

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

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 (SVMPs) are important toxins involved in local tissue damage and play a relevant role in the complex and multifactorial inflammatory response characteristic of viperide 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.

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).

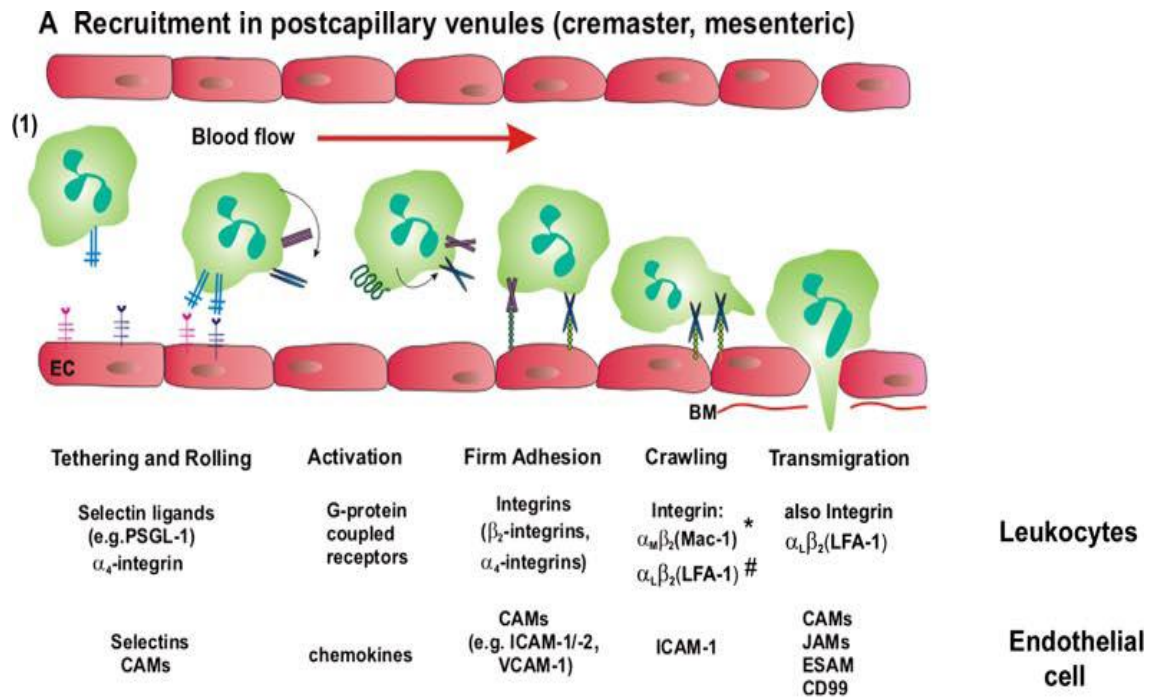


Figura 1- Etapas da interação leucócito-endotélio.
Fonte: Adaptado de Petri, Phillipson e Kubes (2008).

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 conseqüentemente 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 ofídismo 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 seqüência de aminoácidos HEBXHXBGBXH 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 seqüência 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 seqüência 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 seqüência XXCD (XX-Cys-Asp). Esta classe compreende metaloproteinases 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.

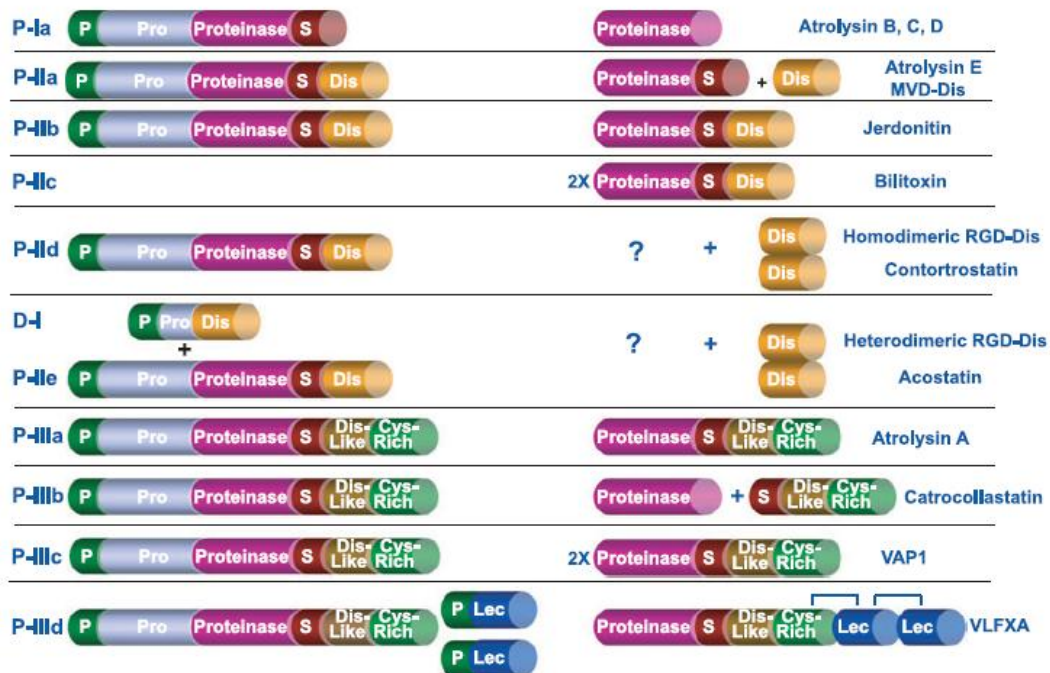


Figura 2- Classificação das SVMPs. As SVMPs são sintetizadas na forma latente como precursores multimodulares que sofrem diferentes estágios de processamento. **P:** pré-domínio, **Pro:** pró-domínio, **Proteinase:** domínio metaloproteínico. **S:** sequência de aminoácidos entre o domínio catalítico 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; COMINETTI 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 à componentes plasmáticos 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 sub-cutâneo 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		**			

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.

REFERÊNCIAS¹

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. BnP1, 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 angiopoetin-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. rACLFa1f, 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. Angiotensin-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 reprotolysin 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 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 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-ARAÚJO, 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 α 2 β 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 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 α M β 2-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, n. 3, p. 950-956, 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-ARAUJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 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.