo concentração de proteínas foi feito através de uma curva-padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (Sigma) como padrão. Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão (n = 3 animais por grupo).

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

Figura 20 – Concentração proteica do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos “salina + salina” (sal+sal), “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).

A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se ácido bicinonínico de acordo com Smith *et al.* (1985). O cálculo concentração de proteínas foi feito através de uma curva-padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (Sigma) como padrão. Os resultados são expressos como a média $\pm$ desvio padrão (n = 3 animais por grupo).

*p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

4.3.4.2 SDS-PAGE

Os sobrenadantes dos exsudatos peritoneais foram analisados por meio de SDS-PAGE 10%, com e sem redução por β -mercaptoetanol, como podemos observar na figura 21.

Figura 21 – SDS-PAGE (10%) do sobrenadante do exsudato peritoneal de camundongos.

Amostras em condições não reduzidas (a) e reduzidas (b). Canaletas (1 a 3) grupo “salina + salina”, (4 a 6) grupo “carragenina + salina”, (7 a 9) grupo “carragenina + antitrombina” e (10) marcador de massa molecular Dual Color Precision Plus (Biorad) (9 μ L). As proteínas (5 μ g) foram coradas com Coomassie R-350 (GE Healthcare). As setas indicam bandas que estão presentes em intensidades variáveis entre os grupos experimentais.

Na figura 21, é possível observar que as amostras dos diferentes grupos analisados apresentam perfis eletroforéticos semelhantes. Entretanto, algumas bandas estão presentes em intensidades variáveis entre os grupos experimentais, como a banda de aproximadamente 66 kDa, correspondente à albumina (indicada pelas setas), que apresenta maior intensidade no grupo tratado com antitrombina (cg+AT).

4.3.4.3 2D SDS-PAGE

O conteúdo proteico do sobrenadante do exsudato peritoneal de três espécimes dos grupos “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”, pós-tratados com antitrombina de *B. jararaca* ou com solução salina, foi avaliado por meio de 2D SDS-PAGE. Cada amostra foi analisada em triplicata, totalizando 27 géis (figuras 22, 23 e 24).

Figura 22 – 2D SDS-PAGE do exsudato peritoneal de camundongos do grupo “salina + salina”.

As amostras foram aplicadas em fitas Immobiline DryStrip de 7 cm com gradiente de pH de 3 a 10 (GE Healthcare) e a focalização isoelétrica (primeira dimensão) foi realizada em aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE 10%. Os géis foram corados com Coomassie Blue R-350 (GE Healthcare).

Figura 23 – 2D SDS-PAGE do exsudato peritoneal de camundongos do grupo “carragenina + salina”.

As amostras foram aplicadas em fitas Immobiline DryStrip de 7 cm com gradiente de pH de 3 a 10 (GE Healthcare) e a focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi realizada em aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE 10%. Os géis foram corados com Coomassie Blue R-350 (GE Healthcare).

Figura 24 – 2D SDS-PAGE do exsudato peritoneal de camundongos do grupo “carragenina + antitrombina”.

As amostras foram aplicadas em fitas Immobiline DryStrip de 7 cm com gradiente de pH de 3 a 10 (GE Healthcare) e a focalização isoeétrica (primeira dimensão) foi realizada em aparelho Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). A segunda dimensão foi realizada em SDS-PAGE 10%. Os géis foram corados com Coomassie Blue R-350 (GE Healthcare).

Os géis foram analisados pelo programa ImageMaster Platinum 7.0 (GE Healthcare), sendo que os *matches* totais representam os *spots* comuns entre os dois grupos e os *spots* exclusivos se referem àqueles encontrados unicamente em uma condição.

Inicialmente, foram comparados apenas os grupos experimentais “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”. De acordo com essa análise, o número total de

matches é 582, enquanto o número de *spots* que apresentam variação quantitativa é 29. Destes, 6 são exclusivos do grupo “carragenina + salina” e 14 são exclusivos do grupo “carragenina + antitrombina”, sendo que 5 estão mais intensos no grupo “carragenina + salina” e 4 no grupo “carragenina + antitrombina” (tabela 13).

Tabela 13 – Número de *matches* e *spots* com variação quantitativa do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos experimentais “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).

	<i>Matches</i>	<i>Spots</i> com variação quantitativa	<i>Spots</i> exclusivos	<i>Spots</i> mais intensos
Grupo cg+sal	582	29	6	5
Grupo cg+AT			14	4

Foram também comparados os grupos experimentais “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”. De acordo com essa segunda análise, o número total de *matches* é 685, enquanto o número de *spots* que apresentam variação quantitativa é 64. Destes, 12, 6 e 22 são exclusivos e 3, 7 e 14 estão mais intensos no grupo “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”, respectivamente (tabela 14).

Tabela 14 – Número de *matches* e *spots* com variação quantitativa do exsudato peritoneal de camundongos dos grupos experimentais “salina + salina” (sal+sal), “carragenina + salina” (cg+sal) e “carragenina + antitrombina” (cg+AT).

	<i>Matches</i>	<i>Spots</i> com variação quantitativa	<i>Spots</i> exclusivos	<i>Spots</i> mais intensos
Grupo sal+sal			12	3
Grupo cg+sal	685	64	6	7
Grupo cg+AT			22	14

4.3.4.4 Identificação dos *spots* de interesse por espectrometria de massas (nanoESI-FTICR)

Os *spots* de interesse, que apresentaram variação quantitativa entre os grupos experimentais “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”, foram excisados do gel (figura 25), digeridos *in gel* com tripsina e submetidos à espectrometria de massas em nanoESI-FTICR.

Figura 25 – *Spots* com variação quantitativa identificados por espectrometria de massas (nanoESI-FTICR).

Amostrado do grupo "carragenina + salina" (a) e do grupo "carragenina + antitrombina" (b).

Dentre os peptídeos identificados, os *spots* identificados como sorotransferrina estão mais intensos no grupo “carragenina + salina” (*spots* 4 e 22), enquanto o *spot* identificado como apolipoproteína AI (*spot* 8) está mais intenso no grupo “carragenina + antitrombina”. Além disso, a α_1 -antitripsina (*spot* 1), a cadeia γ do fibrinogênio (*spot* 17) e o cininogênio (*spot* 18) são proteínas que foram encontradas exclusivamente no grupo “carragenina + antitrombina” nesta análise. A albumina (*spots* 2, 5, 10, 11, 12, 19, 20, 21 e 23) e o complemento C3 foram identificados nos dois grupos em análise (*spots* 3 e 24) (tabela 15).

Tabela 15 – Identificação dos *spots* de interesse, que apresentaram variação quantitativa, por espectrometria de massas (nanoESI-FTICR).

<i>Spot</i>	<i>Match count</i> [*]	% de volume		<i>Anova</i> ^{**}	Proteína ^{***}
		Cg + sal	Cg + AT		
1	1	---	5,364	1,05e-6	A1-antitripsina
2	2	56,119	36,648	1,663e-5	Albumina
3	1	---	0,089	5,177e-5	Complemento C3
4	2	3,972	2,722	7,075e-5	Sorotransferrina
5	1	---	1,756	8,799e-5	Albumina
6	1	---	0,630	1,951e-4	Não identificada
7	1	1,311	---	4,862e-4	Não identificada
8	2	2,205	4,209	9,137e-4	Não identificada
9	1	0,139	---	0,001	Não identificada
10	1	---	0,779	0,001	Albumina
11	2	0,216	2,044	0,001	Albumina
12	1	---	1,113	0,001	Albumina
13	1	---	0,127	0,002	Não identificada
14	2	0,515	0,368	0,002	Não identificada

^{*}Número de condições, ou grupos, em que o *spot* está presente.

^{**}p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

^{***}Identificada por meio de espectrometria de massas (nanoESI-FTICR).

Tabela 15 – Identificação dos *spots* de interesse, que apresentaram variação quantitativa, por espectrometria de massas (nanoESI-FTICR).

<i>Spot</i>	<i>Match count</i> [*]	% de volume		<i>Anova</i> ^{**}	Proteína ^{***}
		Cg + sal	Cg + AT		
15	2	4,044	3,014	0,002	Não identificada
16	1	---	0,699	0,003	Não identificada
17	1	---	0,0763	0,005	Fibrinogênio (cadeia γ)
18	1	---	0,106	0,006	Cininogênio
19	1	---	1,189	0,008	Albumina
20	2	0,117212	1,288	0,012	Albumina
21	1	---	0,764	0,014	Albumina
22	2	2,2814	1,830	0,023	Sorotransferrina
23	1	---	1,407	0,025	Albumina
24	1	0,124616	---	0,025	Complemento C3
25	1	---	0,693	0,027	Não identificada
26	1	1,862	---	0,030	Não identificada
27	1	0,494	---	0,033	Não identificada
28	1	1,803	---	0,038	Não identificada
29	2	0,388	0,932	0,043	Não identificada

^{*}Número de condições, ou grupos, em que o *spot* está presente.

^{**}p<0,05, estatisticamente diferente do grupo tratado com solução salina (sal+sal+cg).

^{***}Identificada por meio de espectrometria de massas (nanoESI-FTICR).

4.4 SPR

A interação entre a antitrombina humana e de *B. jararaca* com a heparina foi investigada por meio de SPR, em equipamento BIAcore T200 (GE Healthcare), como descrito na seção 3.2.4.2.

Diferentes concentrações de antitrombina (1-300 $\mu\text{g/mL}$), humana ou de *B. jararaca*, foram injetadas por 300 segundos em um *sensor chip* SA contendo moléculas de heparina imobilizadas e a dissociação entre as duas moléculas em análise foi monitorada por 900 segundos (figuras 26 e 27).

Figura 26 – Sensorgrama da interação entre a antitrombina humana e a heparina, avaliada em sistema BIAcore T200.

Diferentes concentrações de antitrombina humana (1-300 $\mu\text{g/mL}$) foram injetadas por 300 segundos em fluxo de 5 $\mu\text{L/min}$ em um *sensor chip* SA contendo moléculas de heparina imobilizadas e a dissociação entre as duas moléculas em análise foi monitorada por 900 segundos. (RU) unidades de ressonância.

Figura 27 – Sensorgrama da interação entre a antitrombina da serpente *B. jararaca* e a heparina, avaliada em sistema BIAcore T200.

Diferentes concentrações de antitrombina da serpente *B. jararaca* (1-300 $\mu\text{g/mL}$) foram injetadas por 300 segundos em fluxo de 5 $\mu\text{L/min}$ em um *sensor chip SA* contendo moléculas de heparina imobilizadas e a dissociação entre as duas moléculas em análise foi monitorada por 900 segundos. (RU) unidades de ressonância.

Os dados cinéticos foram calculados utilizando-se o modelo de ligação 1:1 de Langmuir. As constantes de associação (k_a), dissociação (k_d) e a afinidade de ligação (K_D) calculadas para a antitrombina humana são $4.336 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,041^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $2,085^{-7} \text{ M}$, respectivamente (tabela 16). Para a antitrombina de *B. jararaca* esses valores são $7.054 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,476^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $6,316^{-8} \text{ M}$ para os valores de k_a , k_d e K_D , respectivamente (tabela 16), sugerindo que a antitrombina isolada desta serpente apresenta maior afinidade pela heparina que a antitrombina humana.

Tabela 16 – Parâmetros cinéticos obtidos por meio de ressonância plasmônica de superfície em sistema BIAcore T200 (GE Healthcare) para a antitrombina humana e de *B. jararaca*.

	$k_a (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})^*$	$k_d (\text{s}^{-1})^{**}$	$K_D (\text{M})^{***}$
Antitrombina humana	4.336	$9,041^{-4}$	$2,085^{-7}$
Antitrombina de <i>B. jararaca</i>	7.054	$4,476^{-4}$	$6,316^{-8}$

Os parâmetros cinéticos da interação entre a antitrombina humana ou de *B. jararaca* e a heparina foram determinados por meio de ressonância plasmônica de superfície em sistema BIAcore T200 (GE Healthcare) utilizando-se o *sensor chip* SA contendo moléculas de heparina biotinizadas imobilizadas em sua superfície. Diferentes concentrações de antitrombina ($1\text{-}300 \mu\text{g/mL}$) diluída em tampão HBS-EP foram aplicadas por 300 segundos durante a fase de associação (tempo de contato) em fluxo constante de $5 \mu\text{L/min}$, a 37°C . A dissociação foi realizada por 900 segundos em fluxo constante de $5 \mu\text{L/min}$. A superfície do *sensor chip* foi regenerada após a ligação da antitrombina utilizando-se NaCl 2M, em fluxo de $10 \mu\text{L/min}$, durante 60 segundos. Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando-se o modelo de ligação 1:1 de Langmuir.

* constante de associação

** constante de dissociação

*** afinidade de ligação

4.5 Clonagem e expressão da antitrombina da serpente *B. jararaca*

Para a construção da biblioteca de cDNA do fígado da serpente *B. jararaca*, o RNA total foi extraído de fragmentos deste órgão de acordo com as recomendações do fabricante do reagente TRIZOL (Invitrogen). O RNA total isolado foi então quantificado através de leitura a 260 nm (A_{260}) e apresentou uma concentração de $1,632 \text{ mg/mL}$.

Dois microgramas de RNA total foram utilizados para a construção da biblioteca utilizando-se o *kit Smart PCR cDNA Synthesis* (Clontech). O mRNA foi transcrito para cDNA e ligado a adaptadores contendo o sítio para a enzima de restrição *Sfi*I em ambas as extremidades. O cDNA obtido foi amplificado por PCR e o produto foi digerido com proteinase K, para a inativação da atividade da enzima DNA polimerase. Em seguida, o cDNA foi digerido com a enzima *Sfi*I e fracionado em coluna Chromaspin 400.

Um microlitro e meio do cDNA fracionado, com tamanhos acima de 500 bp, foi ligado ao vetor λ TriplEx2 (1 μ L) utilizando-se o *kit Gigapack III Gold Packaging Extract* (Stratagem). A ligação (4 μ L) foi então misturada ao extrato de empacotamento de fago (50 μ L) e incubada por 3 horas a 25 °C para a obtenção da biblioteca.

A biblioteca resultante (não amplificada) foi titulada em meio LB e de acordo com o número de plaques apresentou título de $2,7 \times 10^6$ pfu/mL, em que pfu é unidade formadora de plaque. Após a amplificação, a biblioteca foi novamente titulada em meio LB e apresentou título de $1,98 \times 10^8$ pfu/mL.

Com base nas sequências peptídicas internas conservadas entre as antitrombinas já descritas para outras espécies e na sequência N-terminal da antitrombina de *B. jararaca* obtida por degradação de Edman (His-Glu-Ser-Ser-Val-Gln-Asp-Ile-Ile-Thr) (MORAIS et al., 2009), foram construídos 4 oligonucleotídeos degenerados, sendo 3 *forward* (sequência N-terminal e aminoácidos 122-129 e 216-223 da sequência da antitrombina humana) e 1 *reverse* (aminoácidos 122-129 da sequência da antitrombina humana) (figura 28).

Figura 28 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da antitrombina humana (A_{Thum}) e das sequências peptídicas internas conservadas entre as antitrombinas já descritas para outras espécies utilizadas para a construção de oligonucleotídeos degenerados.

A _{Thum}	HGSPVDICTAKPRDIPMNPNCIYRSPEKKATEDEGSEQKIPEATNRRVWELSKANSRFAT	60
OligosDeg	-----	
A _{Thum}	TFYQHLADSKNDNDNIFLSPLSISTAFAMTKLGACNDTLQQLMEVFKFDITISEKTSQIH	120
OligosDeg	-----	
A _{Thum}	FFFAKLNCRLYRKANKSSKLVSANRLFGDKSLTFNETYQDISELVYGAKLQPLDFKENAE	180
OligosDeg	-FFAKLNCR----- *****	8
A _{Thum}	QSRAAINKWVSNKTEGRITDVPSEAINELTVLVLVNTIYFKGLWKSFKSPENTRKELFY	240
OligosDeg	-----VNTIYFKG----- *****	16
A _{Thum}	KADGESCSASMMYQEGKFRYRRVAEGTQVLELPFKGDDITMVLILPKPEKSLAKVEKELT	300
OligosDeg	-----	
A _{Thum}	PEVLQEWLDELEEMMLVVHMPRFRIEDGFSLKEQLQDMGLVDFLSPKSKLPGIVAEGRD	360
OligosDeg	-----	
A _{Thum}	DLYVSDAFHKAFLEVNEEGSEAAASTAVVIAGRSLNPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTI	420
OligosDeg	-----	
A _{Thum}	IFMGRVANPCVK	432
OligosDeg	-----	

(OligosDeg) oligonucleotídeos degenerados e (*) resíduos idênticos.

Utilizando-se os oligonucleotídeos degenerados construídos e, como molde, a biblioteca de cDNA de fígado da serpente *B. jararaca*, foi amplificado um fragmento de DNA interno de aproximadamente 500 pares de base (pb) do gene da antitrombina dessa serpente. O produto da PCR foi avaliado através de eletroforese em gel de agarose 1% (figura 29).

Figura 29 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR utilizando-se a biblioteca de cDNA do fígado da serpente *B. jararaca* como molde e os oligonucleotídeos degenerados correspondentes à região N-terminal (*forward*) e ao aminoácidos 122-129 (*reverse*).

(1) produto da PCR e (2) marcador de pares de base Gene Ruler DNA Leader 1k (Fermentas).

O fragmento de DNA obtido foi clonado em vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) e utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5- α por eletroporação. Os clones positivos, contendo o vetor de clonagem e o fragmento de DNA de interesse e apresentando cerca de 790 pb, foram identificados por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *forward* e *reverse*. Dos 20 clones avaliados, 6 continham o inserto de interesse (clones positivos) (figura 30).

Figura 30 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR para identificação dos clones contendo o fragmento de interesse, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *forward* e M13 *reverse*.

(1-20) produto da PCR e (pb) marcador de pares de base Gene Ruler DNA Leader 1k (Fermentas). As setas (↑) indicam os clones positivos.

Com base em uma sequência peptídica interna obtida da antitrombina de *B. jararaca*, foram construídos dois oligonucleotídeos específicos, um *forward* e um *reverse* (sequência sublinhada na figura 31). Estes oligonucleotídeos foram utilizados em reações de PCR contendo também os oligonucleotídeos *forward* (LD5') e *reverse* (T7 promoter) do vetor λ TriplEx2 e a biblioteca de cDNA de fígado da serpente. Dessa forma, foram amplificados dois fragmentos de DNA do gene da antitrombina dessa serpente, de aproximadamente 500 e 1000 pb. Os produtos da PCR foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (figura 32).

Figura 32 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR utilizando-se a biblioteca de cDNA do fígado da serpente *B. jararaca* como molde e os oligonucleotídeos específicos construídos com base na sequência interna de nucleotídeos da antitrombina desta serpente.

(a) (1) produto da PCR utilizando-se os oligonucleotídeos LD5'(Clontech) e o oligonucleotídeo específico *reverse* e (pb) marcador de pares de base Gene Ruler DNA Leader 1k (Fermentas); (b) (1) produto da PCR utilizando-se o oligonucleotídeo específico *forward* e o oligonucleotídeo T7 promoter (Clontech) e (pb) marcador de pares de base Gene Ruler DNA Leader 1k (Fermentas).

Os fragmentos de DNA obtidos foram clonados em vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) e utilizados na transformação de bactérias *E. coli* DH5- α por eletroporação. Os clones positivos, contendo o vetor de clonagem e o fragmento de DNA de interesse, foram identificados por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *forward* e *reverse*. De 7 clones avaliados, 6 continham um dos insertos de interesse (clones positivos) (figura 33).

Figura 33 – Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR para identificação dos clones contendo o fragmento de interesse, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *forward* e *reverse*.

(1-7) produto da PCR e (pb) marcador de pares de base Gene Ruler DNA Leader 1k (Fermentas). A seta (→) indica o fragmento de DNA presente nos clones positivos.

Os clones positivos foram então selecionados para extração de DNA plasmidial em pequena escala (mini preparação plasmidial) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). O DNA purificado foi sequenciado utilizando-se o *kit DYEnamic ET* Terminator Cycle Sequencing* (Amersham - Biosciences) em sequenciador automático de DNA – ABI-Prism 377 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram alinhadas à sequência da antitrombina humana. Como podemos observar na figura 34, essa segunda etapa do processo permitiu a obtenção da sequência interna e C-terminal da antitrombina da serpente *B. jararaca*.

Figura 35 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da antitrombina humana (AThum) e da sequência de aminoácidos da antitrombina da serpente *B. jararaca* (ATBj).

As setas vermelhas (↓) indicam os resíduos de Lys e Arg que participam da interação com a heparina, as setas azuis (↓) indicam os sítios de glicosilação (Asn) e as setas pretas (↓) indicam o sítio reativo (Arg393-Ser394). (E) Glu (ácido glutâmico), (G) Gly (glicina), (K) Lys (lisina), (N) Ans (asparagina), (Q) Gln (glutamina), (R) Arg (arginina) e (X) aminoácido não identificado. (*) Resíduos idênticos, (:) substituições conservadas e (.) substituições semi-conservadas.

Na figura 35 é possível observar que foi obtida praticamente a sequência completa da antitrombina de *B. jararaca*, composta por 430 aminoácidos. Por meio desse alinhamento, podemos observar que 7 dos 10 resíduos de Lys (K) e Arg (R) e 3 dos 4 sítios de glicosilação (Asn - N) encontram-se conservados na antitrombina de *B. jararaca*. Além disso, os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio reativo (Arg393-Ser394) também são conservados. Cinco aminoácidos da região C-terminal não foram identificados e são representados por uma letra X na figura 35.

5 DISCUSSÃO

O mecanismo pelo qual a antitrombina exerce seu efeito anticoagulante é bastante estudado bem como sua modificação conformacional decorrente da sua ligação à heparina e ao heparan-sulfato (CARRELL, 1999). Os mecanismos de sua atividade anti-inflamatória são, no entanto, menos caracterizados. Considerando-se a importância do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da sepse e eventos associados, como a CID, o presente trabalho teve como objetivo o estudo da atividade anti-inflamatória da antitrombina da serpente *B. jararaca*.

A antitrombina utilizada neste trabalho foi isolada do plasma da serpente *B. jararaca* por meio de cromatografia de afinidade utilizando-se a coluna cromatográfica HiTrap Heparin HP (GE Healthcare). Como descrito por Moraes (2009), essa estratégia de purificação mostrou-se eficiente, uma vez que a antitrombina foi purificada 87 vezes, aproximadamente, apresentando uma recuperação da atividade de cerca de 24% e uma atividade específica final de 500,68 (U/mg) (MORAIS, 2009).

A fim de confirmar sua identidade, a antitrombina purificada foi submetida à espectrometria de massas (nanoESI-qTOF). Foram obtidas as sequências de 6 peptídeos, os quais apresentaram similaridade às antitrombinas de camundongo (*Mus musculus*), avestruz (*Struthio camelus*) e tartaruga (*Chelydra serpentina*). Esses peptídeos, quando comparados à sequência da antitrombina humana, composta por 432 aminoácidos, correspondem à 15,5% da molécula (67 aminoácidos). Dos 67 aminoácidos identificados, apenas 9 não apresentaram identidade à sequência da antitrombina humana, sendo que destes apenas 2 não apresentaram alta similaridade ao aminoácido correspondente, sugerindo uma alta conservação entre as moléculas.

Com o objetivo de comparar a atividade anti-inflamatória da antitrombina de *B. jararaca* e da antitrombina humana, esta molécula foi isolada do plasma humano por meio de um processo de purificação semelhante ao empregado para a antitrombina dessa serpente. Inicialmente, foi utilizado o mesmo processo de isolamento da antitrombina da serpente *B. jararaca*, sem modificações. Entretanto, a antitrombina humana não se ligou à coluna cromatográfica equilibrada com 500 mM de NaCl. Sua ligação à coluna ocorreu somente quando a concentração de NaCl foi reduzida para 250 mM, sugerindo que a antitrombina humana apresenta menor afinidade pela heparina que a antitrombina de *B. jararaca*.

Além de pequenas diferenças com relação à sequência de aminoácidos, outra característica que pode estar relacionada à diferença de afinidade pela heparina é o conteúdo de

carboidratos presente na antitrombina – a antitrombina de *B. jararaca* apresenta o dobro do conteúdo total de carboidratos, em relação à massa molecular, que a antitrombina humana (18 e 9%, respectivamente) (MORAIS, 2009). No entanto, como descrito anteriormente, sabe-se que a antitrombina β , que apresenta uma cadeia a menos de carboidrato que a antitrombina α , possui maior afinidade pela heparina. A molécula de antitrombina humana contém quatro sítios de glicosilação, podendo ser glicosilada em todos esses sítios (antitrombina α) ou em apenas três desses sítios (antitrombina β) (STEIN; CARRELL, 1995). A antitrombina β não possui a cadeia de carboidratos no resíduo Asn135, o qual está situado próximo ao sítio de ligação à heparina, o que resulta em uma maior afinidade pela heparina do que a encontrada para a antitrombina α (BRENNAN; GEORGE; JORDAN, 1987). Sabe-se também que algumas espécies de peixes e aves apresentam apenas a isoforma contendo três cadeias de carboidratos (ANDERSEN et al., 2000; TEJADA; DEELEY, 1995). Na antitrombina de salmão (*Salmo salar*) foram descritos apenas três sítios de glicosilação e a afinidade que esse inibidor apresenta pela heparina é similar à da antitrombina β , sendo essa característica decorrente da substituição do resíduo de aminoácido Asn135, presente em todas as antitrombins de vertebrados superiores descritas, por uma Asp no inibidor de salmão (ANDERSEN et al., 2000).

A interação entre diferentes proteínas com a heparina e o heparansulfato é responsável por um grande número de processos fisiológicos importantes. Consequentemente, o conhecimento da afinidade e da cinética dessas interações é de grande interesse (OSMOND et al., 2002). A determinação das constantes cinéticas e de afinidade pode ser realizada por meio de SPR, uma técnica *label-free* capaz de avaliar a interação entre moléculas em tempo real. A SPR consiste no monitoramento de interações específicas entre um analito em solução e o seu ligante acoplado a superfície de um *sensor chip*, através de alterações no índice de refração resultantes do aumento da concentração do analito na superfície do *sensor chip*. Por meio dessa ferramenta a interação da antitrombina humana e da serpente *B. jararaca* com a heparina foi investigada em sistema BIAcore T200.

A afinidade de ligação (K_D) entre duas moléculas é dada em função das suas constantes de associação (k_a) e dissociação (k_d), sendo $K_D = k_d / k_a$. Assim, quanto maior o valor de k_a e menor os valores de k_d e K_D , maior a interação e a afinidade entre duas moléculas. Os valores de k_a , k_d e K_D calculados para a antitrombina humana são $4.336 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $9,041^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $2,085^{-7} \text{ M}$, respectivamente. Para a antitrombina de *B. jararaca* esses valores são $7.054 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $4,476^{-4} \text{ s}^{-1}$ e $6,316^{-8} \text{ M}$ para k_a , k_d e K_D , respectivamente, sugerindo que a antitrombina de *B. jararaca* apresenta maior afinidade pela heparina que a antitrombina humana.

Dessa forma, uma possível explicação para a maior afinidade pela heparina apresentada pela antitrombina de *B. jararaca*, é que esta molécula pode apresentar apenas três cadeias de carboidratos ligadas à sua estrutura proteica e essas cadeias são maiores que as encontradas na antitrombina humana, resultando em um maior conteúdo total de carboidratos. Essa hipótese será discutida em maiores detalhes posteriormente nessa seção.

Com relação à atividade anti-inflamatória da antitrombina desta serpente, os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram o efeito anti-inflamatório do pré e do pós-tratamento com esta molécula na resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina.

Os modelos experimentais de inflamação induzida por carragenina têm sido largamente utilizados para investigar a fisiopatologia da resposta inflamatória aguda e para avaliar drogas anti-inflamatórias (POSADAS et al., 2004).

A injeção de carragenina na pata de camundongos induz um edema bifásico, sendo que o primeiro pico de edema ocorre entre 4 e 6 horas e o segundo pico ocorre entre 48 e 72 horas (HENRIQUES et al., 1987). Este padrão também foi observado nos resultados obtidos.

Os resultados apresentados demonstraram que o pré-tratamento de 1 hora com a antitrombina de *B. jararaca* diminuiu significativamente a formação de edema de pata em diferentes intervalos de tempo (4, 6, 24 e 48 horas), especialmente 48 horas após a injeção de carragenina, em que foi observada uma inibição de 51,7%. Nos intervalos de tempo de 2, 72 e 96 horas esta inibição não foi verificada. É interessante observar que o tratamento com antitrombina não modificou o perfil do edema causado pela carragenina.

O pós-tratamento de 1 hora com a antitrombina de *B. jararaca* diminuiu significativamente a formação de edema de pata em todos os intervalos de tempo avaliados (2, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas), especialmente 24 e 96 horas após a injeção de carragenina, em que foi observada uma inibição de 58,2 e 60,6%, respectivamente.

Henriques et al. (1987) demonstraram que o edema de pata induzido por carragenina é mediado, principalmente, pela prostaglandina E_2 e pela PLA_2 . Posadas et al. (2004) demonstraram que também ocorre o envolvimento da síntese de NO e a expressão da enzima COX-2. A segunda fase do edema induzido por carragenina difere da primeira pelo aumento da expressão de COX-2, que tem início no intervalo de tempo de 6 horas, concomitantemente à produção de NO (POSADAS et al., 2004).

No perfil do edema obtido neste estudo a segunda fase ocorreu em 48 horas, sugerindo que uma maior expressão de COX-2 estaria ocorrendo neste período. A inibição do edema pela antitrombina foi maior neste intervalo de tempo (51%) para o pré-tratamento. Para o pós-tratamento, a inibição do edema foi maior na sua segunda fase (58,2% em 24 horas, 45% em

48 horas, 43% em 72 horas e 60,6% em 96 horas), sendo estes resultados condizentes com os resultados de Harada et al. (1999), que demonstraram que a antitrombina inibe a expressão do RNAm da COX-2 através da inibição da produção do TNF- α . Cabe ressaltar que a antitrombina também diminui a produção de NO, como descrito por Hagiwara et al. (2010).

O pós-tratamento com a antitrombina se mostrou mais eficiente na inibição da formação do edema de pata quando comparado aos resultados obtidos com o pré-tratamento, como podemos observar na tabela 17.

Tabela 17 – Comparação entre a inibição da formação do edema de pata induzido por carragenina pelo pré e pós-tratamento com antitrombina de *B. jararaca*.

Tempo (horas)	Porcentagem de inibição	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento
2	não apresentou inibição	35,0
4	19	28,1
6	20	39,8
24	28	58,2
48	52	45,5
72	não apresentou inibição	43,0
96	não apresentou inibição	60,6

Apenas os intervalos de tempo de 4, 6, 24 e 48 horas apresentaram inibição com o pré-tratamento com a antitrombina, enquanto o pós-tratamento foi capaz de inibir a formação do edema em todos os intervalos de tempo avaliados. Além disso, a porcentagem de inibição também foi maior com o pós-tratamento.

A inibição da formação de edema pelo pós-tratamento com a antitrombina nos tempos mais tardios, especialmente 72 e 96 horas, sugere o envolvimento desta molécula na resolução da inflamação e não apenas na sua inibição.

A resolução da inflamação era inicialmente considerada um processo passivo. Entretanto, este fenômeno é atualmente considerado um processo ativo, que envolve a síntese de citocinas anti-inflamatórias e de mediadores lipídicos e a indução da apoptose dos neutrófilos (LUERMAN et al., 2010).

A resolução da inflamação é iniciada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias pelos macrófagos, como a IL-3, a IL-10 e o TGF- β , e mediadores lipídicos (lipoxinas, protectinas e resolvinas) pelas células endoteliais e pelos macrófagos (PLACHINTA et al., 2003). As citocinas anti-inflamatórias diminuem a produção de TNF- α e inibem a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais (WINYARD; WILLOUGHBY, 2003). As lipoxinas, por sua vez, reduzem a permeabilidade vascular, prevenindo o recrutamento de neutrófilos (VERLEYE; HEULARD; GILLARDIN, 2000). As resolvinas e as protectinas bloqueiam a produção de mediadores pró-inflamatórios e inibem a migração de neutrófilos *in vivo* (LEVY et al., 2001).

Dessa forma, a alta porcentagem de inibição da formação do edema causada pelo pós-tratamento com a antitrombina de *B. jararaca* nos últimos intervalos de tempo avaliados (72 e 96 horas) sugere que este inibidor pode estar envolvido no processo de resolução da inflamação.

A atividade anti-inflamatória da antitrombina humana também foi avaliada utilizando-se esse mesmo modelo, entretanto, apenas o pós-tratamento com a antitrombina humana foi realizado. Os resultados apresentados demonstraram que o pós-tratamento de 1 hora com a antitrombina humana diminuiu significativamente a formação de edema de pata apenas nos intervalos de tempo de 4 e 6 horas. Nesses intervalos foi observada uma inibição de 47,2 e 56,5%, respectivamente.

Apesar da maior porcentagem de inibição apresentada pela antitrombina humana nos intervalos de tempo de 4 e 6 horas, o pós-tratamento com a antitrombina de *B. jararaca* mostrou-se mais eficiente na inibição da formação do edema de pata, como podemos observar na tabela 18.

Tabela 18 – Comparação entre a inibição da formação do edema de pata induzido por carragenina pelo pós-tratamento com antitrombina de *B. jararaca* e com a antitrombina humana.

Tempo (horas)	Porcentagem de inibição	
	Antitrombina de <i>B. jararaca</i>	Antitrombina humana
2	35,0	não apresentou inibição
4	28,1	47,2
6	39,8	56,5
24	58,2	não apresentou inibição
48	45,5	não apresentou inibição
72	43,0	não apresentou inibição
96	60,6	não apresentou inibição

Assim, os resultados obtidos sugerem que o tratamento realizado com a antitrombina de *B. jararaca* foi mais eficiente do que o tratamento realizado com antitrombina humana, sugerindo uma maior atividade da antitrombina dessa serpente na inibição e na resolução da inflamação.

A maior atividade anti-inflamatória da antitrombina de *B. jararaca* em comparação à antitrombina humana pode estar relacionada à diferença de afinidade pela heparina entre essas duas moléculas. Como determinado por SPR e descrito anteriormente, a antitrombina de *B. jararaca* possui maior afinidade pela heparina, característica que apresenta relevância fisiológica considerando-se que o receptor celular para a antitrombina envolvido na sua atividade anti-inflamatória, Syndecan-4, é uma molécula tipo heparina.

Os valores cinéticos e de afinidade estabelecidos para a antitrombina de *B. jararaca* sugerem que sua ligação ao Syndecan-4 ocorre de maneira mais rápida e seu desligamento desse receptor ocorre de maneira mais lenta, o que poderia potencializar a atividade anti-inflamatória da antitrombina dessa serpente.

A resposta inflamatória induzida pela carragenina nas cavidades pleural e peritoneal é caracterizada pela intensa formação de exsudato e migração de células inflamatórias, particularmente neutrófilos (MALECH; GALLIN, 1987). De maneira similar, o aumento na

migração celular para a cavidade peritoneal, especialmente células polimorfonucleares, ocorre após 4 horas da administração intraperitoneal de carragenina.

O pré-tratamento de 1 hora com antitrombina de *B. jararaca* diminuiu em 48% o influxo de células para a cavidade peritoneal induzido por carragenina. Este efeito é atribuído, principalmente, à redução da migração de células polimorfonucleares, como demonstrado pela contagem diferencial de células migradas, em que foi verificada uma inibição de 74% do número de células. O pós-tratamento de 1 hora com antitrombina de *B. jararaca* também diminuiu significativamente o influxo de células para a cavidade peritoneal induzido por carragenina. Os resultados demonstraram uma inibição de 34% do número total de células migradas e 43% do número de células polimorfonucleares.

Os mediadores químicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico participam do aumento da migração de leucócitos induzida pela carragenina (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999). Essa migração é mediada também pelas citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β (CUZZOCREA et al., 1999; UTSUNOMIYA; NAGAI; OH-ISHI, 1991), sendo a produção destes mediadores inibida pela antitrombina (HAGIWARA et al., 2010; HARADA et al., 1999; SOUTER et al., 2001). Assim, a diminuição da secreção dessas citocinas pode contribuir para a inibição da migração celular induzida pela carragenina, como observado nos resultados obtidos neste trabalho.

Ao contrário do observado para o modelo de edema de pata, o pós-tratamento com a antitrombina mostrou-se menos eficiente na inibição da migração de células para a cavidade peritoneal quando comparado aos resultados obtidos com o pré-tratamento, como podemos observar na tabela 19.

Tabela 19 – Comparação entre a inibição pelo pré e pós-tratamento com antitrombina de *B. jararaca* na migração de células para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.

	Porcentagem de inibição	
	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Número total de células	48	34
Número de células polimorfonucleares	74	43

Os mediadores químicos e os produtos finais do processo inflamatório exercem um efeito deletério na microcirculação, levando ao dano endotelial e à trombose microvascular (BICK, 1996). O *rolling* dos leucócitos circulantes é a fase inicial e pré-requisito para as fases subsequentes da infiltração dessas células, que envolve a liberação de mediadores inflamatórios, enzimas citotóxicas e radicais do oxigênio (LAWRENCE; SPRINGER, 1991). Esses componentes reduzem a perfusão capilar e levam ao desenvolvimento da falência de órgãos (MCCUSKEY; URBASCHEK; URBASCHEK, 1996). Nesse contexto, a inibição do *rolling* e da adesão dos leucócitos ao endotélio é de grande importância para o controle da resposta inflamatória.

Como observado para os modelos de edema de pata e migração celular para a cavidade peritoneal, o pré-tratamento de 1 hora com antitrombina de *B. jararaca* diminuiu significativamente o *rolling* de leucócitos induzido por carragenina. Os resultados demonstraram uma inibição de 65,8, 75 e 60,7% nos intervalos de tempo de 10, 20 e 30 minutos, respectivamente, após a aplicação de carragenina diretamente sobre o músculo cremaster. Devido ao desenho experimental deste modelo, não foi possível realizar o pós-tratamento de uma hora com a antitrombina, considerando-se que a exposição do músculo cremaster deve ser realizada antes da aplicação tópica de carragenina e a preparação precisaria ser mantida por um grande intervalo de tempo.

Como descrito pela literatura, a antitrombina possui a habilidade de diminuir a expressão de P-selectina (YAMASHIRO et al., 2001), da integrina β_2 (GRITTI et al., 2004), da ICAM-1 (INTHORN et al., 1998) e da E-selectina (INTHORN et al., 1998), inibindo por sua vez o *rolling* e a adesão de leucócitos, eventos centrais da inflamação. Dessa forma, a diminuição da expressão destas moléculas de adesão pode contribuir para a inibição do *rolling* de leucócitos induzido pela carragenina, como observado nos resultados obtidos neste trabalho.

Quando a indometacina é administrada 30 minutos antes ou após a injeção de carragenina, o efeito anti-inflamatório da antitrombina não é observado, o que confirma o envolvimento da prostaciclina neste evento, considerando-se que um dos mecanismos pelo qual a antitrombina exerce seu efeito anti-inflamatório é através da indução da síntese e liberação da prostaciclina e a indometacina, por sua vez, inibe a via de síntese deste mediador. É importante ressaltar que o mesmo efeito foi observado por Hoffmann et al. (2000) e Harada et al. (1999).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que a antitrombina de *B. jararaca* desempenha sua atividade anti-inflamatória através da modulação da síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, como observado para a antitrombina humana.

A inflamação aguda induzida por agentes inflamatórios gera alterações celulares e teciduais complexas, de diferentes características e intensidades. Essas alterações também são afetadas por mecanismos imunes endógenos que podem controlar e limitar o dano tecidual ou contribuir para o desenvolvimento do processo inflamatório. A metodologia tradicional para estudar o dano e o reparo tecidual decorrentes do processo inflamatório é baseada na análise por microscopia das alterações intra e extracelulares, na análise imunohistoquímica de componentes particulares e na quantificação de diversos mediadores inflamatórios presentes nos tecidos alterados. Apesar dos avanços significativos dessas técnicas experimentais, uma perspectiva geral do processo inflamatório é difícil de ser obtida e mudanças sutis em marcadores-chave geralmente não são identificadas devido às limitações dessas técnicas (AHN; SIMPSON, 2007).

A proteômica é uma técnica com grande potencial para a análise de amostras proteicas altamente complexas, como aquelas originadas nas áreas de lesão tecidual e, conseqüentemente, pode ser empregada para a análise comparativa de uma variedade de fluidos em diferentes condições. Esta técnica está sendo utilizada no estudo de diversos fluidos teciduais, como plasma, fluido cerebrospinal, saliva, lágrimas, fluido amniótico, urina, exsudato peritoneal, fluido sinovial e fluido broncoalveolar (HU; LOO; WONG, 2006).

Devido à complexidade da composição protéica dos tecidos, a análise proteômica de tecidos alterados apresenta diversas complicações técnicas e interpretativas. Entretanto, essas dificuldades podem ser contornadas pela análise do proteoma de fluidos corpóreos gerados em condições patológicas, considerando-se que estes constituem uma fonte rica de biomarcadores (AHN; SIMPSON, 2007). Em particular, os exsudatos coletados nos sítios da lesão representam uma grande variedade de material através do qual as alterações podem ser analisadas em detalhe através de ferramentas proteômicas (RUCAVADO et al., 2011). Dessa forma, o emprego destas ferramentas para a análise de exsudatos é uma abordagem promissora para a caracterização do processo inflamatório e da ação de moléculas com potencial anti-inflamatório (ESCALANTE et al., 2009).

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de inibição da inflamação pela antitrombina de *B. jararaca*, foi realizada a análise proteômica do exsudato peritoneal.

O conteúdo proteico do exsudato peritoneal de três espécimes dos grupos “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina” foi determinado utilizando-se

ácido bicinconínico. Os resultados obtidos demonstraram que a administração de carragenina na cavidade peritoneal causou um aumento da concentração proteica do exsudato peritoneal de camundongos. Por outro lado, o tratamento dos animais com antitrombina de *B. jararaca* causou uma redução da concentração de proteínas do exsudato peritoneal destes camundongos, ilustrando a inibição do processo inflamatório induzido por carragenina pela antitrombina.

Como descrito anteriormente, a inflamação é definida como uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado frente a uma injúria e compreende eventos vasculares, celulares e linfáticos (CARLOS; HARLAN, 1990). Os eventos vasculares da resposta inflamatória envolvem alterações hemodinâmicas, que levam ao aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento de proteínas plasmáticas para o tecido intersticial (KOWAL-VERN et al., 1997; RANKIN, 2004). Desta forma, a diminuição da concentração de proteínas no exsudato peritoneal do grupo tratado com antitrombina de *B. jararaca* reitera seu envolvimento na inibição do processo inflamatório agudo induzido por carragenina. Estes resultados sugerem a participação deste inibidor nos eventos vasculares da resposta inflamatória, que resulta na diminuição da permeabilidade vascular e consequente diminuição do extravasamento de proteínas plasmáticas.

Por meio de SDS-PAGE foi possível observar que as amostras dos diferentes grupos analisados apresentam perfis eletroforéticos semelhantes. Entretanto, algumas bandas estão presentes em intensidades variáveis entre os grupos experimentais, como a banda de aproximadamente 66 kDa, correspondente à albumina, que apresenta maior intensidade no grupo “carragenina + antitrombina” e menor intensidade no grupo “salina + salina”.

Este aumento aparente da concentração de albumina no grupo tratado com antitrombina pode ser decorrente do fato da albumina atuar como transportadora de diferentes moléculas e assim, ligar-se a diversas proteínas e peptídeos de interesse, como hormônios, citocinas e quimiocinas (SAHAB; ICZKOWSKI; SANG, 2007). Alguns dos mediadores envolvidos na inibição da inflamação pela antitrombina podem ser transportados pela albumina, justificando uma maior concentração desta proteína no exsudato peritoneal dos camundongos tratados com antitrombina de *B. jararaca*.

Os exsudatos peritoneais foram então analisados por meio de 2D SDS-PAGE. Foram considerados os grupos experimentais “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”. É importante salientar que cada grupo experimental foi analisado em triplicata biológica e experimental, totalizando 27 géis.

Inicialmente, foram comparados os perfis proteicos dos grupos “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”. Essa análise demonstrou uma diferença na intensidade de 29 *spots* entre esses dois grupos, sendo 5 exclusivas do grupo “carragenina + salina” e 15 do grupo “carragenina + antitrombina”. Além disso, 5 apresentaram maior intensidade no grupo “carragenina + salina” e 4 no grupo “carragenina + antitrombina”. Estes dados sugerem que a atividade anti-inflamatória da antitrombina pode ser mediada, ao menos em parte, pelo aumento da síntese e/ou liberação de proteínas específicas relacionadas à inibição da inflamação aguda induzida pela carragenina.

Posteriormente, foram comparados os perfis eletroforéticos dos grupos experimentais “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”. Essa segunda análise revelou que 64 *spots* apresentam diferenças de intensidade entre esses três grupos, sendo que destes 12, 6 e 22 são exclusivos dos grupos “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”, respectivamente. Além disso, 3, 7 e 14 estão mais intensos nos grupos “salina + salina”, “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”, respectivamente. Esses valores reforçam a sugestão de que a atividade anti-inflamatória da antitrombina pode ser decorrente da síntese e/ou liberação de proteínas responsáveis pela inibição da inflamação.

Os *spots* com variação quantitativa identificados na primeira análise, envolvendo apenas os grupos experimentais “carragenina + salina” e “carragenina + antitrombina”, foram excisados do gel, digeridos com tripsina e identificados através de espectrometria de massas (nanoESI-FTICR). Das 29 proteínas analisadas, 17 foram identificadas, 4 no grupo “carragenina + salina” e 13 no grupo “carragenina + antitrombina”.

Dentre essas proteínas, 9 foram identificadas como albumina e correspondem a 53% do total de proteínas identificadas. Esse resultado sugere a necessidade da utilização de técnicas de depleção da albumina para a análise proteômica desses exsudatos. A presença de proteínas mais abundantes no material de estudo, como a albumina e as imunoglobulinas, prejudica a detecção e identificação das proteínas menos abundantes, de especial importância para a identificação de biomarcadores (LINKE; DORAISWAMY; HARRISON, 2007). Por outro lado, as estratégias de depleção podem remover também outras proteínas, especialmente aquelas associadas à albumina, em um processo de codepleção (DE MORAIS-ZANI et al., 2011; GRANGER et al., 2005). Além disso, a albumina pode atuar como transportadora de proteínas, ligando-se à diversas proteínas e peptídeos de interesse, como hormônios e citocinas, fazendo com que as estratégias de depleção não sejam aplicáveis à análise de

exsudatos inflamatórios em busca da elucidação do mecanismo de inibição da inflamação (SAHAB; ICZKOWSKI; SANG, 2007).

A enzima C3 do sistema complemento foi identificada tanto no grupo “carragenina + salina” (*spot* 24) quanto no grupo “carragenina + antitrombina” (*spot* 3). A presença desta proteína ilustra a relação entre a ontogênese da inflamação e a ativação do sistema complemento. O sistema complemento consiste em uma rede de proteínas que desempenham um papel importante na defesa do organismo e na inflamação (SARMA; WARD, 2011). As proteases liberadas pelos neutrófilos e macrófagos (HUBER-LANG et al., 2002; WARD; ZVAIFLER, 1973), bem como a calicreína, a plasmina e o fator XIIa da cascata de coagulação têm a capacidade de gerar produtos de ativação do sistema complemento (SARMA; WARD, 2011).

Durante a ativação do sistema complemento são gerados C3a e C5a (MARCEAU; HUGLI, 1984), anafilotoxinas que exercem múltiplos efeitos na resposta inflamatória. Estas proteínas podem atuar como potentes agentes quimiotáticos para os fagócitos (neutrófilos e monócitos) para os locais de injúria e inflamação. Além disso, induzem a liberação de histamina pelos mastócitos, o *burst* oxidativo em neutrófilos e a produção de TNF- α (MARKIEWSKI; DEANGELIS; LAMBRIS, 2006).

A enzima C3 apresenta massa molecular de 195 kDa e é composta por 2 cadeias polipeptídicas, uma cadeia α e uma cadeia β , com 120 e 75 kDa, respectivamente (BOKISCH; DIERICH; MULLER-EBERHARD, 1975). Os *spots* identificados como a enzima C3 apresentam aproximadamente 120 (*spot* 24) e 65 kDa (*spot* 3) e a semelhança entre as massas moleculares obtidas e descritas pela literatura sugere que estes *spots* correspondem às duas cadeias que compõem esta enzima. A presença deste componente do sistema complemento nos dois grupos experimentais analisados sugere que a inibição da inflamação pela antitrombina de *B. jararaca* não está relacionada ao sistema complemento.

A sorotransferrina foi identificada duas vezes como presente em maior quantidade no grupo “carragenina + salina” (*spots* 4 e 22). As transferrinas compõem uma família de glicoproteínas presente em todos os vertebrados cuja principal função é sequestrar e transportar o ferro circulante. As reações inflamatórias causam distúrbios no metabolismo do ferro, resultando em baixas concentrações de ferro livre. Estes distúrbios são mediados pela ativação da cascata das citocinas, como o TNF- α , a IL-1 e a IL-6 (PHILIPPE; RUIVARD, 2000). A concentração de ferro parece ser o principal fator de regulação da síntese de transferrina, a qual é aumentada mediante baixas concentrações de ferro (MORTON; TAVILL, 1977). Dessa forma, a presença de transferrina em menor quantidade no grupo

“carragenina + antitrombina” sugere que o pós-tratamento com a antitrombina de *B. jararaca* bloqueou ou diminuiu os distúrbios no metabolismo do ferro, provavelmente através da inibição da expressão e liberação de mediadores inflamatórios, como os citados acima. A inibição da síntese destas citocinas pela antitrombina foi descrita por Hagiwara et al. (2010), Harada et al. (1999) e Souter et al. (2001).

A α 1-antitripsina foi identificada no exsudato do grupo “carragenina + antitrombina”. Esta proteína é um importante inibidor de serinoproteases, pertencente à família das serpinas, produzida principalmente pelo fígado. Entretanto, a α 1-antitripsina também é produzida por macrófagos (PERLMUTTER et al., 1985), eosinófilos (JOHANSSON et al., 2001) e neutrófilos (MASON et al., 1991) e é armazenada em suas vesículas secretórias, as quais são liberadas durante a exocitose (CLEMMENSEN et al., 2011). Essa proteína tem a capacidade de inibir as proteases liberadas pelos neutrófilos, incluindo a elastase, a catepsina G e a proteinase 3 (BAGGIOLINI, 1972; BORREGAARD; COWLAND, 1997). Estudos clínicos e experimentais demonstraram que a α 1-antitripsina diminui a infiltração de neutrófilos durante o processo inflamatório agudo e crônico (GRIESE et al., 2007; SUBRAMANIAM et al., 2010). Dessa forma, a presença desta serpina no exsudato peritoneal do grupo “carragenina + antitrombina” sugere seu envolvimento no mecanismo de inibição da inflamação aguda pela antitrombina de *B. jararaca*.

A apolipoproteína AI, o componente protéico das lipoproteínas de alta densidade (HDL), está presente em maior quantidade no grupo “carragenina + antitrombina” (*spot* 8). Estudos demonstraram que a apolipoproteína A-I reduz o espalhamento, a adesão e a migração de neutrófilos, além de inibir o recrutamento de leucócitos em modelo *in vivo* de inflamação aguda (MURPHY et al., 2011). Esta proteína inibe também a expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 (ASHBY et al., 1998; COCKERILL et al., 1995), podendo estar envolvida na inibição do processo inflamatório mediada pela antitrombina.

O fibrinogênio e o cininogênio também foram identificados no grupo “carragenina + antitrombina” (*spots* 17 e 18, respectivamente). Essas duas proteínas fazem parte da cascata de coagulação e são consideradas moléculas pró-inflamatórias (ESMON, 2005; KHAN et al., 2010). A interação entre o processo inflamatório e a coagulação é um fenômeno bem estabelecido. A inflamação inicia a cascata de coagulação, diminui a atividade do mecanismo de anticoagulação e interfere no sistema fibrinolítico. As citocinas inflamatórias são os principais mediadores envolvidos na ativação da cascata de coagulação (ESMON, 2005).

Além disso, outra contribuição do processo inflamatório é o aumento na concentração de fibrinogênio, classificado como uma proteína de fase aguda (HANTGAN et al., 2001).

Inversamente, a ativação da coagulação resulta na deposição de fibrina, que por sua vez também possui efeito pró-inflamatório e amplifica a resposta inflamatória (FEISTRITZER; WIEDERMANN, 2007). Dessa forma, o fibrinogênio é considerado como uma importante ligação entre a inflamação e a hemostasia (ESMON, 2005).

O cininogênio de alto peso molecular participa da via intrínseca da cascata de coagulação, compondo o chamado sistema de contato. De acordo com a massa molecular do *spot* 18 (aproximadamente 66 kDa), identificado como cininogênio, trata-se da maior cadeia do cininogênio de alto peso molecular clivado. A molécula do cininogênio de alto peso molecular apresenta 110 kDa, entretanto, quando clivado pela calicreína plasmática libera bradicinina e resulta em uma proteína composta por duas cadeias polipeptídicas, uma de 62 e outra de 46 kDa (KHAN et al., 2010).

A presença de moléculas relacionadas à ativação da cascata de coagulação sugere que a atividade anti-inflamatória da antitrombina é independente da sua ação anticoagulante e este resultado é corroborado por Wiedermann e Romisch (2002).

O processo de clonagem da antitrombina de *B. jararaca* envolveu a construção de uma biblioteca de cDNA do fígado desta serpente. Inicialmente, o RNA total deste órgão foi obtido com a utilização do reagente TRIZOL (Invitrogen), que mantém a integridade do RNA enquanto lisa as células e dissolve seus componentes (INVITROGEN, 1999).

O RNA total foi utilizado para a construção da biblioteca, sendo transcrito para cDNA, o qual foi amplificado e ligado ao vetor λ TriplEx2, utilizando-se os kits *Smart PCR cDNA Synthesis* (Clontech) e *Gigapack III Gold Packaging Extract* (Stratagene).

A biblioteca resultante (não amplificada) apresentou título de $2,7 \times 10^6$ pfu/mL, sendo este valor maior que o recomendado, de $1-2 \times 10^6$ pfu/mL (CLONTECH, 2009). Esta biblioteca foi então amplificada e, após a amplificação, apresentou título de $1,98 \times 10^8$ pfu/mL, sendo este valor considerado representativo.

De posse da biblioteca de cDNA do fígado da serpente *B. jararaca*, foram construídos quatro oligonucleotídeos degenerados baseados tanto em sequências de nucleotídeos internas conservadas entre as antitrombinas descritas para outras espécies quanto na sequência N-terminal da antitrombina de *B. jararaca* obtida por degradação de Edman (MORAIS et al., 2009).

Um oligonucleotídeo é chamado degenerado quando algumas de suas posições apresentam diferentes possibilidades de bases (KWOK et al., 1994). Entretanto, quando o número de posições degeneradas é alto, a especificidade da reação é menor (LINHART; SHAMIR, 2005).

Os oligonucleotídeos construídos foram utilizados em reações de PCR, juntamente com a biblioteca de cDNA de fígado da serpente *B. jararaca* como molde, com o objetivo de amplificar um fragmento de DNA interno do gene da antitrombina dessa serpente.

Por tratar-se de oligonucleotídeos degenerados e, por isso, com menor especificidade, foram realizadas diversas reações de PCR, com diferentes concentrações de $MgCl_2$ e diferentes temperaturas de anelamento, até a obtenção de um produto da reação apresentando uma única banda.

As enzimas DNA-polimerase necessitam de cátions divalentes, usualmente Mg^{2+} , para a sua atividade. Como dNTPs e oligonucleotídeos se ligam ao Mg^{2+} , a concentração deste cátion deve exceder a concentração molar dos grupos fosfato presentes nestes dois componentes da reação. Dessa forma, é difícil estimar uma concentração ideal de Mg^{2+} para todas as circunstâncias. Apesar da concentração rotineiramente utilizada ser de 1,5 mM, o aumento na concentração de Mg^{2+} para 4,5 ou 6 mM pode causar uma diminuição (KRAWETZ; PON; DIXON, 1989; RIEDEL; WINGFIELD; BRITZ, 1992) ou um aumento (HARRIS; JONES, 1997) de reações inespecíficas. Assim, a concentração ótima de Mg^{2+} deve ser determinada empiricamente para cada combinação de oligonucleotídeos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

A temperatura utilizada para o anelamento dos oligonucleotídeos também é crítica. Temperaturas muito altas prejudicam o anelamento ao molde, resultando em um baixo rendimento do produto da reação. Temperaturas muito baixas favorecem reações não-específicas, resultando na amplificação de segmentos de DNA não desejados. Normalmente, emprega-se uma temperatura de anelamento 3-5 °C abaixo da sua temperatura teórica. Entretanto, é recomendado realizar uma série de reações com temperaturas partindo de 2 a 10 °C abaixo da temperatura calculada para os oligonucleotídeos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Com o estabelecimento da concentração de Mg^{2+} e da temperatura de anelamento ideais, foi obtido um fragmento de DNA que foi então clonado em vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega). Trata-se de um vetor de clonagem linearizado que apresenta uma timidina (T) nas duas extremidades, o que previne a recircularização do vetor, aumentando assim a eficiência da ligação dos produtos de PCR. Além disso, este é um vetor alta-cópia, com múltiplos sítios de clonagem e protocolo de ligação simples e rápido, características que fazem deste um sistema conveniente para a clonagem de fragmentos de DNA (PROMEGA, 2009).

O produto da ligação foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5- α por eletroporação e os clones positivos, contendo o vetor de clonagem e o fragmento de DNA de interesse e apresentando cerca de 790 pb (240 pb do vetor de clonagem e 550 pb do produto da PCR), foram identificados por PCR. Seis dos 20 clones avaliados continham o inserto (clones positivos) e foram então selecionados para extração de DNA plasmidial em pequena escala (mini preparação plasmidial) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Por meio do sequenciamento do DNA obtido, em sequenciador ABI-Prism 377 (Applied Biosystems), foi determinada a sequência N-terminal da antitrombina da serpente *B. jararaca*, possibilitando a identificação de 127 resíduos de aminoácidos.

Com base em uma sequência interna obtida da antitrombina de *B. jararaca*, foram construídos dois oligonucleotídeos específicos, os quais foram utilizados em reações de PCR. Essas reações resultaram na obtenção de dois fragmentos de DNA, um de 500 e outro de 1000 pb, os quais foram então clonados em vetor de clonagem pGEM-T, utilizados na transformação de bactérias *E. coli* DH5- α por eletroporação e isolados por meio de mini preparação plasmidial (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Esses fragmentos de DNA foram então sequenciados em sequenciador ABI-Prism 377 (Applied Biosystems). Nessa segunda etapa de clonagem, uma grande parte da sequência da antitrombina de *B. jararaca* foi obtida, envolvendo a identificação de 316 resíduos de aminoácidos da região interna e C-terminal dessa molécula.

As sequências resultantes das duas etapas de clonagem correspondem à sequência praticamente completa da antitrombina de *B. jararaca*, a qual foi alinhada à sequência da antitrombina humana e apresentou similaridade de cerca de 65%. Dos 430 resíduos de aminoácidos que compõem a antitrombina dessa serpente, apenas cinco não foram identificados. Dos 425 aminoácidos identificados, 149 não apresentaram identidade à antitrombina humana, o que corresponde a 35%. Desses, 72 envolvem substituições conservadas, 33 envolvem substituições semi-conservadas e 44 envolvem substituições não conservadas.

Apesar da longa distância evolutiva entre serpentes e humanos, diversas características da antitrombina encontram-se conservadas, como o sítio reativo composto por uma arginina e uma serina. Baseados na homologia da sequência de aminoácidos, Hunt e Dayhoff (1980) sugeriram que os inibidores plasmáticos de proteases divergiram de um ancestral comum há aproximadamente 500 milhões de anos e Jordan (1983) sugere que há 350-400 milhões de anos certos elementos da antitrombina já estariam bem estabelecidos. A alta conservação entre a sequência obtida para a antitrombina de *B. jararaca* e a antitrombina humana

corroborar o estudo de Jordan (1983) e é ilustrada pela alta similaridade entre a região amino-terminal de salmonídeos e humanos (70% de similaridade), apesar da significativa distância evolutiva (SALTE; NORBERG; ODEGAARD, 1995).

Entretanto, um dos seis resíduos de cisteína não é conservado na antitrombina dessa serpente (Cys430→Lys). Na antitrombina humana, esses resíduos formam três pontes dissulfeto (Cys8-Cys128, Cys21-Cys95 e Cys247-Cys430). Considerando-se que esses resíduos são responsáveis pela manutenção da estrutura das proteínas devido à formação de pontes dissulfeto e que esses seis resíduos encontram-se conservados na antitrombina de *Salmo salar* (ANDERSEN et al., 2000), é possível que essa substituição seja decorrente de erros no sequenciamento do fragmento de DNA obtido por PCR.

Por outro lado, sete dos dez resíduos de lisina e arginina presentes na região N-terminal da molécula e responsáveis pela interação com a heparina estão conservados (Lys28, Lys29, Arg47, Lys114, Lys125, Lys136 e Arg145). Os três resíduos diferentes em relação à sequência da antitrombina humana sofreram substituições conservadas (Lys53→Asn, Lys107→Gln, Lys139→Glu). A substituição de uma lisina por um ácido glutâmico na posição 139 também é descrita na antitrombina de *Salmo salar* (ANDERSEN et al., 2000) e *Gallus gallus* (TEJADA; DEELEY, 1995). O resíduo de lisina na posição 139 possui papel central na interação da antitrombina com a heparina (KRIDEL; CHAN; KNAUER, 1996). Entretanto, essa substituição não afetou a afinidade da antitrombina de *B. jararaca* pela heparina, como demonstrado pelos resultados obtidos por meio SPR.

O resíduo de ácido glutâmico na posição 113, que também desempenha um papel crucial na ligação à heparina e na ativação da molécula, também é conservado na antitrombina de *B. jararaca* (ANDERSEN et al., 2000).

Com relação aos sítios de glicosilação, apenas três foram identificados na antitrombina de *B. jararaca*. Como descrito anteriormente, a antitrombina humana apresenta quatro sítios de glicosilação nas posições Asn96, Asn135, Asn155 e Asn192. A isoforma β não possui o sítio Asn135 glicosilado, provavelmente devido à presença de serina no lugar de treonina na terceira posição da sequência de reconhecimento para a glicosilação Asn-X-Thr/Ser (PICARD; ERSDAL-BADJU; BOCK, 1995). Em *B. jararaca*, a asparagina da posição 96 foi substituída por uma glicina (Asn96→Gly), causando a perda de um sítio de glicosilação. A mesma substituição foi identificada também na antitrombina de *Gallus gallus* (TEJADA; DEELEY, 1995). O sítio de glicosilação que envolve o resíduo de asparagina na posição 135 (Asn135) e possui uma serina na terceira posição (Ser137), podendo ou não ser glicosilado na antitrombina humana, encontra-se conservado na antitrombina de *B. jararaca* e a segunda

posição da sequência de reconhecimento é ocupada por uma lisina (Lys136) em ambas as moléculas. Os outros dois sítios de glicosilação, que envolvem os resíduos de asparagina 155 e 192, também encontram-se conservados na antitrombina de *B. jararaca*.

Dessa forma, é possível que a ausência de um sítio de glicosilação confira à antitrombina de *B. jararaca* maior afinidade pela antitrombina quando comparada à antitrombina humana, como demonstrado pelos resultados de SPR. Além disso, essa diferença pode ser responsável pela maior atividade anti-inflamatória da antitrombina dessa serpente, considerando-se que o receptor celular envolvido nesse mecanismo, Syndecan-4, é um receptor tipo heparina.

Assim, os resultados do presente estudo demonstraram a atividade anti-inflamatória da antitrombina da serpente *B. jararaca* e elucidaram características bioquímicas e estruturais dessa molécula.

Esses resultados podem contribuir para a elucidação do mecanismo de inibição da inflamação pela antitrombina e do seu potencial terapêutico. Além disso, a antitrombina de *B. jararaca* pode ainda ser utilizada como modelo para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas com aplicações farmacêuticas e biomédicas.

6 CONCLUSÕES

1. A antitrombina da serpente *B. jararaca* possui maior afinidade pela heparina do que a antitrombina humana, como demonstrado pelo valor de afinidade de ligação (K_D) e às constantes de associação (k_a) e dissociação (k_d) obtidas por meio de ressonância plasmônica de superfície.
2. A antitrombina de *B. jararaca* apresenta atividade anti-inflamatória, sendo que o pré e o pós-tratamento com essa molécula é capaz de inibir a formação de edema, a interação leucócito-endotélio e a migração celular.
3. A atividade anti-inflamatória da antitrombina dessa serpente é maior quando comparada à da antitrombina humana, nas condições experimentais e modelo biológico utilizados.
4. A antitrombina de *B. jararaca* é composta por 430 aminoácidos e possui três sítios de glicosilação.
5. Sua sequência de aminoácidos apresenta 65% de similaridade em relação à antitrombina humana.
6. As características importantes para a atividade biológica desse inibidor encontram-se conservadas na antitrombina de *B. jararaca*, como o sítio reativo composto por uma arginina e uma serina e os resíduos de lisina e arginina presentes na região N-terminal da molécula, responsáveis pela interação com a heparina.
7. Esses resultados podem contribuir para a elucidação do mecanismo de inibição da inflamação pela antitrombina e para o desenvolvimento de moléculas com aplicações farmacêuticas e biomédicas.

REFERÊNCIAS*

- AHN, S. M.; SIMPSON, R. J. Body fluid proteomics: Prospects for biomarker discovery. **Proteomics Clin. Appl.**, v. 1, n. 9, p. 1004-1015, 2007.
- ANDERSEN, O.; FLENGSRUD, R.; NORBERG, K.; SALTE, R. Salmon antithrombin has only three carbohydrate side chains, and shows functional similarities to human beta-antithrombin. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 6, p. 1651-1657, 2000.
- ASHBY, D. T.; RYE, K. A.; CLAY, M. A.; VADAS, M. A.; GAMBLE, J. R.; BARTER, P. J. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 18, n. 9, p. 1450-1455, 1998.
- BAE, J. S.; REZAIE, A. R. Mutagenesis studies toward understanding the intracellular signaling mechanism of antithrombin. **J. Thromb. Haemost.**, v. 7, n. 5, p. 803-810, 2009.
- BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc. Res.**, v. 5, n. 3, p. 384-394, 1973.
- BAGGIOLINI, M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions. **Enzyme**, v. 13, n. 1, p. 132-160, 1972.
- BICK, R. L. Disseminated intravascular coagulation: objective clinical and laboratory diagnosis, treatment, and assessment of therapeutic response. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 22, n. 1, p. 69-88, 1996.
- BOKISCH, V. A.; DIERICH, M. P.; MULLER-EBERHARD, H. J. Third component of complement (C3): structural properties in relation to functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 6, p. 1989-1993, 1975.
- BOMBELI, T.; MUELLER, M.; HAEBERLI, A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. **Thromb. Haemost.**, v. 77, n. 3, p. 408-423, 1997.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, n. 10, p. 3503-3521, 1997.
- BOURIN, M. C.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. **Biochem. J.**, v. 289, pt. 2, p. 313-330, 1993.
- BOUSKELA, E.; RUBANYI, G. M. Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, and its combination with NW-nitro-L-arginine on early events following lipopolysaccharide injection: observations in the hamster cheek pouch microcirculation. **Int. J. Microcirc. Clin. Exp.**, v. 15, n. 4, p. 170-180, 1995.

* De acordo com:

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

BRAUN, M.; PIETSCH, P.; ZEPP, A.; SCHROR, K.; BAUMANN, G.; FELIX, S. B. Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 17, n. 11, p. 2568-2575, 1997.

BRENNAN, S. O.; GEORGE, P. M.; JORDAN, R. E. Physiological variant of antithrombin-III lacks carbohydrate sidechain at Asn 135. **FEBS Lett.**, v. 219, n. 2, p. 431-436, 1987.

BROZE, G. J., JR.; MAJERUS, P. W. Purification and properties of human coagulation factor VII. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 4, p. 1242-1247, 1980.

BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1033-1036, 1991.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University Press, 1989. 425.

CAREY, D. J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. **Biochem. J.**, v. 327, pt. 1, p. 1-16, 1997.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. **Immunol. Rev.**, v. 114, p. 5-28, 1990.

CARRELL, R.; SKINNER, R.; WARDEN, M.; WHISSTOCK, J. Antithrombin and heparin. **Mol. Med. Today.**, v. 1, n. 5, p. 226-231, 1995.

CARRELL, R. W. How serpins are shaping up. **Science**, v. 285, n. 5435, p. 1861, 1999.

CIDADE, D. A.; SIMAO, T. A.; DAVILA, A. M.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; BON, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 437-461, 2006.

CINES, D. B.; POLLAK, E. S.; BUCK, C. A.; LOSCALZO, J.; ZIMMERMAN, G. A.; MCEVER, R. P.; POBER, J. S.; WICK, T. M.; KONKLE, B. A.; SCHWARTZ, B. S.; BARNATHAN, E. S.; MCCRAE, K. R.; HUG, B. A.; SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood**, v. 91, n. 10, p. 3527-3561, 1998.

CLEMMENSEN, S. N.; JACOBSEN, L. C.; RORVIG, S.; ASKAA, B.; CHRISTENSEN, K.; IVERSEN, M.; JORGENSEN, M. H.; LARSEN, M. T.; VAN DEURS, B.; OSTERGAARD, O.; HEEGAARD, N. H.; COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. Alpha-1-antitrypsin is produced by human neutrophil granulocytes and their precursors and liberated during granule exocytosis. **Eur. J. Haematol.**, v. 86, n. 6, p. 517-530, 2011.

CLONTHEC. SMART cDNA library construction kit. **User Manual**, v. p. 1-49, 2009.

COCKERILL, G. W.; RYE, K. A.; GAMBLE, J. R.; VADAS, M. A.; BARTER, P. J. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 15, n. 11, p. 1987-1994, 1995.

COLLEN, D.; SCHETZ, J.; DE COCK, F.; HOLMER, E.; VERSTRAETE, M. Metabolism of antithrombin III (heparin cofactor) in man: effects of venous thrombosis and of heparin administration. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 7, n. 1, p. 27-35, 1977.

CONARD, J.; BROSSTAD, F.; LIE LARSEN, M.; SAMAMA, M.; ABILDGAARD, U. Molar antithrombin concentration in normal human plasma. **Haemostasis**, v. 13, n. 6, p. 363-368, 1983.

CROWLEY, S. R. The pathogenesis of septic shock. **Heart Lung**, v. 25, n. 2, p. 124-134; quiz 135-136, 1996.

CRUTCHLEY, D. J.; CONANAN, L. B.; TOLEDO, A. W.; SOLOMON, D. E.; QUE, B. G. Effects of prostacyclin analogues on human endothelial cell tissue factor expression. **Arterioscler. Thromb.**, v. 13, n. 7, p. 1082-1089, 1993.

CRUTCHLEY, D. J.; SOLOMON, D. E.; CONANAN, L. B. Prostacyclin analogues inhibit tissue factor expression in the human monocytic cell line THP-1 via a cyclic AMP-dependent mechanism. **Arterioscler. Thromb.**, v. 12, n. 6, p. 664-670, 1992.

CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L.; DE SARRO, G.; COSTANTINO, G.; ROMBOLA, L.; MAZZON, E.; IALENTI, A.; DE SARRO, A.; CILIBERTO, G.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **J. Immunol.**, v. 163, n. 9, p. 5094-5104, 1999.

DAMUS, P. S.; WALLACE, G. A. Purification of canine antithrombin III-heparin cofactor using affinity chromatography. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 61, n. 4, p. 1147-1153, 1974.

DE AGOSTINI, A. I.; WATKINS, S. C.; SLAYTER, H. S.; YOUSSEOUFIAN, H.; ROSENBERG, R. D. Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. **J. Cell. Biol.**, v. 111, n. 3, p. 1293-1304, 1990.

DE BOER, J. P.; CREASEY, A. A.; CHANG, A.; ROEM, D.; EERENBERG, A. J.; HACK, C. E.; TAYLOR, F. B., JR. Activation of the complement system in baboons challenged with live *Escherichia coli*: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 10, p. 4293-4301, 1993.

DE MORAIS-ZANI, K.; GREGO, K. F.; TANAKA, A. S.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Depletion of plasma albumin for proteomic analysis of *Bothrops jararaca* snake plasma. **J. Biomol. Tech.**, v. 22, n. 2, p. 67-73, 2011.

DELLA BELLA, S.; MOLTENI, M.; MOCELLIN, C.; FUMAGALLI, S.; BONARA, P.; SCORZA, R. Novel mode of action of iloprost: in vitro down-regulation of endothelial cell adhesion molecules. **Prostaglandins Other Lipid. Mediat.**, v. 65, n. 2-3, p. 73-83, 2001.

DEMENTIEV, A.; DOBO, J.; GETTINS, P. G. Active site distortion is sufficient for proteinase inhibition by serpins: structure of the covalent complex of alpha1-proteinase inhibitor with porcine pancreatic elastase. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 6, p. 3452-3457, 2006.

DUNZENDORFER, S.; KANEIDER, N.; RABENSTEINER, A.; MEIERHOFER, C.; REINISCH, C.; ROMISCH, J.; WIEDERMANN, C. J. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan-mediated regulation of human neutrophil migration by the serpin antithrombin III. **Blood**, v. 97, n. 4, p. 1079-1085, 2001.

EISENHUT, T.; SINHA, B.; GROTTTRUP-WOLFERS, E.; SEMMLER, J.; SIESS, W.; ENDRES, S. Prostacyclin analogs suppress the synthesis of tumor necrosis factor- α in LPS-stimulated human peripheral blood mononuclear cells. **Immunopharmacology**, v. 26, n. 3, p. 259-264, 1993.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; PINTO, A. F.; TERRA, R. M.; GUTIERREZ, J. M.; FOX, J. W. Wound exudate as a proteomic window to reveal different mechanisms of tissue damage by snake venom toxins. **J. Proteome. Res.**, v. 8, n. 11, p. 5120-5131, 2009.

ESMON, C. T. The interactions between inflammation and coagulation. **Br. J. Haematol.**, v. 131, n. 4, p. 417-430, 2005.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipases A(2). **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 833-840, 2000.

FEISTRITZER, C.; KANEIDER, N. C.; STURN, D. H.; WIEDERMANN, C. J. Syndecan-4-dependent migration of human eosinophils. **Clin. Exp. Allergy**, v. 34, n. 5, p. 696-703, 2004.

FEISTRITZER, C.; MOSHEIMER, B. A.; TANCEVSKI, I.; KANEIDER, N. C.; STURN, D. H.; PATSCH, J. R.; WIEDERMANN, C. J. Src tyrosine kinase-dependent migratory effects of antithrombin in leukocytes. **Exp. Cell Res.**, v. 305, n. 1, p. 214-220, 2005.

FEISTRITZER, C.; WIEDERMANN, C. J. Effects of anticoagulant strategies on activation of inflammation and coagulation. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 7, n. 6, p. 855-870, 2007.

FISCHER, E.; MARANO, M. A.; VAN ZEE, K. J.; ROCK, C. S.; HAWES, A. S.; THOMPSON, W. A.; DEFORGE, L.; KENNEY, J. S.; REMICK, D. G.; BLOEDOW, D. C.; ET AL. Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in *Escherichia coli* septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. **J. Clin. Invest.**, v. 89, n. 5, p. 1551-1557, 1992.

FRANÇA, F. O. S.; MALAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 72-86.

FREEMAN, B. D.; ZEHNBAUER, B. A.; BUCHMAN, T. G. A meta-analysis of controlled trials of anticoagulant therapies in patients with sepsis. **Shock**, v. 20, n. 1, p. 5-9, 2003.

FROST, C. L.; NAUDE, R. J.; MURAMOTO, K. Ostrich antithrombin III: kinetics and mechanism of inhibition of ostrich thrombin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, n. 9, p. 1164-1171, 2002.

GE. **BIAcore** - Sensor Surface Handbook. p. 100, 2005.

GETTINS, P. G.; FAN, B.; CREWS, B. C.; TURKO, I. V.; OLSON, S. T.; STREUSAND, V. J. Transmission of conformational change from the heparin binding site to the reactive center of antithrombin. **Biochemistry**, v. 32, n. 33, p. 8385-8389, 1993.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leukoc. Biol.**, v. 55, n. 5, p. 662-675, 1994.

GRANGER, J.; SIDDIQUI, J.; COPELAND, S.; REMICK, D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. **Proteomics**, v. 5, n. 18, p. 4713-4718, 2005.

GRAY, E.; SOUTER, P.; RÖMISCH, J.; POOLE, S. Antithrombin inhibits in vitro lipopolysaccharide induced procoagulant activity and cytokine production [Abstract]. **Shock**, v. 13, p. 147, 2000.

GRIESE, M.; LATZIN, P.; KAPPLER, M.; WECKERLE, K.; HEINZLMAIER, T.; BERNHARDT, T.; HARTL, D. alpha1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients. **Eur. Respir. J.**, v. 29, n. 2, p. 240-250, 2007.

GRITTI, D.; MALINVERNO, A.; GASPARETTO, C.; WIEDERMANN, C. J.; RICEVUTI, R. Attenuation of leukocyte beta 2-integrin expression by antithrombin-III. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 17, n. 1, p. 27-32, 2004.

GRUNDMANN, H. J.; HAHNLE, U.; HEGENSCHIED, B.; SAHLMULLER, G.; BIENZLE, U.; BLITSTEIN-WILLINGER, E. Inhibition of endotoxin-induced macrophage tumor necrosis factor expression by a prostacyclin analogue and its beneficial effect in experimental lipopolysaccharide intoxication. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 3, p. 501-505, 1992.

HACK, C. E.; AARDEN, L. A.; THIJS, L. G. Role of cytokines in sepsis. **Adv. Immunol.**, v. 66, p. 101-195, 1997.

HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; MATSUMOTO, S.; NOGUCHI, T. High dose antithrombin III inhibits HMGB1 and improves endotoxin-induced acute lung injury in rats. **Intensive. Care Med.**, v. 34, n. 2, p. 361-367, 2008.

HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; SHINGU, C.; MATSUMOTO, S.; UCHIDA, T.; NOGUCHI, T. Antithrombin III prevents cerulein-induced acute pancreatitis in rats. **Pancreas**, v. 38, n. 7, p. 746-751, 2009.

HAGIWARA, S.; IWASAKA, H.; SHINGU, C.; MATSUMOTO, S.; UCHIDA, T.; NOGUCHI, T. High-dose antithrombin III prevents heat stroke by attenuating systemic inflammation in rats. **Inflamm. Res.**, v. 59, n. 7, p. 511-518, 2010.

HANTGAN, R. R.; SIMPSON-HAIDARIS, P. J.; FRANCIS, C. W.; MARDER, V. J. Fibrinogen structure and physiology. In: COLMAN, R. W.; HIRSH, J.; MARDER, V. J.; CLOWES, A. W.; GEORGE, J. N. (Ed.). **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 203-232.

HARADA, N.; OKAJIMA, K.; KUSHIMOTO, S.; ISOBE, H.; TANAKA, K. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. **Blood**, v. 93, n. 1, p. 157-164, 1999.

HARRIS, S.; JONES, D. B. Optimisation of the polymerase chain reaction. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 54, n. 3, p. 166-173, 1997.

HATADA, E. N.; KRAPPMANN, D.; SCHEIDEREIT, C. NF-kappaB and the innate immune response. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 52-58, 2000.

HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.

HOFFMANN, J. N.; VOLLMAR, B.; INTHORN, D.; SCHILDBERG, F. W.; MENDER, M. D. Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 279, n. 1, p. C98-C107, 2000.

HORIE, S.; ISHII, H.; KAZAMA, M. Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells. **Thromb. Res.**, v. 59, n. 6, p. 895-904, 1990.

HU, S.; LOO, J. A.; WONG, D. T. Human body fluid proteome analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 23, p. 6326-6353, 2006.

HUBER-LANG, M.; YOUNKIN, E. M.; SARMA, J. V.; RIEDEMANN, N.; MCGUIRE, S. R.; LU, K. T.; KUNKEL, R.; YOUNGER, J. G.; ZETOUNE, F. S.; WARD, P. A. Generation of C5a by phagocytic cells. **Am. J. Pathol.**, v. 161, n. 5, p. 1849-1859, 2002.

HUNT, L. T.; DAYHOFF, M. O. A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 95, n. 2, p. 864-871, 1980.

HUNTINGTON, J. A.; MCCOY, A.; BELZAR, K. J.; PEI, X. Y.; GETTINS, P. G.; CARRELL, R. W. The conformational activation of antithrombin. A 2.85-A structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 20, p. 15377-15383, 2000.

HUNTINGTON, J. A.; READ, R. J.; CARRELL, R. W. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 923-6, 2000.

IBA, T.; KIDOKORO, A. What can we learn from the three megatrials using anticoagulants in severe sepsis? **Shock**, v. 22, n. 6, p. 508-512, 2004.

INTHORN, D.; HOFFMANN, J. N.; HARTL, W. H.; MUHLBAYER, D.; JOCHUM, M. Effect of antithrombin III supplementation on inflammatory response in patients with severe sepsis. **Shock**, v. 10, n. 2, p. 90-96, 1998.

INVITROGEN. TRIZOL reagent. **User Manual**, v. p. 1-2, 1999.

IRVING, J. A.; PIKE, R. N.; DAI, W.; BROMME, D.; WORRALL, D. M.; SILVERMAN, G. A.; COETZER, T. H.; DENNISON, C.; BOTTOMLEY, S. P.; WHISSTOCK, J. C. Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering alpha(1)-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. **Biochemistry**, v. 41, n. 15, p. 4998-5004, 2002.

JOHANSSON, B.; MALM, J.; PERSSON, T.; JANCIAUSKIENE, S.; ANDERSSON, P.; CARLSON, J.; EGESTEN, A. Alpha-1-antitrypsin is present in the specific granules of human eosinophilic granulocytes. **Clin. Exp. Allergy**, v. 31, n. 3, p. 379-386, 2001.

JOHNSTON, B.; WALTER, U. M.; ISSEKUTZ, A. C.; ISSEKUTZ, T. B.; ANDERSON, D. C.; KUBES, P. Differential roles of selectins and the alpha4-integrin in acute, subacute, and chronic leukocyte recruitment in vivo. **J. Immunol.**, v. 159, n. 9, p. 4514-4523, 1997.

JORDAN, R. E. Antithrombin in vertebrate species: conservation of the heparin-dependent anticoagulant mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 227, n. 2, p. 587-595, 1983.

JORDAN, R. E.; OOSTA, G. M.; GARDNER, W. T.; ROSENBERG, R. D. The binding of low molecular weight heparin to hemostatic enzymes. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 21, p. 10073-10080, 1980.

JORRES, A.; DINTER, H.; TOPLEY, N.; GAHL, G. M.; FREI, U.; SCHOLZ, P. Inhibition of tumour necrosis factor production in endotoxin-stimulated human mononuclear leukocytes by the prostacyclin analogue iloprost: cellular mechanisms. **Cytokine**, v. 9, n. 2, p. 119-125, 1997.

KANEIDER, N. C.; EGGER, P.; DUNZENDORFER, S.; WIEDERMANN, C. J. Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 287, n. 1, p. 42-46, 2001.

KANEIDER, N. C.; REINISCH, C. M.; DUNZENDORFER, S.; ROMISCH, J.; WIEDERMANN, C. J. Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. **J. Cell. Sci.**, v. 115, n. Pt 1, p. 227-236, 2002.

KHAN, M. M.; LIU, Y.; KHAN, M. E.; GILMAN, M. L.; KHAN, S. T.; BROMBERG, M.; COLMAN, R. W. Upregulation of tissue factor in monocytes by cleaved high molecular weight kininogen is dependent on TNF-alpha and IL-1beta. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 298, n. 2, p. H652-658, 2010.

KIM, T. H.; BAE, J. S. Inhibitory effects of antithrombin on the expression of secretory group IIA phospholipase A(2) in endothelial cells. **BMB Rep.**, v. 43, n. 9, p. 604-608, 2010.

KOIDE, T. Isolation and characterization of antithrombin III from human, porcine and rabbit plasma, and rat serum. **J. Biochem. (Tokyo)**, v. 86, n. 6, p. 1841-1850, 1979.

KOIDE, T.; OHTA, Y.; ODANI, S.; ONO, T. Chicken antithrombin. Isolation, characterization, and comparison with mammalian antithrombins and chicken ovalbumin. **J. Biochem.**, v. 91, n. 4, p. 1223-1229, 1982.

KOUNTCHEV, J.; BIJUKLIC, K.; BELLMANN, R.; WIEDERMANN, C. J.; JOANNIDIS, M. Reduction of D-dimer levels after therapeutic administration of antithrombin in acquired antithrombin deficiency of severe sepsis. **Crit. Care**, v. 9, n. 6, p. R596-600, 2005.

KOWAL-VERN, A.; WALENGA, J. M.; SHARP-PUCCI, M.; HOPPENSTEADT, D.; GAMELLI, R. L. Postburn edema and related changes in interleukin-2, leukocytes, platelet activation, endothelin-1, and C1 esterase inhibitor. **J. Burn. Care Rehabil.**, v. 18, n. 2, p. 99-103, 1997.

KRAWETZ, S. A.; PON, R. T.; DIXON, G. H. Increased efficiency of the Taq polymerase catalyzed polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, n. 2, p. 819, 1989.

KRIDEL, S. J.; CHAN, W. W.; KNAUER, D. J. Requirement of lysine residues outside of the proposed pentasaccharide binding region for high affinity heparin binding and activation of human antithrombin III. **The J. of Biol. Chem.**, v. 271, n. 34, p. 20935-20941, 1996.

KURACHI, K.; SCHMER, G.; HERMODSON, M. A.; TELLER, D. C.; DAVIE, E. W. Characterization of human, bovine, and horse antithrombin III. **Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 368-373, 1976.

KWOK, S.; CHANG, S. Y.; SNINSKY, J. J.; WANG, A. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. **PCR Methods Appl.**, v. 3, n. 4, p. S39-47, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p. 680-685, 1970.

LAMY, M.; DEBY-DUPONT, G. Is sepsis a mediator-inhibitor mismatch? **Intensive Care Med.**, v. 21 Suppl 2, p. S250-257, 1995.

LAWRENCE, M. B.; SPRINGER, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 859-873, 1991.

LEON, M.; AIACH, M.; COEZY, E.; GUENNEC, J. Y.; FIESSINGER, J. N. Antithrombin III synthesis in rat liver parenchymal cells. **Thromb. Res.**, v. 30, n. 4, p. 369-375, 1983.

LEVI, M.; TEN CATE, H.; BAUER, K. A.; VAN DER POLL, T.; EDGINGTON, T. S.; BULLER, H. R.; VAN DEVENTER, S. J.; HACK, C. E.; TEN CATE, J. W.; ROSENBERG, R. D. Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifylline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees. **J. Clin. Invest.**, v. 93, n. 1, p. 114-120, 1994.

LEVY, B. D.; CLISH, C. B.; SCHMIDT, B.; GRONERT, K.; SERHAN, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 612-619, 2001.

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, n. 10, p. 645-655, 1990.

LINHART, C.; SHAMIR, R. The degenerate primer design problem: theory and applications. **J. Comput. Biol.**, v. 12, n. 4, p. 431-456, 2005.

LINKE, T.; DORAISWAMY, S.; HARRISON, E. H. Rat plasma proteomics: effects of abundant protein depletion on proteomic analysis. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.**, v. 849, n. 1-2, p. 273-281, 2007.

LUERMAN, G. C.; URIARTE, S. M.; RANE, M. J.; MCLEISH, K. R. Application of proteomics to neutrophil biology. **J. Proteomics**, v. 73, n. 3, p. 552-561, 2010.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Inflammation: the actors and their language**. Cells, tissues and diseases. 2. ed. Nova York: Oxford University Press, 2004. p.307-382.

MAK, P.; ENGHILD, J. J.; DUBIN, A. Hamster antithrombin III: purification, characterization and acute phase response. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 115, n. 1, p. 135-141, 1996.

MALECH, H. L.; GALLIN, J. I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, n. 11, p. 687-694, 1987.

MAMMEN, E. F. Antithrombin: its physiological importance and role in DIC. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 24, n. 1, p. 19-25, 1998.

MARCEAU, F.; HUGLI, T. E. Effect of C3a and C5a anaphylatoxins on guinea-pig isolated blood vessels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 230, n. 3, p. 749-754, 1984.

MARCUM, J. A.; ATHA, D. H.; FRITZE, L. M.; NAWROTH, P.; STERN, D.; ROSENBERG, R. D. Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 16, p. 7507-7517, 1986.

MARKIEWSKI, M. M.; DEANGELIS, R. A.; LAMBRIS, J. D. Liver inflammation and regeneration: two distinct biological phenomena or parallel pathophysiologic processes? **Mol. Immunol.**, v. 43, n. 1-2, p. 45-56, 2006.

MASON, D. Y.; CRAMER, E. M.; MASSE, J. M.; CRYSTAL, R.; BASSOT, J. M.; BRETON-GORIUS, J. Alpha 1-antitrypsin is present within the primary granules of human polymorphonuclear leukocytes. **Am. J. Pathol.**, v. 139, n. 3, p. 623-628, 1991.

MATTHAY, M. A. Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and anti-inflammatory properties. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 10, p. 759-762, 2001.

MAYADAS, T. N.; ROSENKRANZ, A.; COTRAN, R. S. Glomerular inflammation: use of genetically deficient mice to elucidate the roles of leukocyte adhesion molecules and Fc-gamma receptors in vivo. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 8, n. 3, p. 293-298, 1999.

MAZZONE, A.; CUSA, C.; BUCCI, L.; VEZZOLI, M.; GHIO, S.; BUGGIA, I.; REGAZZI, M. B.; FOSSATI, G.; MAZZUCHELLI, I.; GRITTI, D. The effects of iloprost infusion on microcirculation is independent of nitric oxide metabolites and endothelin-1 in chronic peripheral ischaemia. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 29, n. 1, p. 1-5, 1999.

MCCUSKEY, R. S.; URBASCHEK, R.; URBASCHEK, B. The microcirculation during endotoxemia. **Cardiovasc. Res.**, v. 32, n. 4, p. 752-763, 1996.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR., V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33-61

MITCHELL, J. A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 24, p. 11693-11697, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORAIS, K. B. **Purificação e caracterização da antitrombina do plasma da serpente *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) (Ophidia: Viperidae, Crotalinae)**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Geral) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2009.

MORAIS, K. B.; FERNANDES GREGO, K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Identification of proteins similar to *Bothrops jararaca* coagulation inhibitor (BjI) in the plasmas of *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu* and *Crotalus durissus terrificus* snakes. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 149, n. 2, p. 236-240, 2008.

MORAIS, K. B.; VIEIRA, C. O.; HIRATA, I. Y.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. *Bothrops jararaca* antithrombin: isolation, characterization and comparison with other animal antithrombins. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 152, n. 2, p. 171-176, 2009.

MORTON, A. G.; TAVILL, A. S. The role of iron in the regulation of hepatic transferrin synthesis. **Br. J. Haematol.**, v. 36, n. 3, p. 383-394, 1977.

MURPHY, A. J.; WOOLLARD, K. J.; SUHARTOYO, A.; STIRZAKER, R. A.; SHAW, J.; SVIRIDOV, D.; CHIN-DUSTING, J. P. Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, n. 6, p. 1333-1341, 2011.

NAHAS, L.; BETTI, F.; KAMIGUTI, A. S.; MARTINS, I. S. S. Blood coagulation mechanism in the snakes *Waglerophis merremii* and *Bothrops jararaca*. **Comp. Biochem. and Physiol.**, v. 69, p. 739-743, 1981.

NAHAS, L.; BETTI, F.; KAMIGUTI, A. S.; SATO, H. Blood coagulation inhibitor in a snake plasma (*Bothrops jararaca*). **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v. 30, n. 1, p. 106-113, 1973.

NEVIERE, R.; TOURNOYS, A.; MORDON, S.; MARECHAL, X.; SONG, F. L.; JOURDAIN, M.; FOURRIER, F. Antithrombin reduces mesenteric venular leukocyte interactions and small intestine injury in endotoxemic rats. **Shock**, v. 15, n. 3, p. 220-225, 2001.

NICOLINI, F. A.; MEHTA, P.; LAWSON, D.; MEHTA, J. L. Reduction in human neutrophil chemotaxis by the prostacyclin analogue iloprost. **Thromb. Res.**, v. 59, n. 3, p. 669-674, 1990.

NORDENMAN, B.; NYSTROM, C.; BJORK, I. The size and shape of human and bovine antithrombin III. **Eur. J. Biochem.**, v. 78, n. 1, p. 195-203, 1977.

ODA, T.; KATORI, M.; HATANAKA, K.; NAGAI, Y. Inhibition of neutrophil migration by a selective inhibitor of matrix metalloproteinase: analysis by intravital microscopy. **Mediators Inflamm.**, v. 4, n. 2, p. 133-137, 1995.

OELSCHLAGER, C.; ROMISCH, J.; STAUBITZ, A.; STAUSS, H.; LEITHAUSER, B.; TILLMANN, H.; HOLSCHERMANN, H. Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. **Blood**, v. 99, n. 11, p. 4015-4020, 2002.

OKAJIMA, K.; UCHIBA, M. The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 24, n. 1, p. 27-32, 1998.

OLSON, S. T.; BJORK, I.; SHEFFER, R.; CRAIG, P. A.; SHORE, J. D.; CHOAY, J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 18, p. 12528-12538, 1992.

OLSON, S. T.; RICHARD, B.; IZAGUIRRE, G.; SCHEDIN-WEISS, S.; GETTINS, P. G. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. **Biochimie**, v. 92, n. 11, p. 1587-1596, 2010.

OSMOND, R. I.; KETT, W. C.; SKETT, S. E.; COOMBE, D. R. Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization. **Anal. Biochem.**, v. 310, n. 2, p. 199-207, 2002.

OSTROVSKY, L.; WOODMAN, R. C.; PAYNE, D.; TEOH, D.; KUBES, P. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. **Circulation**, v. 96, n. 7, p. 2302-2310, 1997.

PERLMUTTER, D. H.; COLE, F. S.; KILBRIDGE, P.; ROSSING, T. H.; COLTEN, H. R. Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, n. 3, p. 795-799, 1985.

PERLMUTTER, D. H.; GLOVER, G. I.; RIVETNA, M.; SCHASTEEN, C. S.; FALLON, R. J. Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. 10, p. 3753-3757, 1990.

PERRY, D. J. Antithrombin and its inherited deficiencies. **Blood Rev.**, v. 8, n. 1, p. 37-55, 1994.

PETERSEN, E. E. D.-W., G.; SOTTRUP-JENSEN; L. MAGNUSSON, S. The primary structure of antithrombin-III (heparin-cofactor): partial homology between alpha1-antitrypsin

and antithrombin-III. In: COLLEN, D. W., B.; VERSTRAETE, M. (Ed.). **The physiological inhibitors of coagulation and fibrinolysis**. Amsterdam: Elsevier. 1979. p.43.

PHILIPPE, P.; RUIVARD, M. Iron and inflammation. **Rev. Prat.**, v. 50, n. 9, p. 961-965, 2000.

PICARD, V.; ERSDAL-BADJU, E.; BOCK, S. C. Partial glycosylation of antithrombin III asparagine-135 is caused by the serine in the third position of its N-glycosylation consensus sequence and is responsible for production of the beta-antithrombin III isoform with enhanced heparin affinity. **Biochemistry**, v. 34, n. 26, p. 8433-8440, 1995.

PIZZO, S. V. Serpin receptor 1: a hepatic receptor that mediates the clearance of antithrombin III-proteinase complexes. **Am. J. Med.**, v. 87, n. 3B, p. 10S-14S, 1989.

PLACHINTA, R. V.; HAYES, J. K.; CERILLI, L. A.; RICH, G. F. Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. **Anesthesiology**, v. 98, n. 1, p. 89-95, 2003.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PROMEGA. pGEM-T and pGEM-T Easy vector systems. **Technical Manual**, v. p. 1-27, 2009.

PULLETZ, S.; LEHMANN, C.; VOLK, T.; SCHMUTZLER, M.; ZIEMER, S.; KOX, W. J.; SCHERER, R. U. Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia. **Crit. Care Med.**, v. 28, n. 8, p. 2881-286, 2000.

QUINSEY, N. S.; GREEDY, A. L.; BOTTOMLEY, S. P.; WHISSTOCK, J. C.; PIKE, R. N. Antithrombin: in control of coagulation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 3, p. 386-389, 2004.

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clin. Issues**, v. 15, n. 1, p. 3-17, 2004.

REIF, O. W.; FREITAG, R. Control of the cultivation process of antithrombin III and its characterization by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. A**, v. 680, n. 2, p. 383-394, 1994.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 475-480, 1997.

RIEDEL, K. H.; WINGFIELD, B. D.; BRITZ, T. J. Combined influence of magnesium concentration and polymerase chain reaction specificity enhancers. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 71, n. 1, p. 69-72, 1992.

RIVA, C. M.; MORGANROTH, M. L.; LJUNGMAN, A. G.; SCHOENEICH, S. O.; MARKS, R. M.; TODD, R. F., 3RD; WARD, P. A.; BOXER, L. A. Iloprost inhibits

neutrophil-induced lung injury and neutrophil adherence to endothelial monolayers. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 3, n. 4, p. 301-309, 1990.

ROBERTS, R. M.; MATHIALAGAN, N.; DUFFY, J. Y.; SMITH, G. W. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 5, n. 3-4, p. 385-436, 1995.

ROSENBERG, J. S.; MCKENNA, P. W.; ROSENBERG, R. D. Inhibition of human factor IXa by human antithrombin. **J. Biol. Chem.**, v. 250, n. 23, p. 8883-8888, 1975.

ROSENBERG, R. D. Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. **Am. J. Med.**, v. 87, n. 3B, p. 2S-9S, 1989.

ROSENBERG, R. D.; DAMUS, P. S. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. **J. Biol. Chem.**, v. 248, n. 18, p. 6490-6505, 1973.

ROSENBERG, R. D. B. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: COLMAN, W. H., J.; MARDER, V. J.; SALZMAN, E. W. (Ed.). **Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott, 1994. p.837-860.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p.329-335, 1947.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BURCHERL, W.; BUCKLEY, E. E.; DEULOFEU, V. (Ed.). **Venomous Animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 345-841.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; GUTIERREZ, J. M.; FOX, J. W. Proteomics of wound exudate in snake venom-induced pathology: search for biomarkers to assess tissue damage and therapeutic success. **J. Proteome Res.**, v. 10, n. 4, p. 1987-2005, 2011.

SAHAB, Z. J.; ICZKOWSKI, K. A.; SANG, Q. X. Anion exchange fractionation of serum proteins versus albumin elimination. **Anal. Biochem.**, v. 368, n. 1, p. 24-32, 2007.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**, v. 20, n. 8, p. 949-956, 1999.

SALMIVIRTA, M.; LIDHOLT, K.; LINDAHL, U. Heparan sulfate: a piece of information. **FASEB J.**, v. 10, n. 11, p. 1270-1279, 1996.

SALTE, R.; NORBERG, K.; ODEGAARD, O. R. Some functional properties of teleost antithrombin. **Thromb. Res.**, v. 80, n. 3, p. 193-200, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 2344 p.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CARDOSO, J. L.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, 2008.

SARMA, J. V.; WARD, P. A. The complement system. **Cell Tissue Res.**, v. 343, n. 1, p. 227-235, 2011.

SCHEDIN-WEISS, S.; AROCAS, V.; BOCK, S. C.; OLSON, S. T.; BJORK, I. Specificity of the basic side chains of Lys114, Lys125, and Arg129 of antithrombin in heparin binding. **Biochemistry**, v. 41, n. 41, p. 12369-12376, 2002.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.htm>>. Acesso em: 2 fev. 2013.

SOUTER, P. J.; THOMAS, S.; HUBBARD, A. R.; POOLE, S.; ROMISCH, J.; GRAY, E. Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood. **Crit. Care. Med.**, v. 29, n. 1, p. 134-139, 2001.

STEIN, P. E.; CARRELL, R. W. What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? **Nat. Struct. Biol.**, v. 2, n. 2, p. 96-113, 1995.

STOSCHECK, C. M. Quantification of protein. **Methods Enzymol.**, v. 182, p. 50-68, 1990.

STRATIKOS, E.; GETTINS, P. G. Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 9, p. 4808-4813, 1999.

SUBRAMANIAM, D.; STEELE, C.; KOHNLEIN, T.; WELTE, T.; GRIP, O.; MATALON, S.; JANCIAUSKIENE, S. Effects of alpha 1-antitrypsin on endotoxin-induced lung inflammation in vivo. **Inflamm. Res.**, v. 59, n. 7, p. 571-578, 2010.

SUMMARIA, L.; BOREISHA, I. G.; ARZADON, L.; ROBBINS, K. C. Activation of human Glu-plasminogen to Glu-plasmin by urokinase in presence of plasmin inhibitors. *Streptomyces* leupeptin and human plasma alpha1-antitrypsin and antithrombin III (plus heparin). **J. Biol. Chem.**, v. 252, n. 11, p. 3945-3951, 1977.

SUN, H. M.; HONG, L. Z.; SHEN, X. K.; LIN, X. Q.; SONG, Y.; SHI, Y. Antithrombin-III without concomitant heparin improves endotoxin-induced acute lung injury rats by inhibiting the activation of mitogen-activated protein kinase. **Chin. Med. J. (Engl.)**, v. 122, n. 20, p. 2466-2471, 2009.

TANAKA-AZEVEDO, A. M.; TANAKA, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. A new blood coagulation inhibitor from the snake *Bothrops jararaca* plasma: isolation and characterization. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, v. 308, n. 4, p. 706-712, 2003.

TAYLOR, F. B., JR.; EMERSON, T. E., JR.; JORDAN, R.; CHANG, A. K.; BLICK, K. E. Antithrombin-III prevents the lethal effects of *Escherichia coli* infusion in baboons. **Circ. Shock.**, v. 26, n. 3, p. 227-235, 1988.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circ. Res.**, v. 88, n. 9, p. 877-887, 2001.

TEJADA, M. L.; DEELEY, R. G. Cloning of an avian antithrombin: developmental and hormonal regulation of expression. **Thrombosis and haemostasis**, v. 73, n. 4, p. 654-661, 1995.

THALER, E.; SCHMER, G. A simple two-step isolation procedure for human and bovine antithrombin II/III (heparin cofactor): a comparison of two methods. **Br. J. Haematol.**, v. 31, n. 2, p. 233-243, 1975.

TOTZKE, G.; SCHOBERSBERGER, W.; SCHLOESSER, M.; CZECHOWSKI, M.; HOFFMANN, G. Effects of antithrombin III on tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synthesis in vascular smooth muscle cells. **J. Interferon. Cytokine Res.**, v. 21, n. 12, p. 1063-1069, 2001.

UCHIBA, M.; OKAJIMA, K. Antithrombin does not directly promote the endothelial production of prostacyclin in cultured endothelial cells. **Thromb. Haemost.**, v. 86, n. 2, p. 722-723, 2001.

UCHIBA, M.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K. Effects of various doses of antithrombin III on endotoxin-induced endothelial cell injury and coagulation abnormalities in rats. **Thromb. Res.**, v. 89, n. 5, p. 233-241, 1998.

UCHIBA, M.; OKAJIMA, K.; MURAKAMI, K.; OKABE, H.; TAKATSUKI, K. Attenuation of endotoxin-induced pulmonary vascular injury by antithrombin III. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 6 Pt 1, p. L921-930, 1996.

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. **J. Immunol.**, v. 147, n. 6, p. 1803-1809, 1991.

VAN DER POLL, T.; LEVI, M.; HACK, C. E.; TEN CATE, H.; VAN DEVENTER, S. J.; EERENBERG, A. J.; DE GROOT, E. R.; JANSEN, J.; GALLATI, H.; BULLER, H. R.; ET AL. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 1253-1259, 1994a.

VAN DER POLL, T.; LEVI, M.; VAN DEVENTER, S. J.; TEN CATE, H.; HAAGMANS, B. L.; BIEMOND, B. J.; BULLER, H. R.; HACK, C. E.; TEN CATE, J. W. Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. **Blood**, v. 83, n. 2, p. 446-451, 1994b.

VAN DEVENTER, S. J.; BULLER, H. R.; TEN CATE, J. W.; AARDEN, L. A.; HACK, C. E.; STURK, A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. **Blood**, v. 76, n. 12, p. 2520-2526, 1990.

VERLEYE, M.; HEULARD, I.; GILLARDIN, J. M. Phenazone potentiates the local anaesthetic effect of lidocaine in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 41, n. 5, p. 539-542, 2000.

VIDAL, N.; RAGE, J.-C.; COULOUX, A.; HEDGES, S. B. Snakes (Serpentes). In: HEDGES, S. B. e KUMAR, S. (Ed.). **The timetree of life**. Oxford: Oxford University Press, 2009. p.390-397.

VIEIRA, C. O.; TANAKA, A. S.; SANO-MARTINS, I. S.; MORAIS, K. B.; SANTORO, M. L.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. *Bothrops jararaca* fibrinogen and its resistance to hydrolysis evoked by snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 151, n. 4, p. 428-432, 2008.

WARD, P. A.; ZVAIFLER, N. J. Quantitative phagocytosis by neutrophils. I. A new method with immune complexes. **J. Immunol.**, v. 111, n. 6, p. 1771-1776, 1973.

WARREN, B. L.; EID, A.; SINGER, P.; PILLAY, S. S.; CARL, P.; NOVAK, I.; CHALUPA, P.; ATHERSTONE, A.; PENZES, I.; KUBLER, A.; KNAUB, S.; KEINECKE, H. O.; HEINRICHS, H.; SCHINDEL, F.; JUERS, M.; BONE, R. C.; OPAL, S. M. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 286, n. 15, p. 1869-1878, 2001.

WHISSTOCK, J.; SKINNER, R.; LESK, A. M. An atlas of serpin conformations. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, n. 2, p. 63-67, 1998.

WIEDERMANN CH, J.; ROMISCH, J. The anti-inflammatory actions of antithrombin - a review. **Acta Med. Austriaca**, v. 29, n. 3, p. 89-92, 2002.

WIEDERMANN, C. J. Clinical review: molecular mechanisms underlying the role of antithrombin in sepsis. **Crit. Care**, v. 10, n. 1, p. 209, 2006.

WIEDERMANN, C. J.; HOFFMANN, J. N.; JUERS, M.; OSTERMANN, H.; KIENAST, J.; BRIEGEL, J.; STRAUSS, R.; KEINECKE, H. O.; WARREN, B. L.; OPAL, S. M. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. **Crit. Care Med.**, v. 34, n. 2, p. 285-292, 2006.

WINYARD, P. G.; WLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**. Totowa: Humana, 2003. 378 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Genebra, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 2 fev. 2013.

YAMASHIRO, K.; KIRYU, J.; TSUJIKAWA, A.; HONJO, M.; NONAKA, A.; MIYAMOTO, K.; HONDA, Y.; TANIHARA, H.; OGURA, Y. Inhibitory effects of antithrombin III against leukocyte rolling and infiltration during endotoxin-induced uveitis in rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 42, n. 7, p. 1553-1560, 2001.

YAMAUCHI, T.; UMEDA, F.; INOUCHI, T.; NAWATA, H. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 163, n. 3, p. 1404-1411, 1989.

ZARDI, E. M.; ZARDI, D. M.; DOBRINA, A.; AFELTRA, A. Prostacyclin in sepsis: a systematic review. **Prostaglandins Other. Lipid. Mediat.**, v. 83, n. 1-2, p. 1-24, 2007.