DAIANA SILVA LOPES

**AÇÃO DA JARARAGINA NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE
MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS
ENDOTELIAIS HUMANAS**

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
2011

DAIANA SILVA LOPES

**AÇÃO DA JARARAGINA NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE
MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS
ENDOTELIAIS HUMANAS**

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

Orientadora: Dra. Patricia Bianca Clissa

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Lopes, Daiana Silva.

Ação da jararagina na expressão gênica e protéica de mediadores
pró-inflamatórios por células endoteliais humanas / Daiana Silva
Lopes. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Patrícia Bianca Clissa.

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: Toxinas de serpentes.

Versão do título para o inglês: Action of jararhagin in gene and protein
expression of proinflammatory mediators by human endothelial cells.

Descritores: 1. Veneno de serpente 2. Jararagina 3. Inflamação 4.
Moléculas de adesão I. Clissa, Patrícia Bianca II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB04/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Daiana Silva Lopes.

Título da Tese: Ação da jararagina na expressão gênica e protéica de mediadores pró-inflamatórios por células endoteliais humanas.

Orientador(a): Patrícia Bianca Clissa.

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:

São Paulo, 17 de agosto de 2007.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Dra. Patrícia Bianca Clissa

Laboratório de Imunopatologia

Instituto Butantan

Secretaria da Saúde

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Aplicação da metodologia de análises da expressão gênica diferencial no estudo do mecanismo de ação de toxinas sobre células endoteliais humanas*” - **Registro CEP: 526/04.**

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária, realizada no dia 17 de agosto de 2007, analisou e APROVOU a solicitação de inclusão da aluna Daiana Silva Lopes no Projeto de Pesquisa acima mencionado, bem como, a prorrogação do prazo do Estudo para mais dois anos e meio (aproximadamente trinta meses).

Atenciosamente,

Dr. Murilo Alexandre Carmona
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

c/c para a Divisão de Clínica Obstétrica

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 das alterações locais induzidas por toxinas isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis*”, protocolo nº 411/07, sob a responsabilidade de Patrícia Bianca Clissa e Daiana Silva Lopes, 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 12/09/2007.

“We certify that the Research entitled Study of local tissue damage induced by toxins from *Bothrops pauloensis* snake venom, protocol nº 411/07, under the responsibility of Patrícia Bianca Clissa and Daiana Silva Lopes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/12/2007”.

São Paulo, 12 de setembro de 2007.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus Pais, José Lopes e Divina. Obrigada pela confiança depositada em mim, pelo constante incentivo e paciência. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Patricia Bianca Clissa, minha querida orientadora, meu exemplo. Obrigada pela oportunidade e pela confiança depositada em mim, por me ensinar a crescer, pelo carinho, apoio e amizade. Gosto muito de você.

À Dra. Ana Maria Moura, pela orientação, oportunidade e confiança durante todo o meu doutorado. Por me acolher como sua neta. Obrigada por tudo.

À Dra. Máisa Splendore Della-Casa pela leitura crítica desse trabalho e por toda contribuição profissional. À amiga Má, você fez meus dias mais felizes em Sampa. Sua alegria e seu amor são muito importantes para mim. Obrigada por tudo!

À Dra. Cristiani Baldo, por ter contribuído muito para o meu crescimento profissional e pela leitura crítica desse trabalho. À minha amiga Cris, obrigada por ter me acolhido em sua casinha, pela paciência e pelo carinho. Adoro Você!

À Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro, pela colaboração e pelas discussões críticas desse trabalho. Querida Eli, obrigada pelo carinho.

À Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, por ter me mostrado o maravilhoso mundo da pesquisa. Pela orientação, incentivo e carinho sempre.

Ao Dr. Johannes Eble e todo seu grupo de pesquisa. Pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

As amigas Alletta e Déssirre, por toda ajuda com os experimentos e pelo carinho.

À Flávia Figueredo Rezende, pela contribuição profissional. À amiga Flavinha, pelo companheirismo, dedicação, carinho e amor.

À amiga Amanda pela convivência agradável e pelo carinho.

À todos os pesquisadores e alunos do laboratório de Imunopatologia, Geraldo, Irene, Kátia, Marisa, Cris Caporrino, Sérgio, Daniel, Hércules, Rafael, Juliana, Sandriana, Bruna, Priscila, Renata, Ane, Nicole, Tiago, Juninho, Caio, Gabriela, Podé, Louise, Bianca, Tamires, por toda ajuda e agradável convivência.

À todos os funcionários do Laboratório de Imunopatologia por sempre estarem dispostos em ajudar.

Às amigas Iara e Isa, meninas vocês alegraram o laboratório. Iara, fofinha, obrigada por tudo!

À amiga Bruna, obrigada por tudo querida!

Às amigas Cris Lúcio e Ariane, pela paciência nos momentos difíceis e pela amizade.

À amiga Carol, pela paciência, carinho e adorável convivência.

À minha querida amiga Stella. Minha irmãzinha, pelo carinho, amor, ajuda e eterna amizade.

Às minhas amigas Carol, Janaína e Larissa que mesmo de longe sempre estiveram presente nesta longa caminhada. Obrigada pelo carinho e apoio.

Aos meus amigos e familiares de Monte Alegre de Minas.

À família Russo Mendonça, pelo incentivo, apoio e carinho em todos os momentos. Em especial ao meu amor Marcelo.

Aos meus Pais e ao meu irmão Raffael, por todo carinho e apoio. Amo vocês!

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro

Este projeto foi realizado no Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP Processo nº: 2008/58680-9

RESUMO

LOPES, D. S. **Ação da jararagina na expressão gênica e protéica de mediadores pró-inflamatórios por células endoteliais humanas.** 2011. 126 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As metaloproteases presentes nos venenos ofídicos (SVMPs) são toxinas-chave envolvidas na patogênese do envenenamento, causando hemorragia e inflamação. A jararagina é uma metaloprotease hemorrágica da classe PIII isolada a partir do veneno de *Bothrops jararaca*, que em modelo experimental animal possui um efeito pró-inflamatório caracterizado principalmente por edema, liberação de citocinas e migração celular. Compreender como é a resposta inflamatória desencadeada por SVMPs, estabelecendo os principais mediadores inflamatórios no desenvolvimento do dano tecidual, pode contribuir de forma significativa com o tratamento dos efeitos locais dos envenenamentos ofídicos. Neste estudo nós avaliamos e quantificamos por PCR em tempo real a expressão de 9 genes envolvidos com a resposta inflamatória desencadeada pela ação da jararagina em células endoteliais humanas (HUVECs). Estes genes foram selecionados a partir de um experimento prévio de *Microarray*. Nossos resultados confirmaram um significativo aumento na expressão da quimiocina IL-8, moléculas de adesão (E-Selectina, V-CAM-1, I-CAM-1), CD-69, Angiopoetina-2 e MMP-10. Nós também investigamos o efeito da jararagina na expressão protéica de moléculas de adesão e da quimiocina IL-8. A molécula de adesão PECAM-1 foi expressa na superfície das HUVECs em todos os tratamentos e intervalos de tempo analisados. Entretanto não observamos aumento da expressão das moléculas E-selectina e VCAM-1, na superfície de HUVECs tratadas com a jararagina. A jararagina também não induziu a liberação de IL-8 no sobrenadante de HUVECs. Uma vez que a jararagina pode se ligar a plaquetas e fibroblastos desencadeando diferentes respostas celulares nós também investigamos a interação da jararagina com as HUVECs através da integrina $\alpha_2\beta_1$. Nossos resultados sugerem que a jararagina se liga nas células endoteliais, mas o receptor celular envolvido neste efeito ainda não está claro. Este trabalho contribui com a literatura na medida em que elucida a participação de importantes genes dentro do contexto inflamatório desencadeado pela jararagina em células endoteliais, resultante do envenenamento botrópico.

Palavras-chave: Veneno de serpente. Jararagina. Inflamação. Moléculas de adesão.

ABSTRACT

LOPES, D. S. **Action of jararhagin in gene and protein expression of proinflammatory mediators by human endothelial cells.** 2011. 126 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Snake venom metalloproteinases (SVMP) are important toxins involved in local tissue damage and play a relevant role in the complex and multifactorial inflammatory response characteristic of viperid envenomings. Jararhagin, a SVMP from *Bothrops jararaca* venom, causes a local reaction manifested by hemorrhage, edema, cytokine release and inflammatory cells recruitment. Understanding how the inflammatory response is triggered by svmps, establishes the key inflammatory mediators in the development of tissue damage and can contribute significantly to the treatment of local effects of snake envenoming. In this study we evaluated and quantified by real time PCR the expression of 9 genes involved in inflammatory response, triggered by jararhagin in human endothelial cells (HUVECs). These genes were selected from a previous *microarray* experiment. Our results confirmed a significant increase in the gene expression of chemokine IL-8, adhesion molecules (E-selectin, V-CAM-1, I-CAM-1), CD-69, Angiopoietin-2 and MMP-10. We also investigated the effect of jararhagin on expression of adhesion molecules in the surface of HUVECs by flow cytometry. We did not observe increased expression of E-selectin and VCAM-1 molecules on the surface of huvecs compared with control. Jararhagin did not increase the release of soluble chemokine IL-8 and E-selectin in HUVECS supernatant. Since jararhagin can bind to platelets and fibroblasts triggering different cellular responses, we also investigated the interaction of huvecs with jararhagin through integrin $\alpha 2\beta 1$. Our results suggest that jararhagin binds to endothelial cells, but the cellular receptor involved in this effect remains unclear. This work contributes to the literature highlighting the participation of important genes within the inflammatory context triggered by jararhagin on endothelial cells.

Key words: Snake venom. Jararhagin. Inflammation. Adhesion molecules.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS*

ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinase) - Disintegrina/Metaloproteinase

bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) - Fator de crescimento de fibroblastos básico

BSA (Bovine Serum Albumin) - Soro Albumina Bovina

cDNA (complementary Deoxyribonucleic Acid) - Ácido desoxirribonucleico complementar

COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CXCL1 (Chemokine-C-X-C-motif-ligand 1) - CXC quimiocina ligante 1

CXCL2 (Chemokine-C-X-C-motif-ligand 2) - CXC quimiocina ligante 2

CXCL8 (Chemokine-C-X-C-motif-ligand 8) - CXC quimiocina ligante 8

DDIT 4 (DNA-damage-inducible transcript 4)

DMSO- Dimetilsulfóxido

DMH- Dose mínima hemorrágica

DNA (Deoxyribonucleic Acid) - Ácido desoxirribonucleico

EDTA- Ácido etilenodiamino tetracético

EGF (endothelial growth factor) - Fator de crescimento endotelial

EGR-1- fator de transcrição: resposta para crescimento tardio 1

EGR-3- fator de transcrição: resposta para crescimento tardio 3

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) - Ensaio de imuno-absorção por ligação enzimática

HEPES - (N-2-hydroxyethylpiperzine-N1-2-ethanesulfonic acid)

HKG- house keeping gene

HU-USP - Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) - Cultura primária de células endoteliais de cordões umbilicais humanos

IgG - Imunoglobulina G

IL-1 β - Interleucina -1 β

IL6 - Interleucina-6

IL-8 - Interleucina-8

Jar - Jararagina

Jar/Alexa488 - Jararagina conjugada com Alexa488

Jar C - Jararagina C

MEC - Matriz Extracelular

MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) - Metaloproteinase de matriz extracelular 9

MMPs (matrix metalloproteinases) - Metaloproteinases de matriz extracelular

MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyl tetrazolium bromide)

NO - Óxido Nítrico

PAF - fator de ativação de plaquetas

PBS (Phosphate Buffered Saline) - Salina tamponada com fosfato

PEG10 (paternally expressed 10)

RNA (Ribonucleic Acid) - Ácido ribonucléico

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) - Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SOD 2 (superoxide dismutase 2, mitochondrial)

SVMPs (Snake Venom Metalloproteinases) – Metaloproteinases de venenos de serpentes

TACE (TNF- α converting enzyme) - Enzima conversora de TNF- α

TNFR1 (Tumor Necrosis Factor- α Receptor 1) - Receptor do TNF- α 1

TNFR2 (Tumor Necrosis Factor- α Receptor 2) - Receptor do TNF- α 2

TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α) - Fator de necrose tumoral alfa

Tris - hidroximetil-aminometano

* No texto as siglas estão representadas pela combinação das letras iniciais das seqüências de palavras que constitui um nome referente a língua inglesa. Desta forma, a sigla DNA (inglês) foi mantida ao invés da sigla ADN (português). Para facilitar a leitura do texto, as palavras constituintes das siglas foram citadas em inglês e somente nesta lista as palavras relacionadas às siglas foram traduzidas para o português.

LISTA DE SÍMBOLOS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácidos e símbolos			Códons
A	Ala	Alanina	GCA GCC GCG GCU
C	Cys	Cisteína	UGC UGU
D	Asp	Ácido aspártico	GAC GAU
E	Glu	Ácido glutâmico	GAA GAG
F	Phe	Fenilalanina	UUC UUU
G	Gly	Glicina	GGA GGC GGG GGU
H	His	Histidina	CAC CAU
I	Ile	Isoleucina	AUA AUC AUU
K	Lys	Lisina	AAA AAG
L	Leu	Leucina	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Metionina	AUG
N	Asn	Asparagina	AAC AAU
P	Pro	Prolina	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Glutamina	CAA CAG
R	Arg	Arginina	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Serina	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Treonina	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Valina	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Triptofano	UGG
Y	Tyr	Tirosina	UAC UAU

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Inflamação	14
1.1.1	<i>Células endoteliais</i>	15
1.1.2	<i>Leucócitos e moléculas de adesão</i>	16
1.1.3	<i>Citocinas</i>	19
1.1.4	<i>Estímulos pró-inflamatórios</i>	20
1.2	Envenenamentos ofídicos	21
1.3	Metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs)	23
1.4	Jararagina	27
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Animais	32
3.2	Veneno	32
3.3	Obtenção da metaloproteinase jararagina	32
3.3.1	<i>Dosagem de proteínas</i>	33
3.3.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	33
3.3.3	<i>Atividade hemorrágica</i>	34
3.3.4	<i>Remoção de endotoxina das amostras de jararagina</i>	34
3.3.4.1	<i>Coluna de Polimixina B</i>	34
3.3.4.2	<i>Eliminação por separação de fase utilizando Triton X-114</i>	35
3.3.4.3	<i>Teste LAL (Limulus Amebocyte Lysate)</i>	35
3.4	Marcação da jararagina marcada com Alexa 488®	35
3.5	Efeito da jararagina sobre a viabilidade e adesão de células HUVEC	35
3.5.1	<i>Obtenção das células HUVEC</i>	36
3.5.2	<i>Ensaio de viabilidade por 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 (MTT)</i>	37
3.5.3	<i>Quantificação das células aderentes por MTT</i>	38
3.5.4	<i>Microscopia de contraste de fase</i>	38
3.6	Expressão gênica de células endoteliais estimuladas com jararagina	38
3.6.1	<i>Condições experimentais de células HUVEC</i>	38
3.6.2	<i>Extração de RNA total de HUVECs tratadas com jararagina</i>	39

3.6.3	<i>Reação de Transcrição Reversa (RT) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)</i>	39
3.6.4	<i>Reação de PCR em tempo real</i>	40
3.7	Citometria de Fluxo (FACS).....	43
3.8	Dosagem de E-Selectina e IL-8 no sobrenadante de HUVEC tratadas com jararagina por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	44
3.9	Ligação da jararagina ao domínio A da integrina α_2 (<i>A2 domain</i>) por ensaio de Binding	44
3.10	Análise estatística.....	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Obtenção da jararagina	46
4.1.1	<i>Cromatografia do veneno de Bothrops jararaca</i>	46
4.1.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	48
4.1.3	<i>Obtenção da jararagina livre de endotoxina</i>	49
4.1.4	<i>Ensaio de viabilidade de células HUVECs tratadas com jararagina</i>	51
4.2	Ação da jararagina sobre células HUVECs	52
4.2.1	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	52
4.2.2	<i>Ensaio de adesão celular</i>	53
4.2.3	<i>Microscopia de contraste de fase</i>	55
4.3	Expressão gênica de células endoteliais estimuladas por jararagina	56
4.3.1	<i>Padronização das reações de PCR</i>	56
4.3.2	<i>Escolha do gene que será utilizado como controle interno na técnica de PCR em tempo real</i>	57
4.3.3	<i>Expressão gênica avaliada por PCR em tempo real</i>	61
4.4	Determinação da expressão de moléculas de adesão na superfície de HUVECs por citometria de fluxo	67
4.5	Dosagem de de E-Selectina e IL-8 no sobrenadante de HUVECs por Ensaio imunoenzimático (Elisa).....	72
4.6	Ligação direta da jararagina às células endoteliais	73
4.7	Ligação da jararagina no domínio A da subunidade α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$ por ensaio de fase sólida	74
4.8	Ligação da jararagina às células endoteliais através da integrina α_2 por citometria de fluxo	75
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÕES	89

REFERÊNCIAS	90
ANEXO A - Descrição dos genes citados na tabela 1e localização celular.....	108
ANEXO B - Papers publicados	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

Quando ocorre uma lesão tecidual, vários eventos se seguem, desde a formação do coágulo de fibrina, resposta inflamatória, formação de tecido granular incorporando uma re-epitelialização e angiogênese até a formação da matriz extracelular e o remodelamento tecidual (XUE et al., 2006).

A inflamação é uma resposta do tecido vascularizado à infecções por diferentes agentes, à exposição a toxinas ou à lesão celular, envolvendo o acúmulo extravascular de proteínas plasmáticas e leucócitos. Ela tem como objetivo destruir ou isolar o agente agressor e o tecido danificado e assim, recompor a homeostase do tecido lesado (GALLIN; GOLDSTEIN; SNYDERMAN, 1992; PAUL, 1998). Embora a inflamação tenha uma função protetora no controle de infecções e na promoção de reparo das lesões, quando ocorre de forma exacerbada pode causar dano tecidual e doenças, como a artrite reumatóide e lúpus eritematoso.

O processo inflamatório culmina com os eventos celulares mediados pelas células endoteliais e pelos leucócitos. Além da participação das moléculas de adesão e citocinas, várias outras moléculas atuam como mediadores inflamatórios, tais como: prostaglandinas, radicais do oxigênio, NO (óxido nítrico), tromboxanos, leucotrienos, PAF (fator de ativação plaquetária) e mediadores plasmáticos produzidos pelos sistemas de coagulação, das cininas, fibrinolítico e complemento (VORONOV; APTE; SOFER, 1999).

A resposta inflamatória inicia-se com fenômenos vasculares mediados principalmente pela histamina. O resultado é um aumento localizado e imediato da irrigação sangüínea causando hiperemia ou rubor. Em seguida, tem início a produção local de mediadores inflamatórios que promovem o aumento da permeabilidade capilar e a quimiotaxia, processo químico pelo qual células polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos são atraídos para o foco da lesão. Estas células, por sua vez, realizam a fagocitose dos elementos que estão na origem da inflamação e produzem mais mediadores químicos, dentre os quais estão as citocinas (como, por exemplo, o fator de necrose tumoral e as interleucinas), quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Nessa etapa, as plaquetas e o sistema de coagulação do sangue também são ativados

visando conter possíveis sangramentos. Além disso, diversos fatores de adesão são expressos na superfície das células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos internamente. Estes fatores irão mediar a adesão e a diapedese de monócitos circulantes e outras células inflamatórias para o local da lesão.

A dor, outro sintoma característico da inflamação, é causada primariamente pela estimulação das terminações nervosas por algumas destas substâncias liberadas durante o processo inflamatório como pelas prostaglandinas e pela bradicinina, mas também em parte por compressão relacionada ao edema.

1.1.1 Células endoteliais

O endotélio vascular é formado por uma monocamada de células (células endoteliais) que revestem o lúmen dos vasos separando o sangue dos tecidos. A integridade funcional e estrutural do endotélio é fundamental para manutenção da homeostasia e função circulatória (NEREN et al., 1993) desempenhando um papel crítico em um grande número dos processos fisiológicos e patológicos (CINES, 1998).

As células endoteliais são alongadas e achatadas, possuem núcleo alongado e poucas organelas. No citoplasma são encontrados os grânulos de Weibel- Palade, que constituem o sítio de síntese do fator de Von Willebrand, importante para a adesão de plaquetas à matriz extracelular e um marcador de células endoteliais. Na superfície externa, as células endoteliais estão em contato com a membrana basal, e na superfície oposta, com as células circulantes e os componentes plasmáticos.

Estas células estão integralmente envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo, coagulação, tráfico de leucócitos, na formação de edema, cicatrização de feridas, e angiogênese.

Em condições fisiológicas normais, as células endoteliais vasculares promovem uma superfície antiinflamatória e anticoagulante, regulando o fluxo sanguíneo, controlando a permeabilidade vascular e mantendo os leucócitos circulantes. Em resumo, a fluidez do sangue é mantida pelas células endoteliais por vários mecanismos que inibem a coagulação, entre eles, a expressão de inibidores da via do fator tecidual (TFPIs), que bloqueiam o início da coagulação; a expressão de proteoglicanos de heparan sulfato que se ligam à anti-trombina III e inativam a

trombina, e também pela capacidade dessas células de degradar ou mascarar sinais que ativam as plaquetas. Além disso, as células endoteliais produzem o óxido nítrico (NO) e a prostaglandina D₂ (PGI₂) que sinergicamente inibem a adesão e agregação plaquetária. O fluxo sanguíneo é regulado por um balanço de sinais que aumentam ou diminuem o tônus das camadas em torno das células da musculatura lisa vascular (POBER; SESSA, 2007).

Células endoteliais em repouso não interagem com leucócitos. Nessa condição, proteínas como a P-selectina e quimiocinas permanecem armazenadas nos grânulos de Weibel-Palade. Além disso, está suprimida a transcrição de moléculas de adesão, tais como E-selectina, VCAM1 e ICAM1 (WU et al., 1996). Outro fato relevante é a produção da enzima óxido nítrico sintase (isoformas eNOS e NOS3), que leva a produção de NO, um potente mediador antiadesivo que previne a adesão leucócito-célula endotelial em condições basais, através da inibição da ativação de leucócitos e da expressão gênica. A importância do NO na prevenção da adesão leucocitária, em condições fisiológicas normais, foi demonstrada, quando a N-monometil-arginina foi usada para bloquear a produção de NO, resultando em um aumento de 15 vezes na adesão de neutrófilos (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991).

Entretanto, no caso de uma injúria ou infecção, as células endoteliais controlam a migração de leucócitos pela expressão de moléculas de adesão e liberação de quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (MIDDLETON et al., 2002).

1.1.2 Leucócitos e moléculas de adesão

O recrutamento de leucócitos para os tecidos lesados é um evento característico da resposta inflamatória, sendo a interação dos leucócitos circulantes com o endotélio vascular, o passo fundamental para este evento (Figura 1).

Durante a inflamação os fagócitos promovem o recrutamento ativo de células inflamatórias para o local da infecção, o reconhecimento dos microorganismos e a fagocitose. Além disso, produzem citocinas que possuem importantes papéis na resposta inflamatória. Os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) medeiam as fases iniciais na resposta inflamatória. Na ausência de infecção eles circulam no sangue e não migram para dentro dos tecidos.

Os macrófagos respondem ao estímulo quase tão rapidamente quanto os neutrófilos, mas persistem por mais tempo nos locais da inflamação. Eles não são terminalmente diferenciados como os neutrófilos e podem sofrer divisão celular em um local inflamatório. Portanto, são as células efetoras nos estágios mais tardios da resposta imunológica natural (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

As moléculas de adesão celular são glicoproteínas expressas na superfície da célula, que medeiam o contato entre duas células ou entre as células e o endotélio. O processo de adesão é essencial para os vários eventos biológicos, como morfogênese, crescimento, organização e estabilidade tecidual, inflamação, resposta do hospedeiro às infecções e injúria, cicatrização e resposta imune celular (ALBELDA et al., 1994; FARSKY; MELLO, 1995). As moléculas de adesão estão divididas em quatro superfamílias: selectinas, integrinas, superfamília das imunoglobulinas e caderinas.

As selectinas são uma família de glicoproteínas de superfície celular que possuem um domínio lectina N-terminal (expresso extracelularmente) que se liga à resíduos de carboidrato, um domínio transmembranar e uma pequena cauda citoplasmática. A família de selectinas é formada por três proteínas: L-selectina, P-selectina, E-selectina, e representa uma família de receptores expressos em leucócitos (L), plaquetas e células endoteliais (P) ou apenas em células endoteliais (E) respectivamente, (TEDDER et al., 1995). Elas medeiam interações iniciais de adesão entre leucócitos intravasculares e o endotélio vascular em áreas de inflamação (MCEVER et al., 1995), e estão envolvidas com o comportamento de *rolling* de leucócitos (BEVILACQUA; NELSON, 1993; FARSKY; MELLO, 1995).

As integrinas são glicoproteínas transmembranares, heterodiméricas, formadas por duas subunidades associadas não-covalentemente (α e β). Nos vertebrados, a família é composta por 18 subunidades α e 8 subunidades β , o que resulta em 24 heterodímeros diferentes (TAKADA et al., 2007). Elas participam na organização tissular, atuam como receptores para outras moléculas de adesão, (DIAMOND, 1994) e também estão associadas à firme adesão leucocitária à parede do vaso.

A superfamília das imunoglobulinas abrange um grupo de moléculas de adesão caracterizadas pela presença de duas a sete unidades semelhantes às imunoglobulinas G no seu domínio extracelular (ALBELDA; BUCK, 1990; ALBELDA et al., 1994). Cinco membros desta família estão envolvidos na firme aderência entre célula endotelial e leucócitos: Moléculas de

adesão intercelular 1 (ICAM-1 ou CD56) e 2 (ICAM-2 ou CD102), molécula de adesão da célula vascular (VCAM-1 ou CD106), Molécula 1 de adesão celular endotelial à plaqueta (PECAM-1 ou CD31) e Molécula 1 de adesão da célula de adressina mucosal (MadCAM-1). Estas proteínas são expressas em diferentes tipos celulares, sendo que a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 no endotélio quiescente é baixa, mas na presença de estímulos inflamatórios, suas concentrações na membrana endotelial são extremamente aumentadas. Por outro lado, as moléculas de adesão ICAM- 2 e PECAM-1 apresentam uma significativa expressão constitutiva em células endoteliais (HUO; LEY, 2001). A PECAM-1 localiza-se nas junções endoteliais e participa da transmigração dos leucócitos através do endotélio (MULLER et al., 1993).

As caderinas são moléculas de adesão dependentes do cálcio que permitem a ligação entre células vizinhas. Cada uma das células que são ligadas possui sempre o mesmo tipo de caderina que a outra, sendo as interações entre elas homofílicas. Essas moléculas possuem função de formação e manutenção da integridade dos tecidos (TAKEICHI, 1995; TEPASS, 1999).

Figura 1- Etapas da interação leucócito-endotélio.
Fonte: Adaptado de Petri, Phillipson e Kubes (2008).

1.1.3 Citocinas

Citocinas são um diverso grupo de proteínas, de baixa massa molecular (8-25KDa) envolvidas na comunicação entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Estas moléculas regulam importantes processos biológicos, como crescimento, diferenciação e ativação celular, inflamação, imunidade, reparo de tecidos, fibrose e morfogênese. A ação das citocinas envolve uma ligação de alta afinidade com receptores na superfície das células alvo. As citocinas são pleiotrópicas, podendo atuar sobre diferentes tipos celulares; e também possuem uma ação redundante, influenciando na síntese e ação de outras citocinas (AKIRA et al., 1990; BLACKWILL; BURKE, 1989). Em geral, as citocinas possuem uma vida média curta, assim a ativação transcricional das citocinas é transitória e elas não são armazenadas como moléculas pré-formadas.

As citocinas são sintetizadas por várias células como monócitos, macrófagos, linfócitos, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos, células musculares e plaquetas (FURIE; RANDOLPH, 1995; MILLER; KRANGEL, 1992). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferons (IFN), interleucinas (IL), quimiocinas, fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β), e fator de transformação de crescimento (TGF- β).

As citocinas participam de todas as fases da resposta inflamatória. As principais citocinas envolvidas na regulação da inflamação são TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-6 e IL-8.

A citocina TNF- α é produzida por macrófagos e linfócitos, e suas células alvos são os fibroblastos e as células endoteliais. O TNF- α atua na inflamação, fibrose, produção de outras citocinas (IL-1, IL-6, GM-CSF) e indução de moléculas de adesão (BEMELMANS; VAN TITS, BUURMAN, 1996; VORONOV; APTE; SOFER, 1999).

A IL-1 β é um importante mediador da resposta inflamatória, e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (AKIRA et al., 1990). Esta citocina é produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas, algumas células B, fibroblastos e células endoteliais. Ela atua sinergicamente com o TNF- α e induz a expressão de moléculas de adesão e o recrutamento leucocitário.

A IL-6 é produzida por macrófagos, células T e B, fibroblastos e células endoteliais. Esta interleucina atua na resposta imune antígeno-específica e na inflamação, sendo um mediador

chave da resposta imune de fase aguda. Ela atua em sinergismo com TNF- α e IL-1 na indução de proteínas de fase aguda (WHINCER; EVANS, 1990) e está relacionada com o recrutamento e ativação de neutrófilos (HOPKINS et al., 2003).

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são proteínas relativamente pequenas (8-10 KDa) que regulam principalmente o tráfico de leucócitos através da interação com receptores acoplados à proteína G. As quimiocinas foram originalmente descritas como as citocinas que medeiam o recrutamento de leucócitos para o sítio de inflamação, mas um subgrupo das quimiocinas, a família Cys-X-Cys (CXC), possui um importante papel na regulação da angiogênese em condições inflamatórias, fibrose e câncer (KOCH et al., 2001; MEHRAD et al., 2007). IL-8 é uma quimiocina CXC com ligação de alta afinidade para receptores CXCR1 e CXCR2, ambos são abundantemente expressos em células endoteliais. IL-8 é expressa principalmente por leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e células tumorais, e desempenha importante papel na quimiotaxia, inflamação e angiogênese de tumores. Além disso, essa quimiocina atua diretamente na célula endotelial induzindo a migração, proliferação e a formação de tubo (LI et al., 2003).

1.1.4 Estímulos pró-inflamatórios

A inflamação pode ser desencadeada por diversos agentes, como microorganismos (bactérias, vírus ou parasitas), agressores químicos e físicos (produtos cáusticos, toxinas, traumatismos, calor, frio ou radiações) ou ainda por deficiente vascularização da região provocando isquemia ou necrose e consequentemente a inflamação. O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou endotoxina é um componente do envelope exterior de todas as bactérias gram-negativas altamente pró-inflamatória (SALUK; WACHOWICZ, 2005). Diversos venenos de serpentes induzem resposta inflamatória caracterizada por edema, recrutamento de leucócitos e liberação de mediadores pró-inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2005).

1.2 Envenenamentos ofídicos

As serpentes sempre despertaram a fascinação e o medo ao longo da história da humanidade. Originadas há aproximadamente 135 milhões de anos (COATES; RUTA, 2000), as serpentes são caracterizadas como um grupo monofilético independente, originado dos lagartos ou de algum ancestral destes (KOCHVA, 1986). Atualmente, consistem em um dos grupos mais bem sucedidos dos vertebrados e apesar do formato corporal altamente conservado, este grupo exibe uma grande riqueza de espécies e conquistou uma enorme variedade de ambientes (LEE; SCANLON, 2002).

Na fauna brasileira existem 10 famílias, constituindo um total de 371 espécies (BÉRNILS, 2010). Contudo, apenas 2 famílias, Elapidae e Viperidae, são consideradas peçonhentas, produzindo toxinas e tendo aparelhos apropriados para inoculá-las. O veneno produzido nas glândulas veneníferas possui a função de paralisar ou matar as presas e defender contra predadores. A glândula de veneno teve origem pela especialização de glândulas salivares, sendo assim, parte dos componentes do veneno tem relação com enzimas digestivas (KOCHVA, 1986).

O ofidismo consiste em um importante problema de saúde pública no Brasil em virtude de sua grande frequência e gravidade. Nos últimos seis anos, o número de acidentes com animais peçonhentos cresceu 32,7%, em todo o Brasil. Em 2003, foram 68.219 notificações, contra 90.558, em 2009. Dados preliminares indicam que acidentes com esses animais foram responsáveis por 309 mortes no Brasil em 2009, sendo que as serpentes foram responsáveis por 22.763 desses casos e 106 mortes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Da família Viperidae fazem parte os gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus). De acordo com o Ministério da Saúde (2010), as serpentes do gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas como jararacas, são responsáveis por aproximadamente 88% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país. Vale ressaltar aqui que baseado em evidências morfológicas e moleculares, algumas espécies que pertenciam ao gênero *Bothrops*, atualmente pertencem ao gênero *Bothropoides* (FENWICK et al., 2009). As espécies mais conhecidas no Brasil são *Bothrops atrox* na região Norte, *Bothrops erythromelas* no Nordeste, *Bothrops moojeni*

nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, *Bothrops jararaca* na região Sul e Sudeste, *Bothrops jararacussu* no Cerrado da região central e em florestas tropicais do Sudeste, e *Bothrops neuwiedi*, encontrada em todo território nacional, exceto na Bacia Amazônica.

A composição do veneno de serpentes varia entre as diferentes espécies do gênero *Bothrops*, mas em geral ele é composto por proteínas farmacologicamente e bioquimicamente ativas e uma pequena fração não protéica, como íons metálicos e aminas biogênicas (BJARNASON; FOX, 1994; MATSUI et al., 2000).

As diversas toxinas presentes no veneno botrópico podem provocar distúrbios da hemostasia, como alterações na função plaquetária, na coagulação sanguínea e no sistema fibrinolítico (MARKLAND, 1998). Nos casos mais graves podem ocorrer complicações sistêmicas, como insuficiência renal aguda.

Os efeitos locais são caracterizados por edema, hemorragia, inflamação e necrose (VORONOV; APTE; SOFER, 1999; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995a), podendo também ocorrer complicações locais como abscesso e síndrome compartimental.

Desde o desenvolvimento do soro antiofídico por Vital Brazil em 1901, a imunoterapia constitui o principal tratamento para as vítimas dos acidentes ofídicos e consiste da administração parenteral de antivenenos heterólogos preparados a partir do plasma de cavalos imunizados com venenos. A eficácia deste tratamento está em neutralizar os efeitos sistêmicos do envenenamento, entretanto possuem uma baixa eficácia para prevenir o dano tecidual local induzido pelos venenos (GUTIÉRREZ et al., 1998). A administração dos antivenenos pode gerar efeitos adversos como, por exemplo: urticária, náuseas, vômitos, bronco espasmo, hipotensão, edema e choque anafilático (WARRELL et al., 1995; LALLOO; THEAKSTON, 2003).

As proteínas responsáveis pelos efeitos do envenenamento botrópico são metaloproteinases, serinoproteases, disintegrinas, lectinas tipo C, miotoxinas, fosfolipases A₂ (PLA₂), L-amino ácido oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterases, arginina esterases, hialuronidases, 5'- nucleotidases e NAD-nucleosidases (RUSSEL, 1980; TU, 1988; MEIER, 1990; STOCKER, 1990; BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

As fosfolipases (PLA₂s) endógenas são enzimas que atuam sobre membranas celulares clivando os fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. Estas enzimas apresentam um importante papel em várias funções celulares, incluindo manutenção dos fosfolipídios celulares, geração de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular e

contração muscular. (DENNIS et al., 1991; SANTOS-FILHO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009). As fosfolipases A₂ presentes no veneno de serpente apresentam uma variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, como mionecrose, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hipotensão e indução de edema (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995b; HARRIS et al., 2000; SINGH et al., 2000; SOARES et al., 2004; SANTOS-FILHO et al., 2008).

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que contribuem para o efeito tóxico do envenenamento por afetarem muitos componentes da cascata de coagulação sanguínea, podendo interferir na função plaquetária ou no sistema fibrinolítico (WHITE, 2005; KAMIGUTI, 2005; SWENSON et al., 2005). Algumas dessas enzimas são denominadas “thrombin-like” por clivarem o fibrinogênio, mas apesar de possuírem uma ação semelhante à trombina, permitem apenas a formação de um coágulo frouxo, por não serem capazes de ativar o fator XIII, responsável pela estabilização do coágulo de fibrina (BRAUD et al., 2000).

Dentre todas as toxinas presentes na complexa mistura de um veneno botrópico, acredita-se que as metaloproteases sejam uma classe de toxinas-chave envolvidas na patogênese local induzida pelo envenenamento (FOX; SERRANO, 2005).

1.3 Metaloproteases de veneno de serpentes (SVMP)

As metaloproteases do veneno de serpente (SVMP) fazem parte da super família das Metzincinas. Todas as Metzincinas são zinco-dependentes e possuem um resíduo de metionina na porção carboxi terminal na volta abaixo do sítio ligante de zinco (met-turn). Por isso, estas toxinas podem ser inibidas pelos agentes quelantes EDTA ou 1,10 fenantrolina (MATSUI; FUJIMURA; TITANI 2000). A sequência de aminoácidos HEBXHXBG BXH constitui o sítio de ligação do zinco e é comum a todas as metaloproteases.

As Metzincinas compreendem 6 subfamílias, as Astacinas, Serralisinas, Matrixinas, Snapalisinas, Reprolisinas (M12B) e Leishmanolisinas (HOOPER, 1994; GOMIS-RUTH et al., 2003; RAMOS; ARAÚJO, 2006). A subfamília M12B é composta pelas SVMPs, pelas ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) e pelas ADAMTSs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) (FOX; SERRANO, 2005)

As ADAMs (proteínas de mamíferos contendo os domínios disintegrina e metaloproteinase) são proteínas transmembrânicas que estão envolvidas em importantes eventos fisiológicos como controle de fusão membranar, clivagem de citocinas e fatores de crescimento, migração celular, bem como desenvolvimento muscular, fertilização e determinação do destino da célula. Além disso, também estão envolvidas em patologias como inflamação e câncer (SEALS; COURTNEIDGE, 2003).

As metaloproteases são sintetizadas na forma inativa ou zimogênio, e a ativação dessas proteínas ocorre por um mecanismo chamado “cysteine-switch”. De acordo com este mecanismo, o grupo tiol presente na sequência conservada do pró-domínio PKMGGVT, interage com o zinco presente no sítio ativo, bloqueando a ligação do substrato. Desta forma, é necessária a remoção do grupo tiol do sítio ativo para ativar a enzima. A ativação da enzima pode ocorrer por atividade catalítica residual ou por ação de outras proteases do veneno, por um mecanismo ainda não elucidado (GRAMS et al., 1993; SHIMOKAWA et al., 1996; RAMOS; ARAÚJO, 2006).

As SVMPs apresentam grande similaridade com as matrixinas (MMPs), que são metaloproteases de mamíferos que degradam a matriz extracelular e participam de importantes processos biológicos incluindo o desenvolvimento embrionário, angiogênese e cicatrização de feridas, bem como nos processos patológicos, como inflamação, câncer e destruição do tecido (WOESSNER, 1998; HEMONARD; GRIMALD, 1990).

As SVMPs são sintetizadas como proteínas multimodulares, e de acordo com a organização de seus múltiplos domínios, foram inicialmente classificadas em quatro classes, designadas P-I, P-II, P-III e P-IV (BJARNASON; FOX, 1994). As metaloproteases da classe P-I são compostas na forma madura apenas pelo domínio metaloprotease, possuem baixa massa molecular (20-30 kDa), e fraca atividade hemorrágica. As da classe P-II possuem um domínio metaloprotease e um domínio disintegrina na região C-Terminal. Essas toxinas apresentam massa molecular de 30-60 kDa e geralmente sofrem processamento pós-traducional liberando o peptídeo disintegrina, que são as disintegrinas clássicas encontradas nos venenos de serpentes. Essas disintegrinas possuem a sequência RGD (Arg-Gly-Asp), que lhes confere alta afinidade por receptores de plaquetas e, portanto atuam como potentes inibidores da agregação plaquetária. A classe P-III contém além dos domínios metaloprotease e tipo-disintegrina, um domínio rico em cisteína. O domínio tipo-disintegrina conserva os resíduos de cisteína nas mesmas posições que as disintegrinas clássicas RGD apresentando substituições nesses resíduos pela sequência XXCD

(XX-Cys-Asp). Esta classe compreende metaloproteínas em geral altamente hemorrágicas e de massa molecular de 60-110 kDa. As metaloproteases da classe P-IV possuem um domínio adicional tipo-lectina e são toxinas de alta massa molecular (80-100 kDa).

Fox e Serrano (2008) propuseram uma reclassificação onde 11 subclasses de SVMPs foram identificadas: P-Ia, P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId, P-IIe, D-I, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId (Figura 2). Nessa reclassificação, a classe P-IV foi incluída na classe P-III por ser considerada como o resultado de uma modificação pós-traducional da classe P-III.

Figura 2- Classificação das SVMPs. As SVMPs são sintetizadas na forma latente como precursores multimodulares que sofrem diferentes estágios de processamento. **P**: pré-domínio, **Pro**: pró-domínio, **Proteinase**: domínio metaloproteínase. **S**: sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico e disintegrina ou tipo-disintegrina, **Dis**: disintegrina, **Dis-Like**: domínio tipo-disintegrina, **Cys-Rich**: domínio rico em cisteínas, **Lec**: domínio ligante de lectina. Fonte: Adaptado de Fox e Serrano (2008).

A diversidade estrutural das SVMPs confere às mesmas a capacidade de interferir em diversos sistemas celulares provocando alterações no sistema hemostático e outros efeitos como necrose, apoptose e inflamação, que caracterizam a lesão tecidual que ocorre após o envenenamento (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; LAING et al., 2003). De modo geral, o mecanismo de ação das SVMPs está relacionado à

proteólise de componentes da matriz extracelular (GUTIÉRREZ et al., 2005), proteínas plasmáticas (SILVA et al., 2003; WANG et al., 2008), proteínas de membrana celular e à interação com receptores específicos, como integrinas de superfície de plaquetas (DE LUCA et al., 1995; YOU et al., 2006), células endoteliais (SOUZA et al., 2000; COMINNETTI et al., 2004) e fibroblastos (ZIGRINO et al., 2002), ativando ou inibindo a resposta celular. Esses efeitos podem resultar em várias alterações fisiopatológicas tais como inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragia (GUTIÉRREZ et al., 2005).

A resposta inflamatória desencadeada pelas SVMPs é caracterizada pela formação de edema, recrutamento de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios no local da picada. Entre estes mediadores estão prostaglandinas, leucotrienos, NO, PAF, mediadores dos sistemas complemento, fibrinolítico e de coagulação) e diversas citocinas tais como, TNF- α e IL-1 β , que amplificam a resposta inflamatória contribuindo com o processo de necrose (VORONOV; APTE; SOFER, 1999).

A metaloprotease da classe P-I neuwiedase provocou dano tecidual local com mionecrose e reação inflamatória, evidenciada pelo recrutamento de leucócitos e liberação de citocinas IL-8 (Interleucina-8), IL-1 β e IL-6 e de MMP-9 (matrix metalloproteinase 9) no músculo gastrocnêmio e liberação de IL-1 β e IL-6 por cultura de macrófagos peritoneais - MPAC (RODRIGUES et al., 2000; LOPES et al., 2009)

A BaP1, P-I isolada do veneno de *Bothrops asper*, também induz moderada mionecrose e diferentes efeitos inflamatórios, como edema, infiltrado leucocitário, liberação de citocinas, PGE2 e expressão de moléculas de adesão (GUTIÉRREZ et al., 1995; RUCAVADO, 2002; FERNANDES, 2006).

A toxina HF3 isolada do veneno de *Bothrops jararaca* induziu fagocitose por macrófagos dependente da integrina $\alpha_m\beta_2$ (SILVA et al., 2004). Vários trabalhos têm demonstrado o papel inflamatório da jararagina, a metaloprotease P-III isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (MOURA-DA-SILVA et al., 1996; CLISSA et al., 2001).

1.4 Jararagina

Um bom modelo para estudar a resposta inflamatória que caracteriza o envenenamento ofídico é a metaloproteinase jararagina. A jararagina é uma toxina de 52 kDa, isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, que apresenta estrutura contendo os domínios metaloproteinase, domínio tipo-disintegrina (ECD: Glu-Cys-Asp) e domínio rico em cisteínas (PAINE et al., 1992), característicos de uma SVMP do tipo P-III. Ao domínio carboxi-terminal rico em cisteína, tem sido atribuídas propriedades adesivas às componentes plasmáticas e proteínas da MEC (SERRANO et al., 2006). Além da similaridade estrutural com as MMPs, observada no domínio catalítico, a jararagina apresenta similaridade estrutural com as ADAMs, proteínas envolvidas em comunicação e regulação da função celular, principalmente nos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (FOX; SERRANO, 2008).

Em geral, as toxinas pertencentes à esta classe são altamente hemorrágicas, sendo esta atividade dependente do domínio metaloproteinase, entretanto, o domínio tipo-disintegrina e o domínio rico em cisteínas também têm se mostrado importantes nas funções biológicas destas toxinas (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007; SERRANO et al., 2006).

Desde seu isolamento, esta proteína vem sendo muito estudada e considerada uma toxina de grande versatilidade e conseqüente importância médica. A jararagina é capaz de promover hemorragia local e sistêmica (LAING; MOURA-DA-SILVA, 2005; ESCALANTE et al., 2003). Este efeito hemorrágico, provavelmente é devido a sua ação proteolítica sobre componentes da membrana basal vascular (MARKLAND, 1998) e a inibição da agregação plaquetária pode acentuar este efeito (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996). Moura-da-Silva et al. (2008) demonstraram que a jararagina é capaz de se ligar com alta afinidade ao colágeno I e ao colágeno IV, e que essa afinidade está relacionada diretamente com a atividade hemorrágica desta toxina. Tanjoni et al. (2010) atribuíram ao domínio tipo-disintegrina da jararagina a ligação ao colágeno e ao domínio rico em cisteína a ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$; a existência desses dois diferentes sítios de ligação, interfere na interação integrina-matriz com conseqüente apoptose das células endoteliais. Recentemente, Baldo et al. (2010) demonstraram que a jararagina localiza-se ao redor dos vasos sanguíneos e co-localiza-se com o colágeno IV e que a forte hemorragia causada por metaloproteases da classe PIII está relacionada ao acúmulo destas proteínas na membrana basal.

Um dos primeiros trabalhos que descreveram a participação da jararagina na resposta inflamatória, induzida após o envenenamento, mostrou que a jararagina foi capaz de processar o precursor do TNF- α recombinante (pró-TNF) na sua forma ativa, exibindo uma atividade TACE-like (MOURA-DA-SILVA et al., 1996). Mais tarde, Clissa et al. (2001) mostraram, que em modelo experimental de cultura de macrófagos, a jararagina estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias, induzindo um aumento na transcrição de mRNA que codifica para IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Laing et al. (2003), verificaram que a necrose induzida pela jararagina foi totalmente abolida em animais deficientes em receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) e foi significativamente reduzida em animais deficientes em IL-6, mostrando a importância das citocinas inflamatórias na necrose tecidual que ocorre após o envenenamento. Além disso, a jararagina induz dor quando injetada no coxim plantar de ratos (DALE et al., 2004) e acúmulo de leucócitos no tecido subcutâneo murino, com predomínio de neutrófilos (COSTA et al., 2002),

Além da ação da jararagina sobre células endoteliais culminando com o efeito hemorrágico característico das SVMP, a jararagina também age sobre as células endoteliais induzindo a produção de prostaglandinas, óxido nítrico e liberação de IL-8 (SCHATTNER et al., 2005). Alguns estudos realizados por nosso grupo têm se concentrado em avaliar o efeito da jararagina sobre as células endoteliais vasculares e verificar o seu mecanismo de ação, uma vez que esta toxina apresenta algumas atividades seletivas a estas células. Foi observado por Tanjoni et al. (2005), que o tratamento de células endoteliais murinas (Tend) com a jararagina resultou em uma diminuição na viabilidade celular e na capacidade destas células se manterem aderidas às placas de cultura, resultando em apoptose por *anoikis*. A atividade pró-apoptótica da jararagina foi dependente da atividade catalítica e o tratamento destas células com a jararagina por 10 minutos foi suficiente para causar uma rápida mudança na dinâmica do citoesqueleto, com retrações celulares, acompanhadas pelo rearranjo das fibras de actina e interferência no contato de adesão focal. Em concordância com estes resultados também foi observado apoptose de células endoteliais isoladas do cordão umbilical humano (HUVECs) após tratamento com a jararagina, sugerindo que também ocorra o mecanismo de *anoikis* (BALDO et al., 2008).

No veneno de *Bothrops jararaca* são encontradas duas formas da jararagina, a jararagina íntegra e a jararagina-C, uma molécula contendo apenas os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas, sendo esta um produto de clivagem proteolítica da jararagina (MOURA-DA-SILVA et al., 2003). A molécula de jararagina-C mostrou-se eficiente em desencadear a liberação local de

citocinas e aumentou o rolamento de neutrófilos na parede do endotélio, sugerindo que os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas também possam papéis importantes nos eventos iniciais da resposta inflamatória aguda (CLISSA et al., 2006). Entretanto, o papel dos domínios estruturais das SVMPs na atividade pró-inflamatória ainda não está totalmente esclarecido.

O perfil da expressão gênica de células endoteliais submetidas a um tratamento com a jararagina foi realizado recentemente por nosso grupo, em colaboração com o Dr. Jay Fox, na Universidade de Virgínia (dados não publicados). A expressão gênica de células HUVEC estimuladas com 10µg/mL de jararagina (200nM) por 24h, foi avaliada pela técnica de *Microarray* (*Affymetrix*- chip HG-U133A contendo 22.283 pares de sonda). Os resultados demonstram que HUVECS tratadas com jararagina tiveram 59 genes regulados positivamente, com um aumento na expressão maior ou igual a 1,5 quando comparados com as células controle tratadas com meio de cultura. Destes, 25 genes estavam relacionados direta ou indiretamente com a resposta inflamatória. Uma regulação gênica negativa, com diminuição na expressão menor ou igual a -1,5 foi observada em 11 genes e 7 destes correspondem a mediadores inflamatórios. Estes genes estão envolvidos com diferentes efeitos biológicos, como por exemplo: sinalização e interação célula-célula; morte celular; resposta imune ou doenças inflamatórias, etc. Um resumo dos genes e as atividades biológicas em que estão envolvidos pode ser visualizado na tabela 1 (A lista com a descrição dos genes encontra-se no anexo A). Uma análise mais precisa, no sentido de quantificarmos a expressão destes genes, poderia nos informar com maior nitidez quais genes expressos possuem um papel mais relevante na resposta inflamatória desenvolvida após o tratamento com a jararagina. Diante disso, nesse trabalho desenvolvemos um estudo da expressão gênica de mediadores inflamatórios induzidos pela jararagina pela técnica de PCR em tempo real, e também uma análise no padrão de expressão na superfície celular de alguns destes genes.

Tabela 1- Lista de genes cuja expressão foi alterada após tratamento de HUVECs com 200nM de jararagina por 24 horas em experimentos de *Microarray* realizados com *GeneChip Affymetrix HgU133 probe* e analisados pelo programa *Ingenuity analysis*.

Gene	Fold change	Family	Cell to Cell signaling and interaction	Cell Death	Cellular Movement	Immune Response	Inflammatory Disease
SELE	5,33	adhesion molecule	**		**	**	**
CD69	3,39	transmembrane receptor		**	**	**	
SAT	3,23	Enzyme		**			**
VCAM1	2,75	adhesion molecule	**	**	**	**	
IL8	2,23	Cytokine	**	**	**	**	**
CEBPD	2,15			**			**
IL6	1,97	Cytokine	**	**	**	**	**
THBD	1,97	transmembrane receptor	**	**			
SULF1	1,95	Enzyme	**	**	**		
CXCL6	1,91	Cytokine	**		**	**	
ANGPT2	1,88	growth factor	**	**	**	**	
CDKN1B	1,82		**	**	**	**	
SOD2	1,78	Enzyme		**			**
DTR	1,75	growth factor	**	**	**	**	
PEG10	1,74			**			
MMP10	1,73	Peptidase					**
ARG2	1,69	Enzyme		**			**
GULP1	1,67			**			
DAF	1,66		**	**	**	**	**
TLN1	1,64		**				
CSF2RB	1,59	transmembrane receptor	**	**		**	
PLCB1	1,55	Enzyme				**	
IL1RL1	1,54	transmembrane receptor	**	**	**	**	**
BTG1	1,54			**			
SH3BP5	1,53			**			
ANGPTL4	-1,51			**			
HES1	-1,54	transcription regulator	**	**			
JAG2	-1,56	growth factor		**			
BGN	-1,61						**
DDIT4	-1,63			**			
JAG1	-2,2	growth factor	**	**	**		
BHLHB2	-2,3	transcription regulator		**			

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito inflamatório da jararagina sobre as células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs).

2.2 Objetivos específicos

- 1- Verificar a ação da jararagina na viabilidade e adesão de células HUVECs;
- 2- Quantificar a expressão de 9 genes envolvidos na resposta inflamatória, que foram regulados positivamente nos experimentos de *Microarray* (IL-6, IL-8, CXCL-6, E-Selectina, V-CAM-1, I-CAM-1, CD-69, Angiopoetina-2, MMP-10) pela técnica de PCR em Tempo Real.
- 3- Analisar a ação da jararagina na expressão protéica de E-selectina, VCAM-1 e PECAM-1 por células HUVECs.
- 4- Avaliar a ação da jararagina na liberação de IL-8 e E-selectina solúvel por células HUVECs;
- 5- Avaliar a interação da jararagina com as células HUVECs pela integrina $\alpha_2\beta_1$.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos envolvendo animais foram realizados com camundongos machos da linhagem BALB/c, pesando entre 18-22 gramas, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos com ração e água filtrada fornecidos *ad libitum*, a temperatura ambiente. As condições experimentais foram reguladas pela Comissão de Ética Animal do Instituto Butantan (411/07) de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA).

3.2 Veneno

O veneno de *Bothrops jararaca* foi obtido do *pool* de venenos extraído de serpentes mantidas em cativeiro no Biotério Central do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP. As amostras de veneno foram liofilizadas e mantidas à -20 °C até o momento do uso.

3.3 Obtenção da metaloproteinase jararagina

A metaloproteinase jararagina foi isolada de acordo com a metodologia descrita por Moura-da-Silva et al. (2003). Foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de rápida performance - ÄKTA (GE Healthcare - USA). Inicialmente, 100mg do veneno de *Bothrops jararaca* foram ressuspensos em 1,25mL de água Milli-Q e 1,25mL de tampão de amostra (Tris 0,02M, CaCl₂ 0,001M, (NH₄)₂SO₄ 1,2M, pH 7,4). Em seguida, o veneno foi centrifugado à 12000rpm por 5min à 4 °C e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22µm. Foram aplicados 2mL desta amostra em uma coluna de interação hidrofóbica Hi-Trap Phenyl FF Low Sub (GE-Healthcare), previamente equilibrada com o tampões A (Tris 0,02M, (NH₄)₂SO₄ 1,2M, CaCl₂ 0,001M, pH 7,4). Frações de 5mL foram coletadas com fluxo de 1mL/min, com a formação de um gradiente de concentração entre os tampões A e B, variando de 1,2M à 0M de (NH₄)₂SO₄ em 100mL. Tampão B: Tris 0,02M, CaCl₂ 0,001M, pH7,4).

A fração III, referente à jararagina, foi dialisada contra o tampão Tris 0,02M/CaCl₂ 0,001M, pH 6,8 à 4 °C por 12h e submetida a uma nova cromatografia em coluna de troca-iônica Mono-Q HR 5/50 GL (GE-Healthcare), previamente equilibrada com o tampão A (Tris 0,02mM/CaCl₂ 0,001M, pH6,8). Frações de 1mL foram coletadas com fluxo de 1mL/min, com a formação de um gradiente de concentração de 50mL entre os tampões A e B, variando de 0 à 0,3M de NaCl. Tampão B: NaCl 1M, Tris 0,02M e CaCl₂ 0,001M pH 6,8).

As cromatografias foram monitoradas pela leitura da absorbância a 280nm e as frações foram congeladas imediatamente à -80 °C.

3.3.1 Dosagem de proteínas

A estimativa da concentração protéica da jararagina foi determinada por um método colorimétrico, utilizando uma solução de *Bradford* comercial (Sigma - USA) e uma curva padrão de soroalbumina bovina (Sigma), de 200 à 6,25µg/mL (BRADFORD, 1976).

3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O grau de pureza das toxinas foi avaliado em eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, na presença de SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) e β-mercaptoetanol, segundo Laemmli (1970). Amostras contendo 5µg de proteína foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 125 mM, pH 6,8 contendo glicerol a 10%, β-mercaptoetanol 5%, 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol como marcador da corrida. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5min e aplicadas ao gel. Os padrões de peso molecular utilizados foram: β-galactosidase-116 kDa, soroalbumina-66 kDa, ovoalbumina-45 kDa, lactato desidrogenase-35 kDa, endonuclease de restrição Bsp981-25 kDa, β-lactoalbumina-18.4 kDa, lisozima-14.4 kDa. O tampão de corrida foi constituído por Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM e SDS a 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada com uma corrente de 20 mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. As proteínas foram fixadas com metanol 50% e ácido acético 10% durante 15 a 20min e corados por 1h com uma solução de 0,2% de Coomassie Blue R-250 em água e metanol na proporção de 1:1. O gel foi descorado numa solução contendo 30% de etanol e 10% de ácido acético em água destilada.

3.3.3 Atividade hemorrágica

Esta atividade foi realizada em camundongos segundo Nikai et al. (1984). Duas doses mínimas hemorrágicas (DMH) da jararagina (1 dose = 1,25µg/animal de 18 à 22 gramas) foram diluídas em 50µL de solução salina e injetadas intradermicamente no dorso de camundongos, previamente depilados. Após 3h de inoculação, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, as peles foram cuidadosamente removidas e foi observada a presença de halos hemorrágicos na superfície interna da pele. O halo hemorrágico foi estimado considerando o produto entre o maior e o menor diâmetro da área da lesão (mm²).

3.3.4 Remoção de endotoxina das amostras de jararagina

Para remoção de endotoxina da amostra de jararagina foram testadas duas metodologias distintas, coluna de polimixina B e separação de fase utilizando Triton X-114. Na preparação de todos os tampões e do Triton X114 10% foi utilizada água apirogênica e os materiais plásticos utilizados estavam livres de pirogênio.

3.3.4.1 Coluna de polimixina B

Esta metodologia foi realizada conforme o protocolo recomendado pelo fabricante das colunas de Polimixina (*Affinity Pak Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel – Pierce/Thermo Scientific*). Inicialmente a coluna foi regenerada com aproximadamente 5mL de 1% deoxicolato de sódio e equilibrada com 10mL de tampão (NaCl 200mM, Tris 20mM, pH 7.4) em fluxo contínuo, com a força da gravidade. Aproximadamente 1mg de jararagina previamente filtrada em membrana de 0,22µm foi aplicado na coluna e o fluxo foi fechado por 1h para favorecer a interação do LPS com a polimixina acoplada à resina. Após este período, o fluxo foi aberto e a jararagina foi eluída com o mesmo tampão, pela força da gravidade.

3.3.4.2 Eliminação por separação de fase utilizando Triton X-114

Esta metodologia foi realizada de acordo com Aida e Pabst (1990). Cada ciclo de separação de fase foi realizado como descrito: Em uma solução de 1mL de jararagina (500µg/mL), previamente filtrada em membrana de 0,22µm, foi adicionado 100µL de uma solução de Triton X-114 10%, resultando em uma solução final de Triton 1%. Esta mistura foi incubada em banho de gelo por 30min e agitada vigorosamente a cada 5min. Posteriormente, a amostra foi incubada à 37 °C por 5min para permitir a formação de duas fases. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5min à 13000 x g à temperatura ambiente. Em seguida, a fase aquosa foi recuperada cuidadosamente para não haver contaminação com a fase oleosa, que ficou depositada no fundo do tubo. As amostras foram submetidas à 1, 3 ou 5 ciclos de separação, até a completa eliminação da endotoxina.

3.4.3.3 Teste LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*)

Para detecção de endotoxina nas amostras foi realizado o teste de LAL (lisado de amebócitos do caranguejo *Limulus polyphemus*). Este teste foi realizado de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante (*Kit Limulus Amebocyte Lysate Endosafe, Alko do Brasil*) e apresenta uma sensibilidade de 0,125UE (Unidades de Endotoxina). A recomendação da farmacopéia quanto à quantidade de endotoxina permitida em uma amostra biológica é de 0,5UE (DING; HO, 2001).

O princípio do teste biológico do LAL se baseia no fato de que a endotoxina bacteriana produz uma reação de gelificação com o lisado dos amebócitos circulantes do caranguejo através de um processo enzimático. A endotoxina, em conjunto com cátions divalentes ativam zimógenos de serino-proteases encontrados nos amebócitos iniciando uma reação enzimática em cascata, que altera estruturalmente a proteína chamada coagulágeno, levando assim à formação do gel (LEVIN; BANG, 1968). Sendo a jararagina uma metaloproteinase, ela poderia estar ativando diretamente esta cascata de coagulação, gerando um resultado falso-positivo. Para evitar este problema, a jararagina usada neste teste teve a sua ação enzimática inativada pelo calor (70 °C/10min), processo este que não afeta a ação do LPS em ativar a cascata de coagulação.

Estes testes foram realizados pelo Laboratório de Controle Microbiológico da Divisão Bio-Industrial do Instituto Butantan.

3.4 Marcação da jararagina com Alexa fluor 488 ®

A jararagina foi conjugada com fluoróforo Alexa Fluor 488® de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen - USA). Resumidamente, a toxina foi dialisada contra o tampão bicarbonato de sódio 0,1M pH 8,3, na concentração de 10mg/mL. Em seguida, 100µL da toxina foram adicionados à 10µL de Alexa 488® (10mg/mL em DMSO- dimetilsulfóxido) e incubados por 1h à temperatura ambiente, protegidas da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50µL de cloreto de amônio 50mM à cada tubo. A separação das proteínas conjugadas foi realizada em coluna de gel filtração Sephadex G-25 em tampão fosfato, pH 8,0. A eficiência da marcação foi verificada pela leitura da absorbância a 280nm e 495nm, de acordo com as instruções do fabricante do reagente.

3.5 Efeito da jararagina sobre a viabilidade e adesão de células HUVECs

Experimentos de curva dose-resposta e de cinética tanto da viabilidade, quanto da aderência das células endoteliais, foram realizados com o intuito de definirmos a melhor concentração de jararagina e o melhor tempo de tratamento a ser utilizado em nossos experimentos.

3.5.1 Obtenção das células HUVECs

Cordões umbilicais humanos de recém nascidos foram doados sob o Consentimento Livre e Esclarecido da parturiente, logo após o parto (Hospital Universitário da USP–Comitê de Ética Humano Protocolo: 526/04). A veia do cordão foi lavada com solução salina tamponada estéril para a retirada de coágulos de sangue. As células endoteliais foram retiradas da veia do cordão pelo tratamento com 0,1% de collagenase tipo IV (*Worthington- USA*) diluída em meio de cultura RPMI 1640 (aproximadamente 1mL de meio de cultura com collagenase 0,1% por cm de cordão). A solução foi mantida dentro da veia por 15min à temperatura de 37 °C e após este

período o cordão foi massageado e o líquido coletado em um tubo estéril, a colagenase foi inativada com 10% de SFB e as células centrifugadas. As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%), L – glutamina (2mM), penicilina (50unidades/mL), estreptomicina (15µg/mL), heparina (45µg/mL), 2-mercaptoetanol (50µM), piruvato de sódio (1mM), fator de crescimento para fibroblastos básico (bFGF – 20ng/mL) e fator de crescimento epidermal (EGF – 10ng/mL) - (todos os reagentes do meio de cultura utilizados foram da *Invitrogen*). Após a suspensão no meio citado acima as células foram transferidas para uma garrafa de cultivo celular de 25cm² previamente gelatinizada (gelatina 1%) e mantidas à 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e as células foram utilizadas até a 5ª passagem. Durante os experimentos, as células foram mantidas em meio de cultura contendo todos os suplementos citados anteriormente, com exceção do bFGF e EGF.

3.5.2 Ensaio de viabilidade por 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 (MTT)

A viabilidade celular após o tratamento das células com a jararagina foi quantificada pela atividade da succinil desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas. O substrato utilizado para esta enzima foi o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT). As células HUVECs (5x10⁵ células/ml) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, previamente gelatinizadas (gelatina 0,2%), com 100µL de meio de cultura suplementado com os compostos descritos acima e com a metade das concentrações dos fatores de crescimento (10ng/mL de bFGF e 5ng/mL de EGF). Após a aderência por cerca de 24h, este meio foi substituído por meio novo completo, sem os fatores de crescimento e então as células foram tratadas com diferentes concentrações de jararagina (5, 10, 20 e 30µg/mL), 1µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS), ou o veículo (PBS estéril) por um período de 48h. Após os períodos de 6, 24, e 48h foram adicionados diretamente sobre o meio de cultura 20µL de uma solução contendo 5mg/mL de MTT e mantido à 37 °C por 3h. Após este período, foram adicionados 100µL de uma solução de SDS 10%/HCl 0,01M durante um período de 18h. A densidade ótica (DO) das amostras foi lida em um comprimento de onda de 570nm e os resultados expressos pelos valores da DO. As culturas foram feitas em triplicatas e o experimento repetido três vezes.

3.5.3 Quantificação das células aderentes por MTT

O procedimento seguido foi o mesmo do ensaio de viabilidade por MTT, porém, após os tempos de tratamento, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, descartado e foram seguidas 2 seqüências de delicadas lavagens das células com PBS estéril, para a retirada das células que não se encontravam aderidas ao substrato na placa de cultura.

3.5.4 Microscopia de contraste de fase

A capacidade de aderência e o aspecto geral das células HUVECs foram examinadas por microscopia de contraste de fase. Foram plaqueadas 5×10^5 células/garrafa de 25cm^2 previamente gelatinizadas, contendo todos os complementos citados anteriormente e metade das concentrações dos fatores de crescimento (10ng/mL de bFGF e 5ng/mL de EGF). No dia seguinte, este meio foi descartado e substituído por um meio completo sem os fatores de crescimento. As culturas de células endoteliais foram estimuladas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de jararagina, 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou o veículo. Após um período de 3 e 24h do tratamento, as células foram examinadas em microscópio de contraste de fase e fotografadas.

3.6 Expressão gênica de células endoteliais estimuladas com jararagina

3.6.1 Condições experimentais das células HUVEC tratadas com a jararagina

Para este experimento, foram plaqueadas 5×10^5 células/garrafa de 25cm^2 previamente gelatinizadas, contendo todos os complementos citados anteriormente e metade das concentrações dos fatores de crescimento (10ng/mL de bFGF e 5ng/mL de EGF). No dia seguinte, este meio foi descartado e substituído por um meio completo sem os fatores de crescimento. As células foram mantidas em cultura até atingirem 80% de confluência e então elas foram estimuladas com 10 $\mu\text{g/mL}$ (200nM) de jararagina, 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou PBS (veículo) por um período de 3, 6 ou 24h.

3.6.2 Extração de RNA total de HUVECs tratadas com jararagina

Após o tratamento com a jararagina, o LPS ou o veículo, as células que estavam aderidas na garrafa (ou desgrudadas e livres no sobrenadante, no caso da jararagina 24h) foram ressuspensas em 1mL de Trizol (Invitrogen), transferidas para um microtubo livre de RNase e centrifugadas a 12.000 x g durante 10min em uma centrífuga *Eppendorf 5415C*. Posteriormente, foram adicionados 200µL de clorofórmio para cada mL de reagente utilizado inicialmente, e estes foram agitados vigorosamente por 15s. Após 10min, as amostras foram centrifugadas novamente a 12.000 x g durante 10min. A fase aquosa (superior) resultante foi transferida para um microtubo novo e à este foram adicionados 250µL de isopropanol. Após 10min, as amostras foram centrifugadas (12.000 x g /10min) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (RNA) foi lavado com 1mL de etanol 75% e centrifugado novamente (7.500 x g /10min). O sobrenadante foi descartado novamente e o precipitado ressuspendido em 30µL de água livre de RNase (Promega - USA). A concentração de RNA foi quantificada conforme procedimento descrito por Sambrook et al. (1989), onde a absorbância em 260nm = 1 significa uma solução contendo 40µg de RNA/mL. A pureza do RNA foi determinada através da razão entre as absorbâncias obtidas em 260 e 280 nm (razão entre 260/280 maior que 1,7).

3.6.3 Reação de Transcrição Reversa (RT) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de transcrição reversa do mRNA para cDNA foi realizada utilizando-se o *Kit-Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Para cada reação foi realizada uma mistura dos seguintes reagentes: 1µg de RNA, 1µL de oligo (dT)₂₀ 50µM, 1µL de dNTP Mix (10mM) e completado o volume final para 13µL com água destilada estéril. Esta mistura foi aquecida a 65 °C durante 5min e resfriada em banho de gelo por mais 5min. Ao conteúdo do tubo, foi acrescentado: 4µL de 5x *First-Strand buffer*, 1µL DTT 0,1M, 1µL *Rnase OUT* (40U/µL) e 1µL da enzima transcriptase reversa *Superscript III*(200U/µL). A mistura foi incubada por 50 °C durante 60min e depois a 70 °C por 15min para inativar a reação. Após a reação de transcrição reversa, o cDNA obtido foi submetido à reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Para tanto, 1µL do cDNA (50ng) obtido como descrito acima, foi incubado com 1U de Taq DNA Polimerase

(Invitrogen), 5pM dos *primers* senso e anti-senso, e 10mM de dNTP. Estes reagentes foram diluídos em um tampão contendo 200mM de Tris-HCl, pH 8,4, 500mM de KCl e 1,5 mM de MgCl₂. Foi adicionado uma quantidade de água livre de RNase suficiente para 25µL/reacção. A reacção de PCR foi realizada com 1 ciclo inicial de denaturação de 94 °C durante 2min, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 50s (temperatura de denaturação), 58 °C ou 60 °C por 45s (temperatura de anelamento) e 72 °C por 1min (temperatura de extensão). Os produtos do PCR foram detectados em um sistema de eletroforese com gel de agarose a 1%, utilizando-se como marcadores do tamanho dos nucleotídeos, o *Gene Ruler DNA ladder* (Fermentas) ou *Fast Ruler Middle Range DNA ladder* (Fermentas).

3.6.4 Reacção de PCR em Tempo Real

Para as reacções de PCR em Tempo Real foi utilizado o kit *qPCR – Sybr Green Rox Plus* - (LGC Biotecnologia – São Paulo, Brasil) nas seguintes condições: 6,25µL de solução *Sybr® Green SuperMix*; 0,9µL *primer* anti-senso (5pM); 0,9µL *primer* senso (5pM); 3,7µL água livre de RNase e 2µL cDNA (100ng) para um volume final de 12,5µL de reacção. As condições das corridas foram: 95 °C - 15min (temperatura de ativação da enzima TaqStart – DNA Polimerase), 95 °C- 15s (temperatura de desnaturação), 58°C- 30s (temperatura de anelamento), 72 °C- 30s (temperatura de extensão), seguida por um ciclo para detecção da Curva de *melting* de cada produto amplificado, de 95 °C à 65 °C diminuindo 0,5 °C a cada 20s. Os experimentos foram realizados em um termociclador da marca *BioER (Japan)*. Nossos resultados foram avaliados pelo método de comparação do C_T (LIVAK et al., 2001), no qual a quantificação relativa da expressão de um gene é realizada através da comparação da amplificação com um controle endógeno constitutivo (o “house keeping gene ou HKG”). Os resultados foram expressos em “Quantidade Relativa de cDNA”, que significa o número de vezes a mais que um determinado gene foi expresso em relação às respectivas amostras controles (PBS).

Com base no experimento de *Microarray*, foram selecionados os seguintes genes para serem analisados por PCR em Tempo Real: CD-69 (Marcador de ativação celular); E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (Moléculas de adesão); IL-6, CXCL-6, e IL-8- 8 (Quimiocinas/citocinas); Angiopoetina 2 (fator de crescimento endotelial) e MMP-10 (Metaloproteinase de matriz).

A lista das sondas, com as respectivas seqüências desenhadas com auxílio do programa

Primers	Oligonucleotídeo 3' (Rv-Antisense)	Oligonucleotídeo 5' (Fw-Sense)	Pares de bases
IL-6	5' GTTACATGTCTCCTTTCTCAG 3'	5' GAAGATTCCAAAGATGTAGCC 3'	120
E-selectina	5' CAGTTCACAATTTGCTCACAC 3'	5' CTGCCTGTACCAATACATCC 3'	118
V-CAM-1	5' AATCTTCCATCCTCATAGCA 3'	5' GCAAGTCTACATATCACCCA 3'	206
CD-69	5' TGTATTGGCCCACTGATAAGG 3'	5' GTTTCGTAGCAGAGAACAGC 3'	183
ICAM-1	5' CATTACGCTCACCTTGG 3'	5' TATGGCAACGACTCCTTCT 3'	238
CXCL6	5' TTTCTTGTTTCCACTGTCCA3'	5' CGTTACGCTGAGAGTAAACC 3'	187
ANGPT-2	5' GTCCTTAGGTGAGTTTGATGTG 3'	5' CAGGTGTTAGTATCCAAGCA 3'	161
MMP-10	5' CTCCATGTTCTTTAACTGCGA 3'	5' TATACACCAGATTGCCAAGAG 3'	148
IL-8	5' TATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAA 3'	5' ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG 3'	280

(*Whitehead Institute for Biological Research*, <http://www.genome.wi.mit.edu/>) está descrita na tabela 2.

Tabela 2- Seqüência de *primers* utilizados nas reações de PCR tradicional e PCR em Tempo Real

β-globina	5' GAAGAGCC AAGGACAGGTAC 3'	5' CAACTTCATCCACGTTTAC C 3'	260
GAPDH	5'CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG 3'	5'GAGCCACATCGCTCAGACAC 3'	150
β-actina	5'TCATACTCCTGCTTGCTGATCC 3'	5' CCACGAAACTACCTTCAACTCC3'	267

3.7 Citometria de Fluxo (FACS)

O efeito da jararagina na expressão de moléculas de adesão na superfície de células endoteliais foi avaliado por citometria de fluxo. Resumidamente, HUVECs foram estimuladas com PBS, 10µg/mL de jararagina ou 1ng/mL de LPS por 1, 3, 6 ou 24h. Em seguida as células foram removidas da garrafa de cultura por tripsina/EDTA (Invitrogen). As células ($0,5 \times 10^6$) foram incubadas em suspensão com anticorpo bloqueador (*Affinity Purified Human FcγR-Binding Inhibitor- BD System*) na concentração de 1µg/ 10^6 células durante 20min/4 °C. Posteriormente as células foram lavadas com PBS/1% de albumina sérica (BSA) e centrifugadas. A análise da expressão de diferentes moléculas de adesão foi avaliada pela incubação das células com os anticorpos monoclonais anti-CD31/PECAM-1-fluoresceína, E-selectina-fluoresceína,

VCAM-1-fluoresceína ou anti-Integrina α_2 (CD49b) fluoresceína (R&D Systems - USA), na concentração de $1\mu\text{g}/10^6$ células em PBS/ 1% BSA por 30min /4 °C. Para detecção da integrina $\alpha_2\beta_1$ também foi utilizado o monoclonal anti-integrina α_2 JA221 não marcado. Nessas reações foi utilizados como 2º anticorpo o anti-mouse IgG- FITC ($1\mu\text{g}/10^6$ células- R &D Systems). Para todas as amostras foram utilizados controles isotópicos em uma concentração de $1\text{mg}/10^6$ células (R&D Systems). Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS contendo 0,1% paraformaldeído (Merck - USA). As amostras foram analisadas em duplicatas (10^4 eventos por aquisição) utilizando software Cell Quest (*Becton Dickinson*) em FACScalibur.

Para verificar a ligação da jararagina às HUVECs foram realizados dois experimentos diferentes. As HUVECs foram tripsinizadas e incubadas com jararagina marcada com Alexa 488 (1, 10 ou $50\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1h e o ensaio de citometria de fluxo foi seguido como descrito acima. Ou ainda, células tratadas com PBS ou $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de jararagina por 1h foram tripsinizadas e tratadas com anticorpo monoclonal anti-jararagina MaJar3 (Tanjoni et al., 2003) na concentração de $50\mu\text{g}/\text{mL}$, seguido da incubação com anti-mouse IgG- FITC ($1\mu\text{g}/10^6$ células- R &D Systems). As etapas seguintes foram iguais às descritas anteriormente.

O monoclonal JA221 (anti- α_2 humano produzido em rato) foi gentilmente doado pelo Dr. Johannes Eble do Center for Molecular Medicine, Dept. Vascular Matrix Biology, Excellence Cluster Cardio Pulmonary System, Frankfurt University Hospital Frankfurt, Frankfurt-Alemanha.

3.8 Dosagem de E-Selectina e IL-8 no sobrenadante de HUVEC tratadas com jararagina por ensaio imunoenzimático (ELISA)

O sobrenadante de HUVECs tratadas com jararagina por 1, 3 e 6h foram coletados, congelados a -20 °C e reservados para posterior dosagem das proteínas por ELISA. Para estes ensaios foram utilizados kits *DuoSet® ELISA* (R&D Systems) com anticorpos anti-E-selectina/CD62E e anti-CXCL8/IL-8 humana. Os anticorpos de captura diluídos em PBS foram adsorvidos em placas de 96 poços (Nunc Maxisorp) overnight à temperatura ambiente. No dia seguinte estas placas foram lavadas com PBS/Tween 20 0,05% por 3 vezes e bloqueadas por 1h com uma solução a 1% de BSA em PBS. Após este período de bloqueio as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween 20 0,05% e as amostras (ou a curva padrão das proteínas) foram

colocadas para incubação por mais 2h à temperatura ambiente. Após nova lavagem foi adicionado o segundo anticorpo (anticorpo policlonal de camundongo biotilado anti IL-8 ou anti-E-selectina) incubado durante 2h à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas novamente e incubadas com uma solução de peroxidase conjugada à streptavidina (diluída em reagente diluente específico de cada kit), durante 20min à temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS/Tween 20 0,05%, foram adicionados 100µL do reagente Tetrametilbenzidina (Sigma) para revelar a reação. Após cerca de 30min a reação foi interrompida com ácido sulfúrico à 30% e a absorbância lida em um comprimento de onda de 450nm. A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão feita com as respectivas proteínas recombinantes, utilizadas em uma diluição seriada a partir de 6000 até 93,75 para E-selectina e 2.000 até 15,62 pg/mL para IL-8. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear em um programa de análise de curvas GraphPad Software Versão 2.01.

3.9 Ligação da jararagina ao domínio A da integrina α_2 (*A2 domain*) por ensaio de Binding

Para este ensaio placas de 96 poços (Maxisorp, NUNC) foram previamente sensibilizadas por incubação com 10µg/mL do domínio A (*collagen binding site*) recombinante da subunidade $\alpha_2\beta_1$ (EBLE et al., 2009) à 4 °C por 24h. Após sensibilizadas as placas foram lavadas com TBS/2mM MgCl₂ e bloqueadas com 1% BSA em TBS/2mM, MgCl₂ por 1h à 37 °C. Em seguida as placas foram lavadas novamente e incubadas com uma diluição seriada (1:2) de jararagina, partindo da concentração de 26µg/mL, por 2h à temperatura ambiente. Como controle negativo, foi utilizado 1% BSA em TBS/2mM, MgCl₂. Após este período, as placas foram lavadas com HEPES e fixadas com 2,5% de glutaraldeído em HEPES por 10min. Em seguida as placas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-jararagina produzido em coelho (1:10000) diluído em 1% BSA em TBS/2mM, MgCl₂ por 1h e 30min à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:10000) diluído em 1% BSA em TBS/2mM MgCl₂ por 1h e 30min à temperatura ambiente. Após a lavagem, a atividade da enzima fosfatase alcalina foi detectada com o substrato paranitrofenil fosfato (pNPP) e a reação foi interrompida com NaOH (1,5M) e

absorbância das amostras foi mensurada utilizando leitor de Elisa com um comprimento de onda de 405nm.

Este experimento foi realizado no laboratório do Dr. Johannes Eble do Center for Molecular Medicine, Dept. Vascular Matrix Biology, Excellence Cluster Cardio Pulmonary System, Frankfurt University Hospital Frankfurt, Frankfurt- Alemanha.

3.10 Análise estatística

Os resultados obtidos representam a média de 3 experimentos e foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e avaliados estatisticamente pela análise paramétrica através do teste t-Student. Em todos os cálculos foi fixado o nível de significância de 0,5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção da jararagina

4.1.1 Cromatografia do veneno de *Bothrops jararaca*

A jararagina foi isolada seguindo os métodos já padronizados em nosso laboratório (MOURA-DA-SILVA et al., 2003). O fracionamento do veneno de *Bothrops jararaca* em coluna

de interação hidrofóbica Phenyl FF Hytrap, resultou em 3 frações majoritárias (Figura 3). Todas as frações foram avaliadas para atividade hemorrágica e a fração III foi a fração correspondente à jararagina parcialmente purificada. Esta fração eluiu com 100% do tampão B (Tris 20mM; CaCl₂ 1mM, pH7.4).

O pool da fração III foi dialisado conforme descrito em materiais e métodos e posteriormente submetido à coluna de troca iônica Mono-Q HR 5/50 GL. O perfil cromatográfico desta etapa resultou em 3 frações (Figura 4). O pico 3 mostrou um perfil eletroforético com uma única banda protéica em torno de 52 kDa, massa molecular correspondente a jararagina. O rendimento total ao final do processo foi de 4%. A jararagina foi quantificada pelo método de Bradford (1976) e estocada a -80 °C.

Figura 3- Fracionamento do veneno de *Bothrops jararaca* em coluna de interação hidrofóbica. Nessa etapa, 25mg do veneno bruto de *Bothrops jararaca* foi fracionado em resina de interação hidrofóbica Phenyl-Superose Hytrap equilibrada com os tampões (Tampão A: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2M; Tris 20mM; CaCl_2 1mM pH 7,4; Tampão B: Tris 20mM; CaCl_2 1mM, pH7.4) resultou em 3 frações. As frações foram coletadas a um fluxo de 0,5mL/min e as absorbâncias lidas a 280 nm. A jararagina foi recuperada na fração III e foi submetida à 2ª etapa de purificação.

Figura 4- Perfil cromatográfico do fracionamento da fração III em resina de troca-iônica Mono-Q, equilibrada com tampões (Tampão A: Tris 20mM/ CaCl_2 1mM, pH6.8; Tampão B: NaCl 1M, Tris 20mM e CaCl_2 1mM pH 6.8) resultou em 3 frações. As frações foram coletadas num fluxo de 0,5mL/min e as absorbâncias lidas a 280 nm. A jararagina purificada eluiu na fração III.

4.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS/PAGE)

A análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE de 5 μ g de proteína das frações resultantes do processo de purificação da jararagina demonstrou que em condições redutoras, a jararagina proveniente da coluna de interação hidrofóbica Phenyl FF Hytrap, apresentou uma banda majoritária com massa molecular de aproximadamente 52kDa e vários contaminantes de baixo peso molecular (Figura 5A). Após o processo de purificação em coluna de troca iônica houve eliminação dos contaminantes e podemos observar a presença de uma única banda na altura de 52kDa (Figura 5B).

Figura 5- Eletroforese em gel de poliacrilamida à 12,5%, na presença de SDS das frações resultantes do processo de purificação da jararagina. **A:** Material proveniente da coluna de Interação Hidrofóbica (fração 3): 1-Marcador de massa molecular, 2- Fração correspondente à jararagina parcialmente purificada. **B:** Material proveniente da coluna de Troca Iônica (fração 3): 1-Marcador de massa molecular, 2- jararagina purificada.

4.1.3 Obtenção da jararagina livre de endotoxina

Após a purificação da jararagina, a presença de endotoxinas foi avaliada pelo teste de LAL e foi constatado que havia contaminação por LPS em nossas amostras, em uma concentração superior ou igual à 0,125UE/mL. Diante do fato de que a transcrição gênica nas células endoteliais é fortemente ativada na presença de LPS e que a presença deste na amostra de jararagina utilizada em nossos experimentos poderia levar a resultados falso-positivos, foram avaliadas duas metodologias distintas com o objetivo de eliminar a endotoxina (LPS) presente na jararagina.

Inicialmente a jararagina foi recromatografada em coluna *Detoxi-Gel TM Endotoxin Removing Gel*, contendo Polimixina B. Este método foi eficiente em remover a endotoxina de nossas amostras, no entanto o rendimento foi baixo, resultando em 60% de recuperação da jararagina livre de endotoxina.

Na tentativa de obtermos um maior rendimento no processo de eliminação do LPS, foi utilizada outra metodologia: a separação de fase com Triton X-114. Soluções de jararagina (600 µg/mL) foram submetidas à 1, 3 ou 5 ciclos conforme descrito em material e métodos. Ao final do processo, tanto as amostras submetidas à 1, como 3 ou 5 ciclos apresentaram-se livres de endotoxina. Na tabela 3 podemos comparar os rendimentos destas duas metodologias e sua eficiência em eliminar a endotoxina das amostras de jararagina.

Tabela 3- Estimativa do rendimento e resultados do teste de LAL da jararagina submetida aos 2 processos de remoção de endotoxina.

Amostras	Teste LAL	Concentração inicial (µg/ml)	Conc. Final (µg/ml)	Rendimento (%)
Jararagina	Positivo	600	600	-----
Coluna de polimixina B	Negativo	600	360	60
1 ciclo Triton X-114	Negativo	600	600	100
3 ciclos Triton X-114	Negativo	600	600	100
5 ciclos Triton X-114	Negativo	600	485	81

Para avaliar a preservação da atividade biológica da jararagina, após os processos de purificação e de eliminação da endotoxina, foi utilizado como parâmetro a capacidade da jararagina induzir hemorragia no dorso de camundongos. Neste experimento, foi observado que tanto a jararagina não tratada como as amostras de jararagina submetidas aos 2 processos de eliminação do LPS (coluna de polimixina ou tratamento com Triton X-114) foram capazes de induzir um evidente halo hemorrágico no dorso de camundongos 3 horas após a inoculação de 2 DMH de jararagina/animal (Figura 6), demonstrando que os diferentes tratamentos para eliminar o LPS não interferiram na atividade biológica da toxina.

Figura 6- Efeito hemorrágico da jararagina no dorso de camundongos. Foi avaliada a presença/ausência de halos hemorrágicos no dorso de camundongos inoculados com PBS (controle negativo) jararagina (2,5µg/animal), jararagina tratada em coluna de Polimixina (2,5µg/animal) ou tratada com 1 ciclo de Triton X-114 (2,5µg/animal).

4.1.4 Ensaios de viabilidade de células HUVECs tratadas com jararagina

Com objetivo de verificar se o tratamento com Triton X-114 não interferiu na citotoxicidade da jararagina nas células HUVECs, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de MTT. Nossos resultados demonstram que com 6h de tratamento (Figura 7) não há diferença significativa na viabilidade de células tratadas com jararagina (10 μ g/mL) ou jararagina livre de endotoxina (10 μ g/mL) que passaram por 1 ou 3 ciclos de tratamento com Triton X-114. Entretanto houve diferença significativa entre as amostras submetidas à 5 ciclos, apresentando-se mais tóxica para as células. O reagente Triton X-114 0,1%, foi tóxico para as células diminuindo a viabilidade 6h após o tratamento, quando comparado com o controle (PBS).

Uma vez que apenas um ciclo do tratamento com Triton X-114 foi eficiente para eliminar o LPS da amostra de jararagina e que este não alterou a atividade hemorrágica e a citotoxicidade sobre células HUVECs, escolhemos este tratamento para obtenção da jararagina utilizada em nossos experimentos.

Figura 7 - Viabilidade celular de HUVECs estimuladas com jararagina (10 μ g/ml) submetida ao tratamento de eliminação de endotoxina por Triton X-114. As células foram incubadas com as amostras por 6h e a viabilidade foi avaliada pelo método do MTT. Células tratadas com PBS ou Triton X-114 (0,1%) foram usadas como controle. As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com o controle.

4.2 Ação da jararagina sobre células HUVEC

No intuito de verificarmos a citotoxicidade da jararagina sobre células HUVECs e de escolhermos uma concentração que tivesse um efeito de descolamento sobre as células, mas que não apresentasse alta toxicidade, realizamos testes de viabilidade e adesividade celular de HUVECs tratadas com jararagina pela técnica de *MTT*.

4.2.1 Ensaio de viabilidade celular

O efeito da jararagina na viabilidade das células endoteliais avaliado pela técnica de *MTT* demonstrou que em até 6h de tratamento não houve sinais de toxicidade da jararagina sobre as células endoteliais com as concentrações de 5 e 10 µg/mL. Por outro lado, 20 e 30 µg/mL de jararagina causaram leve redução da viabilidade das células. Após 24h de tratamento, observou-se que as concentrações de 5, 10, 20 e 30 µg/mL de jararagina induziram alteração na viabilidade, de maneira dose e tempo dependente (Figura 8). Após 48h, observou-se uma drástica diminuição da viabilidade das células HUVECs em todas as concentrações utilizadas. Em todos os tempos analisados, observamos que o tratamento com LPS não alterou a viabilidade das células HUVECs, ao passo que o tratamento com a água Milli-Q induziu morte celular nas primeiras 6h.

Figura 8- Efeito da jararagina sobre a viabilidade das células HUVECs analisada pelo método de MTT. As células foram tratadas com jararagina (5, 10, 20 e 30 µg/mL), LPS (1µg/mL), PBS (controle negativo) ou água (controle positivo) por 6, 24 ou 48h. As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com controle.

4.2.2 Ensaio de adesão celular

O efeito da jararagina na adesão das células endoteliais ao substrato (gelatina 0,1%) foi analisado em culturas de HUVECs, onde as células não aderidas foram removidas com 2 lavagens de PBS e a quantidade de células que permaneceram aderidas foi quantificada pela técnica de *MTT*. Em todos os tempos analisados, foi observado que o tratamento com LPS não alterou a capacidade de adesão das células HUVECs, ao passo que o tratamento com a água induziu a lise das células já nas primeiras 6h. Nossos resultados demonstram que em até 6h de tratamento com diferentes concentrações de jararagina não há sinas de perda de adesão das

células, entretanto houve uma interferência significativa na capacidade de adesão causada pela jararagina, em todas as concentrações utilizadas após 24h de tratamento. Esta atividade foi bem acentuada ao longo de 48h mostrando que houve um descolamento praticamente total das células da placa de cultura com as concentrações iguais ou superiores a 10 μ g/mL (Figura 9).

Apesar da perda de adesão das células tratadas com a 10 μ g/mL de jararagina no tempo de 24h, os experimentos de viabilidade demonstram que aproximadamente 50% das células continuaram viáveis. Desta forma escolhemos esta concentração e tempo para realizarmos os nossos experimentos.

Figura 9- Efeito da jararagina sobre a adesão das células HUVECs avaliadas pelo método de MTT. As células foram tratadas com jararagina (5, 10, 20 e 30 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL), PBS (controle negativo) ou água (controle positivo) por 6, 24 ou 48h. As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com controle negativo.

4.2.3 Microscopia de contraste de fase

O efeito da jararagina sobre a adesão das HUVECs ao substrato também foi examinado por microscopia de contraste de fase. Foi observado que 3h após o estímulo não houve diferença visível no aspecto morfológico entre as células tratadas com PBS (controle), jararagina (10 μ g/mL) ou LPS (1 μ g/mL). Entretanto, 24h após o estímulo, observamos que a jararagina foi capaz de induzir uma perda significativa na capacidade de adesão e o descolamento das células HUVECs do substrato, visualizado pelos espaços vazios na placa. O tratamento com controle ou LPS não resultou no descolamento das células (Figura 10).

Figura 10- Microscopia de contraste de fase (20X) de células HUVECs tratadas com jararagina (10 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL) ou PBS e examinadas ao microscópio de luz 3 e 24h após o tratamento.

4.3 Expressão gênica de células endoteliais estimuladas com jararagina

4.3.1 Padronização das reações de PCR

Inicialmente foram realizadas reações de PCR semiquantitativo, com o objetivo de padronizarmos as nossas condições experimentais para realização dos experimentos de PCR em Tempo Real. Foi utilizado o cDNA proveniente de HUVECs tratadas com PBS (controle negativo), jararagina (10µg/mL) ou 1µg/mL de LPS (controle positivo) por 3h.

Nossos resultados mostram que houve a amplificação dos genes que codificam a β -actina, E-Selectina, V-CAM-1, CD69, ICAM-1 e IL-6 em todas as amostras de cultura estimuladas (dados não mostrados). A presença de uma única banda no gel de agarose demonstra o sucesso da amplificação nas condições utilizadas. Entretanto, nestas condições de reação não foi observada a amplificação dos genes que codificam para CXCL-6, Ang-2, IL-8 e MMP-10. Diante disso, fizemos algumas modificações experimentais no intuito de verificarmos a eficiência destas sondas. Diferentes concentrações de $MgCl_2$ foram utilizadas nas reações com as sondas CXCL-6 e Ang-2 com intuito de estabelecermos a melhor concentração. Observamos que houve uma melhor amplificação quando foram utilizadas as concentrações $\geq 2,5$ mM de $MgCl_2$. Também foi realizada uma reação de PCR de gradiente de temperaturas de anelamento para as sondas IL-8 e MMP-10 (Dados não mostrados). Foi observado que houve amplificação em todas as temperaturas de anelamento utilizadas. De acordo com a intensidade da banda, escolhemos a temperatura de 58 °C para o primer MMP-10 e 60 °C para o primer IL-8. Padronizadas todas as condições experimentais, procedemos com os experimentos para a escolha do gene constitutivo a ser utilizado posteriormente no experimento de PCR em tempo real.

4.3.2 Escolha do gene utilizado como controle interno na técnica de PCR em tempo real

Na tentativa de encontrar o melhor gene constitutivo para os experimentos de PCR em tempo real, avaliamos 3 genes distintos: β -actina, β -globina e GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Foram construídas curvas com concentrações conhecidas de cDNA obtido das culturas de HUVECs estimuladas com LPS por 24h. Escolhemos esta amostra uma vez que neste tempo e com este estímulo observou-se o aumento da transcrição gênica da célula, de acordo com os experimentos iniciais de PCR semi-quantitativo. Foi utilizada uma escala logarítmica com base 10 nas diluições, iniciando-se com 100ng de cDNA de GAPDH; 5ng de β -globina e 50ng de β -actina.

O PCR em tempo real também foi realizado utilizando-se o cDNA obtido das culturas de HUVECs estimuladas com as amostras de jararagina 10 μ g/mL, 1 μ g/mL de LPS, ou PBS após os tempos de 3, 6 e 24h. Para o gene β -actina (Figura 11), a equação da reta obtida a partir dos dados da curva-padrão forneceu um coeficiente de correlação de 0.99, *slope* = -3,6 e eficiência da PCR de 90%. Ainda para este gene, observamos uma expressão constante independente do tratamento (PBS, jararagina ou LPS), dados expressos pelo valor de C_T . Outro gene constitutivo avaliado foi a β -globina, a curva-padrão para esta proteína apresentou coeficiente de correlação de 0.86, *slope*= -1,81 e eficiência da PCR 245%. Para este gene observamos uma pequena variação nos valores de C_T dependendo do tipo e tempo de tratamento (Figura 12). Para o gene GAPDH, a curva-padrão resultou em coeficiente de correlação de 0.97, *slope*= -5,16 e eficiência da PCR 54%, o tipo de tratamento não induziu variação significativa na expressão gênica deste gene.

Uma curva do gene constitutivo ideal deve possuir: coeficiente de correlação próximo de 1, *slope* próximo de - 3,5 e eficiência da PCR próxima de 100%. Além disso, os valores de C_T não podem variar dependendo do tratamento, devendo ser constantes para todas as amostras. O gene que mais se aproximou das características ideais e que teve uma menor variação de acordo com o tratamento foi a β -actina, desta forma escolhemos a β -actina como o gene constitutivo para realização de nossos experimentos.

Figura 11- Análise por PCR em tempo real da expressão do gene que codifica a β -actina em células HUVECs. **A:** Curva-padrão realizada com diferentes concentrações de cDNA de HUVECS estimuladas com LPS por 24h e os valores da equação da reta. **B:** Gráfico das amostras de cDNA de HUVECs estimuladas com jararagina 10 $\mu\text{g/mL}$ (200nM) ou 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS, ou PBS por de 3, 6 e 24h. **C:** Gráfico da emissão de fluorescência pelo “Sybr Green” das amostras amplificadas da curva padrão. Cada curva representa uma amostra diferente. Coeficiente de correlação: 0,9915; Slope: -3,6; Eficiência da PCR: 90,0%. Os testes foram feitos em duplicata.

Figura 12- Análise por PCR em tempo real da expressão do gene que codifica para a β -globina em células HUVECs. **A:** Gráfico da curva-padrão realizada com diferentes concentrações de cDNA de HUVECS estimuladas com LPS por 24h e os valores da equação da reta. **B:** Gráfico das amostras de cDNA de HUVECs estimuladas com jararagina 10 μ g/mL (200nM), 1 μ g/mL de LPS, ou PBS por 3, 6 ou 24h. **C:** Gráfico da emissão de fluorescência pelo “Sybr Green” das amostras amplificadas da curva padrão. Cada curva representa uma amostra diferente. Coeficiente de correlação: 0,86; Slope: -1,81; Eficiência da PCR: 254,0%. Os testes foram feitos em duplicata.

Figura 13- Análise por PCR em tempo real da expressão do gene que codifica para o GAPDH em células HUVECs. **A:** Gráfico da curva-padrão realizada com diferentes concentrações de cDNA de HUVECS estimuladas com LPS por 24h e os valores da equação da reta. **B:** Gráfico das amostras de cDNA de HUVECs estimuladas com jararagina 10µg/mL (200nM), 1µg/mL de LPS ou PBS por 3,6 ou 24h. **C:** Gráfico da emissão de fluorescência pelo “Sybr Green” das amostras amplificadas da curva padrão. Cada curva representa uma amostra diferente. Coeficiente de correlação: 0,971; Slope: -5,16; Eficiência da PCR: 54%. Os testes foram feitos em duplicata.

4.3.3 Expressão gênica avaliada por PCR em tempo real

A expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios em HUVECs foi avaliada por PCR em tempo real 3, 6 e 24h após estímulo com a jararagina e com o LPS. O LPS foi utilizado em nossos experimentos como um controle positivo e portanto os resultados serão apresentados com intuito de comparação, não sendo o foco principal de nosso estudo. De acordo com os nossos resultados, a jararagina induziu um aumento da expressão das moléculas de adesão E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (Figura 14). A jararagina induziu um aumento da expressão da molécula de adesão E-selectina 6 e 24h após o estímulo, sendo a quantidade relativa de cDNA 49 e 7 vezes maior em relação ao controle (PBS), respectivamente. As células HUVECs apresentaram um aumento na expressão da molécula de adesão VCAM-1 6 e 24h após o tratamento com a jararagina, e esta expressão foi 4 e 2,5 vezes maior em relação ao controle, respectivamente. Observamos que 6h após o estímulo com a jararagina ocorreu aumento na expressão da molécula de adesão ICAM-1, com uma quantidade de cDNA 5 vezes maior em relação ao controle. O LPS induziu um forte aumento da expressão das moléculas de adesão em todos os tempos avaliados.

A expressão das citocinas IL-6, IL-8 e CXCL-6, também foi avaliada (Figura 15). A quimiocina IL-8 apresentou aumento significativo em relação ao controle, 6h após o tratamento com a jararagina. O gene que codifica para IL-8 aumentou 9 vezes em relação ao controle. A jararagina não induziu um aumento significativo na expressão dos genes que codificam a IL-6 e CXCL-6 nos tempos estudados.

Também foi avaliada a expressão dos genes Ang-2, CD-69, e MMP-10 (Figura 16). A expressão do fator de crescimento Ang-2 foi 5 vezes maior em relação ao controle no tempo de 6h. Após 24h, o aumento da Ang-2 foi de aproximadamente 7 vezes. Interessantemente, não foram observados aumentos significativos dessa molécula após estímulo com LPS. O gene CD-69 foi 10 vezes mais expresso em relação ao controle com 6h de estímulo e 10 vezes mais expresso após 24h.

A jararagina também estimulou as células HUVECs a expressarem 6 vezes mais a metaloprotease MMP-10, 6h após o estímulo. Em geral, nossos resultados demonstram que a expressão de mediadores inflamatórios em células HUVECs estimuladas com a jararagina ocorreu após 6h de tratamento. Observamos também que os genes que codificam para Ang-2 e E-selectina foram os mais expressos.

Figura 14- Expressão gênica das moléculas de adesão E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 pelas HUVECs. As células foram estimuladas com jararagina (10 µg/mL), LPS (1µg/mL) ou PBS por 3, 6 e 24h. Após os intervalos de tempo o RNA foi extraído e submetido à transcrição reversa. Em seguida, foi realizada a quantificação por PCR em tempo real do gene que codifica para as moléculas de adesão. As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com controle.

Figura 15- Expressão gênica das citocina IL-6, CXCL-6 e IL-8 pelas HUVECs. As células foram estimuladas com jararagina (10 µg/mL), LPS (1µg/mL) ou PBS por 3, 6 e 24h. Após os intervalos de tempo o RNA foi extraído e submetido à transcrição reversa. Em seguida, foi realizada a quantificação por PCR em tempo real do gene que codifica para as citocinas. As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com controle.

Figura 16- Expressão gênica de Ang-2, CD-69 e MMP-10 pelas HUVECs. As células foram estimuladas com jararagina (10 µg/mL), LPS (1µg/mL) ou PBS por 3, 6 e 24h. Após os intervalos de tempo o RNA foi extraído e submetido à transcrição reversa. Em seguida, foi realizada a quantificação por PCR em tempo real do gene que codifica para Ang-2, CD-69 e MMP-10. As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com o controle.

Tabela 4- Tabela com os principais genes expressos pelas HUVECs após tratamento com a jararagina. Os valores representam o número de vezes que o gene foi mais expresso em relação ao controle (PBS).

Gene	Tempo de tratamento		
	3 horas	6 horas	24 horas
E-seletina	-----	49 vezes	7 vezes
VCAM-1	-----	4	2,5
ICAM-1	-----	5	-----
IL-6	-----	-----	-----
IL-8	-----	9	-----
CXCL-6	-----	-----	-----
CD-69	-----	10	10
Ang-2	-----	5	7
MMP-10	-----	6	-----

4.4 Determinação da expressão de moléculas de adesão na superfície de HUVEC por citometria de fluxo

A expressão das moléculas de adesão, E-selectina, VCAM-1 e PECAM-1 na superfície de HUVECs, foi investigada por citometria de fluxo 1, 3, 6 e 24h após o estímulo com jararagina (Figuras 17 à 19). As HUVECs apresentaram uma expressão basal de E-selectina 1h após o estímulo, sendo que a porcentagem de células que expressam essa molécula foi significativamente aumentada quando tratadas com LPS, 3, 6 e 24h, enquanto a jararagina não induziu o aumento da expressão dessa proteína quando comparado com o controle PBS. O tratamento com LPS também foi capaz de induzir aumento nos níveis de expressão de VCAM-1 em HUVECs, 6 e 24h após o tratamento, com aproximadamente 22 e 25% das células expressando essa proteína, respectivamente. A molécula de adesão PECAM-1 foi expressa por aproximadamente 70% das células independente do tratamento e em todos os tempos avaliados. No tempo de 24h observamos uma diminuição da porcentagem das células tratadas com jararagina que expressaram a molécula PECAM-1.

Nosso próximo passo foi avaliar a possível clivagem e degradação da molécula de adesão E-selectina da superfície da célula pela jararagina. Para isso, HUVECs foram estimuladas com LPS (1ng/mL) por 3h. Após serem lavadas as células foram incubadas com a jararagina (10µg/mL) por 2h. Na figura 20 observamos que o aumento nos níveis de E-selectina mediados pelo LPS não foram modificados pela jararagina.

Figura 17- Expressão de E-selectina na superfície de HUVECs. As células foram estimuladas com controle (PBS), 10µg/mL de jararagina ou 1ng/mL de LPS por 1, 3, 6 ou 24h. As células foram marcadas com anticorpos anti-E-selectina-fluoresceína ou controle isotípico e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a porcentagem de células que expressam E-selectina. As amostras foram analisadas em duplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com o controle.

Figura 18- Expressão de VCAM-1 na superfície de HUVECs. As células foram estimuladas com controle (PBS), 10µg/mL de jararagina ou 1ng/mL de LPS por 1, 3, 6 ou 24h. As células foram marcadas com anticorpos anti-VCAM-1- fluoresceína ou controle isotípico e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a porcentagem de células que expressam VCAM-1. As amostras foram analisadas em duplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com o controle.

Figura 19- Expressão de PECAM-1 na superfície de HUVECs. As células foram estimuladas com controle (PBS), 10µg/mL de jararagina ou 1ng/mL de LPS por 1, 3, 6 ou 24h. As células foram marcadas com anticorpos anti-PECAM-1-fluoresceína ou controle isotípico e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a porcentagem de células que expressam PECAM-1. As amostras foram analisadas em duplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com o controle.

Figura 20- Expressão de E-selectina na superfície de HUVECS. As células foram estimuladas com PBS, $10\mu\text{g/mL}$ de jararagina ou 1ng/mL de LPS por 3h. Em seguida as células tratadas com LPS foram lavadas e incubadas com jararagina ($10\mu\text{g/mL}$) por 2h. As células foram marcadas com anti-E-selectina-fluoresceína ou controle isotípico e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados expressam a porcentagem de células que expressam E-selectina. As amostras foram analisadas em duplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com controle.

4.5 Dosagem de E-Selectina e IL-8 no sobrenadante de HUVECs por ensaio imunoenzimático (Elisa)

A produção e liberação da quimiocina IL-8 e da molécula de adesão E-selectina solúvel pelas células HUVECs estimuladas com a jararagina, foi avaliada no sobrenadante das células 1, 3 e 6h após o estímulo. Células tratadas com LPS apresentaram altas concentrações de IL-8, 3 e 6h após o estímulo (Figura 21), enquanto não foram observados níveis significativos dessa quimiocina no sobrenadante de células tratadas com jararagina quando comparado com o controle PBS. Não foram observados níveis significativos de E-selectina no sobrenadante de HUVECs em nenhum dos tratamentos (Figura 22)

Figura 21- Dosagem de IL-8 no sobrenadante de HUVECs. Células foram tratadas com PBS, jararagina (10µg/mL) ou LPS (1ng/mL) por 1, 3 e 6h. A dosagem dessa quimiocina foi realizada por ELISA com kit específico para IL-8 (R&D). As amostras foram analisadas em triplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com controle.

Figura 22- Dosagem de E-selectina no sobrenadante de HUVECs. Células foram tratadas com PBS, jararagina (10µg/mL) ou LPS (1ng/mL) por 1, 3 e 6h. A dosagem dessa molécula foi realizada por ELISA com kit específico para E-Selectina (R&D). As amostras foram analisadas em triplicata.

4.6 Ligação direta da jararagina às células endoteliais

A interação da jararagina marcada com Alexa 488 às células endoteliais foi avaliada por citometria de fluxo. Na figura 23, observamos o aumento da porcentagem de células tratadas com 1, 10 ou 50µg/mL de jararagina/Alexa 488 quando comparado com o controle, sugerindo que a jararagina foi capaz de se ligar às HUVECs. A interação da jararagina com as células HUVEC também foi detectada de forma indireta, pelo anticorpo anti-jararagina MaJar3, células tratadas com 10µg/mL de jararagina expressaram mais o MaJar 3, que detecta a jararagina, em comparação com as células tratadas com PBS.

Figura 23- Detecção da jararagina Alexa 488 na superfície de HUVECS. As células foram tripsinizadas e incubadas com 1, 10 ou 50µg/mL de jararagina por 1h. Os resultados expressam porcentagem de células que expressam a jararagina/Alexa 488 por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas em duplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras controle.

Figura 24- Detecção da jararagina na superfície de HUVECS. As células foram estimuladas com PBS ou 10µg/mL de jararagina por 1h e marcadas com o anti-jararagina MAJar3. Os resultados expressam porcentagem de células que expressam o monoclonal MAJar 3 detectado por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas em duplicata e * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às amostras tratadas com controle.

4.7 Ligação da jararagina no domínio A da subunidade α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$ por ensaio de fase sólida

Uma vez que as células endoteliais expressam entre outras integrinas a integrina $\alpha_2\beta_1$ em sua superfície (STULPACK; CHERESH, 2004) e que a jararagina possui uma afinidade específica por esta integrina na superfície de plaquetas (DE LUCA et al., 1995; KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996) e de células endoteliais (MOURA-DA-SILVA et al., 2001), o próximo passo então foi confirmar a ligação da ao domínio A da subunidade α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$. Na figura 25, observamos que a jararagina se liga no domínio A da subunidade α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$ de forma dose dependente.

Figura 25- Ligação da jararagina ao domínio A da subunidade α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$. Diferentes concentrações de jararagina (diluição seriada 1:2) foram incubadas em placa previamente sensibilizadas com integrina α_2 (domínio A da subunidade α_2). Como controle foi utilizado BSA.

4.8 Ligação da jararagina nas células endoteliais através da integrina α_2 por citometria de fluxo

Uma vez que a jararagina foi capaz de se ligar ao domínio A da subunidade α_2 da integrina $\alpha_2\beta_1$ em ensaio de fase sólida, o próximo passo foi avaliar a ligação da jararagina nas células endoteliais através da integrina α_2 por citometria de fluxo utilizando diferentes anticorpos anti-integrina α_2 . Nossos resultados demonstraram que a jararagina não interferiu na ligação de diferentes anticorpos anti-integrinas na superfície de HUVECs. Na figura 26 observamos que aproximadamente 98% das células expressaram a integrina α_2 através da marcação com CD49b independente do tratamento, PBS ou jararagina. Resultado semelhante foi obtido com o anticorpo anti-integrina- α_2 JA221, que detectou cerca de 75% das células quando estimuladas com PBS ou jararagina.

Figura 26- Expressão da integrina α_2 na superfície de HUVECs. HUVECS foram estimuladas com PBS, ou 10 μ g/mL jararagina por 1h e marcadas com anti-integrina α_2 (CD49b ou JA221) ou controle isotípico.

5 DISCUSSÃO

A lesão tecidual que ocorre após o envenenamento botrópico é o resultado da hemorragia e da resposta inflamatória que ocorre no local da picada e as SVMPs são consideradas uma das principais responsáveis por estes efeitos.

Vários estudos têm demonstrado o papel da jararagina, uma SVMP da classe PIII isolada do veneno de *Bothrops jararaca*, nos processos inflamatórios que ocorrem após o envenenamento (MOURA-DA-SILVA et al., 1996; CLISSA et al., 2001; LAING et al., 2003; COSTA et al., 2002; GALLAGHER et al., 2005). Em um estudo realizado pelo nosso grupo, dados preliminares de um experimento de *Microarray* realizado em HUVECs previamente estimuladas com jararagina (Tabela 1), demonstraram que esta toxina regulou a expressão de importantes genes relacionados à resposta inflamatória. Entre eles, genes envolvidos na sinalização celular e interação célula-célula, como E-selectina, VCAM-1, IL-8, IL-6, trombosmodulina e receptor IL-1 tipo 1. Estes genes são importantes para eventos celulares que ocorrem após a estimulação das células endoteliais pela jararagina, como quimiotaxia e *rolling* de leucócitos.

Outro grupo de genes que foram regulados positivamente pela jararagina estão relacionados à morte celular, como PEG10 (paternally expressed 10), receptor IL-1 tipo 1, CD69, DDIT 4 (DNA-damage-inducible transcript 4) e Angiopoetina 2. Esses genes podem estar relacionados à apoptose induzida por esta toxina e outras SVMPs. De acordo com Tanjoni et al. (2005), a jararagina induziu uma diminuição na adesão ao substrato e na viabilidade celular, resultando em apoptose de células endoteliais murinas (tEnd) por anoikis. Baldo et al. (2008) também observaram apoptose em HUVECs após o tratamento com jararagina, sugerindo que este evento também ocorre por anoikis.

Ainda no experimento de *Microarray* realizado por nosso grupo, HUVECs tratadas com jararagina também expressaram genes relacionados com doenças inflamatórias como o SOD 2 (superoxide dismutase 2, mitochondrial), PEG10, E-selectina, VCAM-1, IL-8. O aumento da expressão destes genes confirma que a jararagina é capaz de induzir uma resposta inflamatória proeminente. A análise da expressão gênica de fibroblastos tratados com jararagina também demonstra o aumento da expressão de genes relacionados à morte celular e doenças inflamatórias (GALLAGHER et al., 2005).

No nosso estudo de *Microarray*, também identificamos a expressão de genes envolvidos em outros efeitos biológicos, tais como movimento celular, função e desenvolvimento do sistema hematológico, resposta imune, desenvolvimento e função dos sistemas imunológicos e linfáticos e anormalidades e lesões do organismo.

Gallagher et al. (2003) investigaram o efeito do veneno total de *Crotalus atrox* e *Bothrops jararaca* em perfis de expressão gênica de células endoteliais da veia umbilical humana utilizando a tecnologia de *Microarray*. HUVECs tratadas com veneno de *Bothrops jararaca* tiveram 33 genes regulados positivamente, sendo estes genes relacionados ao crescimento e manutenção celular, comunicação celular e tradução de sinais. Vários genes expressos em HUVECs tratadas com ambos os venenos estão associados com as vias de apoptose, como EGR-1, EGR-3, quimiocina IL-8, interleucina 11 e caspases.

Diante do exposto, no presente trabalho, nosso objetivo foi confirmar e quantificar o aumento da expressão de alguns genes relacionados à resposta inflamatória, previamente detectados pelo *Microarray*, com o auxílio da técnica de PCR em tempo real. Foi verificada, em nosso estudo, a expressão dos genes que codificam para as seguintes proteínas: IL-6, IL-8, CXCL-6, E-Selectina, VCAM-1, ICAM-1, CD-69, Angiopoetina-2 e MMP-10. Também foi avaliada a expressão de moléculas de adesão, E-selectina e VCAM-1 e da quimiocina IL-8 por FACS e Elisa. Além disso, avaliamos a ligação da jararagina às células endoteliais através da integrina $\alpha_2\beta_1$.

Ação da jararagina na expressão gênica e protéica de moléculas de adesão

O recrutamento de leucócitos para os tecidos lesados é evento característico da resposta inflamatória e a interação leucócito-endotélio é promovida pela expressão de glicoproteínas de adesão celular na membrana de leucócitos e células endoteliais, as quais são induzidas por citocinas (FARSKY; MELLO, 1995). Os componentes do veneno de serpentes são importantes ativadores de agentes pró-inflamatórios, e as SVMPs interferem no *rolling*, ativação, aderência e extravasamento de leucócitos para o tecido lesado (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007).

O primeiro evento que ocorre na migração celular durante a resposta inflamatória é o *rolling* de leucócitos na superfície do endotélio vascular mediado pelas selectinas. A E-selectina

tem sua expressão no endotélio induzida por agentes pró-inflamatórios, ela reconhece carboidratos presentes na superfície dos leucócitos, como o ligante 1 de glicoproteína P-selectina (PSGL-1), e participa dos eventos iniciais da interação entre neutrófilos e endotélio (PENBERTHY et al., 1997). A jararagina e a jararagina-C, uma disintegrina tipo-ECD originada por autólise da jararagina, desencadeiam as reações iniciais da resposta inflamatória, como *rolling* e adesão de leucócitos na parede do endotélio (CLISSA et al., 2006).

Inicialmente, nossos resultados indicam que houve um aumento significativo da expressão gênica das moléculas de adesão E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 após estímulo das células HUVECs com a jararagina. Nossos dados mostram a expressão gênica de **E-selectina** 49 e 7 vezes maior em relação ao grupo controle, com 6 e 24 horas após o estímulo, respectivamente. É interessante observar que, apesar de encontrarmos elevados níveis de RNA mensageiro nestas células, não houve aumento significativo nos níveis desta molécula de adesão expressas na superfície de HUVECs estimuladas com a jararagina. Em um estudo anterior Clissa et al. (2001) demonstraram que a jararagina tinha uma ação de degradação total ou parcial sobre citocinas pró-inflamatórias em sobrenadante de cultura de células; por isso, nós fomos investigar se este efeito também seria o responsável pela ausência da expressão de E-selectina na superfície de HUVECs. Nós observamos que não ocorreu clivagem ou degradação induzidas por essa metaloprotease, uma vez que a jararagina não interferiu nos níveis de E-selectina expressos na superfície de HUVECs previamente estimuladas com LPS.

Existem poucos trabalhos na literatura que descrevem o efeito de SVMPs da classe PIII sobre células endoteliais, no que concerne a expressão gênica e protéica de mediadores inflamatórios. Entre os poucos trabalhos existentes, a toxina berithractivase foi detalhadamente estudada (SILVA et al., 2003; SCHATTNER et al., 2005). Esta toxina foi isolada do veneno de *Bothrops erythromelas* e apresenta 69% de similaridade com a jararagina. Embora elas sejam da classe PIII, ambas possuem efeitos totalmente opostos com relação à atividade hemorrágica e na viabilidade de células HUVECs (SCHATTNER et al., 2005).

De forma diferente dos resultados aqui apresentados com a jararagina, estudos iniciais da berithractivase demonstram a expressão da molécula de adesão E-selectina, na superfície de HUVECs após 1 hora de incubação (SILVA et al., 2003). A diferença estrutural existente entre elas poderia justificar a discrepância de nossos resultados, aliado à algumas diferenças sutis na metodologia experimental entre estes 2 experimentos. Silva et al. (2003) após 1 hora de

incubação com 70nM de berithractivase, retiraram o sobrenadante da cultura contendo a toxina e deixaram as células incubando por mais 3 horas subseqüentes, antes de procederem com a tripsinização das células e posterior detecção por citometria de fluxo. Em nossa metodologia, nós incubamos as HUVECs por 1, 3, 6 ou 24 horas com 200nM de jararagina e procedemos imediatamente com a tripsinização e posterior detecção por citometria de fluxo.

Outra justificativa plausível para explicarmos tal discrepância nos resultados poderia estar baseada na presença de LPS nas amostras purificadas de SVMPs, como nós observamos no caso da jararagina. Embora Silva et al. (2003) descreverem que eliminaram a possível interferência de LPS pela incubação de polimixina B nas culturas de células, este tratamento pode não ter o mesmo efeito que eliminar o LPS diretamente das amostras. O passo de eliminação das possíveis contaminações por LPS em nossas amostras se mostrou fundamental para um estudo do efeito direto da jararagina na expressão de agentes pró-inflamatórios, eliminando possíveis interferências nos resultados. Desta forma a expressão observada por estes autores poderia também ser atribuída ao LPS como contaminante e não a um evento direto da toxina sobre as células, uma vez que o LPS é altamente pró-inflamatório e é capaz de induzir expressão de citocinas e moléculas de adesão em células endoteliais (BIERHAUS et al., 2000).

O segundo evento característico que ocorre durante a migração de células inflamatórias para o foco contendo o agente agressor é a firme adesão dos leucócitos ao endotélio ativado (LEFER, 1999), onde acontece a ligação de integrinas presentes nos leucócitos, às moléculas de adesão (CAMs) presentes no endotélio (WALZOG; GAEHTGENS, 2000). Em nossos experimentos a jararagina induziu aumento de 5 vezes na expressão gênica de **ICAM-1**, em relação ao controle, no tempo de 6 horas. Segundo Gallagher et al. (2005) a jararagina também induziu aumento da expressão gênica de ICAM-1 em fibroblastos, de aproximadamente 4 vezes, comparado com fibroblastos não tratados. A expressão desta molécula na superfície de HUVECs não foi avaliada em nossos experimentos, mas dados da literatura (SCHATTNER et al., 2005) relatam que doses de 70–350 nM de jararagina não induziram a expressão celular de ICAM-1 em células HUVECs. Por outro lado, a berithractivase foi capaz de induzir uma pequena expressão desta molécula na superfície de HUVECs após 1 hora de estímulo (SILVA et al., 2003).

Nós verificamos ainda que a jararagina induziu um aumento significativo na expressão do gene que traduz a **VCAM-1**. Foi observada uma expressão cerca de 4 e 2,5 vezes maior do que nas células tratadas com PBS, com 6 e 24 horas, respectivamente, De maneira similar à E-

Selectina, também neste caso não foi observada a expressão desta molécula na superfície de HUVECs tratadas com jararagina por até 24 horas. Nossos resultados finalmente corroboram com os resultados obtidos por Silva et al. (2003) em que também não foi detectado nenhum aumento na expressão celular desta molécula com a concentração de 70nM de berithractivase, durante 1 hora de tratamento em HUVECs. Estes resultados não excluem a nossa hipótese da provável contaminação por LPS nas amostras de berithractivase, uma vez que mesmo o LPS (em nossos experimentos) só induziram a expressão protéica de VCAM-1 após 6 horas de tratamento.

O terceiro passo da migração celular envolve a participação da molécula PECAM-1 responsável pela transmigração dos leucócitos através das junções interendoteliais (ALEXANDER; ELROD; PARK, 2001; FARSKY; MELLO, 1995). Como esperado, nossos resultados demonstram a expressão de **PECAM-1** em todos os intervalos de tempos e tratamentos analisados, já que as células endoteliais apresentam uma expressão constitutiva de PECAM-1 (HUO; LEY, 2001). A diminuição da porcentagem de células tratadas com jararagina que expressaram a molécula PECAM-1 no tempo de 24 horas pode ser explicada pelo descolamento das células induzido pela jararagina neste tempo de tratamento.

A importância *in vivo* destas moléculas de adesão para o recrutamento de leucócitos induzido pelo veneno de *Bothrops asper* foi demonstrada por Zamuner et al. (2005), onde observaram o efeito de anticorpos contra moléculas de adesão (L-selectina, ICAM-1, PECAM-1) na redução do acúmulo de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos após a injeção do veneno. O mesmo efeito foi observado quando foram utilizados os anticorpos contra moléculas de adesão (LECAM-1, LFA-1 e CD18) em camundongos tratados com a metaloprotease BaP1, SVMP da classe P1 isolada do veneno de *Bothrops asper* (FERNANDES et al., 2006).

Ação da jararagina na expressão gênica e protéica de citocinas e quimiocinas

A quimiocina IL-8 encontra-se pré-formada na célula, como uma molécula precursora contendo um peptídeo sinal que tem que ser clivado para a proteína ser secretada (MUKAIDA; KETLINSKI; MATSUSHINA, 1998). Esta quimiocina participa da quimiotaxia e ativação de neutrófilos, levando à liberação do conteúdo dos seus grânulos, bem como de NOs e espécies reativas do oxigênio, contribuindo para defesa do organismo e destruição do tecido no sítio inflamatório.

Neste trabalho foi observado um aumento da expressão gênica em células HUVECs da quimiocina **IL-8**, 6 horas após estímulo com a jararagina. Em contraste, não observamos a liberação no sobrenadante das culturas de HUVECs desta molécula após estímulo com a mesma dose de jararagina nos intervalos de tempo avaliados (1, 3 e 6 horas). Por outro lado, o tratamento das HUVECs com 1nM de LPS induziu níveis extremamente elevados desta quimiocina, detectáveis na forma solúvel no sobrenadante das HUVECs.

De Moraes et al. (2008) relataram que a metaloproteinase recombinante rACLF induziu a liberação de IL-8 pelas células HUVECs. Schattner et al., (2005) também observaram a degranulação dos corpos de Weibel Palade pelo aumento da IL-8 no sobrenadante de HUVECs 1 hora após estímulo com 70nM de jararagina ou berithractivase. A expressão dos genes que codificam para as quimiocinas IL-8, CXCL-1 e CXCL-2, também foi observada com 1 ou 3 horas após a injeção de jararagina no músculo gastrocnêmio de camundongos e em cultura de fibroblastos (GALLAGHER et al., 2005). A neuwiedase (PI isolada do veneno de *Bothrops neuwiedi*), também induziu liberação de KC (homóloga a IL-8 em camundongos) no músculo gastrocnêmio, em cultura de macrófagos e em cultura de células musculares C2C12 (LOPES et al., 2009). Como já citado anteriormente o fato das preparações de obtenção das amostras de berithractivase, rACLF e neuwiedase não terem sido tratadas diretamente para a retirada de eventuais contaminações de endotoxina pode ser o responsável por estes resultados discrepantes com relação à liberação de IL-8. Ressaltamos aqui que o estímulo de HUVECs com apenas 1ng/mL de LPS já foi suficiente para estimular a liberação de IL-8 no sobrenadante de HUVECs.

Além da quimiotaxia de neutrófilos, vários trabalhos têm relatado o papel das quimiocinas na indução de angiogênese durante as desordens inflamatórias e fibroproliferativas, como por exemplo, artrite reumatóide e formação de placas artero-escleróticas (KOCH et al., 2001; CHEN; WALTERSCHEID, 2006). A quimiocina IL-8 induz angiogênese promovendo a proliferação e sobrevivência das células endoteliais. Entretanto, o exato papel da IL-8 na angiogênese ainda não está bem estabelecido, mas sabe-se que esta quimiocina é capaz de estimular a ativação de MMPs, que atuam na degradação da matriz extracelular, promovendo a migração e invasão das células.

Neste trabalho, a expressão gênica de IL-8 pelas células HUVECs ocorreu após 6 horas de estímulo com a jararagina, sugerindo uma via de ativação gênica diferente da via ativada pelo LPS, que induz um aumento na expressão de IL-8 à partir de 3 horas de estímulo e de amplitude

muito maior. Mas um fato bem claro em nossos resultados é que a jararagina está induzindo o aumento na transcrição deste e dos demais genes aqui estudados.

As citocinas pró-inflamatórias possuem um importante papel no dano tecidual local que se estabelece após o envenenamento ofídico (VORONOV; APTE; SOFER, 1999). Vários trabalhos da literatura, utilizando modelos de estudo *in vivo*, relatam a liberação de citocinas pró-inflamatórias no local da injeção tanto de SVMPs da classe PI como PIII, sugerindo que o domínio proteolítico por si só também pode ativar eventos inflamatórios específicos. Fernandes et al. (2006), observaram que a BaP1(PI isolada do veneno de *Bothrops asper*) induziu liberação de IL-1 e TNF- α na cavidade peritoneal de camundongos. Lopes et al. (2009) também identificaram a liberação de IL-6 e IL-1 β no músculo gastrocnêmio de camundongos injetados com a neuwiedase. Com relação às SVMPs da classe PIII, Gallagher et al. (2005) relataram o aumento na expressão das citocinas IL-1 β e IL-6, 1 ou 3 horas após a injeção de jararagina no músculo gastrocnêmio de camundongos, enquanto Laing et al. (2003) e Clissa et al. (2006), identificaram a liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 de 2 a 4 horas após a injeção de jararagina no coxim plantar de camundongos. Na maioria dos trabalhos de avaliação da atividade inflamatória local de SVMPs realizados *in vivo* citados anteriormente, não foi relatada a retirada de eventuais contaminações de LPS das amostras. No entanto, no trabalho de Laing et al. (2003), a atividade necrótica da jararagina foi avaliada em camundongos C3H/He5, que possuem uma mutação no receptor de LPS (Toll like receptor 4), e comparada com o controle normal, não apresentando nenhuma diferença na lesão necrótica resultante. Assim acreditamos que em modelos experimentais *in vivo* o efeito pró-inflamatório resultante da ação destas toxinas se sobressai ao efeito das prováveis contaminações por LPS nas amostras. Por outro lado, quando se tem como objetivo compreender melhor os mecanismos envolvidos na liberação de mediadores inflamatórios desencadeados por SVMPs, a cultura de diferentes linhagens celulares se mostra uma estratégia mais apropriada. Neste sentido é fundamental a utilização de modelos experimentais que sejam livres de interferências externas e o efeito das SVMPs sobre as células pode então ser analisado de forma direta. Entre eles podemos citar o trabalho de Lopes et al. (2009) que relatam a liberação das citocinas IL-6 e TNF- α , em cultura de macrófagos induzidas pela neuwiedase e da quimiocina KC pelos mioblastos (C2C12). Clissa et al. (2001) observaram a liberação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em cultura de macrófagos após estímulo com a jararagina. Essa toxina também induziu expressão das citocinas IL-1 β e IL-6, em

cultura de fibroblastos (GALLAGHER et al., 2005). Por outro lado, em HUVECs não observamos a expressão gênica das citocinas IL-6 e CXCL-6 devido à ação da jararagina, somente à ação do LPS. Aparentemente, as células endoteliais participam pouco da liberação de citocinas induzidas pela jararagina, em comparação com outros tipos celulares, como os macrófagos e os mioblastos.

Ação da jararagina na expressão gênica de angiopoetina

O processo de inflamação está sempre acompanhado do processo de angiogênese, onde os novos vasos suprem o tecido inflamado (oxigênio e nutrientes) e facilitam o transporte de células inflamatórias para o local da inflamação (DVORAK et al., 1995). A jararagina induziu aumento da expressão gênica da Angiopoetina-2 pelas células HUVECs, aproximadamente 5 e 7 vezes maior quando comparado com o controle, 6 e 24 horas após o estímulo respectivamente. As angiopoetinas são fatores de crescimento endoteliais responsáveis pela manutenção da integridade vascular e que além do papel na angiogênese possuem importante papel na regulação da inflamação (FIEDLER; AUGUSTIN, 2006). Ang-1 e Ang-2 se ligam à receptores tirosina quinase Tie2 presentes nas células endoteliais, sendo Ang-1 agonista, e Ang-2, antagonista endógeno (DAVIS et al., 1996; MAISONPIERRE et al., 1997). A ativação de Tie2 pela Ang-1 preserva o estado de repouso do endotélio, ao passo que, Ang-2 inibe a sinalização entre Ang-1/Tie-2 desestabilizando o endotélio (SHARPFENECKER et al., 2005) e facilitando as atividades das citocinas pró-inflamatórias como, atividade quimiotática de neutrófilos e eosinófilos e angiogênese (STURN et al., 2005).

Assim, estímulos pró-inflamatórios ativam fortemente a transcrição de Ang2 em células endoteliais (KIM et al., 2000; MANDRIOTA; PEPPER, 1998), promovendo aumento da permeabilidade vascular (ROVIEZZO et al., 2005), a adesão de leucócitos por aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais e também regulação de citocinas pró-inflamatórias (FIEDLER et al., 2006). Segundo Gallagher et al. (2005), a jararagina também induziu a expressão de Ang-1 em fibroblastos.

A Ang-2 é estocada nos corpos de Weibel Palade e as Ang-1 e Ang-2 induzem a translocação de P-selectina (dos corpos de Weibel Palade) em células endoteliais durante a resposta inflamatória, o que é essencial para a adesão de neutrófilos no endotélio (MALIBA et

al., 2008). Ang-1 e Ang-2 medeiam a migração de neutrófilos através da ativação de PI-3K (BRKOVIC et al., 2007). Segundo Fiedler et al. (2006) camundongos deficientes em Ang-2 não desenvolveram resposta inflamatória após ativação com thioglicolato ou *Staphylococcus aureus*. De acordo com nossos resultados, as células HUVECs após estímulo inflamatório induzido pela jararagina expressam o gene Ang-2, que poderia desestabilizar o endotélio e possibilitar a ação de citocinas pró-inflamatórias e o recrutamento e adesão de leucócitos.

Ação da jararagina na expressão gênica de MMP-10

Outros componentes envolvidos na manutenção da homeostasia vascular são as MMPs. As metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) degradam a maioria dos componentes da matriz extracelular, como colágeno I e IV, laminina, fibronectina e elastina, que são barreiras normais para a migração das células e invasão vascular (VISSE; NAGASE, 2003). Assim, a proteólise da membrana basal e da matriz extracelular é pré-requisito para a formação de novos vasos. As MMPs possuem um importante papel nos processos fisiológicos, como embriogênese, remodelamento de tecido normal e cicatrização de feridas, mantendo um balanço com os inibidores teciduais de metaloproteinases. A ligação das proteínas de matriz extracelular às células endoteliais é importante para manutenção da integridade vascular, uma vez rompida esta transdução de sinais, a célula gera respostas compensatórias para impedir a morte celular.

As SVMPs são relatadas por induzirem a expressão e ativação de algumas MMPs (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). A BaP1 induziu aumento na expressão de MMP-9 no músculo de camundongos (RUCAVADO, 2002). Lopes et al. (2009) também relataram expressão de MMP-9 pela neuwiedase no músculo gastrocnêmio de camundongos. Outros estudos da literatura demonstram que a jararagina regulou de forma positiva a expressão em fibroblastos de vários genes pró-inflamatórios, como metaloproteinases (MMP-10, MMP-1, MMP-3, fator de ativação do plasminogênio tipo tecidual e tipo uroquinase) bem como a expressão de inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz extracelular (TIMP-1 e TIMP-3), sugerindo uma remodelagem proteolítica da matriz por estes componentes (GALLAGHER et al., 2005). No presente trabalho, observamos a expressão de MMP-10 pelas HUVECs após estímulo com a jararagina. MMPs podem promover ou reprimir a inflamação por regular a ação de citocinas e quimiocinas. Em adição, as citocinas também podem induzir a expressão de MMPs

(MANICONE; MCGUIRE, 2008; SARÉN; WELGUS; KOVANEN, 1996). De acordo com Saunders, Bayless e Davis (2005), MMP-1 e MMP-10 promovem regressão dos tubos capilares e apoptose de células endoteliais.

Em nosso modelo a expressão de MMP10 pode estar envolvida com os eventos inflamatórios e com a apoptose induzida pela jararagina nas células endoteliais.

Ação da jararagina na expressão gênica de CD 69 (Marcador de ativação celular)

A jararagina também aumentou a expressão gênica de CD69. De acordo com a literatura, esta molécula é classificada como um marcador de linfócito ativado. Os linfócitos assumem um papel importante desde que se iniciam os mecanismos inflamatórios. Os linfócitos existem na corrente sanguínea e nos tecidos sob formas inativas e, quando em contato com antígenos, sofrem um processo de multiplicação e diferenciação que os transformam em células ativas. As proteínas de superfície dos linfócitos determinam o tipo e função destas células. Por exemplo, os linfócitos T, caracteristicamente, expressam a proteína CD3, os linfócitos T auxiliares, a proteína CD4, e os linfócitos T citotóxicos, a proteína CD8. Algumas das proteínas de superfície são expressas apenas quando os linfócitos são ativados, não sendo possível a sua identificação em células que estão em estado de repouso, inativas. Esta propriedade nos assegura uma ferramenta capaz de avaliar o início da atividade imunoinflamatória pelo surgimento, na corrente sanguínea, de linfócitos que expressem as "proteínas de ativação". O CD69 também é expresso *in vitro* pelas células da linhagem hematopoiética, como células T e B, células NK, macrófagos de camundongos, neutrófilos e eosinófilos, monócitos, plaquetas e células de Langerhans epidermal (MARZIO; MAUËL; BETZ-CORRADIN, 1999). A expressão deste marcador está relacionada com as vias de ativação MKK/ERK e com a ativação do fator de transcrição AP-1 (CASTELLANOS et al., 1997). Alguns trabalhos demonstram a expressão de CD69 em células HUVECs após estímulos inflamatórios com serinoproteases (trombina) (OKADA et al., 2006) e TNF- α (VIEMANN et al., 2006). Entretanto, estudos futuros devem ser realizados para melhor caracterizar a expressão e a função deste marcador nas células endoteliais após estímulo com a jararagina.

Interação da jararagina com as células endoteliais

Em nosso modelo de estudo a jararagina induziu uma expressão significativa de genes relacionados à sobrevivência celular e inflamação, entretanto essa ativação não foi suficiente para ativar as células endoteliais a induzirem a tradução protéica. Os efeitos inflamatórios induzidos pela jararagina podem ser resultado da ligação direta da jararagina à receptores específicos na superfície das células endoteliais, desencadeando vias de sinalização que culminam com a transcrição gênica de mediadores inflamatórios; ou ainda à efeitos indiretos dessa toxina, que podem não ser suficientes para desencadear a sinalização necessária para tradução protéica. Os eventos inflamatórios induzidos pelo LPS, são resultado da ação direta deste componente nas células endoteliais pela ligação à receptores semelhantes a Toll (TLR-2 e TRL-4) ativando diferentes vias de sinalização relacionadas a fatores de transcrição como NF- κ B ou AP-1 que levam a expressão de diferentes quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Entretanto os eventos inflamatórios induzidos pela jararagina possuem um perfil diferente, sugerindo não serem ativados via receptores do tipo Toll.

Uma vez que a jararagina possui afinidade por componentes da matriz (BALDO et al., 2010) e que estas interações podem estar diretamente relacionadas com a capacidade desta molécula em ativar a célula endotelial e induzir a expressão de genes pró-inflamatórios, também foi investigada a interação direta da jararagina com as HUVECs. De acordo com os nossos resultados, apenas 1 μ g/mL de jararagina/Alexa 488 foi suficiente para se ligar nas células endoteliais. Essa interação foi confirmada quando utilizamos o monoclonal anti-jararagina MAJar3, que reconhece a porção C-terminal do domínio disintegrina da jararagina (TANJONI et al., 2003).

Vários trabalhos tem relatado a importância da interação das SVMPs com a integrina $\alpha_2\beta_1$ para sua função. A jararagina inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno por clivar a subunidade β_1 da integrina $\alpha_2\beta_1$ (KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996) ou ainda por interferir na ligação da integrina $\alpha_2\beta_1$ ao colágeno. Além disso, em ensaios de adesão/competição esta toxina apresenta alta seletividade para $\alpha_2\beta_1$ em HUVECs (MOURA-DA-SILVA et al., 2001). De acordo com Zigrino et al. (2002), a ligação da jararagina à integrina $\alpha_2\beta_1$ da superfície de fibroblastos mimetiza a sinalização induzida pelo colágeno, estimulando a produção de MMPs. Em paralelo, a alternagina-C, composta pelos domínios tipo disintegrina e rico em cisteínas bastante similar aos

da jararagina (SOUZA et al., 2000), induz a proliferação das células endoteliais *in vitro* e aumento da expressão de VEGF (COMINNETI et al., 2004), bem como quimiotaxia de neutrófilos por um mecanismo aparentemente dependente de ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2005). Diante disso, nosso próximo passo foi investigar a interação da jararagina com as HUVECs através da integrina $\alpha_2\beta_1$.

Nesse trabalho, foi observado por ensaio de fase sólida, a ligação de maneira dose dependente, da jararagina ao domínio A da subunidade α_2 (sítio de ligação do colágeno na integrina $\alpha_2\beta_1$). Em seguida, analisamos a interação da jararagina com a integrina $\alpha_2\beta_1$ expressa na superfície de HUVECs. De acordo com Tanjoni et al. (2010), em plaquetas a jararagina se liga ao colágeno por motivos localizados no domínio tipo-disintegrina, e se liga à integrina $\alpha_2\beta_1$ por motivos localizados no domínio rico em cisteína. Entretanto, nossos resultados sugerem que a jararagina se liga nas células endoteliais, mas que esta ligação pode não ser via integrina $\alpha_2\beta_1$, e sim por outros receptores presentes nas células. Outra hipótese seria que a jararagina se liga na integrina $\alpha_2\beta_1$, mas que essa ligação é de baixa afinidade e pode estar sendo deslocada pelos anticorpos anti-integrinas (CD49b e JA221); ou ainda, a jararagina e os anticorpos estariam ligados ao mesmo tempo na integrina, porém em epítomos/sítios diferentes. Sendo assim, futuros estudos devem ser realizados para identificar o receptor pelo qual a jararagina se liga nas células endoteliais e as vias de sinalização desencadeadas por essa toxina, culminando com os eventos inflamatórios induzidos pelas SVMP.

Considerações finais

Nossos resultados, quando confrontados com os resultados da literatura, confirmam a importância das moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas para os eventos inflamatórios induzidos pelas SVMPs. Lembramos aqui que estas moléculas são importantes para os eventos inflamatórios induzidos por diferentes agentes e não especificamente para as SVMPs de venenos, entretanto, a compreensão de como estes eventos ocorrem pode contribuir com a literatura no sentido de direcionar o tratamento de pacientes envenenados por serpentes do gênero *Bothrops* para a utilização concomitante de drogas com ação anti-inflamatórias além da soroterapia tradicional.

6 CONCLUSÕES

- Em nosso modelo, a jararagina foi capaz de induzir a expressão de genes pró-inflamatórios. Entretanto esse estímulo não foi suficiente para resultar na expressão protéica em concentrações detectáveis destas moléculas.
- A eliminação do LPS das amostras foi de extrema importância para estudarmos o mecanismo direto da ação da jararagina sobre as células endoteliais.
- As diferenças nos intervalos de tempos de expressão gênica induzida pela jararagina em relação à expressão induzida pelo LPS sugere que esta toxina ativa uma via de sinalização celular diferente da via de ativação induzida pelo LPS.
- A jararagina ligou-se diretamente na célula endotelial, mas o receptor responsável por esta ligação deve ser melhor caracterizado.
- Este trabalho contribui com a literatura na medida em que elucida a participação de importantes genes dentro do contexto inflamatório desencadeado pela jararagina em células endoteliais, resultante do envenenamento botrópico.

REFERÊNCIAS ¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X -114. **J. Immunol. Methods.**, v. 132, p. 191-195, 1990.

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multi-functional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). **FASEB J.**, v. 4, p. 2860-2867, 1990.

ALBELDA, S. M.; BUCK, C. A. Integrins and other cell adhesion molecules. **FASEB J.**, v. 4, p. 2868-2880, 1990.

ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammation injury. **FASEB J.**, v. 8, p. 504-512, 1994. Review.

ALEXANDER, J. S.; ELROD, J. W.; PARK, J. H. Roles of leukocyte and immune cell junctional proteins. **Microcirculation**, v. 8, p. 169-179, 2001.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. 1-10, 2010.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEON, I. R.; BATISTA, I. F.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTES-MENDES, G. P.; RODRIGUES, V. M.; PARALES, J.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. BnPl, a novel P-1 metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**, v. 51, p. 54-65, 2008.

BEMELMANS, M. H.; VAN TITS, L. J.; BUURMAN, W. A. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 1-11, 1996.

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

BÉRNILS, R. S. (Org.). Brazilian reptiles – List of species 2010 Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso em: 10 out 2010.

BEVILACQUA, M.; NELSON, R. M. Selectins. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 379-387, 1993.

BIERHAUS, A.; CHEN, J.; LILIENSIEK, B.; NAWROTH, P.P. LPS and cytokine-activated endothelium. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 26, n. 5, p. 571-87, 2000.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BLACKWILL, R. F.; BURKE, F. The cytokine network. **Immunol. Today**, v. 10, p. 299-304, 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochemistry**, v. 72 , p. 248-254, 1976.

BRAUD, S.; BOM, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

BRKOVIC, A.; PELLETIER, M.; GIRARD, D.; SIROIS, M.G. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. **Journal of Leukocyte Biology.**, v. 81, p. 1093-1101, 2007.

CASTELLANOS, M. C.; MUNOZ, C.; MONTOYA, M. C.; LARA-PEZZI, E.; LOPEZ-CABRERA, M.; DE LANDAZURI, M. O. Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 11, p. 5463-5473, 1997.

CHEN, C. H.; WALTERSCHEID, J. P. Plaque angiogenesis versus compensatory arteriogenesis in atherosclerosis. **Circ. Res.**, v. 99, p. 787-789, 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, p. 3527–3561, 1998.

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

CLISSA, P. B.; LOPES-FERREIRA, M.; DELLA-CASA, M. S.; FARSKY, S. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, v. 47, p. 591-596, 2006.

COATES, M.; RUTA, M. Nice snake, shame about the legs. **Trends Ecol. Evol.**, v. 14, p. 503-507, 2000.

COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H.; RAMOS, O. H.; FOX, J. W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 18247-18255, 2004.

COSTA, E. P.; CLISSA, P. B.; TEIXEIRA, C. F. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venoms-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, p. 13-17, 2002.

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

DAVIS, S.; ALDRICH, T. H.; JONES, P. F.; ACHESON, A.; COMPTON, D. L.; JAIN, V.; RYAN, T. E.; BRUNO, J.; RADZIEJEWSKI, C.; MAISONPIERRE, P.C.; YANCOPOULOS, G. D. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. **Cell**, v. 87, p. 1161-1169, 1996.

DE LUCA, M.; WARD, C. M.; OHMORI, K.; ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, $\alpha 2\beta 1$. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 206, p. 570-576, 1995.

DE MORAES, C. K.; FRITZEN M., CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. rACLFac1f, a recombinant snake venom metalloprotease, activates endothelial cells in vitro. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 14, n. 1, p. 113-127, 2008.

DENNIS, E. A.; RHEE, S. G.; BILLAH, M. M.; HANNUN, Y. A. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. **FASEB J.**, v. 5, p. 2068-2077, 1991.

DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. **Current Biology**, v. 4, p. 506, 1994.

DING, J. L.; HO, B. A. New era in pyrogen testing. **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 277-281, 2001.

DVORAK, H. F.; BROWN, L. F.; DETMAR, M.; DVORAK, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 1029-1039, 1995.

EBLE, J. A.; NILAND, S.; BRACHT, T.; MORMANN, M.; PETER-KATALINIC, J.; POHLENTZ, G.; STETEFELD, J. The $\alpha 2\beta 1$ integrin-specific antagonist rhodocetin is a cruciform, heterotetrameric molecule. **FASEB J.**, v. 23, p. 2917-2927, 2009.

ESCALANTE, T.; NUÑEZ, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; RUCAVADO, A.; THEAKSTON, R. G. D.; GUTIÉRREZ, J. M. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 193, p.17-28, 2003.

FARSKY, S. P.; MELLO, S. B. V. Participação de moléculas de adesão no desenvolvimento da resposta inflamatória. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 80-89, 1995.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET JR, R.L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; ZULIANI, P. J.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, v. 47, p. 549-559, 2006.

FIEDLER, U.; AUGUSTIN, H. G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 12, p. 552-558, 2006.

FIEDLER, U.; REISS, Y.; SCHARPFENECKER, M.; GRUNOW, V.; KOIDL, S.; THURSTON, G.; GALE, N. W.; WITZENRATH, M.; ROSSEAU, S.; SUTTORP, S.; SOBKE, A.; HERRMANN, M.; PREISSNER, K. T.; VAJKOCZY, P.; AUGUSTIN, H. G. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. **Nat. Med.**, v. 12, p. 235-239, 2006.

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

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

FURIE, M. B.; RANDOLPH, G. J. Chemokine and tissue injury. **Am. J. Pathol.**, v. 146, p. 1287-301, 1995.

GALLAGHER, P. G.; BAO, Y.; SERRANO, S. M. T.; KAMAGUTI, A. S.; THEAKSON, D. G.; FOX, J. Use of microarray for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights vein endothelial cells. **Toxicon**, v. 41, p. 429-440, 2003.

GALLAGHER, P.; BAO, Y.; SERRANO, S. M. T.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. G.; MAUCH, C.; MOSKALUK, C.; FOX, J. W. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 45, p. 1-15, 2005.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Ed. Raven Press, 1992.

GOMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Mol. Biotechnol.**, v. 24, p. 157-202, 2003.

GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, F.; MODE, W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism. **FESB Lett.**, v. 335, p. 76-80, 1993.

GUTIÉRREZ, J. M.; LÉON, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1529-1538, 1998.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom, **Mem. Inst. Butantan**, v. 33, p. 1405-1474, 1995a.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995b.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NUNEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal Muscle Necrosis and Regeneration after Injection of BaH1, A Hemorrhagic Metalloproteinase Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 62, p. 28-41, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochemie**, v. 82, p. 841-850, 2000.

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

HARRIS, J. B.; GRUBB, B. D.; MALTIN, C. A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipase A₂, notexin and taipoxin. **Exp. Neurol.**, v. 161, p. 517-526, 2000.

HEMONARD, H.; GRIMAUD, J. A. Matrix metalloproteinases. **Cell Mol. Biol.**, v. 36, n. 2, p. 131-53, 1990. Review.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases, **FESBS Lett.**, v. 354, p. 1-6, 1994.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg. Med.**, v. 5, n. 1, p. 45-57, 2003.

HUO, Y.; LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. **Acta. Physiol. Scand. Charlottesville**, v. 173, n. 1, p. 35-43, 2001.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1041-1049, 2005. Review.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ integrin by the snake venom metalloproteinase jarararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996.

KIM, I.; KIM, H. G.; MOON, S. O.; CHAE, S.W.; SO, J. N.; KOH, K. N.; AHN, B. C.; KOH, G. Y. Angiopoietin-1 induced endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. **Circ. Res.**, v. 86, p. 952-959, 2000.

KOCH, A. E.; VOLIN, M. V.; WOODS, J. M.; KUNKEL, S. L.; CONNORS, M. A.; HARLOW, L. A.; WOODRUFF, D. C.; BURDICK, M. D.; STRIETER, R. M. Regulation of angiogenesis by the C-X-C chemokines interleukin-8 and epithelial neutrophil activating peptide 78 in the rheumatoid joint. **Arthritis Rheum.**, v. 44, p. 31-40, 2001.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolutionary of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65-106, 1986.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 4651-4655, 1991.

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

LAING, D. G.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D. G; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAYLOR, M. J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloprotease-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 3458-3463, 2003.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 987-996, 2005.

LALLOO, D.; THEAKSTON, R. D. G. Snake antivenoms. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 41, p. 277-290, 2003.

LEE, M. S.; SCANLON, J. D. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 77, n. 3, p. 333-401, 2002

LEFER, A. M. Role of the beta-2 integrins and immunoglobulin superfamily members in myocardial ischemia-reperfusion. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 68, p. 1920-1923, 1999.

LEVIN, J.; BANG, F. B. Clottable protein in limulus: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v. 19, p. 186, 1968.

LI, A.; DUBEY, S.; VARNEY, M. L.; DAVE, B. J.; SINGH, R. K. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **J. Immunol.**, v. 170, p. 3369-3376, 2003.

LIVAK, J. K.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PC R and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

MAISONPIERRE, P. C.; SURI, C.; JONES, P. F.; BARTUNKOVA, S.; WIEGAND, S. J.; RADZIEJEWSKI, C.; COMPTON, D.; MCCLAIN, J.; ALDRICH, T. H.; PAPADOPOULOS, N.; DALY, T. J.; DAVIS, S.; SATO, T. N.; YANCOPOULOS, G. D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. **Science**, v. 277, p. 55-60, 1997.

MALIBA, R.; BRKOVIC, A.; NEAGOE, P. E.; VILLENEUVE, L. R.; SIROIS, M. G. Angiopoietin-mediated endothelial P-selectin translocation: cell signaling mechanisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 352-360, 2008.

MANDRIOTA, S. J.; PEPPER, M. S. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. **Circ. Res.**, v. 83, p. 852-859, 1998.

MANICONE, A. M.; MCGUIRE, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 19, n. 1, p. 34-41, 2008.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MARZIO, R.; MAUËL, J.; BETZ-CORRADIN, S. CD69 and Regulation of the Immune Function. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n. 3, p. 565-582, 1999.

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

MCEVER, R. P.; MOORE, K. L.; CUMMINGS, R. D. Leukocyte trafficking is mediated by selectin-carbohydrate interactions. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 11025-11028, 1995.

MEHRAD, B.; KEANE, A. P.; STRIETER, R. M. Chemokines as mediators of angiogenesis. **Tromb. Haemost.**, v. 97, p. 755-762, 2007.

MEIER, J. Venomous snakes. In: STOCKER, K. F. **Medical use of snake proteins**. Basel: Ed. CRC Press, 1990. p. 1-32.

MIDDLETON, J.; PATTERSON, A. M.; GARDNER, L.; SCHMUTZ, C.; ASHTON, B. A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. **Blood**, v. 100, p. 3853-3860, 2002.

MILLER, M. D.; KRANGEL, M. S. Biology and biochemistry of chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 17-46, 1992. Review.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Histórico do ofidismo. 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/historico_ofidismo.pdf> Acesso em: 12 maio 2010.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinase in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cell. **Current Pharmaceutical design**. v. 13, p. 2893-2905, 2007.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DELLA-CASA, M. S.; DAVID, A. S.; ASSAKURA, M. T.; BUTERA, D.; LEBRUN, I.; SHANNON, J. D.; SERRANO, S. M.; FOX, J. W. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 409, p. 395-401, 2003.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G.; PAINE, D. M. J. I.; DENNISON, J. M. T. J.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. G. Processing of pro-tumor necrosis factor- α by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 2000-2005, 1996.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; MARCINKIEWICZ, C.; MARCINKIEWICZ, M.; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of $\alpha_2\beta_1$ integrin by jararhagin, a Metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb. Res.**, v. 102, p. 153-159, 2001.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; RAMOS, O. H. P.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J. S.; FURLAN, S.; BUTERA, D.; DELLA-CASA, M. S.; TANJONI, I.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; EBLE, J. M. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90, p. 484-492, 2008.

MUKAIDA, N.; KETLINSKI, S. A.; MATSUSHIMA, K. Interleukin-8 and other CXC chemokines. In: THOMSON, A. W.; LOTZE, M. T. **The cytokine handbook**. London: Academic Press, 1998.

MULLER, W. A.; WEIGL, S. A.; DENG, X.; PHILLIPS, D. M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 449-460, 1993.

NEREM, R. M.; HARRISON, D. G.; TAYLOR, W. R.; ALEXANDER, R. W. J. Hemodynamics and vascular endothelial biology. **Cardiovasc. Pharmacol.** v. 21, n. 1, p. 6-10, 1993.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and Biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 231, p. 309-311, 1984.

OKADA, M.; SUZUKI, K.; TAKADA, K.; NAKASHIMA, M.; NAKANSHI, T.; SHINOHARA, T. Detection of up-regulated genes in thrombin-stimulated human umbilical vein endothelial cells. **Thrombosis Research**, v. 118, p. 715-721, 2006.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 560-569, 2009.

PAINE, M.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22879, 1992.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. Philadelphia: Ed. Lippincott-Raven, 1998.

PENBERTHY, T. W.; JIANG, Y.; GRAVES, D. T. Leukocyte Adhesion Molecules. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 8, p. 380-388, 1997.

PETRI, B.; PHILLIPSON, M.; KUBES, P. Brief Reviews: Physiology of leukocyte recruitment. **J. Immunol.**, v. 180, p. 6439-6446, 2008.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 803-815, 2007.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloprotease-structure and function of catalytic and desintegrin domains. **Comparative biochemistry and Physiology**, v. 142, p. 328-346, 2006.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwidase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biophys**, v. 381, p. 213-224, 2000.

ROVIEZZO, F.; TSIGKOS, S.; KOTANIDOU, A.; BUCCI, M.; BRANCALEONE, V.; CIRINO, G.; PAPAPETROPOULOS, A. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 314, p. 738-744, 2005.

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

RUSSEL, F. E. Venoms. In: RUSSEL, F. E. **Snake Venoms Poisoning**. Philadelphia: Lippincott, 1980. p. 139-234.

SALUK-JUSZCZAK, J.; WACHOWICZ, B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. **Postepy Biochem.** v. 51, n. 3, p. 280-287, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

SARÉN, P.; WELGUS, H. G.; KOVANEN, P. T. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. **J. Immunol.**, v. 157, p. 4159-4165, 1996.

SAUNDERS, W. B.; BAYLESS, K. J.; DAVIS, G. E. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. **J. Cell. Sci.**, v. 118, p. 2325-2340, 2005.

SCHARPFENECKER, M.; FIEDLER, U.; REISS, Y.; AUGUSTIN, H. G. The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. **J. Cell. Sci.**, v. 118, p. 771-780, 2005.

SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; VENTURA, J. S.; MODESTO, J. C. A.; POZNER, R. G.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The snake venom metalloproteases berythrin and jararhagin activate endothelial cells. **Biol. Chem.**, v. 386, p. 369-374, 2005.

SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev.**, v. 17, p. 7–30, 2003.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; COMINETTI, M. R.; TERRUGGI, C. H.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M. S.; CREPIN, M.; FIGUEIREDO, C. C.; MORANDI, V. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates $\alpha 2\beta 1$ integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, n. 10, p. 1505-1511, 2005.

SERRANO, S. M.; KIM, J.; WANG, D.; DRAGULEV, B.; SHANNON, J. D.; MANN, H. H.; VEIT, G.; WAGENER, R.; KOCH, M.; FOX, J. W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor a domains: role in substrate targeting. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 52, p. 39746-39756, 2006.

SHIMOKAWA, K.; JIA, L. G.; WANG, X. M.; FOX, J. M. Expression, activation and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 335, p. 283-294, 1996.

SILVA, C.A.; ZULIANI, J.P.; ASSAKURAA, M.T.; MENTELE, R.M.; CAMARGO, A.C.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; SERRANO, S.M.T. Activation of $\alpha M\beta 2$ -mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 3, p. 950-956, 2004.

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

SINGH, S. B.; ARMUGAM, A.; KINI, R. M.; KANDIAH, J. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 375, p. 289-303, 2000.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, p. 1677-1690, 2004.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; IEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 341-50, 2000.

STOCKER, K. F. Compositions of snake venoms. In: STOCKER, K. F. **Medical use of snake proteins**. Basel: CRC Press, 1990. p 33-56.

STURN, D. H.; FEISTRITZER, C.; MOSHEIMER, B. A.; DJANANI, A.; BIJUKLIC, K.; PATSCH, J. R.; WIEDERMANN, C. J. Angiopoietin affects neutrophil migration. **Microcirculation**, v. 12, p. 393-403, 2005.

SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. J. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1021-1039, 2005.

TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The integrins. **Genome Biol.**, v. 8, p. 215, 2007.

TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 619-627, 1995.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M.S.; MARQUES-PORTO, R.;

TAKEHARA, H.A.; GUTIÉRREZ, J.M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 801-808, 2003.

TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA CASA, M. S.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G. S.; BLADO, C.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; EBLE, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Different regions of the class PIII snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin and collagen. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1093-1099, 2010.

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

TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, v. 9, p. 866-873, 1995.

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

TEPASS, U. Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 11, p. 540–548, 1999.

TU, A. T. Snake Venoms: General background and composition. In: TU, A. T. **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. New York: John Willey & Sons, 1988. p. 1-19.

VIEMANN, D.; GOEBELER, M.; SCHMID, S.; NORDHUES, U.; KLIMMEK, K.; SORG, S.; ROTH, J. TNF induces distinct gene expression programs in microvascular and macrovascular human endothelial cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, p. 174-185, 2006.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

VORONOV, E.; APTE, R. N.; SOLER, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation, **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 5, p. 5-33, 1999.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News Physiol.**, v. 15, p. 107-113, 2000.

WANG, R.; CAI, J.; HUANG, Y.; XU, D.; SANG, H.; YAN, G. Novel recombinant fibrinogenase of *Agkistrodon acutus* venom protects against LPS-induced DIC. **Thrombosis Research**, v. 123, n. 6, p. 919-924, 2008.

WARRELL, D. A. Clinical Toxicology of snake bite in Asia. In: MEIER, J., WHITE J. **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. New York: CRC Press, 1995. p. 493-594.

WHINCER, J. T.; EVANS, S. W. Cytokines in disease. **Clin. Chem**, v. 38, n. 7, p. 1269-1281, 1990.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WOESSNER, J. F. The matrix metalloproteinase family. In: PARCKS, W. C.; MECHAM, R. P. Matrix metalloproteinases. California: Academic Press, 1998. p. 1-14.

WU, K. K.; THIAGARAJAN, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. **Annu. Rev. Med.**, v. 47, p. 315-331, 1996.

XUE, M.; LE N. T.; JACKSON, C. J. Targeting matrix metalloproteinases to improve cutaneous wound healing. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 1, p. 143-155, 2006.

YOU, W.K.; JANG, Y.J.; CHUNG, K.H.; JEON, O.H.; KIM, D.S.; Functional roles of the two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 339, p. 964-970, 2006.

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

ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A. S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J. W.; MAUCH, C. The reprotolysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling, **J. Biol. Chem.**, v. 227, p. 40528-40535, 2002.]

ANEXO A - Descrição dos genes citados na tabela 1 e localização celular.

GENE	1	Description	2	Location
SELE		selectin E (endothelial adhesion molecule 1)		Plasma Membrane
CD69		CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)		Plasma Membrane
SAT		spermidine/spermine N1-acetyltransferase		Cytoplasm;
VCAM1		vascular cell adhesion molecule 1		Plasma
IL8		interleukin 8		Extracellular Space
CEBPD		CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta		Nucleus
IL6		interleukin 6 (interferon, beta 2)		Extracellular Space
THBD		Thrombomodulin		Plasma Membrane
SULF1		sulfatase 1		
CXCL6		chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)		Extracellular Space
ANGPT2		angiopoietin 2		Extracellular Space
CDKN1B		cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)		Nucleus
SOD2		superoxide dismutase 2, mitochondrial		Cytoplasm
DTR		diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)		Extracellular Space
PEG10		paternally expressed 10		Nucleus
MMP10		matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)		Extracellular Space
ARG2		arginase, type II		Cytoplasm
GULP1		GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1		Cytoplasm
DAF		decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)		Plasma Membrane
TLN1		talin 1		Plasma Membrane
CSF2RB		colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)		Plasma Membrane
PLCB1		phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)		Cytoplasm
IL1RL1		interleukin 1 receptor-like 1		Plasma Membrane
BTG1		B-cell translocation gene 1, anti-proliferative		
SH3BP5		SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)		Cytoplasm
ANGPTL4		angiopoietin-like 4		Extracellular Space
HES1		hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)		Nucleus
JAG2		jagged 2		Extracellular Space
BGN		Biglycan		Extracellular Space
DDIT4		DNA-damage-inducible transcript 4		Cytoplasm
JAG1		jagged 1 (Alagille syndrome)		Extracellular Space
BHLHB2		basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2		Nucleus

Action of neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, on skeletal muscle: an ultrastructural and immunocytochemistry study

Baldo C (1), Ferreira MJ (2), Lopes DS (1), Izidoro LFM (3), Gomes AO (4), Ferro EAV (4), Hamaguchi A (5), Homs-Brandeburgo MI (5), Rodrigues VM (5)

(1) Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, São Paulo, São Paulo State, Brazil; (2) Special Laboratory of Applied Toxinology, CAT/CEPID, Butantan Institute, São Paulo, São Paulo State, Brazil; (3) Integrated Sciences School of Pontal-Federal University of Uberlândia; (4) Institute of Biomedical Science, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil; (5) Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil.

Abstract: The damaging effects of neuwiedase, a non-hemorrhagic snake venom metalloproteinase from P-I class, on gastrocnemius muscle are studied herein. Following neuwiedase injection, ultrastructural alterations were detected early showing disarrangement of skeletal muscle fibers (characterized by discontinuity of Z lines), mitochondrial swelling, and disruption of plasma membrane and basal lamina. Degradation of skeletal muscle and the appearance of an amorphous substance, primarily composed of cellular debris, were noted after 24 hours. The presence of neuwiedase at the injection site (detected by immunocytochemistry) revealed highly specific labeling of myofibril components of damaged myocytes. In addition, proteolysis of muscle proteins assayed through myofibrils extracted from gastrocnemius muscle indicated that neuwiedase provoked degradation of myofibrils, especially myosin. These results suggest that skeletal muscle damage, induced by neuwiedase, is probably due to its proteolytic action on myofibrils, which are responsible for the maintenance of the cellular architecture.

Key words: skeletal muscle, neuwiedase, snake venom metalloproteinases, *Bothrops neuwiedi*.

INTRODUCTION

Envenoming induced by *Bothrops* snakes involves systemic toxic effects and striking alterations at the injection site, leading to variable degrees of local tissue damage (1). These local effects have been defined as pain, hemorrhage, edema, myonecrosis and inflammation. The snake venom metalloproteinases (SVMPs) have been considered as playing a crucial role in the development of the local venom-induced pathogenesis (2-4).

The SVMPs comprise an important class of zinc-dependent enzymes of varying molecular mass. These enzymes are part of the metzincins superfamily, a diverse and expansive group of zinc peptidases from both prokaryotes and eukaryotes (5, 6). SVMPs are synthesized as multidomain zymogen proteins and are grouped in classes and

subclasses from P-I to P-III according to their domain organization (7). SVMPs from P-I class are composed in the mature form only of the catalytic domain and are generally fibrinogenolytic and weak hemorrhagic enzymes. The P-II SVMPs are synthesized with a metalloproteinase plus a disintegrin domain, but are frequently found in venoms as a processed form containing only a disintegrin domain, the classical disintegrins. SVMPs from P-III class are frequently potent hemorrhagins that consist of a catalytic domain followed by disintegrin-like and cysteine-rich domains, linked via the carboxy-terminal to the catalytic domain. P-I and P-III SVMPs are the most abundant group in viper venoms which conserve the catalytic domain in the mature form (7).

In 2000, Rodrigues *et al.* (8) described the isolation and biochemical characterization of a new P-I class SVMP (22 kDa) from *Bothrops neuwiedi* venom,

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

“Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: Inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins”

Maisa Splendore Della-Casa^{a,*}, Inácio Junqueira-de-Azevedo^b, Diego Butera^c,
Patrícia Bianca Clissa^a, Daiana S. Lopes^a, Solange M.T. Serrano^d, Daniel C. Pimenta^e,
Geraldo S. Magalhães^a, Paulo Lee Ho^b, Ana Maria Moura-da-Silva^a

^a Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, Av Vital Brazil 1500, 05503-000, São Paulo, SP, Brazil

^b Centro de Biotecnologia Molecular, Instituto Butantan, Brazil

^c Lowy Cancer Research Centre, University of New South Wales, Australia

^d Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, Brazil

^e Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 June 2010

Received in revised form 18 October 2010

Accepted 27 October 2010

Available online xxxx

Keywords:

Endothelial cell

Platelets

Integrin

Disintegrin

ABSTRACT

Insularin (INS) was obtained from *Bothrops insularis* venom by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a C₁₈ column and characterized as a disintegrin by peptide mass fingerprint and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. A cDNA coding for P-II a metalloproteinase/disintegrin was cloned from a cDNA library from *B. insularis* venom glands. The deduced protein sequence possesses 73 amino acid residues, including the N-terminal, internal peptides of native insularin, the ARGDNP-sequence and 12 cysteines in a conserved alignment. This cDNA fragment was subcloned in the pGEX-4T-1 vector and expressed in a prokaryotic expression system as a fusion protein with glutathione S-transferase (GST-INS). Both native and recombinant insularin inhibited ADP-induced platelet aggregation and endothelial cells (HUVEC) adhesion with similar activities indicating that GST-INS folded correctly and preserved the integrin-binding loop. Insularin may be a tool in studies that involve platelets and endothelial cell adhesion dependent on α IIb β 3 and α v β 3 integrins.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Integrins represent a large family of heterodimeric trans-membrane receptors that mediate cell adhesion to extracellular matrix proteins, and cell–cell interactions. Integrins are involved in fundamental physiological cellular processes and contribute to the pathology of certain diseases, including tumor metastasis, immune dysfunctions, osteoporosis, and

coagulopathies (Hynes, 1992; Ruoslahti, 1991). The integrin α IIb β 3 is the fibrinogen receptor; which is expressed on platelets and mediates platelet aggregation in hemostasis and thrombosis (Calvete, 1999). The integrin α v β 3 is expressed on endothelial cells, osteoclasts, melanoma and other cell types (Cheresh, 1987; Horton, 1990) where it plays a role in physiological processes that includes angiogenesis and tissue repair as well as pathological conditions such as osteoporosis, tumor cell metastasis, adenoviral infections and tumor-induced angiogenesis (Schwartz, 1993; Davis et al., 1993; Ross et al., 1993; Brooks et al., 1994). A common feature of most α IIb β 3, α v β 3, and α 5 β 1 integrin ligands is the presence of the

* Corresponding author. Tel.: +55 11 37267222x2134, 2087; fax: +55 11 37267222x2162.

E-mail address: dellacasa@butantan.gov.br (M.S. Della-Casa).

Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom

Daiana Silva Lopes^a, Cristiani Baldo^{a,*}, Carolina de Freitas Oliveira^b,
Tânia Machado de Alcântara^c, Jaqueline D. Dias Oliveira^d, Luiz Ricardo Gourelart^e,
Amélia Hamaguchi^b, Maria Inês Homsi-Brandeburgo^b, Ana Maria Moura-da-Silva^a,
Patrícia Bianca Clissa^a, Veridiana de Melo Rodrigues^b

^a Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, Av. Dr. Vital Brasil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^c Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^d Laboratório de Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brazil

^e Laboratório de Genética Molecular, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2008

Received in revised form 20 February 2009

Accepted 3 March 2009

Available online 13 March 2009

Keywords:

Snake venom

Metalloproteinases

Neuwiedase

Muscle cell, inflammation

Cytokines

ABSTRACT

The Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs) play a relevant role in the multifactorial inflammatory response induced by *Bothrops* envenomations. Neuwiedase, an SVMP isolated from *Bothrops neuwiedi* venom, is devoid of hemorrhagic activity on skin tests, but is able to induce myonecrosis and degrade fibrinogen, fibrin, type I collagen, fibronectin and laminin. In this study, we analyzed the inflammatory reaction induced by neuwiedase in gastrocnemius muscle, with special focus on cytokines release. Our results showed clear evidence of inflammatory infiltrate in the gastrocnemius muscle and an increase of MMP-9, and the cytokines KC, IL-1 β and IL-6 in the early periods after toxin injection. The cytokine release was also evaluated in inflammatory and muscular cell culture. Both murine peritoneal adherent cells (MPACs) and muscle cells (C2C12) released pro-inflammatory cytokines after stimulus with neuwiedase. MPACs showed increased production of KC, IL-1 β and IL-6 in the cell culture supernatant while in C2C12, the predominant chemokine expressed was KC. These data reinforce the importance of SVMPs in the inflammatory response caused by envenomation and point out the role of muscle cells in this event by releasing pro-inflammatory mediators able to attract leukocytes to the muscle, thus starting and amplifying the setting of the inflammatory reaction.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Envenomings induced by *Bothrops* snakes are characterized by drastic local tissue damage involving hemorrhage, blistering, myonecrosis and a prominent inflammatory response. The inflammatory response, which has extreme relevance to the progress of tissue injury, is

associated with edema, pain, leukocyte infiltrate and release of cytokines and other pro-inflammatory mediators (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Moura-da-Silva et al., 2007).

Raised levels of pro-inflammatory cytokines have been detected in the serum of the victims of *Bothrops* snakes (Barraviera et al., 1995) or in animal models following injection of *Bothrops* venoms (Lomonte et al., 1993; Petricevich et al., 2000). Cytokines are a diverse group of proteins of relatively low-molecular weight with multiple functions. They regulate important biological processes

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3726 7222x2087; fax: +55 11 3726 1505.

E-mail address: cristianibaldo@butantan.gov.br (C. Baldo).

Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom

Carolina de Freitas Oliveira^a, Daiana da Silva Lopes^b, Mirian Machado Mendes^a,
Maria Inês Homsi-Brandeburgo^a, Amélia Hamaguchi^a, Tânia Machado de Alcântara^c,
Patrícia Bianca Clissa^b, Veridiana de Melo Rodrigues^{a,*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Párc 1720 CEP: 38400-902, Uberlândia MG, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo SP, Brazil

^c Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2008

Received in revised form 15 December 2008

Accepted 31 December 2008

Available online 30 January 2009

Keywords:

Bothrops (neuwiedii) pauloensis

Myotoxin

Phospholipase A₂

Snake venom

Matrix metalloproteinase

Inflammation

Cytokine

BnSP-7

ABSTRACT

Envenomations caused by *Bothrops* snake venoms are characterized by prominent local tissue damage due to myonecrosis, hemorrhage, edema and acute muscle damage which is widely correlated with phospholipases A₂ (PLA₂). In the present study, the progression of local tissue damage and inflammation induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom, was evaluated. Local tissue damages characterized by edema, necrosis and inflammation were evaluated until 24 h after inoculation of BnSP-7. The regeneration of myofibers, analyzed by light microscopy, was observed from 72 h to 2 weeks post-inoculation of toxin. MMP-2 was expressed in gastrocnemius muscle at all time points tested, while the expression of MMP-9 increased expressively at the same time interval of regenerating muscle, suggesting the involvement of MMP-9 in the regeneration process. The production of pro-inflammatory cytokines was also increased, whereas IL-1β showed the highest level. Modification of BnSP-7 with BPB decreased the release of IL-8, IL-6 and IL-1β when compared to native BnSP-7. These data suggest that BnSP-7 acts as pro-inflammatory incentives (mediators), inducing MMP and cytokine production from the inflammatory and satellite cells, and thus it may play an important role in inflammatory process and, consequently, in the evolution of local tissue damage and regeneration.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Local tissue damage induced by the envenoming by *Bothrops* snakes is characterized by hemorrhage, edema, inflammation and myonecrosis (Nishioka and Silvera, 1992). Muscle necrosis can occur due to direct action of myotoxic phospholipases A₂ on plasma membranes of muscle cells. Beyond those effects, regeneration was also

verified after treatment of mice muscles with myotoxins (Harris, 2003; Vignaud et al., 2005).

The inflammatory response that settles down soon after envenoming is also of relevance for progress of tissue damage, considering that besides snake venom toxins on site of bite, there is also the participation of endogenous mediators which can contribute with these alterations. Activated leukocytes release a broad spectrum of cytokines such as IL-1, IL-6 and IL-8, which amplify the inflammatory response contributing to necrosis process (Voronov et al., 1999).

The matrix metalloproteinases (MMPs) are also important mediators of tissue damage and inflammation of

* Corresponding author. Tel.: +55 34 32182203; fax: +55 34 3218 2203x22.

E-mail address: veridiana@ingeb.ufubr (V. de Melo Rodrigues).

Anti-Snake Venom Properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinoideae) Aqueous Leaves Extract

Mirian M. Mendes¹, Carolina F. Oliveira¹, Daiana S. Lopes¹, Luís Henrique F. Vale¹,
Tânia M. Alcântara², Luiz Fernando M. Izidoro¹, Amélia Hamaguchi¹, Maria Inês
Honsi-Brandeburgo¹, Andreimar M. Soares^{3*} and Veridiana M. Rodrigues^{1*}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

²Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

³Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil

Many medicinal plants have been recommended for the treatment of snakebites. The aqueous extracts prepared from the leaves of *Schizolobium parahyba* (a plant found in Mata Atlantica in Southeastern Brazil) were assayed for their ability to inhibit some enzymatic and biological activities induced by *Bothrops pauloensis* and *Crotalus durissus terrificus* venoms as well as by their isolated toxins neuwiedase (metalloproteinase), BnSP-7 (basic Lys49 PLA₂) and CB (PLA₂ from crotoxin complex). Phospholipase A₂, coagulant, fibrinolytic, hemorrhagic and myotoxic activities induced by *B. pauloensis* and *C. d. terrificus* venoms, as well as by their isolated toxins were significantly inhibited when different amounts of *S. parahyba* were incubated previously with these venoms and toxins before assays. However, when *S. parahyba* was administered at the same route as the venoms or toxins injections, the tissue local damage, such as hemorrhage and myotoxicity was only partially inhibited. The study also evaluated the inhibitory effect of *S. parahyba* upon the spreading of venom proteins from the injected area into the systemic circulation. The neutralization of systemic alterations induced by i.m. injection of *B. pauloensis* venom was evaluated by measuring platelet and plasma fibrinogen levels which were significantly maintained when *S. parahyba* extract inoculation occurred at the same route after *B. pauloensis* venom injection. In conclusion, the observations confirmed that the aqueous extract of *S. parahyba* possesses potent snake venom neutralizing properties. It may be used as an alternative treatment to serum therapy and as a rich source of potential inhibitors of toxins involved in several physiopathological human and animal diseases. Copyright © 2008 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: snake venom; *Bothrops pauloensis*; *Crotalus durissus terrificus*; medicinal plant; plant anti-snake venom; *Schizolobium parahyba*; natural inhibitors.

INTRODUCTION

Venomous snake bites affect around 2.5 million people annually, killing more than 100 000 of them (Chippaux, 1998). The burden of morbidity and mortality is greatest in rural areas (Lalloo *et al.*, 1995; Warrell *et al.*, 1999). In Latin America, snake bite envenomation constitutes a relevant public health problem where most accidents are due to species of the genus *Bothrops*, although envenomations by *Crotalus* spp. also occurs, particularly

in South America, where they are usually associated with severe systemic envenomations (Rosenfeld, 1971; Kamiguti and Cardoso, 1989; Cupo *et al.*, 1991).

Animal venoms including snake venoms are complex mixtures of proteins, including phospholipases A₂, myotoxins, hemorrhagic metalloproteinases, cytotoxins and other proteases that act by different mechanisms. The pathophysiology of snake bite envenomation involves a complex series of events that are dependent on the combined action of these venom components. *Bothrops* snake venoms induce the release of pharmacologically active substances, with pronounced local effects such as hemorrhage, edema, inflammation and tissue necrosis. In addition, relevant hemostatic and hematological alterations are frequent (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Gutiérrez, 2002).

A serious consequence of *Bothrops* snake bites is muscle necrosis which can evolve with permanent loss of tissue or function, and requires amputation of the affected member (Nishioka and Silveira, 1992). This myonecrosis may be due to a direct effect of myotoxic phospholipase A₂ (PLA₂) homologues upon the plasma membranes of muscle cells (Soares *et al.*, 2004a) or an indirect effect by hemorrhagic zinc-metalloproteinases,

* Correspondence to: Professor V. M. Rodrigues, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil. E-mail: veridiana@ingeb.ufu.br

* Correspondence to: Professor Andreimar M. Soares, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil. E-mail: andreims@fcrp.usp.br

Contract/grant sponsor: Fundações de Amparo à Pesquisa dos Estados de Minas Gerais (FAPEMIG).

Contract/grant sponsor: São Paulo (FAPESP).

Contract/grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).