

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

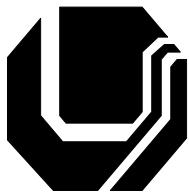
ESTUDO COMPARATIVO DE EFEITOS INFLAMATÓRIOS LOCAIS INDUZIDOS POR PEÇONHAS BOTRÓPICAS

Carla Cristine Neves Mamede

Orientador: Dr. Fábio de Oliveira

Uberlândia - MG

2015



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

ESTUDO COMPARATIVO DE EFEITOS INFLAMATÓRIOS LOCAIS INDUZIDOS POR PEÇONHAS BOTRÓPICAS

Carla Cristine Neves Mamede

Orientador: Dr. Fábio de Oliveira

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

Uberlândia-MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M264e Mamede, Carla Cristine Neves, 1986-
2015 Estudo comparativo de efeitos inflamatórios locais induzidos por
peçonhas botrópicas /Carla Cristine Neves Mamede -- 2015.
129 p. : il.

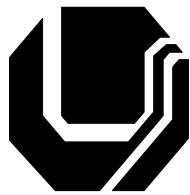
Orientador: Fábio de Oliveira.

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

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Teses. 3. Agentes
antiinfecciosos - Teses. 4. Peçonha – Teses. I. Oliveira, Fábio de. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



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

ESTUDO COMPARATIVO DE EFEITOS INFLAMATÓRIOS LOCAIS INDUZIDOS POR PEÇONHAS BOTRÓPICAS

Aluna: Carla Cristine Neves Mamede

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Fábio de Oliveira

Examinadores:

Dra. Leonilda Stanziola (UFU)

Dra. Erika Renata Barbosa Neiro (UFU)

Dr. Mario Sérgio Rocha Gomes (UESB)

Dr. Norival Alves Santos-Filho (Unesp)

Data da Defesa:

24 de julho de 2015

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

Dr. Fábio de Oliveira

AGRADECIMENTO

Aos meus familiares e amigos, em especial, aos meus pais, Leondes E. Neves e Zolande M. Mamede Neves, e à minha irmã, Cláudia O.N. Mamede, pelo apoio, amor e conforto que sempre me dedicaram.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira pela magistral e estimulante orientação de toda minha vida acadêmica e por acreditar e confiar em meu trabalho.

Às minhas parceiras de pesquisa, Nadia C.G. Morais, Mayara R. Queiroz, Déborah F. C. Pereira, Bruna B. Sousa e Mariana M. Santos pela amizade e companheirismo em momentos de dificuldade e de sucesso, e por tornarem nosso ambiente de trabalho mais agradável e alegre.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, especialmente, Alisson S. Pereira, Thalena C. Zanetti e Samela A.P.B. Vieira, pela importante contribuição com as atividades experimentais.

Aos pesquisadores Dr. Mário S.R. Gomes, Dr. Norival A. Santos-Filho, Dr. Danilo L. Menaldo, Dra. Carolina P. Bernardes e Dra. Júnia O. Costa por me permitirem colaborar com seus trabalhos.

À Dr. Leonilda Stanziola pelos carinhosos ensinamentos e relevante colaboração.

Aos membros da comissão examinadora, Dra. Leonilda Stanziola, Dra. Erika R.B. Neiro, Dr. Mário S.R. Gomes e Dr. Norival A. Santos-Filho pela disponibilidade e atenção.

Aos professores e técnicos administrativos do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) do Brasil.

SUMÁRIO

Apresentação	1
Capítulo I.....	3
Fundamentação Teórica	3
Efeitos Inflamatórios.....	4
Reação Inflamatória	5
Mediadores e Células Inflamatórias	6
Inflamação Aguda E Crônica.....	13
Peçonhas Botrópicas.....	17
Composição e Efeitos da Peçonha	18
Metaloproteases.....	21
Serinoproteases	23
Fosfolipases A ₂	25
Referências	28
Capítulo II.....	38
Efeitos Inflamatórios Locais Induzidos por Toxinas Botrópicas	38
Resumo	39
Introdução	40
Material e Métodos.....	47
Resultados e Discussão.....	51
Referências	69
Capítulo III.....	82
Estudo Comparativo de Efeitos Inflamatórios Locais Induzidos pela Peçonha das Serpentes <i>Bothrops alternatus</i> e <i>Bothrops moojeni</i>.....	82
Resumo	83
Comparative analysis of local inflammatory effects of <i>Bothrops alternatus</i> and <i>Bothrops moojeni</i> snake venoms: enzymatic contribution and inflammatory-modulations	84
Abstract	84

Introduction	86
Material and Methods.....	87
Results	91
Discussion.....	102
References.....	107
Anexo	115
Histological and Ultrastructural Analyses of Muscle Damage Induced by a Myotoxin Isolated from <i>Bothrops alternatus</i> Snake Venom (Research article)	115

APRESENTAÇÃO

No Brasil, cerca de 30.000 acidentes, por ano, são causados por serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*. O envenenamento botrópico é caracterizado por graves danos locais, desencadeados pela toxicidade dos componentes da peçonha e agravados pela consequente inflamação induzida. As patologias decorrentes deste acidente ofídico são consideradas relevantes problemas de saúde pública, podendo levar a alterações físicas permanentes e incapacitantes nas vítimas.

Embora vários estudos experimentais abordem os efeitos dos acidentes ofídicos, a compreensão da reação inflamatória desencadeada pela peçonha, ainda, é fragmentada e complexa. Por isso, observações detalhadas do processo inflamatório são necessárias para entender a heterogeneidade dos efeitos provocados pelas toxinas ofídicas. Um estudo comparativo, além de contribuir para a caracterização patológica dos acidentes botrópicos, favorece a integração dos múltiplos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese dos danos locais do envenenamento. Como os componentes da peçonha estimulam diversos mecanismos e vias inflamatórias, as proteínas isoladas podem servir como ferramentas moleculares para o estudo da inflamação provocada pelo envenenamento. Além de servirem como modelos para investigar e propor medidas terapêuticas alternativas no controle e eliminação dos agravos teciduais do acidente ofídico e de outras condições patológicas similares.

Neste contexto, este trabalho apresenta uma análise comparativa dos efeitos inflamatórios locais induzidos por peçonhas botrópicas. A presente tese foi desenvolvida de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, para obtenção do título de Doutor. Para melhor descrição, os fundamentos teóricos e experimentais desta pesquisa científica foram divididos em capítulos.

Inicialmente, foi feita uma revisão bibliográfica sobre conceitos e dados científicos relacionados ao assunto do trabalho experimental. As características biológicas, bioquímicas e fisiopatológicas do processo inflamatório e das peçonhas de serpentes botrópicas foram apresentadas no **Capítulo I**.

O **Capítulo II**, intitulado “Efeitos inflamatórios locais induzidos por toxinas botrópicas”, correlaciona os fundamentos teóricos aos resultados experimentais obtidos. Ele apresenta o edema, a dor e/ou a mionecrose causados por diferentes proteínas purificadas da peçonha das serpentes *Bothrops alternatus*, *B. moojeni*, *B. leucurus*, *B. pauloensis* e *B. pirajai*. Para verificar a contribuição dos diferentes componentes da peçonha nestes efeitos, a ação de proteínas isoladas foi comparada à da peçonha bruta. A caracterização farmacológica da reação inflamatória induzida por algumas toxinas também foi avaliada. A análise comparativa dos resultados permitiu identificar o envolvimento de diferentes toxinas e mecanismos inflamatórios na patogênese de manifestações locais típicas do envenenamento botrópico.

O **Capítulo III** refere-se a efeitos inflamatórios locais causados pela peçonha das serpentes *B. alternatus* e *B. moojeni*. O edema, a hiperalgesia e a miotoxicidade induzidos por essas peçonhas foram caracterizados e, o envolvimento de enzimas ofídicas e de mediadores inflamatórios no desenvolvimento desses efeitos também foram investigados. Este estudo mostrou que a intensidade dos efeitos provocados pela peçonha de *B. alternatus* é relativamente menor que a de *B. moojeni*. Nossos resultados demonstraram também a participação de proteases, fosfolipases A₂ e de vários mediadores inflamatórios nos efeitos locais provocados pelas peçonhas avaliadas. Os dados e as implicações desse trabalho são apresentados de acordo com padrões textuais e científicos exigidos pelo periódico a ser submetido (Toxicon).

Ao final da tese, foi anexado o artigo “Histological and Ultrastructural Analyses of Muscle Damage Induced by a Myotoxin Isolated from *Bothrops alternatus* Snake Venom”, publicado, em 2013, na revista Protein and Peptides Letters (DOI: 10.2174/0929866511320020011). Este artigo contém parte dos resultados obtidos durante o doutorado, referente à caracterização histopatológica da mionecrose induzida por uma miotoxina (BaltMTX) isolada da peçonha de *B. alternatus*.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

Efeitos Inflamatórios

Em condições fisiológicas, a célula é mantida em um estado ideal de equilíbrio estrutural e funcional que garante a execução de suas funções vitais. O estabelecimento metabólico, a capacidade de diferenciação e especialização, a disponibilidade de nutrientes e a integridade das biomembranas permitem que as células atinjam um estado de normalidade, denominado homeostasia (ROBBINS; COTRAN, 2010). Caso algum desses fatores sejam alterados pela ação de agentes lesivos ou estresse fisiológico sobrevém uma sequência de eventos degenerativos que ocasionam lesão celular e consequente ativação de processos que irão conter ou eliminar a agressão. A reação própria do organismo à infecção e aos danos celulares, com objetivo de eliminar a causa inicial da injúria e restaurar a estrutura e a função normais do tecido, é definida como inflamação (MEDZHITO, 2010). Esta é uma resposta fundamentalmente protetora, determinada pela ação orquestrada de células e mediadores químicos especializados no controle e eliminação de agentes agressores para restabelecimento da área lesada. A reação inflamatória representa um mecanismo fisiológico de defesa tecidual próprio de tecidos conjuntivos, identificada, primariamente, por sinais clássicos de dor, calor (febre), rubor (eritema) e tumor (edema) (MAJNO, 1975; TRACY, 2006). Eventualmente, a persistência desses eventos, associado à ineficiente neutralização do estímulo nocivo, pode agravar a lesão tecidual e comprometer a função do órgão afetado (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; CONSOLARO, 2009; NATHAN; DING, 2010).

Reação inflamatória

Diferentes tipos de agentes lesivos (toxinas, patógenos e alteração fisiológica) podem induzir eventos inflamatórios específicos para contenção da agressão. Inicialmente a resposta inflamatória é desencadeada pela ativação de sensores e mediadores químicos, que induzem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, que levam ao aumento do fluxo sanguíneo (hiperemia) no local da lesão e consequente extravasamento de componentes plasmáticos do sangue para o tecido. Esses eventos determinam a progressiva migração de células de defesa para a região inflamada, com a função de neutralizar a lesão tecidual e promover reparo tecidual (MAJNO; JORIS, 2004). Detalhes desses eventos que culminam na resolução da inflamação aguda são ilustrados na **figura 1.1**.

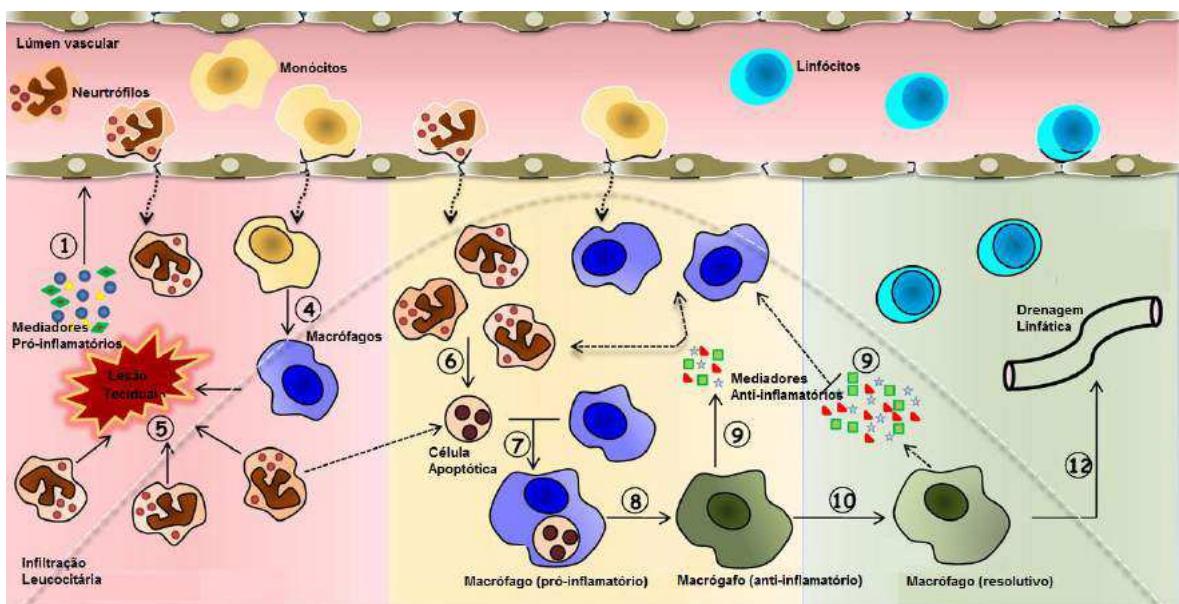


Figura 1.1: Representação dos eventos inflamatórios primários. (1-5) Fase proliferativa: estimulação de sensores celulares no local da lesão tecidual, produção de mediadores inflamatórios, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hiperemia, edema, recrutamento de células de defesa; (6-9) Fase transitória: intensificação do infiltrado inflamatório, acúmulo de mediadores pró-inflamatórios e células fagocíticas; (10-12) Fase resolutiva: amplificação da reação inflamatória, neutralização do agente lesivo, reparo tecidual e resolução da inflamação. Adaptado de ALESSANDRI, et al. (2013).

Mediadores e células inflamatórias

Mediadores inflamatórios são substâncias sinalizadoras essenciais à comunicação bioquímica intercelular e regulação da inflamação (ROWLEY, 1996). Essas substâncias são geradas a partir de células ou de proteínas plasmáticas em resposta a estímulos agressores. Substâncias produzidas por células lesadas ou por microrganismos estimulam a liberação e/ou ativação dos mediadores, que são reconhecidos por receptores celulares específicos em diferentes tipos celulares-alvo. Geralmente os mediadores têm meia-vida curta, sendo degradados ou inativados rapidamente por enzimas. No entanto, um mediador pode desencadear a liberação de outros mediadores e, assim, estabelecer e controlar a reação inflamatória. Alguns mediadores estão mais relacionados à indução de reações vasculares na inflamação, como a histamina, o óxido nítrico e algumas prostaglandinas. Outros, como citocinas e leucotrienos, agem no recrutamento e ativação das células inflamatórias (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012). A **tabela 1.1** resume as características básicas dos principais mediadores inflamatórios. Detalhes de algumas destas substâncias são descritos a seguir:

- Histamina: é uma amina básica, considerada o principal mediador que causa aumento da permeabilidade vascular no início da inflamação. As fontes mais ricas de histamina são os mastócitos que normalmente estão presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos, mas também pode ser liberada por plaquetas agregadas. Seus efeitos vasoativos são mediados, principalmente, pela ligação a receptores H₁ nas células endoteliais, causando dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade capilar (HUANG; THURMOND, 2008).
- Eicosanoides: são ácidos graxos poli-insaturados derivados do ácido araquidônico. Em decorrência de danos celulares e ativação de fosfolipases endógenas, especialmente fosfolipase A₂ (PLA₂) citosólica, os fosfolipídios de membrana são hidrolisados e liberam ácido araquidônico¹. Este pode ser

¹ Ácido araquidônico: ou ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico é um ácido graxo poli-insaturado com 20 carbonos, normalmente é encontrado esterificado nos fosfolipídios de membrana, sendo liberados pela ação de enzimas PLA₂. Os sinais bioquímicos envolvidos na ativação das PLA₂ e produção de ácido

degradado pela via da lipoxigenase² (LOX), dando origem aos leucotrienos (LT) e lipoxinas (LX) ou pela via das ciclooxigenases³ (COX-1 e COX-2), que catalisam a biosíntese de prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) (GILROY, 2010). As fases iniciais e tardias da inflamação são inevitavelmente acompanhadas da liberação de eicosanoides (MURAKAMI; KUDO, 2003; MAJNO; JORIS, 2004; CABRAL, 2005). A PGE₂, produzida por células endoteliais e outros tecidos, e a PGD₂, liberada por mastócitos, são potentes vasodilatadores e aumentam a permeabilidade vascular por potencializarem a ação de outros mediadores vasoativos, como a histamina e bradicinina. A PGD₂, também, é quimioatraente para neutrófilos, enquanto a PGE₂ é hiperalgésica e está envolvida na febre induzida por citocinas. A PGI₂ (ou prostaciclina) é vasodilatadora, inibidora da agregação plaquetária e potencializa o aumento da permeabilidade e os efeitos quimiotáticos de outros mediadores (STRAUS; GLASS, 2001). O TXA₂, produzido por plaquetas, é um potente agente vasoconstritor e agregante plaquetário, que junto com os outros prostanoïdes parece exercer um efeito modulador da reação inflamatória. Os leucotrienos C₄, D₄ e E₄, produzidos principalmente por neutrófilos, causam intensa vasoconstricção e permeabilidade vascular aumentada nas vênulas. Eles são muito mais potentes em alterar a permeabilidade do que a histamina. O LTB₄ é um importante agente quimiotático e ativador de leucócitos, causando agregação e adesão das células ao endotélio vascular, proliferação de macrófagos e linfócitos e, a produção de citocinas por estas células (MURPHY; GIJÓN, 2007). As LXs são reconhecidas como mediadores lipídicos anti-

araquidônico incluem aumento no Ca²⁺ citoplasmáticos e ativação de cinases em resposta a estímulos externos (MURAKAMI; KUDO, 2003).

² Lipoxigenases (LOX): família de enzimas que promovem a conversão de ácido araquidônico em uma variedade de hidroperoxiácidos lineares. A 5-LOX está relacionada à biossíntese de leucotrienos em leucócitos, principalmente; enquanto as 15-LOX e 12-LOX são associadas à produção de lipoxinas em leucócitos, células epiteliais e plaquetas (MADERNA; GODSON, 2005).

³ Ciclooxigenases (COX): conjunto de isoenzimas que catalisam a conversão de ácido araquidônico em prostanoïdes, conhecidos como prostaglandinas e tromboxanos. COX- 1, forma constitutiva, encontrada na mucosa gástrica, plaquetas, endotélio vascular e rins; COX-2, forma induzida por reação inflamatória, presente em macrófagos, monócitos, músculo liso, endotélio, epitélio e neurônios (STRAUS; GLASS, 2001).

inflamatórios, que inibem o recrutamento de leucócitos e ativam processos de reparo celular (MADERNA; GODSON, 2005).

- Citocinas: são proteínas e peptídeos com efeitos pró e anti-inflamatórios, produzidas principalmente por linfócitos e macrófagos. São identificadas mais de 100 citocinas agrupadas como: interleucinas (IL), quimiocinas, fatores de crescimento (GF), interferonas (INF), fatores estimuladores de colônias e fator de necrose tumoral (TNF). IL-1 e TNF- α estão relacionados à indução da expressão de moléculas de adesão endotelial e da síntese de mediadores inflamatórios, incluindo outras citocinas, quimiocinas, GF, eicosanoides e óxido nítrico. Os GF derivados de plaquetas, de fibroblastos e endoteliais, estão associados com os processos de reparo tecidual, na fase final da inflamação. INFs estão relacionadas à atividade antiviral e ativação de macrófagos. As quimiocinas são citocinas quimioatraentes para tipos específicos de leucócitos, como a MCP-1 para monócitos, a MIP-1 α para macrófagos, a eotaxina para eosinófilos, linfotactina para linfócitos e a fractalquina para monócitos e linfócitos (CHEN, et al., 2002).

- Produtos do sistema complemento: compreende mais de 20 proteínas plasmáticas com efeito complementar à ação dos anticorpos. As principais proteínas do sistema complemento são nomeadas de C1 a C9. Quando as proteínas do complemento encontram-se e interagem com complexos抗ígenos-anticorpos, fixam-se nos mesmos, são ativadas e atuam, no local, provocando a degradação da membrana e lise da célula atacada. A ativação das moléculas do complemento, geralmente implica em sua clivagem e liberação de fragmentos maiores (b) com ação enzimática e fragmentos menores (a) quimiotáticos. Quando as proteínas do complemento, no exsudato (ou no plasma), interagem com os complexos抗ígenos-anticorpos, fixam-se e são ativadas para atuarem enzimaticamente, promovendo da digestão de componentes da membrana à lise celular de microrganismos, células estranhas ou infectadas. Os fragmentos C3a e C5a liberados do complemento atuam no aumento da expressão do receptor para adesão celular endotelial neutrofílico, induzem extravasamento vascular, atraem leucócitos por quimiotaxia e estimulam a liberação de histamina por ativação de mastócitos (BARRINGTON, et al., 2001).

Tabela 1.1: Características básicas dos principais mediadores inflamatórios

Mediador	Origem	Ações
		Derivados proteicos
Histamina	Mastócitos, basófilos e plaquetas	Ativação de células endoteliais, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular
Serotoninina	Plaquetas, células neuroendócrinas e mastócito de roedores	Vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular
Neuropeptídeos (substância P, neurocinina A e CGRP)	Leucócitos e nervos sensoriais	Vasodilatação e dor
Citocinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-17 e quimiocinas)	Mastócitos, macrófagos, linfócitos T e células endoteliais	Ativação de células endoteliais, febre, dor, hipotensão, quimiotaxia e ativação de leucócitos
Produtos do sistema complemento (C3a, C3b, C4a, C5a e MAC)	Proteínas do complemento no plasma	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, dano celular e recrutamento de células fagocíticas
Proteases do sistema de coagulação	Proteínas plasmáticas da cascata de coagulação e sistema fibrinolítico	Adesão e recrutamento de leucócitos, indução da produção de citocinas, cininas e prostaglandinas, ativação do sistema complemento
Cininas (Bradicinina)	Peptídeos vasoativos derivados de proteínas plasmáticas (cininogênio)	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e dor
Derivados lipídicos		
Prostaglandinas (PGI ₂ , PGD ₂ e PGE ₂)	Mastócitos, leucócitos e células endoteliais	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, dor e febre
Tromboxanos (TXA ₂)	Plaquetas	Vasoconstrição
Leucotrienos (LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ e LTE ₄)	Mastócitos e leucócitos	Vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia
Lipoxinas (LXA ₄)	Leucócitos, plaquetas, células endoteliais e fibroblastos	Anti-inflamatória pró-resolutiva, antinociceptiva e ativam a ação reparadora de macrófagos
Fator ativador de plaquetas (PAF)	Mastócitos, plaquetas, células endoteliais e leucócitos	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, aumento da adesão dos leucócitos ao endotélio e quimiotaxia

Derivados gasosos		
Espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio	Leucócitos	Dano tecidual, aumento da permeabilidade vascular, expressão de citocinas e de moléculas de adesão de leucócitos endoteliais e amplificação da reação inflamatória
Óxido nítrico (NO)	Leucócitos e endotélio	Vasodilatação e dano tecidual

A reação inflamatória envolve, também, a ativação e recrutamento de várias células de defesa, circulantes e teciduais, como leucócitos e mastócitos, respectivamente (KUBES, 2002). Os leucócitos são as células inflamatórias mais atuantes. Neutrófilos, eosinófilos e basófilos são leucócitos polimorfonucleares, com importante ação fagocítica de agentes agressores, predominantes no início do processo inflamatório. Macrófagos e linfócitos são leucócitos mononucleares essências na defesa e no reparo do tecido lesado, que aparecem sequencialmente à instalação da inflamação. Essas e outras células inflamatórias, além de agirem diretamente sobre o agente agressor, também são responsáveis pela produção de grande número de mediadores químicos, conforme ilustrado na **figura 1.2** (CONSOLARO, 2009; ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

Células de defesa teciduais, como histiócitos (macrófagos residentes), podem ser consideradas células de alarme, responsáveis pela iniciação da mobilização de neutrófilos da circulação para a área da injúria. A desgranulação de mastócitos e indução de agregação plaquetária na região afetada também pode resultar na liberação de mediadores quimiotáticos para monócitos (macrófagos circulantes) e outros leucócitos. Após migração e ativação, os leucócitos, especialmente macrófagos, tornam-se sintetizadores e liberadores de citocinas inflamatórias para o recrutamento de mais células para o tecido alvo. Tais condições promovem interação entre os eventos vasculares, bioquímicos e celulares que especificam e determinam as manifestações locais e sistêmicas da reação inflamatória (CUNHA; FERREIRA, 1986; BAUMANN; GAULDIE, 1994; GREGORY, et al., 2011).

Uma vez que os leucócitos (neutrófilos e macrófagos) tenham sido recrutados para o local da inflamação, eles são ativados por produtos da infecção

ou de células lesadas e reconhecem o agente agressor, estabelecendo a sua remoção via fagocitose, principalmente (SOEHNLEIN; LINDBON, 2010). Este processo envolve três eventos sequenciais: reconhecimento e ligação do material a ser englobado pelo leucócito; sua ingestão, com subsequente fusão com o lisossomo e formação do vacúolo fagocítico (fagolisossomo) e; morte ou degradação do material fagocitado, via espécies reativas de oxigênio ou atividade enzimática. Normalmente, durante a atividade fagocítica pode ocorrer derramamento de enzimas lisossomais. As enzimas derramadas no meio extracelular promovem a destruição tecidual, bem como ativa e/ou desencadeia a formação de vários mediadores químicos, podendo intensificar ou prolongar o processo inflamatório. Enquanto os neutrófilos estão voltados mais diretamente para a fagocitose de bactérias, os macrófagos atuam de forma mais ampla, fagocitando partículas inertes, corpos estranhos, microrganismos diversos, restos celulares e teciduais, etc. Além de fagocitar, os macrófagos têm grande capacidade de síntese e secreção de substâncias envolvidas no processo de remodelagem e reparo tecidual (CONSOLARO, 2009; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Os linfócitos são as células que migram mais tarde para o foco inflamatório. Os linfócitos de diferentes tipos (T e B) estimulados por抗ígenos, macrófagos ativados ou citocinas, são recrutados e atuam para a persistência da resposta inflamatória. Os linfócitos T auxiliares (CD4⁺, T4 ou helpers), especializados em receber a apresentação de抗ígenos por parte dos macrófagos, modulam os eventos inflamatórios, via liberação de mediadores, para ativação de linfócitos T citotóxicos e destruição do agente agressor. Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺ ou T8) liberam enzimas e citocinas que induzem lise e apoptose em células lesadas ou infectadas, além de liberarem citocinas que recrutam e ativam macrófagos. Linfócitos B ativados dão origem aos plasmócitos, que produzem anticorpos direcionados ou contra抗ígenos persistentes no local inflamado (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996).

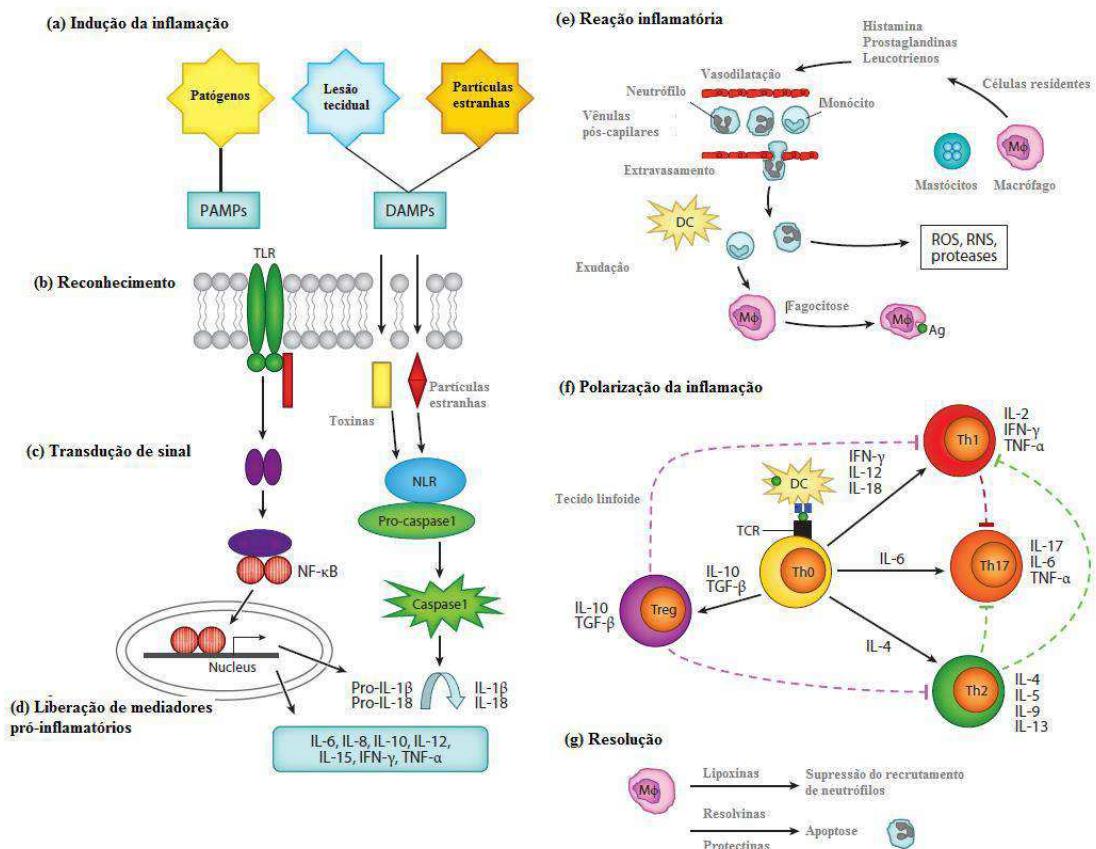


Figura 1.2: Mediadores e células inflamatórias. (a) Agentes agressores induzem reação inflamatória. (b) Sensibilização de receptores permite a detecção e transdução de sinais decorrentes de danos celulares. (c) Sinalização intracelular relacionada à ativação de fatores de transcrição e indução de expressão de mediadores químicos. (d) Citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas são produzidas e liberadas para promover a ativação e o recrutamento de células de defesa. (e) Neutrófilos e monócitos são atraídos para o local da lesão e atravessam o endotélio vascular. Mastócitos e macrófagos residentes no tecido afetado liberam mediadores, promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e intensificando a migração celular. Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas participam da fagocitose do agente agressor. (f) Linfócitos (Th0) migram do tecido linfoide para a região inflamada e polarizam a reação inflamatória de acordo com o estímulo lesivo. Células Th1 e Th17 liberam mediadores pró-inflamatórios, Th2 libera mediadores anti-inflamatórios e Threg tem ação reguladora da inflamação. (g) A resolução da inflamação é direcionada pela ativação de macrófagos que promovem a limpeza e a reparação do tecido. Abreviações: Ag, antígeno; DC, célula dendrítica; DAMP, padrões moleculares associados a danos; IFN-γ, interferon-gamma; IL, interleucina; Mφ, macrófago; MHC, complexo de histocompatibilidade; NF-κB, fator de transcrição kappa B; PAMP, padrões moleculares associados a patógenos; RNS, espécies reativas de nitrogênio; ROS, espécies reativas de oxigênio; TCR, receptor de linfócitos T; Th, linfócitos T auxiliar; TLR, receptor transmembrânico; TNF-α, fator de necrose tumoral α. Adapatado de Ashley, et al. (2012).

Inflamação aguda e crônica

A reação inflamatória pode ser desencadeada por uma variedade de agentes agressores, como, microrganismos, toxinas, isquemia, injúria térmica, hipóxia, corpos estranhos ou outro agente que cause lesão tecidual, infecção e reações imunes. Estes estímulos lesivos promovem a liberação de mediadores inflamatórios que irão agir sobre a microcirculação (arteríolas, vênulas, capilares sanguíneos e linfáticos), para propiciar a chegada de substâncias e células de defesa à área afetada, caracterizando a inflamação aguda.

A vasodilatação é uma das primeiras manifestações do processo inflamatório que ocorre em virtude da ação de vários mediadores no tecido vascular. Qualquer estímulo agressivo capaz de desorganizar e desarranjar os tecidos vascularizados, promovendo a presença de proteínas livres no local, ou ainda, que atue diretamente sobre os mastócitos, estimula a liberação de mediadores vasoativos (HOFSTRA, et al., 2003). Histamina, serotonina, óxido nítrico (NO), neuropeptídos e cininas são alguns dos mediadores que causam dilatação dos pequenos vasos nas primeiras horas da inflamação. O NO, por exemplo, é um gás solúvel que promove vasodilatação pelo relaxamento das células musculares lisas vasculares. A histamina, devido sensibilização de receptores endoteliais H₁, provoca contração do citoesqueleto das células endoteliais e separação das junções interendotelias, com consequente vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar (HUANG; THURMOND, 2008).

Com a persistência da agressão, os receptores endoteliais podem ficar hiposensíveis à histamina, o que poderia provocar involução do processo inflamatório. No entanto, a partir de 1 a 2 horas, a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular são mediados pelas cininas, especialmente bradicinina, que estimulam a liberação de NO e atuam também sobre receptores nociceptivos. Com 3 a 5 horas, os eventos vasculares permanecem adequados em função das prostaglandinas, fundamentais na potencialização dos efeitos da histamina e da bradicinina. Estes eventos são acompanhados do aumento do fluxo sanguíneo,

congestão vascular e formação de exsudato⁴, provocando calor, vermelhidão (rubor ou eritema), edema e dor no local, sinais clássicos da inflamação aguda (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SCHIMD-SCHONBEIN, 2006).

Nas primeiras horas, a inflamação é essencialmente exsudativa. As alterações vasculares iniciais fazem com que ocorra a passagem de líquido com alto teor de imunoglobulinas para o tecido lesado. As imunoglobulinas são proteínas que funcionam como marcadores de estranheza do agente ao qual se ligam, podendo ter atividade inibidora, neutralizadora e imobilizadora direta sobre o agressor, decorrente da reação antígeno-anticorpo. A interação das imunoglobulinas com o agente agressor também sinaliza para outras substâncias atuarem, como as enzimas do sistema complemento ou para reconhecimento dos leucócitos (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

Gradativamente à formação do exsudato, as células sanguíneas de defesa atravessam as paredes dos capilares, migram para área tecidual afetada e nela acumulam-se, caracterizando o infiltrado inflamatório. As células do infiltrado exercem vários tipos de atividade, destacando-se a fagocitose e liberação de substâncias para o meio extracelular a fim de controlar o agente agressor e modular o processo de reparo após a injúria tecidual. A exsudação plasmática aumenta a viscosidade do sangue, diminui o fluxo sanguíneo no local e aumenta a aderência entre as hemácias. Nesta condição de estase, os leucócitos são direcionados para a periferia do vaso, ficam em contato com a parede vascular (marginação leucocitária), aderem (pavimentação leucocitária) e migram através do endotélio (leucodiapedese) em direção aos estímulos quimiotáticos do tecido inflamado. A adesão dos leucócitos às células endoteliais depende da exposição de moléculas de adesão em ambas superfícies celulares, mediadas pela ação de citocinas. As citocinas são secretadas, principalmente, pelas células lesadas, mastócitos e macrófagos, para garantir que os leucócitos sejam recrutados ao local. As quimiocinas, componentes do sistema complemento e leucotrienos,

⁴ Exsudato inflamatório: líquido com alto teor proteico, especialmente imunoglobulinas, que sai do vaso para tecidos inflamados.

agem nos leucócitos aderentes e os estimulam a migrarem através dos espaços endoteliais para os tecidos (GREGORY, et al., 2011).

Na inflamação aguda, os leucócitos polimorfonucleares, especialmente neutrófilos, predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas. Os leucócitos mononucleares, principalmente monócitos/macrófagos, chegam ao campo inflamatório mais tarde em função de sua menor agilidade e reduzida concentração circulante, quando comparadas aos neutrófilos. A resolução do processo inflamatório implica na eliminação do agente agressor, reabsorção do exsudato, fagocitose e digestão dos detritos celulares, promovendo a limpeza e reparo do tecido lesado. Não ocorrendo resolução, o processo se mantém com a intensificação do número de leucócitos mononucleares, definindo, dessa forma, a cronificação da inflamação. Esta é uma reação lenta que pode persistir indefinidamente, destruindo tecidos e promovendo proliferação local de células e de tecido conjuntivo. A cronificação implica persistência do agente agressor e da resposta inflamatória, porém pode evoluir para a resolução do processo; eventualmente pode sofrer surtos de reagudecimento em casos de agressões repetidas. Aspectos diferenciais da inflamação aguda e crônica são listados na **tabela 1.2** (MONTENEGRO; FRANCO, 2004; RANG, et al., 2007; CONSOLARO, 2009; ROBBINS; COTRAN, 2010).

Tabela 1.2: Aspectos diferenciais da inflamação aguda e crônica

Inflamação	Aguda	Crônica
Aspectos clínicos	Instalação súbita e incapacitante. Duração breve, em média 1 a 3 dias. Sintomas locais: edema, hipertermia, eritema e dor. Sintomas sistêmicos: febre, mialgia, prostração, astenia, cefaleia e mal estar.	Instalação de forma insidiosa ou logo após um quadro clínico agudo marcante. Duração prolongada, de semanas a meses. Baixa sintomatologia e manifestações sistêmicas limitadas.
Padrões morfológicos	Exsudato exuberante com grande quantidade de mediadores inflamatórios e imunoglobulinas. Infiltrado polimorfonuclear predominantemente neutrofílico. Significante destruição celular	Exsudato moderado com mediadores celulares e teciduais. Infiltrado volumoso com predomínio de macrófagos e linfócitos. Presença de componentes de reparo e remodelagem tecidual
Características gerais	Predomina eventos vasculo-exsudativos e fenômenos inflamatórios que causam lesão vascular e tecidual. Vasodilatação da microvasculatura, aumento da permeabilidade vascular, lentificação do fluxo sanguíneo e acúmulo de fluido e de leucócitos no tecido extravascular.	Predomina fenômenos produtivos e proliferativos, como angiogênese, fibrogênese e proliferação celular local. Formação de granulomas (aglomeração de macrófagos e linfócitos ao redor do agente agressor) para evitar a proliferação e disseminação da agressão ou levar ao reparo tecidual.

Peçonhas Botrópicas

Peçonhas são secreções glandulares animais repletas de substâncias biologicamente ativas que garantem diferenciada estratégia de defesa e de captura de alimento. A peçonha é formada por uma complexa mistura de proteínas, peptídeos e outras substâncias orgânicas e inorgânicas, produzida por glândulas específicas (TU, 1996). As serpentes peçonhentas podem ser reconhecidas pela presença de dentes ou presas especiais para inoculação da peçonha, localizados na região do maxilar superior (WARRELL, 2010). As espécies peçonhentas brasileiras são classificadas em quatro gêneros principais: *Micrurus*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*. Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia, são conhecidas 26 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, distribuídas em todo o território brasileiro (BERNARDE, 2014, COSTA; BERNILS, 2014). Essas serpentes são responsáveis por cerca de 30.000 acidentes por ano no Brasil (KASTURIRATNE, et al., 2008). Apesar da baixa letalidade, as patologias decorrentes do envenenamento botrópico são consideradas relevantes problemas de saúde pública, podendo levar à alterações físicas permanentes e incapacitantes nas vítimas de acidentes ofídicos (GUTIÉRREZ, et al., 2010).

Composição e efeitos da peçonha

A peçonha ofídica é rica em proteínas, enzimas e peptídeos, além de outros componentes orgânicos e inorgânicos, especialmente cátions metálicos, conforme listado na **figura 1.3** (TU, 1996; RAMOS; SELISTRE-ARAUJO, 2006). Nas peçonhas de espécies *Bothrops*, esses componentes são responsáveis por efeitos locais e sistêmicos típicos do envenenamento. As principais manifestações sistêmicas são relacionadas a distúrbios de coagulação sanguínea, com complicações como hipotensão e hipovolemia, decorrente da perda de líquidos e de sangramentos, que podem contribuir para um quadro de choque e insuficiência renal aguda associada a problemas cardiovasculares. Os efeitos locais do envenenamento, tais como edema, dor, hemorragia e necrose, são marcantes, ocorrem rapidamente e podem levar a amputação e/ou déficit funcional do membro acometido (NISHIOKA; SILVEIRA, 1992; GUTIÉRREZ, et al., 2010).

No envenenamento, as proteínas e peptídeos não enzimáticos da peçonha contribuem para a citotoxicidade e necrose em diferentes tecidos. Alguns dos componentes não enzimáticos da peçonha são: miotoxinas *PLA₂-like*, desintegrinas, toxinas *three-finger*, lectinas tipo-C, peptídeos potenciadores de bradicinina, proteínas de secreção ricas em cisteína (CRISP), peptídeo natriurético, fatores de crescimento endotelial vascular, inibidores de serinoproteases e outros (RAMOS; SELISTRE-ARAUJO, 2006; LOMONTE; RANGEL, 2012). Esses componentes podem se ligar a receptores específicos, canais iônicos ou proteínas plasmáticas e causar alterações em mecanismos fisiológicos importantes do organismo animal. Por isso, eles têm sido alvo de estudos moleculares há anos, e têm contribuído com avanços farmacológicos importantes (MCQUEARY; KINI, 2013).

As desintegrinas, por exemplo, são uma família de polipeptídios (40 a 100 aminoácidos) ricos em cisteína que agem bloqueando seletivamente a função de receptores de integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$, importantes em processos de adesão e reconhecimento celular. Elas têm sido estudadas como potenciais agentes terapêuticos para trombose arterial, metástases tumorais, inflamação, infarto do miocárdio e outros distúrbios biológicos (CALVETE, 2013).

A descoberta do peptídeo potenciador de bradicinina da peçonha de *Bothrops jararaca* deu origem a fármacos anti-hipertensivos, como Captopril® e Enalapril® (FERREIRA, 1965). Já a Botrocetin, uma lectina tipo-C da mesma peçonha, é usada no diagnóstico de coagulopatias (READ; SHERMER; BRINKHOUS, 1978; USAMI, et al., 1993).

As toxinas da peçonha causam lesões vasculares que desencadeiam hemorragia e reação inflamatória local. O aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de proteínas e mediadores inflamatórios levam a formação de edema, geralmente acompanhado de dor e de necrose no local da picada. Enzimas são os principais responsáveis pelos eventos inflamatórios e lesões locais, bem como por alterações sistêmicas relacionadas à hemostasia (TASHIMA, et al., 2008; TEIXEIRA, et al., 2009; ZYCHAR, et al., 2010; KINI; FOX, 2013). Dentre os componentes enzimáticos das peçonhas ofídicas encontram-se: metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A₂, fosfodiesterases, colinesterases, L-aminoácido-oxidases (LAAOs), nucleosidases, hialuronidases, entre outros (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013; FOX, 2013; MARKLAND Jr; SWENSON, 2013; SERRANO, 2013). Na peçonha da serpente *B. alternatus*, por exemplo, as proteases representam mais de 60% dos componentes enzimáticos, seguidas pelas fosfolipases (7,8%). Estes componentes são predominantes na peçonha de grande parte das serpentes do gênero *Bothrops*, e determinam as manifestações clínicas dos acidentes (OHLER, et al., 2010).

As metaloproteases são as proteínas mais abundantes da peçonha botrópica, em algumas espécies representam mais de 50% dos componentes, e são as principais causadoras de eventos hemorrágicos. As serinoproteases de peçonhas de serpentes são bem conhecidas por causarem distúrbios de coagulação, devido à proteólise, inibição ou ativação de componentes do sistema hemostático. Enquanto as fosfolipases A₂ contribuem, especialmente, para os efeitos citotóxicos e inflamatórios do envenenamento botrópico (GUTIÉRREZ, et al., 1995; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ, et al., 2009; CARDOSO, et al., 2010; ZYCHAR et al., 2010).

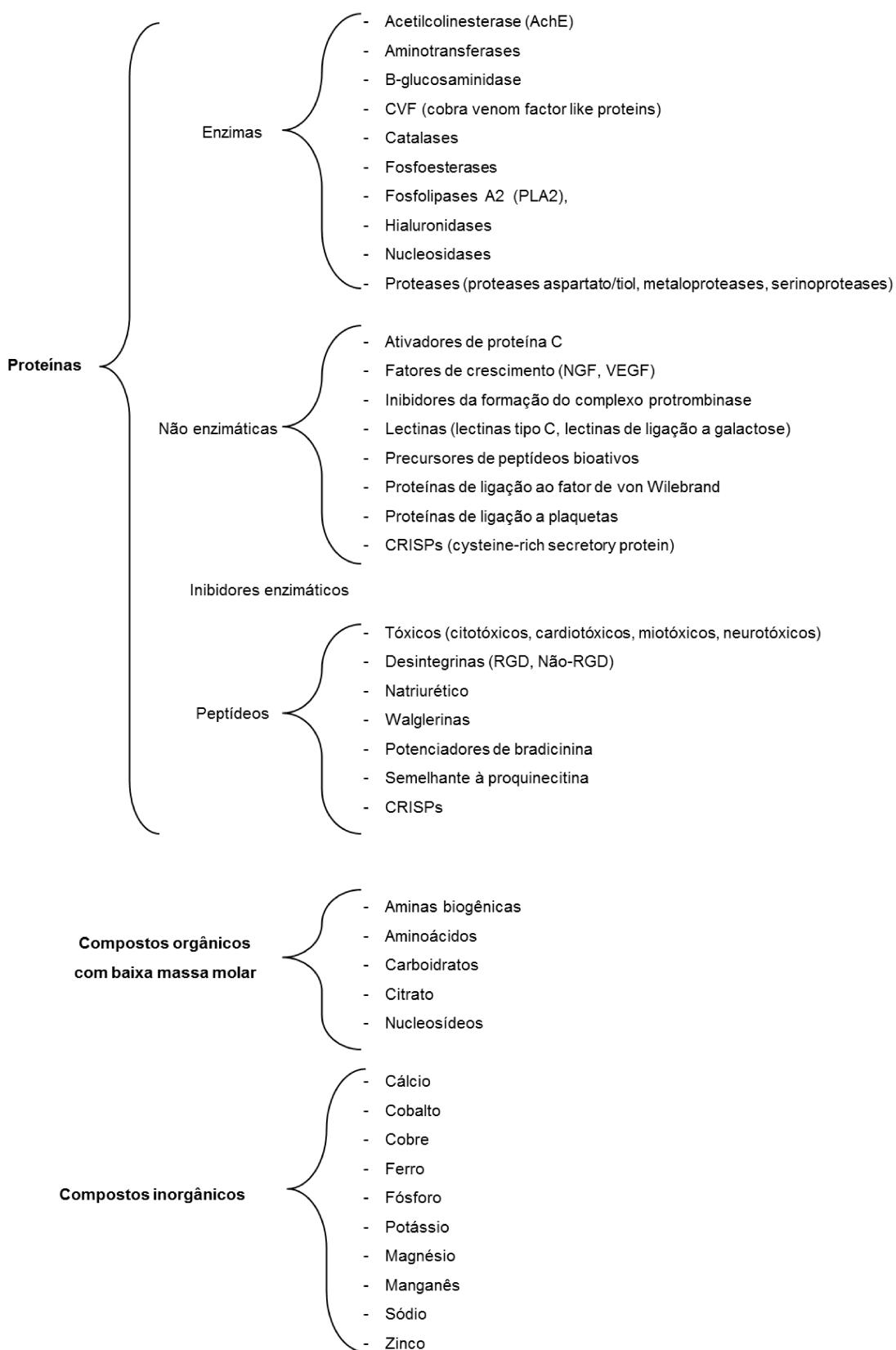


Figura 1.3: Componentes da peçonha de serpentes. Adaptado de RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006.

Análises experimentais dos efeitos locais induzidos por peçonhas de diferentes serpentes do gênero *Botrops* demonstram que a variabilidade da composição das peçonhas influencia na diversificação dos efeitos provocados (QUEIRÓZ; MARQUES; SANTO NETO, 2002; TEIXEIRA, et al., 2003a; QUEIROZ, et al., 2008; GUTIÉRREZ, et al., 2009a; NASCIMENTO, et al., 2010; MOREIRA, et al., 2012; GAY, et al., 2013; LAINES, et al., 2014; WANDERLEY, et al., 2014). A grande quantidade de proteases e fosfolipases A₂ na peçonha botrópica contribui para a predominância de efeitos hemorrágicos e inflamatório locais, característicos destes acidentes odídicos (TASHIMA, et al., 2008; OHLER, et al., 2010; QUEIROZ, et al., 2008; ZYCHAR, et al., 2010). Os efeitos hemorrágicos, por exemplo, podem ser desencadeados devido a alterações vasculares ocasionadas pela ação proteolítica das metaloproteases da peçonha (SVMPs) (FOX; SERRANO, 2008; GOMES, et al., 2009; LOPES, et al., 2009; MORAIS, et al., 2012; MARKLAND Jr.; SWENSON, 2013). A toxicidade induzida por fosfolipases A₂ (PLA₂) botrópicas pode estar associada à ação enzimática ou citotóxica destas proteínas sobre a membrana celular de diferentes componentes teciduais (CHACUR, et al., 2003; DENNIS, et al., 2011; MAMEDE, et al., 2013). Através de diferentes mecanismos, as toxinas botrópicas podem provocar dano tecidual direto e induzir reação inflamatória local (TEIXEIRA, et al., 2003; BONAVITA, et al., 2006; TEIXEIRA, et al., 2009; NASCIMENTO, et al., 2010; ZYCHAR, et al., 2010). A seguir são descritas as proteínas mais abundantes na peçonha botrópica: metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases A₂.

Metaloproteases

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs⁵) são caracterizadas pela dependência catalítica de íons metálicos e pela grande diversidade estrutural e funcional (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). As SVMPs,

⁵ SVMPs: sigla do inglês *snake venom metalloproteinases*.

em geral, são zinco dependentes (metzincinas) e apresentam uma sequência peptídica metal-ligante com três resíduos de histidina e uma glicina, constituindo o domínio catalítico metaloprotease. De acordo com a organização de domínios não enzimáticos adicionais, as SVMPs foram distribuídas em três classes principais: P-I, P-II e P-III, conforme representado na **figura 1.4**. A classe P-I apresenta proteínas com massa molecular entre 20 e 30 kDa que contêm apenas o domínio catalítico. As proteases de 30 a 60 kDa compõem a classe P-II, constituídas pelos domínios metaloprotease e desintegrina. A classe P-III compreende as enzimas com massas molares entre 60-100 kDa, contém os domínios desintegrina-like (semelhante a desintegrina) e rico em cisteína adicionais ao domínio metaloprotease. As classes P-II e P-III são divididas em diferentes subclasses, de acordo com processamento proteolítico ou dimerização. Subunidades semelhantes à lectina tipo C são encontradas associadas por pontes dissulfeto a metaloproteases P-III, configurando a subclasse P-III^d (FOX; SERRANO, 2008).

Diversos efeitos biológicos da peçonha ofídica são atribuídos às SVMPs, especialmente hemorragia, o que contribui significativamente para a letalidade do envenenamento. A ação proteolítica das metaloproteases sobre componentes vasculares compromete a interação entre células endoteliais e a membrana basal, causando lesão vascular e extravasamento sanguíneo, local e sistêmico (KAMIGUTI, et al., 1996; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). As três classes de metaloproteases podem ter atividade hemorrágica, no entanto, a presença de domínios não catalíticos parece potencializar esta ação. A classe P-I contêm proteases relacionadas a eventos hemorrágicos locais discretos ou ausentes. As metaloproteases P-II são menos representativas na peçonha botrópica, mas análises transcriptômicas revelam precursores desta classe em *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi* (CIDADE, et al., 2006; NEIVA, et al., 2009; MOURA-DA-SILVA, et al., 2011). Já as P-III são predominantes na peçonha botrópica e as mais potentes toxinas hemorrágicas, pois a presença dos domínios não catalíticos favorecem a fixação e ação direcionada sobre componentes específicos da microvasculatura (ESCALANTE, et al., 2011). Além da atividade hemorrágica, as SVMPs também apresentam atividades fibrinolítica, apoptótica, pró-inflamatória, ativação ou inibição de fatores de coagulação, entre

outras (FOX; SERRANO, 2008; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012; MARKLAND Jr.; SWENSON, 2013).

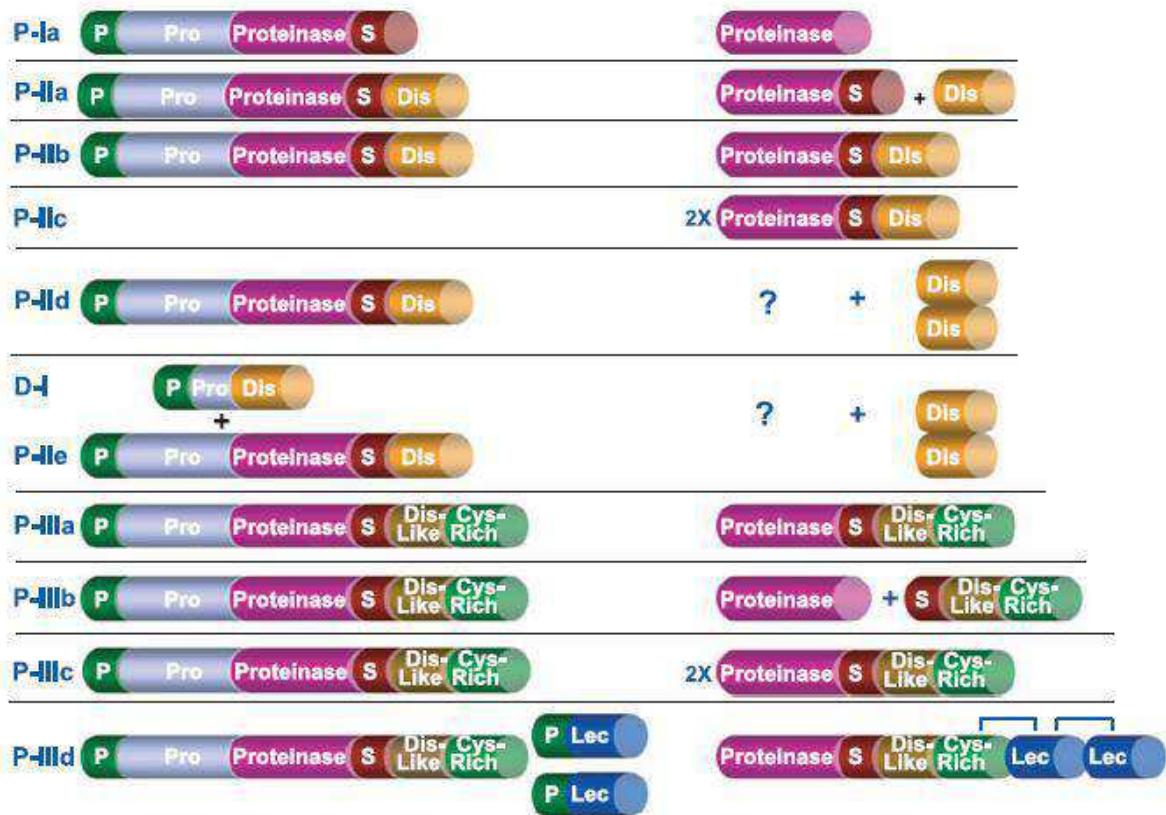


Figura 1.4: Representação esquemática da classificação das SVMPs. À esquerda está representada a origem genômica das subclasses das metaloproteases e à direita a estrutura das proteínas secretadas, indicando as modificações pós-traducionais. Na representação genômica e proteômica os termos indicam: P, peptídeo sinal; Pro, pró-domínio, Proteinase, domínio metaloprotease; S, sequência espaçadora; Dis, domínio desintegrina; Dis-Like, domínio semelhante a desintegrina; Cys-Rich, domínio rico em cisteína; Lec, domínio rico em lectina; (?) processos ainda não identificados. Modificado de Fox, et al. (2008).

Serinoproteases

Serinoproteases são enzimas estruturalmente caracterizadas por um mecanismo catalítico comum que inclui um resíduo de serina altamente reativo, associado a resíduos de histidina e aspartato em seu sítio ativo. Elas apresentam vários resíduos de cisteína, que formam pontes dissulfeto na molécula e, muitas delas, podem ser consideradas glicoproteínas, por apresentarem variados sítios

de glicosilação. Geralmente são proteínas de cadeia única e com massa molecular variando de 26 a 67 kDa, dependendo do conteúdo de carboidratos na molécula. As serinoproteases são consideradas enzimas proteolíticas semelhantes à tripsina, que clivam ligações peptídicas em regiões que contêm resíduos de arginina ou lisina e que são altamente específicas para o substrato (SERRANO; MAROUN, 2005; SERRANO, 2013).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs⁶) são conhecidas como enzimas que afetam a hemostasia. Elas agem sobre a agregação plaquetária, em diversos fatores da cascata de coagulação, nos sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina, causando distúrbios hemostáticos comuns do envenenamento ofídico (Fig. 1.5). Muitas SVSPs que têm atividade fibrinogenolítica semelhante à trombina plasmática, com ação coagulante sobre o fibrinogênio, são classificadas como proteases trombina-símile (ou *thrombin-like*). Algumas serinoproteases podem ter também atividade fibrinolítica ou agir sobre outros fatores da cascata de coagulação, como plaquetas, protrombina, proteína C, fatores V, VIII, XIII e plasminogênio, causando reações pró ou anticoagulante. Existe também um grupo de serinoproteases semelhantes à calicreína (ou *kallikrein-like*). Elas têm ação proteolítica sobre o cininogênio plasmático e promovem liberação de bradicinina, causando redução da pressão sanguínea (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; SERRANO, 2013).

Em virtude desses efeitos, várias SVSPs têm sido estudadas para aplicação em tratamentos e diagnósticos de coagulopatias e doenças cardíacas. Batroxobin é uma *thrombin-like* comercialmente conhecida como Reptilase®, quando originada da peçonha de *B. atrox*, ou Defibrase®, proveniente de *B. moojeni*. Essas serinoproteases são usadas como agente desfibrinogênante em medicamentos antitrombóticos, em testes de quantificação de fibrinogênio plasmático, de desfibrino(ge)nemias e no tratamento de infarto do miocárdio (FUNK, et al., 1971; LATALLO; LOPACIUK, 1973; MARSH; WILLIANS, 2005). A Batroxobin também originou o medicamento Vivostat®, usado como um selante

⁶ SVSPs: sigla do inglês *snake venom serinoproteinases*.

de fibrina em procedimentos cirúrgicos (KJAERGARD, et al., 1997; SERRANO, 2013).

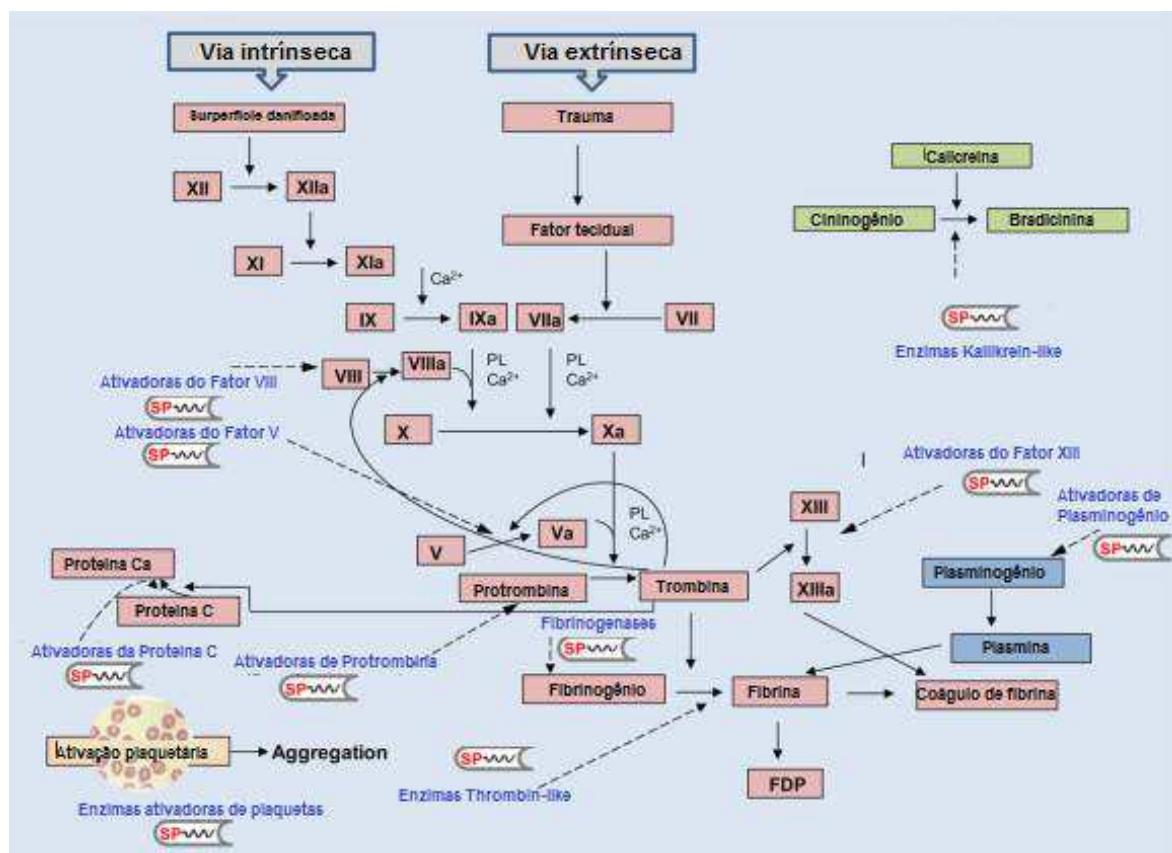


Figura 1.5: Representação esquemática da ação das SVSPs sobre a hemostasia. Os termos delimitados por retângulos representam o sistema hemostático; em rosa os componentes da cascata de coagulação; em azul do sistema de fibrinólise e em verde componentes do sistema calicreína-cinina; os termos escritos em azul apontados com setas descontínuas indicam a ação de serinoproteases isoladas de peconhas ofídicas. Adaptado de SERRANO, 2013.

Fosfolipases A₂

Fosfolipases são proteínas com diferentes ações biológicas relacionadas à hidrólise de fosfolipídios, encontradas em diversos animais, incluindo mamíferos, artrópodes e serpentes. As fosfolipases A₂ (PLA₂)⁷ são enzimas que catalisam a

⁷ PLA₂: abreviação em inglês de phospholipase A₂.

hidrólise específica da ligação 2-acil-éster de fosfolipídios, promovendo a liberação de ácidos graxos, como ácido araquidônico e lisofosfolipídios (**Fig. 1.6**) (DEENEN; VAN; DE HAAS, 1963). Estes são precursores de moléculas sinalizadoras como eicosanoides e fator ativador de plaquetas (PAF), respectivamente, os quais estão relacionados à reação inflamatória. As PLA₂ compõem uma superfamília de enzimas com considerável homologia estrutural classificadas como: secretadas (sPLA₂), citolósicas (cPLA₂), independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), associadas a lipoproteínas e lisossomais. De acordo com características estruturais e gênicas, massa molecular, perfil de pontes dissulfeto, especificidade de substrato fosfolipídico, sequência peptídica, sensibilidade ao Ca²⁺ e atividade catalítica, essas enzimas são distribuídas em vários grupos e subgrupos. (SIX; DENNIS, 2000; KUDO; MURAKAMI, 2002; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; DENNIS, et al., 2011).

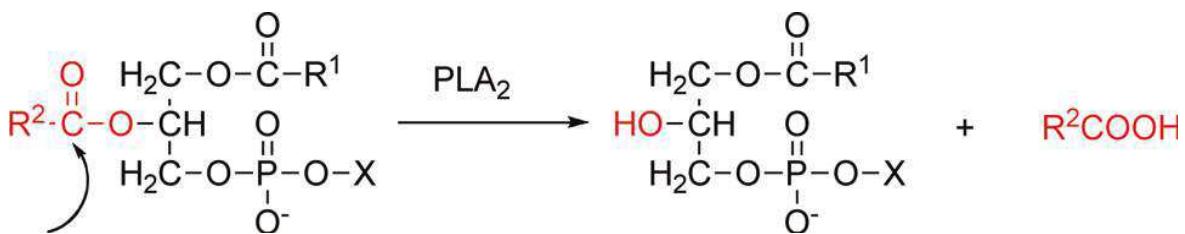


Figura 1.6: representação da ação enzimática de PLA₂: hidrólise de fosfolipídios na ligação 2-acil-éster, com liberação de ácidos graxos. X indica qualquer grupo polar da cabeça do fosfolipídio; R¹ e R² são os radicais de ácidos graxos da molécula. Retirado de DENNIS, et al., 2011.

Na peçonha de serpentes são encontradas sPLA₂ de baixa massa molecular (13-15 kDa) (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). No envenenamento, geralmente, são associadas ao bloqueio da transmissão neuromuscular e à miotoxicidade, que paralisa a presa e promove intensa degeneração tecidual (KINI; EVANS, 1989; WARRELL, 1996; KINI, 2003). As sPLA₂ contêm cerca de 7 pontes dissulfeto em sua estrutura polipeptídica, apresentam resíduo de histidina (His48) no sítio ativo e requerem íons Ca²⁺ como cofator catalítico. A presença do resíduo de aspartato na posição 49 é essencial para a ligação de Ca²⁺ e estabelecimento da função catalítica nas chamadas PLA₂ Asp49 (ARNI; WARD, 1996; MAGRO, et al., 2009). No entanto, algumas sPLA₂ ofídicas podem

apresentar variações do resíduo 49 e conterem o resíduo de lisina em substituição ao aspartato, o que compromete a ligação de Ca^{2+} no catalítico. Consequentemente, as PLA₂ Lys49 são desprovidas de atividade fosfolipásica típica dessa classe de enzimas, mas podem apresentar alta toxicidade, sendo bastante investigadas pela atuação como miotoxinas (OWNBY, et al., 1999; LOMONTE; RANGEL, 2012).

Apesar da similaridade estrutural, as PLA₂ de peçonhas de serpentes exibem grande variedade de efeitos, relacionados ou não à atividade catalítica, como ações neuro e miotóxicas, hemolítica, edematogênica, hiperalgésica, hipotensora, pró-inflamatória, bactericida, anticoagulante e antiplaquetária. A caracterização bioquímica, estrutural e farmacológica das PLA₂ contribui para elucidar a relação entre estrutura e função nessas proteínas, com propósito de compreender o mecanismo de ação dessas enzimas multifuncionais, fundamental para o avanço na terapia antifídica e no desenvolvimento de ferramentas moleculares para estudo de patologias associadas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013).

Referências

- ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, v. 383, p. 787-93, 1996.
- ALESSANDRI, A.L. et al. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 139, p. 189-212, 2013.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ - A structural review. *Toxicon*, v. 34, p. 827-841, 1996.
- ASHLEY, N.T.; WEIL, Z.M.; NELSON, R.J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, v. 43, p. 385-406, 2012.
- BARRINGTON, R. et al. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol. Rev.*, v. 180, p. 5, 2001.
- BAUMANN, H.; GAULDIE J. The acute phase response. *Immunology Today*, v. 15, p. 74-80, 1994.
- BERNARDE, P.S. *Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil*. São Paulo: Anolisbooks, 2014, 224 p.
- BONAVITA, A.G. et al. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by Bothrops jararaca venom in rats. *Toxicon*, v. 47, p. 885-893, 2006.
- CABRAL, G.A. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Science*, v. 77, p. 1699-1710, 2005.
- CALVETE, J.J. The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon*, v. 62, p. 40-49, 2013.

CARDOSO, K.C. et al. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genomics*, v. 11, p. 1-22, 2010.

CHACUR, M. et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, v. 41, p. 667-678, 2003.

CHEN, P. et al. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol.*, v. 169, p. 6408-6416, 2002.

CIDADE, D.A.P. et al. *Bothrops jararaca* venom transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon*, v. 48, p. 437-461, 2006.

CONSOLARO, A. *Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas*. Dental Press: Maringá, 2009.

COSTA H.C.; BÉRNILS R.S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 3, p. 74-84, 2014.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS T. *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6^a ed., 2000, 1252 p.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 129, p. 65-76, 1986.

DEENEN, L.L.M.; VAN, A.Z.; DE HAAS, G.H. The substrate specificity of phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 70, p. 538-553, 1963.

DENNIS, E.A. et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.*, v. 111, p. 6130-6185, 2011.

ESCALANTE, T. et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *Journal of Proteomics*, v. 74, p. 1781-1794, 2011.

FERREIRA, S.H. A Bradykinin-potentiation factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br. J. Pharmacol.*, v. 24, p.163–169, 1965.

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

FOX, J.W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon*, v. 62, p. 75–82, 2013.

FUNK, C. et al. Reptilase-R: a new reagent in blood coagulation. *Br. J. Haematol.*, v. 21, p. 43–52, 1971.

GAY, C. et al. Effect of monospecific antibodies against baltergin in myotoxicity induced by *Bothrops alternatus* venom from northeast of Argentina. Role of metalloproteinases in muscle damage. *Toxicon*, v. 63, p. 104-111, 2013.

GILROY, D.W. Eicosanoids and the endogenous control of acute inflammatory resolution. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 42, p. 524–528, 2010.

GOMES, M.S.R. et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 53, p. 24–32, 2009.

GREGORY, C.D. et al. Leukocyte migratory responses to apoptosis: the attraction and the distraction. *Cell Adh Migr.*, v. 5, p. 293–297, 2011.

GUTIERREZ, J.M. et al. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, v. 33, p. 19-29, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, v. 72, p. 165–182, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 958–975, 2009a.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? *Toxicon*, v. 55, p. 166–170, 2010.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE B. Phospholipases A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon*, v. 62, p. 27–39, 2013.

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

HOFSTRA, C.L. et al. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 305, p. 1212–1221, 2003.

HUANG, J.F.; THURMOND, R.L. The new biology of histamine receptors. *Curr. Allergy. Asthma. Rep.*, v. 8, p. 21–27, 2008.

KAMIGUTI, A. S. et al. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 34, p. 627–642, 1996.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med.*, v. 11, p. 218, 2008.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*, v. 42, p. 827–840, 2003.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon*, v. 27, p. 613–635, 1989.

KINI, R.M.; FOX J.W. Milestones and future prospects in snake venom research. *Toxicon*, v. 62, p. 1-2, 2013.

KJAERGARD, H.K. et al. The Vivostat System for the automated preparation of autologous fibrin sealant. *Cardiovasc. Eng.*, v. 2, p. 204–206, 1997.

KUBES, P. Introduction: the complexities of leukocyte recruitment. *Semin Immunol.*, v. 14, p. 65–72, 2002.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipases A₂ enzymes. *Prostaglandins other lipid mediators*, v. 69, p. 3-58, 2002.

LAINES, J. et al. Toxicity of *Bothrops* sp snake venoms from Ecuador and preclinical assessment of the neutralizing efficacy of a polyspecific antivenom from Costa Rica. *Toxicon*, v. 88, p. 34-37, 2014.

LATALLO, Z.S.; LOPACIUK, S. New approach to thrombolytic therapy: the use of Defibrase in connection with streptokinase. *Thromb Diath Haemorrh Suppl.*, v. 56, p. 253–264, 1973.

LOMONTE, B.; RANGEL J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicol.*, v. 60, p. 520–530, 2012.

LOPES, D.S. et al. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon*, v. 54, p. 42–49, 2009.

MADERNA, P.E.; GODSON, C. Taking insult from injury: lipoxins and lipoxin receptor agonists and phagocytosis of apoptotic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 73, p. 179–187, 2005.

MAGRO, A.J. et al. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venoms. *Protein Pept Lett.*, v. 16, p. 852-859, 2009.

MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, tissues and diseases: Principles of general pathology*. Oxford: New York, 2^a ed., 2004, 1005p.

MAJNO, G. *The Healing Hand - Man and wound in the ancient world*. Harvard University Press: Cambridge, 1975.

MAMEDE, C.C.N. et al. Histological and Ultrastructural Analyses of Muscle Damage Induced by a Myotoxin Isolated from *Bothrops alternatus* Snake Venom. *Protein & Peptide Letters*, v. 20, p. 192-199, 2013.

MARKLAND Jr., F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 3–18, 2013.

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

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

MCCLEARY, R.J.R.; KINI R.M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon*, v. 62, p. 56–74, 2013.

MEDZHITOY, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, v. 140, p. 771–776, 2010.

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M. *Patologia: processos gerais*. São Paulo : Atheneu, 4^a ed., 2004, 320p.

MORAIS, N.C.G. et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Toxicon*, v. 60, p. 1251–1258, 2012.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon*, v. 60, p. 12-20, 2012.

MOURA-DA-SILVA, A.M. et al. Diversity of metalloproteinases in *Bothrops neuwiedi* snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. *BMC Genetics*, v. 12, p. 1-14, 2011.

MURAKAMI, M.; KUDO I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A₂s. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 525, p. 87, 2003.

MURPHY, R.C.; GIJÓN, M.A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J.*, v. 406, p. 527, 2007.

NASCIMENTO, N. G. et al. Contribution of mast cells to the edema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*, v. 55, p. 343–352, 2010.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. *Cell*, v. 140, p. 871–882, 2010.

NEIVA, M. et al. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon*, v. 53, p. 427–436, 2009.

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

OHLER, M. et al. The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. *Journal of Proteome Research.*, v. 9, p. 2422–2437, 2010.

OWNBY, C.L. et al. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon*, v. 37, p. 411-445, 1999.

QUEIROZ, G.P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*, v. 52, p. 842–851, 2008.

QUEIRÓZ, L.S.; MARQUES, M.J.; SANTO NETO, H. Acute local nerve lesions induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, v. 40, p. 1483–1486, 2002.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 142, p. 328–346, 2006.

RANG, H.P. et al. *Rang e Dale Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 6^a ed., 2007, 808 p.

READ, M.S.; SHERMER, R.W.; BRINKHOUS, K.M. Venom coagglutinin, activator of platelet-aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v. 75, p. 4514–4518, 1978.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. *Patologia: bases patológicas das doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier, 8^a ed., 2010, 1480 p..

ROWLEY, A.F. The evolution of inflammatory mediators. *Med. Inflamm.*, v. 5, p. 3–13, 1996.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

SCHIMD-SCHONBEIN, G.W. Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 8, p. 93-131, 2006.

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

SERRANO S.M.T. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 19–26, 2013.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, v. 18, p. 385-405, 2004.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, v. 1488, p.1-19, 2000.

SOEHNLEIN, O.; LINDBON, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 10, p. 427–39, 2010.

STRAUS, D.S.; GLASS, C.K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.*, v. 21, p.185–210, 2001.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1824, p. 164–176, 2012.

TASHIMA, A.K. et al. Snake venomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. *J Proteomics*, v. 71, p. 473-485, 2008.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon*, v. 42, p. 947–962, 2003.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve*, v. 28, p. 449–459, 2003a.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. v. 54, p. 988–997, 2009.

TRACY, R.P. The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor ... and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, *De medicina*, c. A.D. 25). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, v. 61, p. 1051–1052, 2006.

TU, A.T. Overview of snake venomchemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 391, p. 37-62, 1996.

USAMI, Y. et al. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 928–932, 1993.

WANDERLEY, C.W.S. et al. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. *Toxicon*, v. 90, p. 134-147, 2014.

WARRELL, D.A. *Clinical features of envenoming by snake bites: Envenomings and Their Treatments*. Lyon: Fondation Marcel Mérieux, 1996.

WARRELL, D.A. Snake bite. *The Lancet.*, v. 375, p. 77–88, 2010.

ZYCHAR, B.C. et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*, v. 55. p. 227-234, 2010.

Capítulo II

Efeitos inflamatórios locais induzidos por toxinas botrópicas

Resumo

O envenenamento botrópico é caracterizado por graves danos locais, desencadeados pela toxicidade dos componentes da peçonha e agravados pela consequente inflamação induzida. Apesar da baixa letalidade, as patologias decorrentes deste acidente ofídico são consideradas relevantes problemas de saúde pública, podendo levar a alterações físicas permanentes e incapacitantes nas vítimas. Por isso, este trabalho avaliou os efeitos inflamatórios locais causados por várias toxinas botrópicas. O edema, a hiperalgesia e a mionecrose foram avaliados pela injeção intraplantar ou intramuscular de 50 µg de diferentes proteínas e peçonhas de origem botrópica na pata de animais experimentais. Para verificar a contribuição dos diferentes componentes da peçonha nestes efeitos, a ação de proteínas isoladas foi comparada à da correspondente peçonha botrópica. A caracterização farmacológica da reação inflamatória induzida por algumas toxinas também foi avaliada. Com relação às toxinas avaliadas, as metaloproteases da classe P-I foram as que induziram efeitos edematógeno e hiperalgésico mais significativos. A ação inflamatória dessas proteínas é mediada, principalmente, por eicosanoides e histamina. As metaloproteases também contribuem para o efeito miotóxico das peçonhas de *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. pauloensis*. A mionecrose induzida por essas peçonhas apresenta alterações histológicas similares, caracterizadas pela intensa degeneração das fibras musculares, focos hemorrágicos em algumas regiões do tecido e presença de infiltrado inflamatório. Assim, como as metaloproteases, as serinoproteases e as fosfolipases A₂ também participam do efeito miotóxico induzido pelas peçonhas botrópicas de origem. Nossos resultados indicam a efetiva contribuição das metaloproteases na indução de edema, hiperalgesia ou mionecrose e a relativa participação de serinoproteases e fosfolipases A₂ na reação inflamatória local das peçonhas botrópicas.

Palavras-chave: *Botrhops*, edema, hiperalgesia, mionecrose

Introdução

No Brasil, mais de 70% dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* (BRASIL, 2009). Nestes acidentes, a inflamação local marcante é evidenciada pelo desenvolvimento de edema, mionecrose, dor e hemorragia (TEIXEIRA, et al., 1994; CARDOSO, et al., 2003; BERNARDE, 2014). Apesar da baixa mortalidade causada pelo envenenamento botrópico, os danos locais são severos e podem provocar sequelas graves e permanentes, decorrente da rápida ação da peçonha e ineficácia do tratamento (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARREL, 2006; GUTIÉRREZ, et al., 2009; ISBISTER, et al., 2009; QUEIROZ, et al., 2008). A ação proteolítica e citotóxica de componentes da peçonha, associada à inflamação desencadeada, podem contribuir para o agravamento dos efeitos locais do acidente ofídico (BONAVITA, et al., 2006; TEIXEIRA, et al., 2009; NASCIMENTO, et al., 2010; ZYCHAR, et al., 2010).

A inflamação, definida como uma reação imunobiológica a lesões e agentes nocivos, é um mecanismo fisiopatológico relevante para o progresso da lesão tecidual induzida pelo envenenamento ofídico (VORONOV; APTE; SOLER, 1999; MAJNO; JORIS, 2004). O reconhecimento inicial da resposta inflamatória leva a produção e/ou liberação de diversos mediadores químicos e culmina na ativação e recrutamento de células de defesa para contenção da infecção ou do dano tecidual (GRANGER; KUBES, 1994). Através de diferentes mecanismos de ação, as toxinas ofídicas podem provocar lesão tecidual e induzir reação inflamatória local e sistêmica (TEIXEIRA, et al., 2003; MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007; OLIVO, et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2010; ZYCHAR, et al., 2010 WANDERLEY, et al., 2014). A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, mecanismos primários do processo inflamatório que levam a formação de edema, dependem da ativação de mediadores específicos, como histamina e eicosanoides. Com o extravasamento plasmático ocorre a ativação de maior quantidade de mediadores, bem como a liberação de fatores de coagulação e fibrinolíticos, componentes do sistema complemento e citocinas, além da indução de migração de células de defesa. A ativação de mastócitos, por exemplo, favorece a liberação de histamina, um dos principais mediadores

vasoativos, o que intensifica a formação de edema no local da lesão (HOFSTRA, et al., 2003).

As toxinas ofídicas e outros estímulos lesivos também promovem a liberação de substâncias que agem sobre as fibras nervosas no local da inflamação (MCMAHON, CAFFERTY; MARCHAND, 2005). A percepção dolorosa aumentada em resposta à hipersensibilização de nociceptores por substâncias tóxicas ou mediadores inflamatórios é denominada hiperalgesia (HADDAD, 2007). A bradicinina é considerada um dos mediadores mais importantes da hiperalgesia. Os neurônios sensitivos apresentam receptores B₂ para bradicinina, cuja estimulação desencadeia aumento da permeabilidade a sódio e cálcio, com consequente ativação de fibras nervosas, liberação de neuropeptídeos, além da produção de ácido araquidônico e eicosanoides (DRAY, 1995). A bradicinina, ainda, pode ativar células endoteliais que produzem óxido nítrico (NO), podendo também contribuir na formação de edema (BUSCONI; MICHEL, 1993, BARBOSA, et al., 2003). Histamina, serotonina, adrenalina, citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF α), eicosanoides, e óxido nítrico (NO) também estão envolvidos na nocicepção. Estudos experimentais evidenciaram que o efeito hiperalgésico induzido por peçonhas ofídicas é mediado, principalmente, por eicosanoides e bradicinina (TEIXEIRA, et al., 1994; CHACUR, et al., 2001; CHACUR, et al., 2003).

O agravamento dos danos provocados pela ação das toxinas ofídicas associado à persistência do processo inflamatório pode fazer o quadro local evoluir para necrose e, muitas vezes, determinar a perda do membro afetado (CARDOSO, et al., 2003; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARREL, 2006). A necrose é um processo patológico de morte celular, caracterizado pela perda, parcial ou completa, da arquitetura e funcionalidade tecidual (MONTENEGRO; FRANCO, 2004). Nos acidentes ofídicos a necrose pode ocorrer por diferentes mecanismos. A necrose muscular (mionecrose), por exemplo, é causada pela ação direta de fosfolipases A₂ miotóxicas sobre a membrana das células musculares, pelas alterações vasculares ocasionadas por metaloproteases ou por proteínas miotóxicas que interferem no controle iônico dessas fibras (HARRIS, 2003; GUTIÉRREZ, et al., 2009). Outra característica deste processo é a presença de infiltrado leucocitário no local da lesão. Os leucócitos ativados

liberam mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanoides, que amplificam o recrutamento de células fagocíticas e contribui para o processo de necrose (VORONOV; APTE; SOLER, 1999). O componente celular deste processo é representado, primordialmente, por leucócitos mono ou polimorfonucleados. Nos estágios iniciais, a célula fagocítica predominante é o neutrófilo, responsável pela eliminação de agentes lesivos. Os macrófagos são observados em fases mais tardias e crônicas da inflamação, estando associados à fagocitose de restos celulares e de reparo e regeneração tecidual da área inflamada (ZAMUNER, et al., 2005; TEIXEIRA, et al., 2009).

Existem diversos métodos experimentais empregados no estudo da inflamação, muitos deles utilizados para a investigação do efeito inflamatório induzido pelas peçonhas ofídicas. Por exemplo, as análises bioquímica e farmacológica do exsudato inflamatório, do edema e da hiperalgesia induzidos pelas peçonhas botrópicas, permitem inferir o tipo de mediadores e células inflamatórias predominantes nesses eventos (CHACUR, et al., 2001; FARIA, et al., 2001; CHACUR, et al., 2002; BARBOSA, et al., 2003; TEIXEIRA, et al., 2009; NASCIMENTO, et al., 2010; GUIMARAES-SOUZA, et al., 2012; MOREIRA, et al., 2012). A análise dos efeitos provocados pela peçonha bruta ou por proteínas isoladas elucida o papel das diferentes toxinas ofídicas na indução da reação inflamatória (CHACUR, et al., 2003; TEIXEIRA, et al., 2003; ZULIANI, et al., 2005; MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007; LOPES, et al., 2009; ZYCHAR, et al., 2010).

A ação tóxica dos diversos componentes das peçonhas ofídicas pode provocar danos teciduais que levam a ativação de diferentes células e mediadores inflamatórios. O envenenamento botrópico é caracterizado por graves danos locais, desencadeados pela citotoxicidade de componentes da peçonha e agravados pela consequente inflamação induzida (CHACUR, et al., 2001; TEIXEIRA, et al., 2005; BONAVITA, et al., 2006; NASCIMENTO, et al., 2010; ZYCHAR, et al., 2010). A investigação da reação inflamatória, induzida pelas toxinas ofídicas, permite a caracterização dos mecanismos farmacológicos e fisiopatológicos envolvidos em danos teciduais ocasionados pelas peçonhas de serpentes. A **tabela 2.1** apresenta a caracterização dos principais efeitos

inflamatórios locais induzidos por serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*, estudadas nos últimos 10 anos.

Tabela 2.1: Efeitos inflamatórios locais induzidos por peçonhas botrópicas.

Serpente ¹	Efeitos locais da peçonha ²	Referências
<i>B. alternatus</i>	Mionecrose com infiltrado leucocitário e hemorragia	Mamede, et al., 2013
<i>B. atrox</i>	Inflamação aguda Mionecrose com infiltrado leucocitário, hemorragia e edema celular	Escocard, et al., 2006; Moreira, et al., 2012
<i>B. itapetiningae</i>	Edema intraplantar (30% em 1h) Mionecrose com infiltrado leucocitário, hemorragia e degeneração gordurosa	Oliveira Jr., et al., 2012
<i>B. jararaca</i>	Edema intraplantar (80% em 2h) Hiperalgesia (40% em 2h) Mionecrose com presença de infiltrado leucocitário e hemorragia	Zychar, et al., 2010; Silva, et al., 2012; Patrão-Neto, et al., 2013
<i>B. jararacussu</i>	Edema intraplantar (75 - 150% em 1h) Hiperalgesia (80% em 3h) Mionecrose com infiltrado leucocitário e edema	Souza, et al., 2011; Patrão-Neto, et al., 2013; Wanderley, et al., 2014
<i>B. leucurus</i>	Edema intraplantar (25% em 1h) Mionecrose com presença de infiltrado leucocitário e hemorragia	Gomes, et al., 2011; Nunes, et al., 2011
<i>B. marajoensis</i>	Mionecrose discreta com edema intercelular	Cavalcante, et al., 2011
<i>B. moojeni</i>	Edema intraplantar (80 - 150% em 1h) Mionecrose com presença de infiltrado leucocitário e hemorragia	Nascimento, et al., 2010; Nadur-Andrade, et al., 2012; Queiroz, et al., 2014
<i>B. neuwiedi</i>	Edema intraplantar Mionecrose com infiltrado leucocitário e hemorragia e edema celular	Reis, et al., 2014
<i>B. pauloensis</i>	Edema inflamatório (75 - 80% em 1h) Mionecrose com infiltrado leucocitário	Rodrigues, et al., 2007; Oliveira, et al., 2009

¹Espécies de serpentes identificadas no Brasil, conforme listagem da Sociedade Brasileira de Herpetologia (Costa, et al., 2014). ²Efeitos inflamatórios locais induzidos por peçonhas botrópicas em cobaias.

Vários estudos com toxinas isoladas de peçonhas botrópicas abordam as manifestações locais e sistêmicas dos acidentes com serpentes. No entanto, a compreensão da reação inflamatória desencadeada pelo envenenamento ofídico ainda é fragmentada e complexa. Além disso, a variabilidade da composição das peçonhas pode contribuir para a diferenciação dos efeitos e dos mecanismos inflamatórios. As metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs), por exemplo, podem causar a proteólise de componentes vasculares, contribuindo com eventos exsudativos e hemorrágicos do envenenamento (FOX; SERRANO, 2008; MARKLAND Jr; SWENSON, 2013). Os domínios desintegrina e cisteína adicionais destas proteases podem ativar células e vias inflamatórias específicas (TEIXEIRA, et al., 2005; LOPES, et al., 2009; ZYCHAR, et al., 2010). Por outro lado, as serinoproteases (SVSPs) pouco contribuem para a reação inflamatória local induzida por peçonhas botrópicas, mas têm sido amplamente investigadas por causarem distúrbios de coagulação e outras alterações sistêmicas relacionadas à hemostasia (SARAVIA-OTTEN, et al., 2004; MENALDO, et al., 2013). As fosfolipases A₂ (PLA₂) são importantes agentes miotóxicos da peçonha botrópica e sua toxicidade pode estar associada à ação direta sobre fosfolipídios de membrana, com consequente dano tecidual, ativação de nociceptores e de vários mediadores inflamatórios (CHACUR, et al., 2003; TEIXEIRA, et al., 2003; SERRANO, et al., 2005; ZYCHAR, et al., 2010, DENNIS, et al., 2011). A **tabela 2.2** apresenta um levantamento de características e efeitos de diversas proteínas isoladas de peçonhas de *B. alternatus* e *B. moojeni*, duas serpentes de relevância epidemiológica no Brasil.

Tabela 2.2: Classificação e efeitos de metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases A₂ isoladas de peçonhas de *B. alternatus* e *B. moojeni* nos últimos 10 anos.

Toxinas botrópicas	Características/Efeitos	Referência
Metaloproteases		
<i>B. alternatus</i>	Baltergin	Classe P-III, 55 kDa, proteolítica, hemorrágica, edematogênica e miotóxica
	BaltMP-I/II	Classe P-I, 29/36 kDa, proteolíticas e anticoagulantes

	BmooMP α -I	Classe P-I, 24,5 kDa, proteolítica, antitrombótica e anticoagulante	Bernardes, et al., 2008
	BthMP	Classe P-I, 23,5 kDa, proteolítica, pouco hemorrágica, antitrombótica, anticoagulante, edematogênica e miotóxica	Gomes, et al., 2009
<i>B. moojeni</i>	BmooFIBMP-I	Classe P-I, ~23 kDa, proteolítica, não hemorrágica	Torres, et al., 2012
	Moojenin	Classe P-III, proteolítica, não hemorrágica, coagulante, anticoagulante, miotóxica, não edematogênica, não hiperalgésica	Morais, et al., 2012
	BmooMP α -II	Classe P-I, 22,5 kDa, proteolítica, não hemorrágica, antiplaquetária e miotóxica	Queiroz, et al., 2014
	Serinoproteases		
<i>B. alternatus</i>	Bhalternin	<i>Thrombin-like</i> , 31,5 kDa, proteolítica e miotóxica	Costa, et al., 2010
	SPBA	32 kDa, proteolítica	Oliveira, et al., 2013
<i>B. moojeni</i>	BMIB32/35	<i>Thrombin-like</i> , 32/35 kDa, proteolíticas, coagulantes e anticoagulantes	Oliveira, et al., 2013
Fosfolipases A₂			
<i>B. alternatus</i>	BaTX	Subgrupo Lys49 básica, ~14 kDa, não enzimática, citotóxica, edematogênica e miotóxica	Ponce-Soto, et al., 2007
	Ba SpII RP4	Subgrupo Asp49 ácida, ~14 kDa, fosfolipásica, ematogênica e anticoagulante, não miotóxica	Garcia Denegri, et al., 2010
	Myotoxin	Subgrupo Lys49, 15 kDa, não enzimática e miotóxica	Mamede, et al., 2013
	BaltTX-I	Subgrupo Lys49, ~14,5 kDa, não enzimática e miotóxica	Setúbal, et al., 2013
	BaltTX-II	Subgrupo Asp49, ~14,5 kDa, fosfolipásica e miotóxica	Setúbal, et al., 2013
<i>B. moojeni</i>	BmTX-I	Subgrupo Asp49 básica, ~14 kDa, fosfolipásica, edematogênica e miotóxica	Calgarotto, et al., 2008
	BmooTX-I	Subgrupo Asp49 ácida, 15 kDa, fosfolipásica, antiplaquetária e miotóxica	Santos-Filho, et al., 2008

MjTX-III/IV	Subgrupo Lys49, 14,6 kDa, não enzimáticas, citotóxicas	Perchuc, et al., 2010
BmooMtx	Subgrupo Lys49, 16,5 kDa, não enzimática, citotóxica, edematogênica, hiperalgésica e miotóxica	Queiroz, et al., 2011
BthA-I	Subgrupo Asp49 ácida, 13,6 kDa, fosfolipásica, anticoagulante, antiplaquetária, hipotensora, bactericida, citotóxica, edematogênica e miotóxica	Silveira, et al., 2012

A compreensão dos efeitos inflamatórios causados por toxinas ofídicas, ainda, é limitada. Em consequência, a neutralização dos danos locais do envenenamento botrópico continua ineficiente (QUEIROZ, et al., 2008; ISBISTER, et al., 2009; GUTIÉRREZ, et al., 2010; GUTIÉRREZ, 2012). Por isso, observações detalhadas do processo inflamatório são necessárias para entender a heterogeneidade dos efeitos provocados pelas toxinas ofídicas. Um estudo comparativo, além de contribuir para a caracterização patológica dos acidentes botrópicos, favorece a integração dos múltiplos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na gênese dos danos locais do envenenamento botrópico. Como os componentes da peçonha estimulam diversos mecanismos e vias inflamatórias, as proteínas isoladas podem servir como ferramentas moleculares para o estudo da inflamação provocada pelo envenenamento. Além de servirem como modelos para investigar e propor medidas terapêuticas alternativas no controle e eliminação dos agravos teciduais do acidente ofídico e de outras condições patológicas similares.

Neste contexto, este trabalho avaliou os efeitos edematogênico, hiperalgésico e miotóxico causados por várias toxinas botrópicas. Para verificar a contribuição dos diferentes componentes da peçonha nestes efeitos, a ação de proteínas isoladas foi comparada à da peçonha bruta. A caracterização farmacológica da reação inflamatória induzida por algumas toxinas também foi investigada.

Material e Métodos

Toxinas botrópicas

As peçonhas das serpentes *B. alternatus* e *B. moojeni* foram adquiridas do Serpentário Bioagents (Batatais-SP). BaltMTX, BaG2P5, Bhalternin, Moozincina, Bmoo-Agg, Moojenin e BmooMP α -II são proteínas isoladas destas peçonhas e fornecidas, respectivamente, pelos pesquisadores Déborah F. C. Pereira, Tamires S. Paschoal, Júnia O. Costa, Kelly C. Fonseca, Bruna B. Sousa, Nadia C. G. Moraes e Mayara R. Queiroz do Laboratório de Biologia Molecular e Celular/Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

BleucMP e Bothropoidin são metaloproteases isoladas de *B. leucurus* e *B. pauloensis*, respectivamente, fornecidas pelos pesquisadores Mário Sergio Rocha Gomes e Veridiana Rodrigues de Melo do Laboratório de Química de Proteínas/UFU. As proteínas, BmooTX-I, uma fosfolipase A₂ de *B. moojeni*; BpirMP e BpirSP27/41, proteases de *B. pirajai*, foram fornecidas, respectivamente, pelos pesquisadores Norival A. Santos-Filho, Carolina P. Bernardes e Danilo L. Menaldo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (USP).

A concentração proteica de todas as toxinas foi determinada de acordo com o método de microbiureto, descrito por Itzhaki e Gill (1964). As amostras foram conservadas liofilizadas em -20°C e dissolvidas em salina estéril no momento do uso.

Avaliação de efeitos inflamatórios locais

A atividade inflamatória local das toxinas botrópicas foi avaliada com base no efeito edemato-gênico, hiperalgésico e miotóxico induzidos em animais experimentais.

Os testes *in vivo* foram feitos com 3 animais por grupo, ratos Wistar ou camundongos Swiss, seguindo os parâmetros aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFU (protocolo CEUA/UFU - 108/12). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CEBEA/UFU). Durante os experimentos, os animais foram mantidos em

condições controladas de temperatura, umidade e iluminação, com livre acesso a ração e água. Ao final, eles foram sacrificados com overdose anestésica (0,05 mL/kg cetamina/xilasina®) e deslocamento cervical.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), associada ao teste a posteriori de Bonferroni para comparar a diferença entre os grupos. O nível de significância considerado para os testes estatísticos foi de $p<0,05$.

Atividade edemato-gênica e hiperalgésica

A formação de edema e a reação hiperalgésica foram avaliadas, concomitantemente, através da injeção intraplantar (i.pl.) das toxinas botrópicas em animais experimentais. Cerca de 50 µg/100µL das diferentes toxinas foram injetadas na pata traseira direita de ratos machos adultos Wistar (200 ± 5 g) e igual volume de salina estéril foi injetado na pata contralateral para controle. Para verificar a formação de edema, a alteração do volume da pata dos animais foi registrado por pletismografia (VAN ARMAN, et al., 1965). O pletismômetro (Ugo Basile, Itália) foi utilizado para registrar o volume (mL) de líquido deslocado com a imersão da pata posterior dos ratos, até a articulação tíbio-tarsal, no sistema de vasos comunicantes do aparelho, como ilustrado na **figura 2.1A**. O efeito hiperalgésico foi determinado pelo teste de pressão da pata, realizado de acordo com o método descrito por Randall e Sellito (1957). Neste teste, foi utilizado o aparelho analgesímetro (Insight, Brasil), que ao comando de um operador aplica sobre a região plantar da pata dos animais uma força contínua de magnitude crescente (20 g/s), até que o animal apresente uma reação de retirada do membro. O limiar nociceptivo do animal, neste modelo, é representado como a força (g) necessária para indução desta reação (**Fig. 2.1B**). Os animais foram condicionados aos aparelhos um dia antes da realização dos testes, para minimizar o estresse e as variações comportamentais. O volume e o limiar nociceptivo de ambas as patas foi medido antes e em diferentes períodos após a inoculação das toxinas. O percentual de aumento do volume da pata (edema) ou da sensibilidade dolorosa (hiperalgesia) dos animais foram obtidos pela diferença

das medidas de ambas as patas em relação aos valores iniciais, anteriores à injeção das toxinas ou da solução controle.

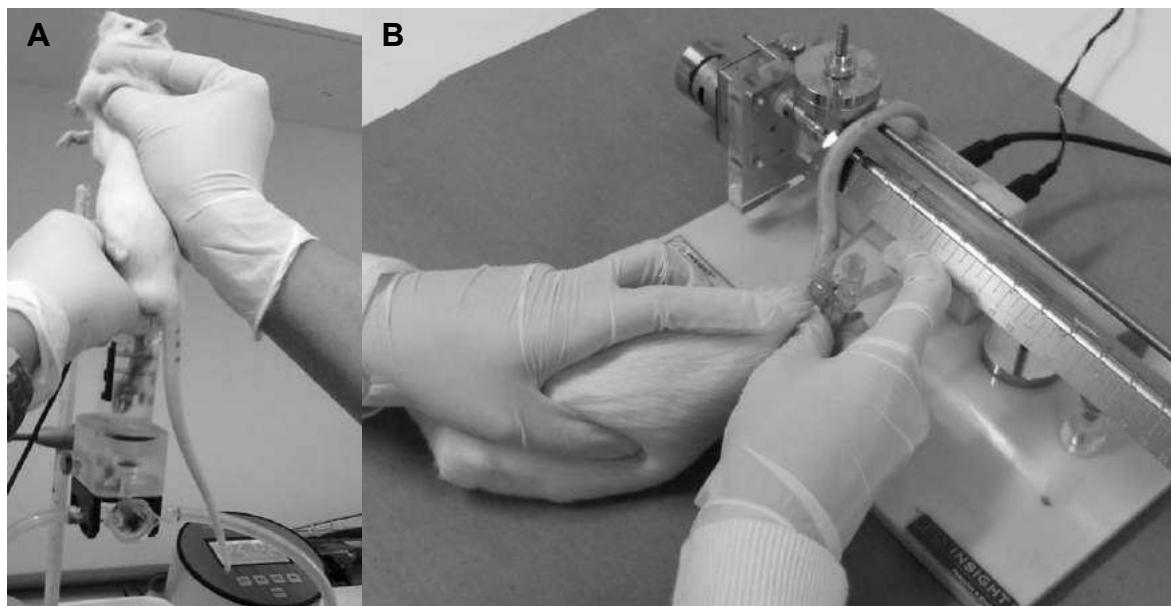


Figura 2.1: Métodos de avaliação de formação de edema e reação hiperalgésica na pata de ratos. **A:** medida do volume da pata do animal utilizando o aparelho pleismômetro; **B:** identificação do limiar nociceptivo do animal por teste de pressão na pata.

Para caracterização dos mecanismos inflamatórios envolvidos na ação edemato-gênica e hiperalgésica das toxinas botrópicas foram realizados diversos tratamentos farmacológicos. Grupos de animais foram pré-tratados com medicamentos antagonistas ou inibidores seletivos dos seguintes mediadores inflamatórios:

- Derivados do ácido araquidônico - prostaglandinas/tromboxanos/leucotrienos: dexametasona (5 mg/kg), um inibidor de fosfolipases A2 endógenas, dissolvido em salina estéril e administrado via intraperitoneal (i.p.) 60 minutos antes das toxinas; indometacina (8 mg/kg), inibidor de ciclooxigenases, dissolvido em tampão tris(hidroximetil)aminometano (TRIS, 1,0 M, pH 8,0) e; ácido nordihidroguaiarético (100 mg/kg), dissolvido em solução de salina estéril e etanol (1:3), ambos injetados i.p. 30 minutos antes das toxinas.
- Histamina: prometazina (15 mg/kg), antagonista de receptor H₁ de histamina, dissolvido em salina estéril e injetado i.p. 30 minutos antes das toxinas;

- Bradicinina: D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-D-Tic-Oic-Arg (HOE-140 - 10 µg/pata), antagonista de receptores BK₂ de bradicinina, dissolvido em salina estéril e administrado via intraplantar (i.pl.) simultaneamente às toxinas e;
- Óxido nítrico: NG-monomethyl-L-arginine acetate (L-NMMA - 100 µg/pata), inibidor da enzima óxido nítrico sintase, ambos dissolvido em salina estéril e injetado i.pl. junto com as toxinas.

Uma vez que os mediadores avaliados também estão envolvidos na gênese da inflamação local induzida por carragenina, um polissacarídeo pró-inflamatório, este agente lesivo foi empregado como controle positivo para determinação da dose e eficácia das drogas usadas (Van Arman, et al., 1965; Chacur, et al., 2001). Após os tratamentos, o aumento do volume da pata e da sensibilidade dolorosa dos animais foi monitorado conforme descrito anteriormente.

Atividade miotóxica

A miotoxicidade induzida pelas toxinas botrópicas foi avaliada com base nas alterações morfológicas provocadas no músculo esquelético de animais experimentais. Cerca de 50 µg/50µL das diferentes toxinas foram injetadas no músculo gastrocnêmico direito de camundongos machos adultos (20 ± 5 g). O grupo controle recebeu o mesmo volume de solução salina no músculo da pata contralateral. Após 24 horas, os animais foram sacrificados para retirada do músculo, que foi armazenado em solução fixadora por 48 horas (10% formaldeído em tampão fosfato-salino). O tecido foi desidratado em soluções de concentrações crescentes de etanol e posteriormente incluído em parafina. O material foi cortado em secções de 5 µm de espessura e corado com hematoxilina e eosina para análise em lâmina histológica por microscopia ótica. Este procedimento foi realizado com a colaboração do Dr. Marcelo Emílio Beletti, pesquisador do Laboratório de Histologia da UFU.

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo dos efeitos inflamatórios locais induzidos por várias toxinas botrópicas. Diferentes proteases e PLA₂ isoladas de peçonhas botrópicas foram avaliadas quanto à indução de edema, hiperalgesia ou mionecrose. A **tabela 2.3** resume as principais propriedades estruturais e funcionais destas proteínas, que foram purificadas e identificadas conforme descrito nos trabalhos referenciados. A mionecrose provocada pelas peçonhas das serpentes *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. pauloensis* também foi investigada e correlacionada à ação das proteínas isoladas. A caracterização desses efeitos contribuiu para a identificação da variabilidade e da intensidade da ação local de diversas toxinas botrópicas. Além de demonstrar o envolvimento de diferentes proteínas da peçonha na patogênese de manifestações locais típicas do envenenamento botrópico.

Tabela 2.3: Proteínas isoladas de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*.

Toxinas	Características e efeitos	Referência
<i>B. alternatus</i> (Balt)		
Bhalternin	SVSP, <i>thrombin-like</i> , 31,5 kDa, proteolítica e miotóxica	Costa, et al., 2010
BaltMTX	PLA ₂ , Lys49, 15 kDa, ácida, miotóxica, antiplaquetária e bactericida	Mamede, et al., 2013; Pereira, 2015
BaG2P5	PLA ₂ , Asp49, 14 kDa, ácida, fosfolipásica, miotóxica e antiplaquetária	Paschoal, 2015
<i>B. leucurus</i> (Bleuc)		
BleucMP	SVMP, P-I, 23 kDa, proteolítica, anticoagulante, miotóxica e edematógena	Gomes, et al., 2011
<i>B. moojeni</i> (Bmoo)		
Moozincina	SVMP, P-I, 28 kDa, fibrinogenolítica, miotóxica, edematógena e hiperalgésica	Mamede, 2011
BmooPa-II	SVMP, P-I, 22,5 kDa, fibrinogenolítica, miotóxica, antiplaquetária	Queiroz, et al., 2014
Bmoo-Agg	SVMP, P-IIIb, 32 kDa, antiplaquetária	Sousa, 2013

Moojenin	SVMP, P-IIIb, 45 kDa, fibrinogenolítica, miotóxica, anticoagulante	Morais, et al., 2012
BmooTx-I	PLA ₂ , Asp49, 14 kDa, ácida, fosfolipásica, miotóxica, edematogênica e antiplaquetária	Santos-Filho, et al., 2008
<i>B. pauloensis</i> (Bpaul)		
Bothropoidin	SVMP, P-III, 49,5 kDa, ácida, proteolítica, hemorrágica e antiplaquetária	Gomes, et al., 2015
<i>B. pirajai</i>		
BpirMP	SVMP, P-I, 23,1 kDa, fibrino(geno)lítica e pouco hemorrágica	Bernardes, et al., 2013
BpirSP27/41	SVSPs, ácidas, 27-41 kDa, fibrino(geno)líticas, edematogênicas e hiperalgésicas	Menaldo, et al., 2012; Menaldo, et al., 2013

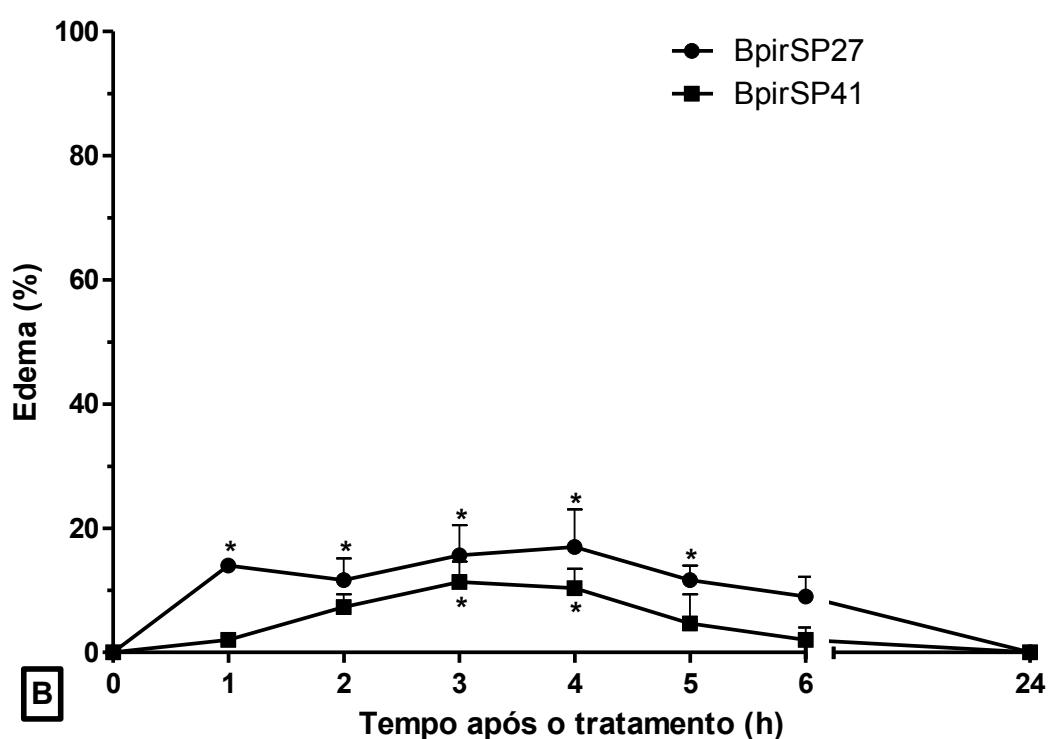
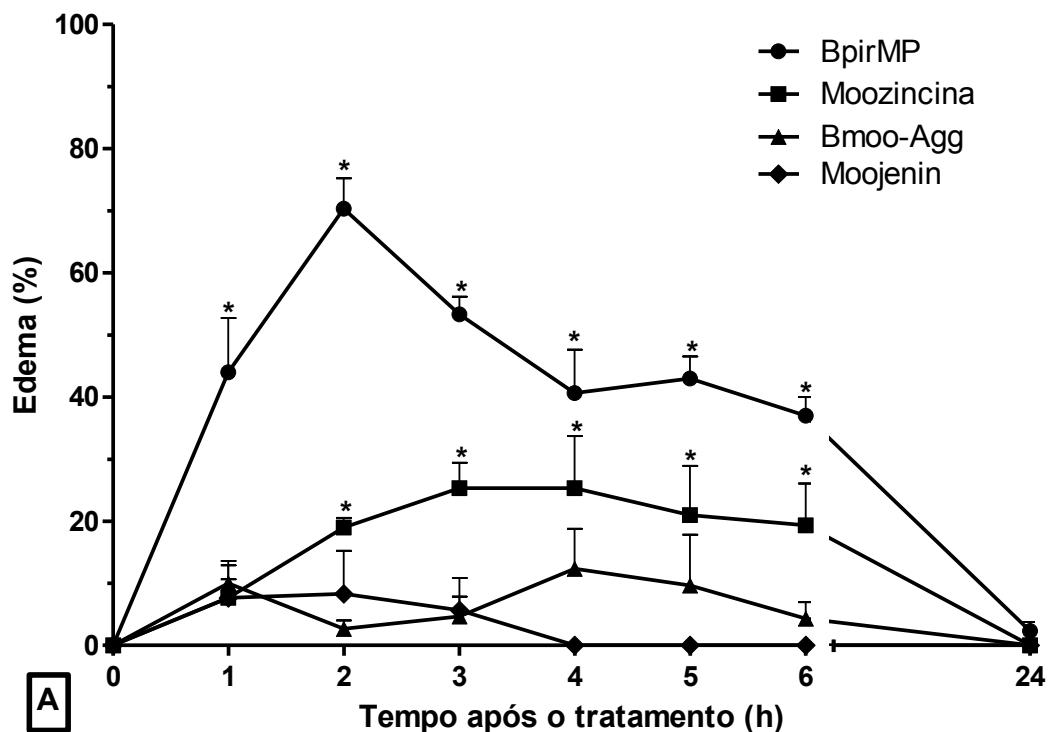
Os acidentes com serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por intensa lesão tecidual no local da picada, devido ao efeito proteolítico, tóxico e inflamatório dos componentes da peçonha (BONAVITA, et al., 2006; BRASIL, 2009; TEIXEIRA, et al., 2009; NASCIMENTO, et al., 2010; ZYCHAR, et al., 2010). A rápida ação das toxinas ofídicas sobre a microvasculatura, associada à ativação de mediadores pró-inflamatórios, levam à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular na região afetada, resultando na formação de edema, uma das primeiras manifestações locais do envenenamento botrópico (TREBIEN; CALIXTO, 1989). A **figura 2.2** mostra a ação edematogênica induzida pela injeção intraplantar de 50 µg/pata de diferentes proteínas isoladas de peçonhas botrópicas. A BpirMP, uma SVMP da classe P-I isolada de *B. pirajai*, causou intenso edema, desde a 1^a até a 6^a hora após a injeção desta protease, com pico máximo de 70% na 2^a hora. Outra metaloprotease P-I, denominada Moozincina e proveniente da peçonha de *B. moojeni*, também causou edema, mas o aumento máximo do volume da pata foi de 25% e ocorreu entre a 3^a e 6^a horas. Enquanto as SVMPs Bmoo-Agg e Moojenin, isoladas da mesma peçonha, não foram capazes de induzir aumento significativo do volume da pata dos animais (**Fig. 2.2A**). Apesar de pertencerem à classe P-III, a caracterização bioquímica destas metaloproteases indicou que elas sofreram alterações pós-traducionais que levaram à perda do domínio catalítico ou de domínios adicionais que determinam

e intensificam a ação proteolítica destas proteínas sobre os componentes vasculares, justificando a incapacidade de causarem edema (MORAIS, et al., 2012; SOUSA, 2013).

As SVMPs são caracterizadas pela dependência catalítica de íons metálicos, presença de multidomínios estruturais e grande diversidade funcional. Elas são abundantes na peçonha botrópica e têm sido consideradas como os principais causadores de danos vasculares e hemorragia no envenenamento (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO; 2006; FOX; SERRANO, 2008). A alta atividade hemorrágica destas proteases é atribuída à presença de domínios não enzimáticos adicionais que se associam a componentes endoteliais, posicionando o domínio catalítico em uma localização favorável à proteólise e ruptura da microvasculatura (SERRANO, et al., 2005; SERRANO, et al., 2006; MOURA-DA-SILVA, et al., 2008; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). As metaloproteases P-I, por conterem apenas o domínio catalítico, apresentam uma ação hemorrágica discreta ou ausente, mas ainda assim podem agir sobre componentes vasculares e causar eventos exsudativos e inflamatórios locais relevantes (RODRIGUES, et al., 2000; RODRIGUES, et al., 2001; GUTIÉRREZ, et al., 2005). Assim como a BpirMP e a Moozincina, várias SVMPs da classe P-I também contribuem na formação do edema induzido por peçonhas botrópicas (RUCAVADO, et al., 1995; MARCUSSI, et al., 2007; GOMES, et al., 2009; SILVA, et al., 2012).

Dentre as toxinas analisadas, as metaloproteases P-I foram as que induziram edema mais expressivo. No entanto, outras proteínas também contribuíram para este efeito. Duas serinoproteases isoladas de *B. pirajai*, BpirSP27 e BpirSP41, causaram um discreto aumento do volume da pata dos animais (~15%) nas primeiras 5 horas da inoculação (**Fig. 2.2B**). Enquanto que as PLA₂ de *B. alternatus*, BaG2P5 e a BaltMTX apresentaram aumento de volume similar (~15%), mas apenas com 1 hora da injeção da toxina (**Fig. 2.2C**). Esses resultados estão de acordo dados da literatura, que afirmam a maior participação das SVMPs na indução de edema inflamatório local, mas também demonstram o envolvimento de PLA₂ e SVSPs neste efeito (LOMONTE; TARKOWSKI;

HANSON, 1993; CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ., 1995; TEIXEIRA, et al., 2003; MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007; ZYCHAR, et al., 2010).



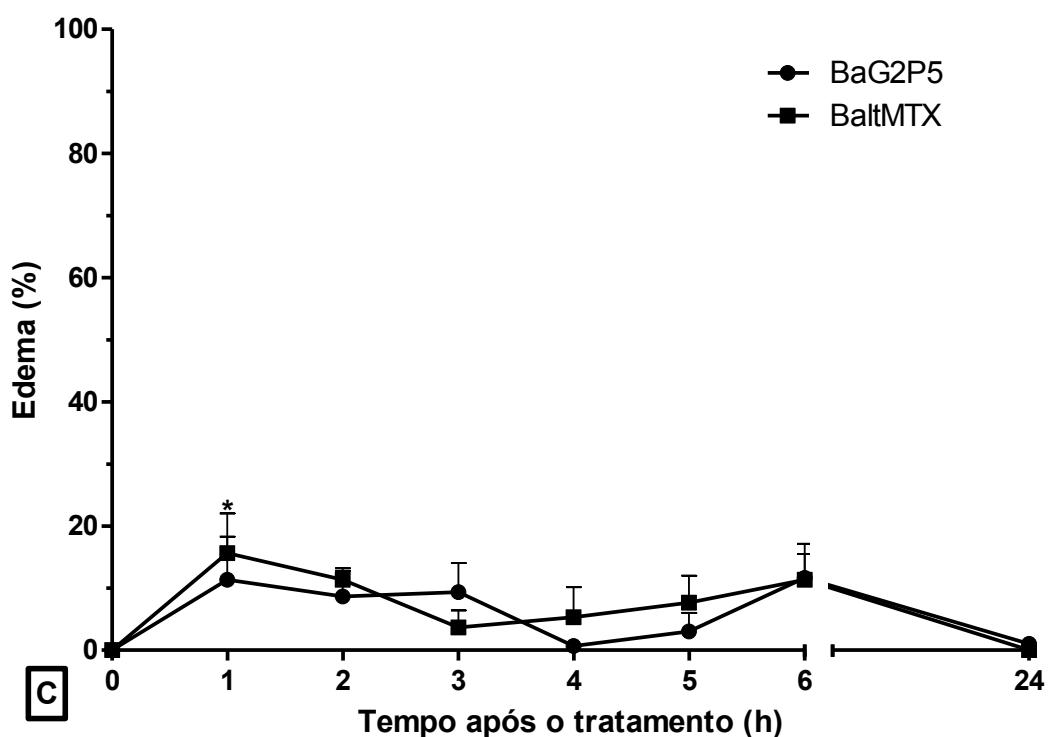


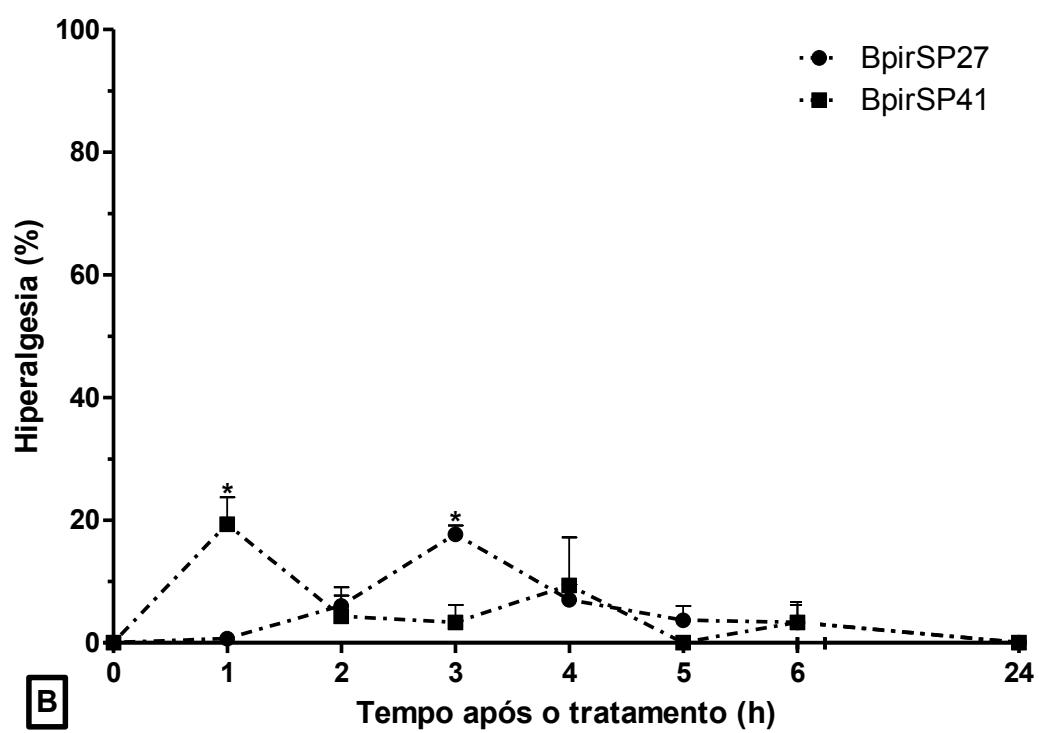
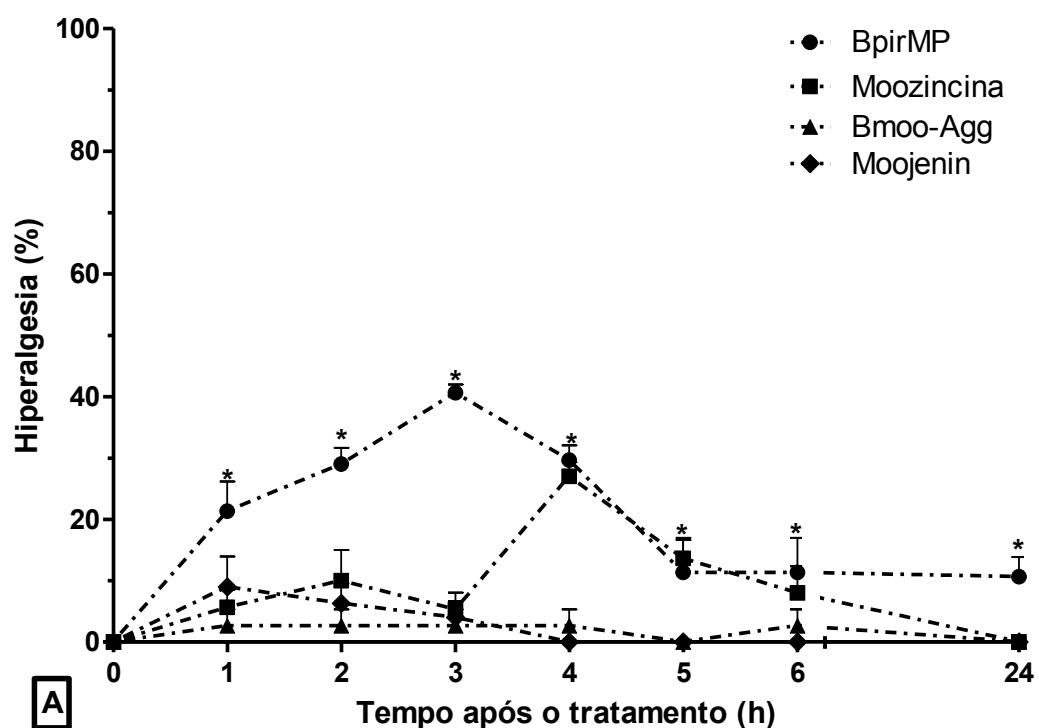
Figura 2.2: Comparação do efeito edemato-gênico induzido por diferentes toxinas botrópicas (50 µg/pata). (A) Metaloproteases da classe P-I e P-III isoladas de *B. pirajai* e *B. moojeni*, respectivamente; (B) Serinoproteases de *B. pirajai*; (C) PLA₂ de *B. alternatus*. O aumento do volume da pata de ratos foi avaliado por pletismografia em diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas) após a injeção intraplantar das toxinas (50 µg/100 µL) e de salina na pata contralateral. Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento do volume da pata em relação às medidas iniciais e representam a média ± erro padrão dos valores obtidos. *Edema significativo, comparado com o volume da pata antes da injeção das toxinas ($p<0,05$).

A inflamação local característica do envenenamento botrópico, geralmente é acompanhada de dor (CARDOSO, et al., 2003; TEIXEIRA, et al., 2009). A ação das toxinas ofídicas sobre componentes celulares pode levar a direta ativação de nociceptores ou induzir a liberação de mediadores químicos que sensibilizam fibras nervosas e reduzem seu limiar nociceptivo, provocando hiperalgesia no local da lesão (CHACUR, et al., 2001; PICOLO, et al., 2002; SOUZA, et al., 2011; ZYCHAR, et al., 2010). Neste trabalho, nós verificamos o efeito hiperalgésico induzido por diferentes toxinas botrópicas (50 µg/pata), nos mesmos animais em que avaliamos a formação de edema. Conforme apresentado na **figura 2.3**, apenas as SVMPs da classe P-I e as SVSPs foram capazes de causar dor local.

BpirMP induziu hiperalgesia em todo o período avaliado, com pico máximo de redução do limiar nociceptivo (40%) na 3^a hora e permanência de efeito residual significativo após 24 horas da injeção da toxina. Já a Moozincina provocou hiperalgesia máxima (27%) apenas com 4 horas após a injeção intraplantar, este efeito reduziu gradativamente até o restabelecimento do limiar normal dos animais com 24 horas (**Fig. 2.3A**). Bpir41 e Bpir27, induziram discreta redução do limiar nociceptivo dos animais (< 20%) após 1 e 3 horas da inoculação intraplantar das SVSPs, respectivamente (**Fig. 2.3B**). As outras toxinas botrópicas, Bmoo-Agg, Moojenin, BaG2P5 e BatIMtx, não causaram efeito nociceptivo significativo.

Assim como na avaliação do edema, nossos dados indicam que as SVMPs da classe P-I e as SVSPs também estão envolvidas na hiperalgesia provocada pelas peçonhas botrópicas. No entanto, quando comparamos os efeitos induzidos pelas proteínas BpirSP27/41 com a intensa ação da metaloprotease BpirMP, podemos sugerir que as serinoproteases têm pouca participação na reação inflamatória local causada pela peçonha de *B. pirajai*. A toxicidade das SVSPs está relacionada, principalmente, às alterações sistêmicas do envenenamento botrópico (SERRANO, 2013). A ação inflamatória destas proteases pode ser desencadeada indiretamente, devido à indução de distúrbios de coagulação e ativação de metaloproteases endógenas (SARAVIA-OTTEN, et al., 2004; ZYCHAR, et al., 2010).

As duas PLA₂ investigadas pouco contribuem para o efeito edemato-gênico e não participam da reação hiperalgésica induzida pela peçonha de *B. alternatus*. Diferentemente, estudos similares com a peçonha de *B. asper* mostraram que as PLA₂ têm relevante participação nos efeitos inflamatórios locais, especialmente na hiperalgesia induzida por esta peçonha (GUTIÉRREZ, et al., 1995; CHACUR, et al., 2003; TEIXEIRA, et al., 2009). Essa divergência pode estar relacionada à variabilidade da composição da peçonha destas serpentes, enquanto análises venômicas demonstram a predominância de PLA₂ em *B. asper*, essas proteínas representam menos de 10% da peçonha de *B. alternatus* (ALAPE-GIRÓN, et al., 2008; OHLER, et al., 2010).



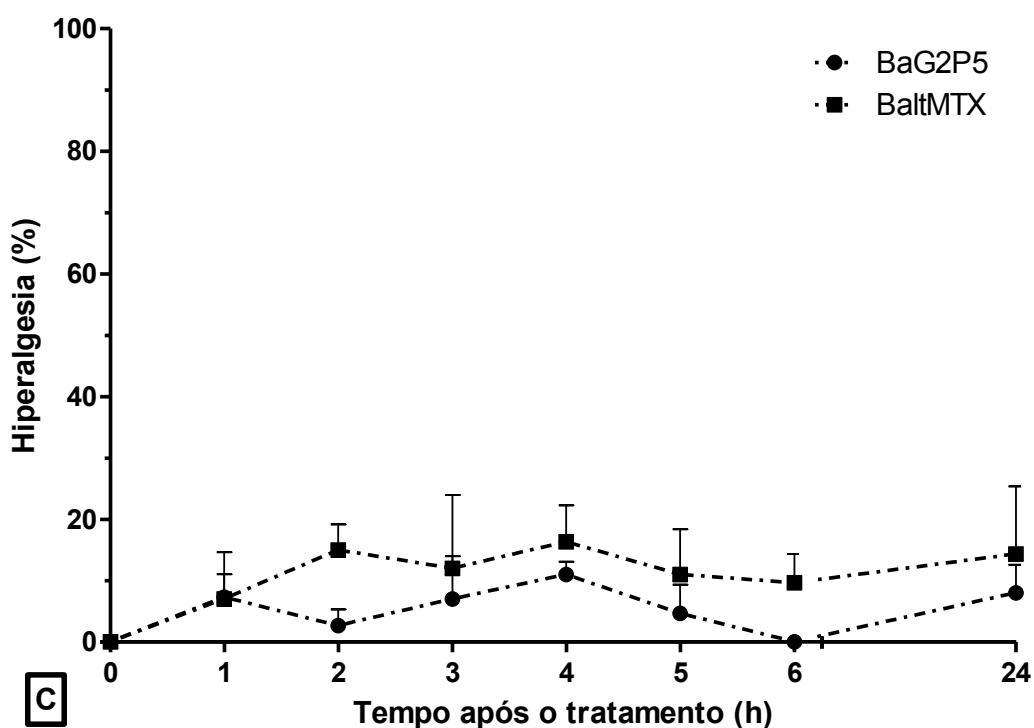


Figura 2.3: Comparação do efeito hiperalgésico induzido por diferentes toxinas botrópicas (50 µg/pata). (A) Metaloproteases da classe P-I e P-III isoladas de *B. pirajai* e *B. moojeni*, respectivamente; (B) Serinoproteases de *B. pirajai*; (C) PLA₂ de *B. alternatus*. O limiar nociceptivo de ratos foi avaliado pelo teste de pressão da pata, em diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 24 horas) após a injeção intraplantar das toxinas (50 µg/100 µL) e de salina na pata contralateral. Os resultados foram calculados pela diferença das medidas de ambas as patas e expressos em porcentagem de aumento da sensibilidade dolorosa (hiperalgesia) dos animais em relação às medidas iniciais. Cada ponto do gráfico representa a média ± erro padrão dos valores obtidos.

*Hiperalgesia significativa, comparada com os valores antes da injeção das toxinas ($p<0,05$).

A resposta inflamatória à toxicidade da peçonha envolve a ativação de inúmeros mediadores químicos relacionados à gênese, persistência e severidade dos efeitos locais do envenenamento botrópico. Para investigar estes mecanismos inflamatórios, nós avaliamos a modulação farmacológica da ação edemato-gênica e hiperalgésica das toxinas que mais contribuíram para esses efeitos. A dose das drogas utilizadas nos tratamentos foi validada pela neutralização desses mesmos efeitos induzidos por carragenina (controle positivo), conforme apresentado na **tabela 2.4**.

Table 2.4: Validação da dose-resposta do tratamento farmacológico.

Tratamento farmacológico	Edema (%)	Hiperalgesia (%)
Carragenina (Controle positive)	64,00 ± 8,02	40,67 ± 4,81
Dexa (Dexametasona - 5,0 mg/Kg)	16,67 ± 6,00*	3,00 ± 3,00*
Indo (Indometacina - 8,0 mg/kg)	13,00 ± 2,08*	12,33 ± 3,33*
Nor (Ácido nordiidroguaíarético - 100 mg/kg)	12,00 ± 4,04*	2,67 ± 2,67*
Prom (Prometazina - 15 mg/kg)	21,00 ± 4,00*	12,67 ± 2,33*
HOE (10 µg/paw)	13,00 ± 7,94*	20,67 ± 3,18*
L-NMMA (100 µg/paw)	38,30 ± 5,21	12,67 ± 6,36*

Grupos de animais experimentais foram pré-tratados com dexametasona (5,0 mg/kg, i.p.), indometacina (8,0 mg/kg, i.p.), ácido nordiidroguaíarético (100 mg/kg, i.p.) e prometazina (15 mg/kg, i.p.) 30 min antes do início dos testes; HOE (10 µg/pata, i.pl.) e L-NMMA (100 µg/pata, i.pl.) foram aplicados simultaneamente à injeção intraplantar do controle positivo (carragenina - 250 µg/pata). O edema foi avaliado pelo aumento de volume da pata após 2 horas do tratamento e a hiperalgesia pelo aumento da sensibilidade dolorosa dos animais após 3 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem de edema ou de hiperalgesia, em relação às correspondentes medidas anteriores ao tratamento, e representam a média ± erro padrão dos valores obtidos.

*Neutralização farmacológica significativa, comparada com os valores do grupo controle ($p < 0,05$).

A **figura 2.4** demonstra o envolvimento de vários mediadores inflamatórios no edema e hiperalgesia induzidos pelas metaloproteases BpirMP e Moozincina. Estes resultados mostram que todos os tratamentos farmacológicos reduziram o edema induzido pela BpirMP (**Fig. 2.4A**). Enquanto que o mesmo efeito provocado pela Moozincina foi significativamente inibido pelo tratamento com Dexa, Indo, Nor e Prom, o que sugere a efetiva participação de eicosanoides e hitamina no efeito edemato-gênico induzido por estas toxinas. Eicosanoides são importantes mediadores vasoativos derivados do ácido araquidônico. O ácido araquidônico, proveniente da hidrólise de fosfolipídios de membrana pela ação de fosfolipases A₂, pode ser degradado pela via da lipoxigenase (LOX), dando origem aos leucotrienos ou pela via das ciclooxigenases (COX), que catalisam a

biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (MURAKAMI; KUDO, 2003; MAJNO; JORIS, 2004; CABRAL, 2005). Um estudo experimental de Nascimento e col. (2010), também verificou a participação de eicosanoides e histamina no edema induzido por *B. moojeni*, no qual destacaram a importante contribuição de mastócitos para a liberação de histamina e potencialização do efeito na primeira hora do tratamento.

A histamina é considerada o principal mediador que causa aumento da permeabilidade vascular no início do processo inflamatório. Sua ação vasoativa se deve, principalmente, pela sensibilização de receptores H₁ nas células endoteliais, causando vasodilatação e formação de edema, podendo ainda, em associação com cininas e outros mediadores, contribuir também para ativação de nociceptores (HOFSTRA, et al., 2003; HUANG; THURMOND, 2008). A partir das primeiras horas, a persistência da reação inflamatória no local da lesão é mediada, especialmente, pela ação de bradicinina, óxido nítrico e eicosanoides (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SCHIMD-SCHONBEIN, 2006). Curiosamente, nossos resultados indicaram que, prostaglandinas, bradicinina e óxido nítrico também participam da ação nociceptiva da Moozincina e do efeito edemato-gênico da BpirMP (**Fig. 2.4**). No entanto, o tratamento com Dexa, Nor e Prom foram os únicos capazes de reduzir a hiperalgesia causada por BpirMP, indicando o envolvimento de apenas leucotrienos e histamina no efeito nociceptivo desta metaloprotease (**Fig. 2.4B**).

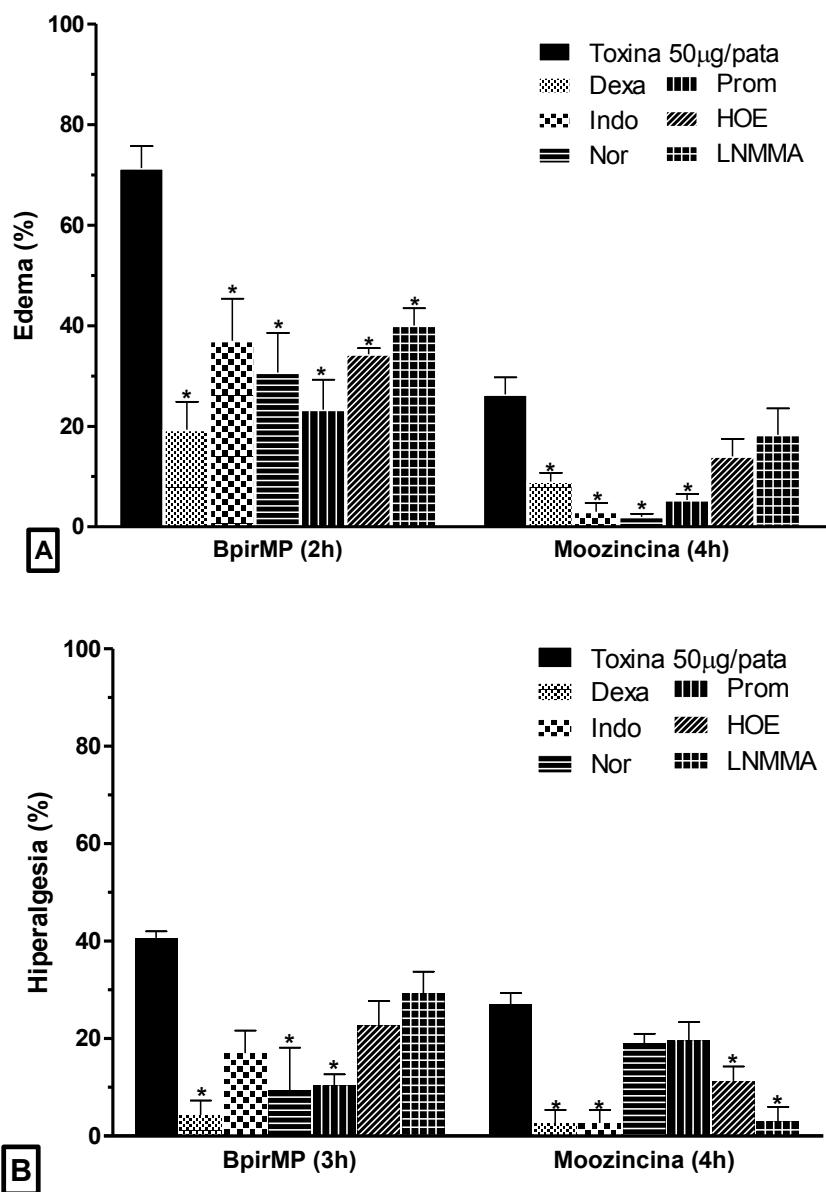


Figura 2.4: Modulação farmacológica de efeitos inflamatórios locais induzidos por BpirMP e Moozincina. Grupos de animais experimentais foram pré-tratados com dexametasona (Dextro - 5,0 mg/kg, i.p.), indometacina (Indo - 8,0 mg/kg, i.p.), ácido nordiidroguaiarético (Nor - 100 mg/kg, i.p.) e prometazina (Prom - 15 mg/kg, i.p.) 30 min antes do início dos testes; HOE (10 µg/pata, i.pl.) e L-NMMA (100 µg/pata, i.pl.) foram aplicados simultaneamente às toxinas. O edema e a hiperalgesia foram avaliados no período de máximo efeito inflamatório induzido após a injeção intraplantar das toxinas (50 µg/100 µL) e de salina na pata contralateral. Os resultados foram calculados a partir da diferença entre as medidas de ambas as patas e expressos em porcentagem de aumento do volume da pata (A) e da sensibilidade dolorosa dos animais (B), em relação às medidas iniciais. Cada barra do gráfico representa a média ± erro padrão dos valores obtidos. *Valores significativamente diferentes, comparados com o grupo controle (toxinas) ($p<0,05$).

Os efeitos provocados pela ação tóxica dos componentes da peçonha podem ser agravados pela consequente ativação e persistência da reação inflamatória no local da lesão, evoluindo para necrose tecidual da região afetada (CARDOSO, et al., 2003; ZAMUNER, et al., 2005). A necrose é um processo patológico de morte celular, caracterizado pela perda, parcial ou completa, da arquitetura e funcionalidade tecidual (MONTENEGRO; FRANCO, 2004). Outra característica deste processo é a presença de infiltrado leucocitário no local da lesão. Os leucócitos ativados liberam mediadores inflamatórios, como citocinas e eicosanóides, que amplificam a resposta inflamatória contribuindo para o efeito necrosante (VORONOV; APTE; SOLER, 1999). Nos acidentes botrópicos a mionecrose é um dos eventos locais que mais contribuem para a perda funcional e amputação de membros (GUTIÉRREZ, et al., 2010; BERNARDE, 2014). Neste trabalho, observamos que várias toxinas botrópicas foram capazes de induzir mionecrose em animais experimentais. O efeito miotóxico foi caracterizado com base nas alterações morfológicas e reação inflamatória provocadas no músculo gastrocnêmico de camundongos após 24 horas da inoculação das toxinas.

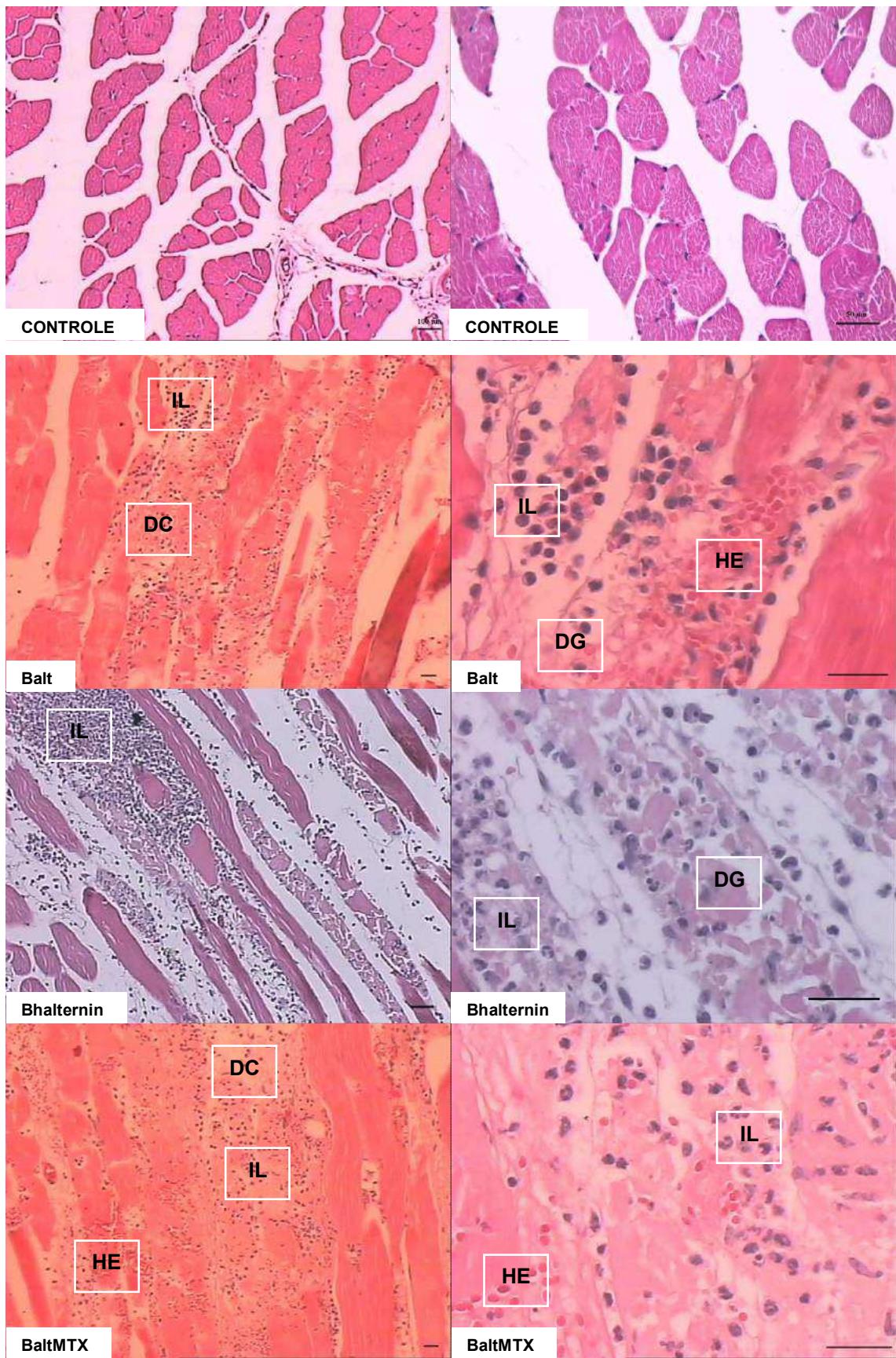
A injeção intramuscular das peçonhas das serpentes *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. pauloensis* induziram alterações histológicas similares, caracterizadas pela intensa degeneração das fibras musculares, focos hemorrágicos em algumas regiões do tecido e presença de infiltrado inflamatório (**Fig. 2.5**). É importante destacar a elevada toxicidade das peçonhas de *B. leucurus* e *B. pauloensis*, que induziram lesão muscular tão potente quanto às demais com uma doses menores. A ação local de todas as toxinas botrópicas foi avaliada com 50 µg/teste, mas essas peçonhas apresentaram alta letalidade e foi necessário reduzir a dose utilizada. Mesmo com a administração de quantidades reduzidas, a mionecrose induzida por *B. leucurus* (10 µg/teste) e *B. pauloensis* (5 µg/teste) foi severa, caracterizadas por extravasamento sanguíneo em toda a extensão do tecido analisado. Condição semelhante foi observada com a Bothropoidin, uma metaloprotease P-III isolada da mesma peçonha, indicando que esta toxina contribui consideravelmente para os danos teciduais relacionados ao envenenamento por serpentes da espécie *B. pauloensis*. A BmooMPa-II, uma SVMP da classe P-I isolada de *B. moojeni*, também induziu necrose muscular

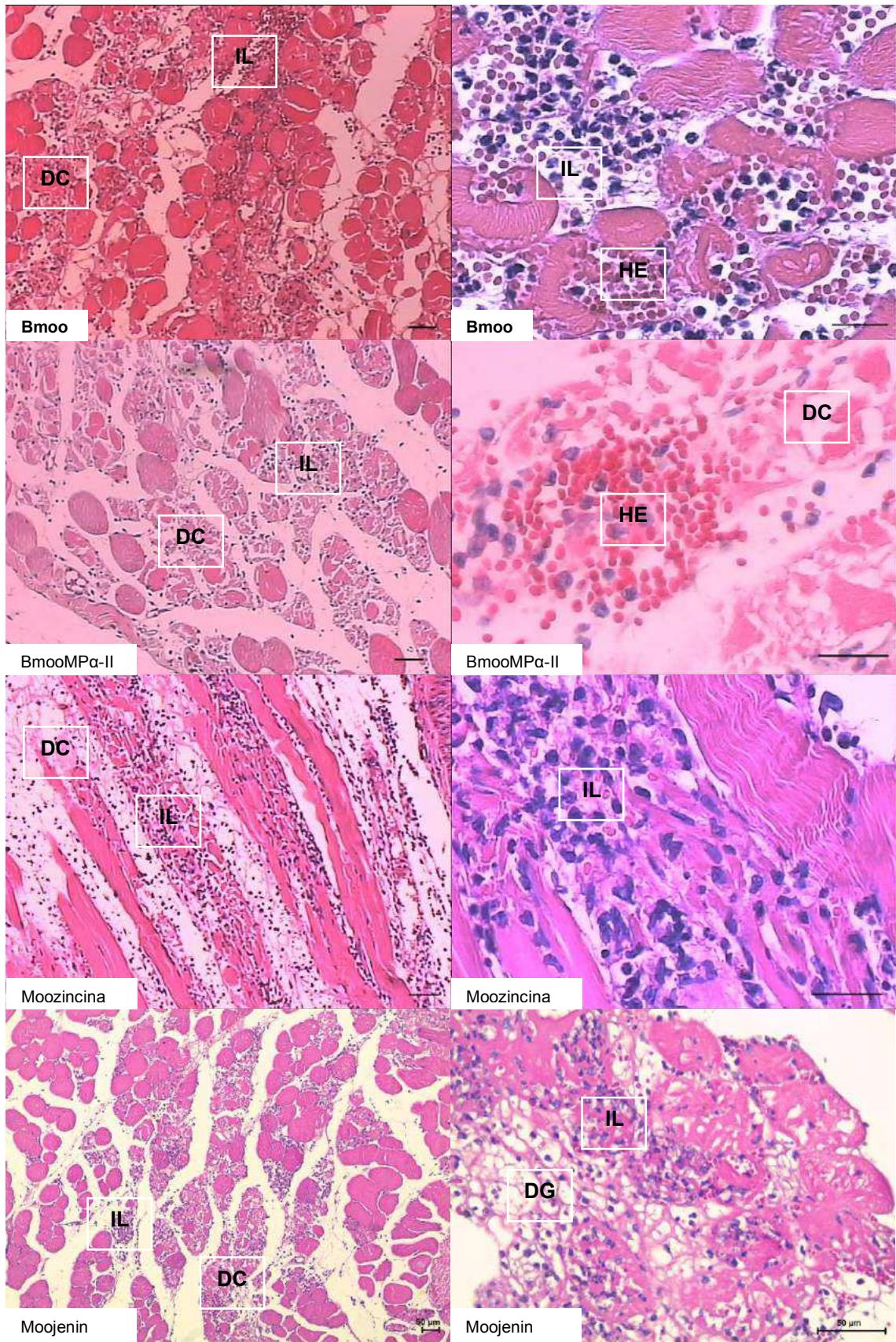
com evidente extravasamento sanguíneo, embora seja caracterizada como não hemorrágica. As outras SVMP da mesma classe, BleucMP e Moojenin, também causaram degeneração muscular e devem contribuir para esse efeito no acidente botrópico de origem (**Fig. 2.5**).

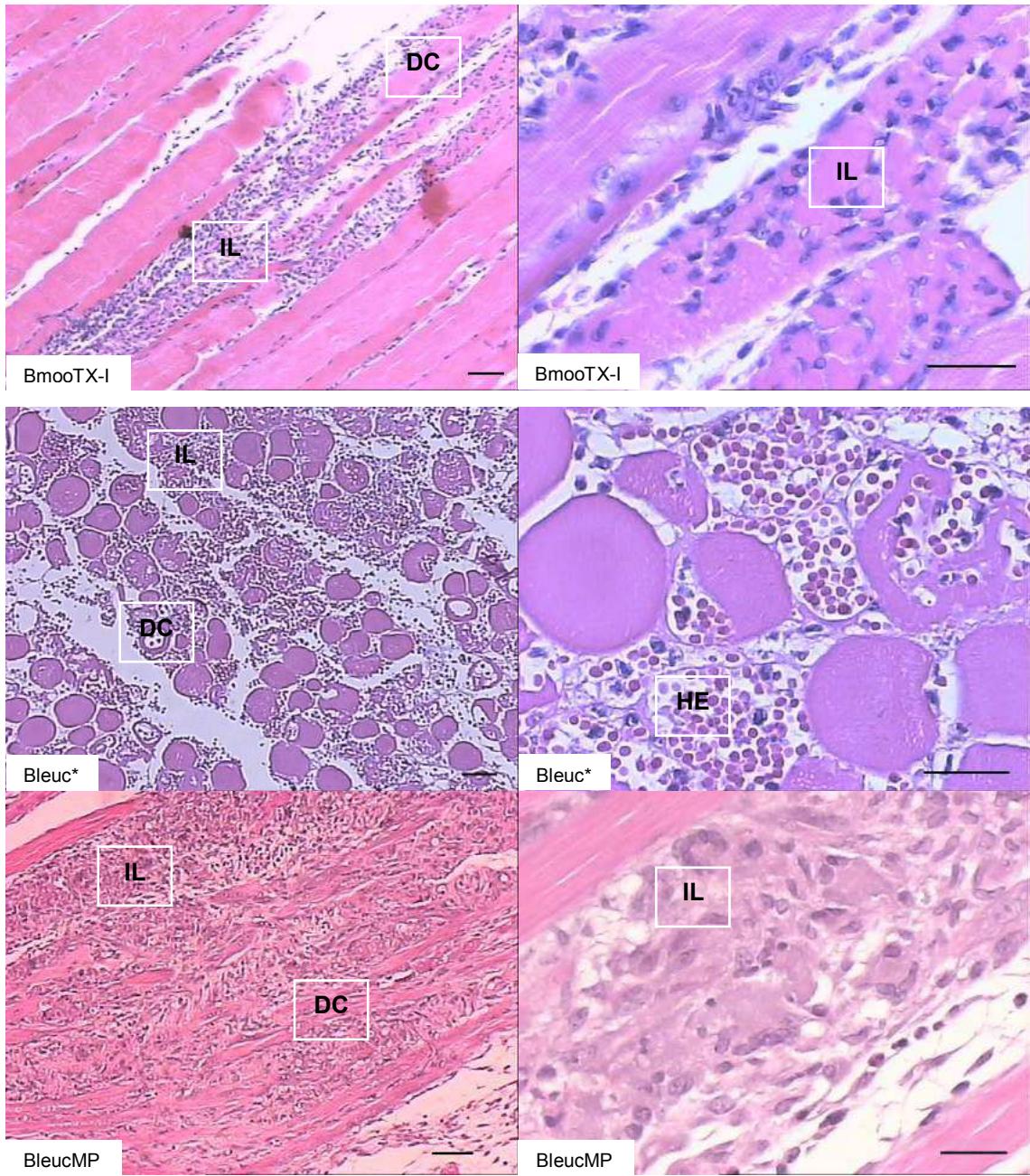
O mecanismo de ação das SVMPs sobre o tecido muscular tem sido atribuído basicamente à ação dessas toxinas sobre capilares sanguíneos, levando à depleção de sangue que nutre as células musculares, induzindo isquemia e consequentemente morte celular (BJARNASON; FOX, 1994; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Estudos com estas toxinas mostraram que as alterações mionécroticas ocorrem rapidamente, em consequência da ação proteolítica sobre os componentes vasculares, isquemia e perfusão reduzida do tecido (HERNÁNDEZ, et al., 2011). Além disso, os domínios adicionais presentes nas metaloproteases da classe PIII, principalmente, podem potencializar o efeito hemorrágico e aumentar a migração leucocitária na microvasculatura (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, et al., 2006; MENEZES; PAES LEME, 2008).

Além das SVMPs, as PLA₂ também contribuem para os eventos inflamatórios do envenenamento botrópico (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004). Elas representam os principais componentes miotóxicos das peçonhas botrópicas e são classificadas em dois grupos principais de miotoxinas: PLA₂ Asp49, que apresentam típica ação enzimática sobre fosfolipídios e PLA₂ Lys49, que são cataliticamente inativas (ARNI; WARD, 1996; OWNBY, et al., 1999; MAGRO, et al., 2009; LOMONTE; RANGEL, 2012). As PLA₂ BmooTX-I e BaltMTX, avaliadas neste trabalho, são representantes destas classes de miotoxinas. A lesão muscular provocada por estas toxinas apresentou algumas diferenças, com relação à presença de focos hemorrágicos e degeneração gordurosa evidenciados apenas com a administração de BaltMTX (**Fig. 2.5**). O efeito destas PLA₂ pode estar associada à hidrólise de componentes lipídicos das células musculares e ativação de mediadores inflamatórios ou à mecanismos indiretos de alteração da permeabilidade da membrana e citotoxicidade (CHACUR, et al., 2003; DENNIS, et al., 2011; QUEIROZ, et al., 2011; MAMEDE, et al., 2013).

Os eventos associados à lesão tecidual induzida pelas peçonhas botrópicas, estão relacionados à ação direta de PLA₂ e de SVMPs hemorrágicas sobre as células musculares e endoteliais ou por mecanismos inflamatórios indiretos de degeneração celular, isquemia e citotoxicidade, provocados por outros componentes miotóxicos (HARRIS, 2003; GAY, et al., 2005; GUTIÉRREZ, et al., 2010). Comparando a ação de diversas toxinas botrópicas, nós observamos a participação de diferentes classes de proteínas na mionecrose causada pelas peçonhas brutas. Todas as proteínas analisadas, inclusive uma serinoproteases de *B. alternatus* (Bhalternin), foram capazes de induzir necrose muscular, evidenciada pela alteração da morfologia tecidual e presença difusa de infiltrado leucocitário (**Fig. 2.5**). O recrutamento de leucócitos é decorrente da resposta inflamatória induzida pela ação das proteínas presentes na peçonha e pela própria degeneração tecidual. O componente celular desta reação é representado, primordialmente, por leucócitos polimorfonucleados (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleados (macrófagos e linfócitos). Nos estágios iniciais, a célula leucocitária predominante é o neutrófilo, responsável pela eliminação de agentes lesivos. Os macrófagos são observados em fases mais tardias e crônicas da inflamação, estando associados à fagocitose de restos celulares. Essas células também são elementos importantes no reparo e regeneração tecidual da mionecrose, para resolução do processo inflamatório (ZAMUNER, et al., 2001; TEIXEIRA, et al., 2009).







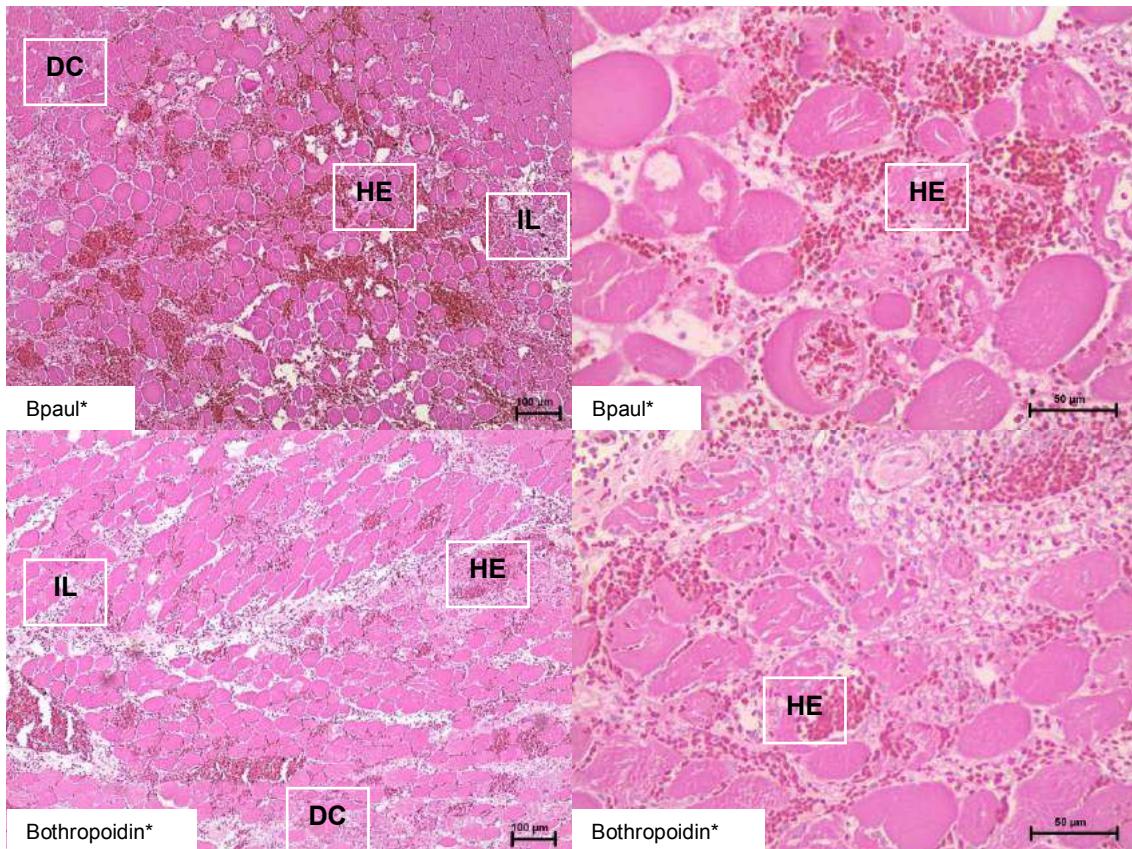


Figura 2.5: Comparação do efeito miotóxico induzido por toxinas botrópicas. Fotomicrografias de cortes histológicos do músculo gastrocnêmico de camundongos, após 24 horas da injeção intramuscular de 50 µg/50 µL das toxinas e de mesmo volume de salina nos animais controle. Peçonhas brutas: Balt, Bmoo, Bleuc (*10 µg/50 µL) e Bpaul (*5 µg/50 µL); Metaloproteases: BmooMPa-II, Moozincina, Moojenin, BleucMP e Bothropoidin(*5 µg/50 µL); Serinoprotease: Bhalternin; PLA2: BaltMTX e BmooTX-I; Controle: aspecto morfológico normal do músculo controle. Observar mionecrose evidenciada pela degeneração das fibras musculares (DC), degeneração gordurosa (DG), infiltrado leucocitário (IL), focos de hemorragia (HE). Barra de escala = 100 µm (imagens da esquerda); barra de escala = 50 µm (imagens da direita).

Assim, nos podemos considerar que a análise comparativa dos nossos resultados permitiu identificar o envolvimento de diferentes toxinas e mecanismos inflamatórios na patogênese de manifestações locais típicas do envenenamento botrópico. Nós demonstramos a efetiva contribuição de metaloproteases para o edema, a hiperalgesia ou a mionecrose causados pelas peçonhas de *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. pirajai*, *B. leucurus* e *B. pauloensis*. Além de verificar a significativa participação de serinoproteases e fosfolipases A2 em parte dos efeitos inflamatórios induzidos por estas peçonhas.

Referências

- ALAPE-GIRÓN, A. et al. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.*, v. 7, p. 3556–3571, 2008.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A(2) - A structural review. *Toxicon*, v. 34, p. 827-841, 1996.
- BARBOSA, A.M. et al. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, v. 42, p. 515–523, 2003.
- BERNARDE, P.S. *Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil*. São Paulo: Anolisbooks, 2014, 224 p.
- BERNARDES, C.P. et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 51, p. 574–584, 2008.
- BERNARDES, C.P. et al. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. *J. Proteomics*, v. 80, p. 250-267, 2013.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.*, v. 14, p. 352–372, 1994.
- BONAVITA, A.G. et al. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon*, v. 47, p. 885–893, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de vigilância epidemiológica* / Ministério da

Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 7. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 9030-9033, 1993.

CABRAL, G.A. Lipdis as bioeffectors in the immune system. *Life Science*, v. 77, p. 1699-1710, 2005.

CALGAROTTO, A.K et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A(2) BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 8, p. 1509-1519, 2008.

CARDOSO, J.L.C. et al. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003, 468 p.

CAVALCANTE, W.L.G. et al. Biological characterization of *Bothrops marajoensis* snake venom. *J Venom Res.*, v. 2., p. 37-41, 2011.

CHACUR, M. et al. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, v. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHACUR, M. et al. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, v. 40, p. 1047-1051, 2002.

CHACUR, M. et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, v. 41, p. 667-678, 2003.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. *Toxicon*, v. 33, p. 31-39, 1995.

COSTA, J.O. et al. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, v. 55, p. 1365–1377, 2010.

COSTA, J.O. et al. Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bothrops alternatus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 13, p. 640-654, 2007.

DENNIS, E.A et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.*, v. 111, p. 6130-6185, 2011.

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

ESCOCARD, R.D. et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiology*, v. 211, p. 37–46, 2006.

FARIA, L. et al. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon*, v. 39, p. 825-830, 2001.

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

GARCIA DENEGRI, M.E. et al. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon*, v. 56, p. 64–74, 2010.

GAY, C. et al. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*, v. 46, p. 546–554, 2005.

GOMES, M.S.R. et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 53, p. 24–32, 2009.

GOMES, M.S.R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 153, p. 290-300, 2011.

GOMES, M.S.R. et al. Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. *J. Biochem.*, v. 157, p. 137–149, 2015.

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

GUIMARAES-SOUZA, L. et al. Involvement of lipidic mediators in the edema formation induced by *Bothrops fonsecai* venom. *Clin. Exp. Med. Lett.*, v. 53, p. 181-185, 2012.

GUTIERREZ, J.M. et al. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, v. 33, p. 19-29, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, v. 45, p. 997–1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, v. 72, p. 165-182, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? *Toxicon*, v. 55, p. 166–170, 2010.

GUTIÉRREZ, J.M. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. *Toxicon*, v. 60, p. 676–687, 2012.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, v. 42, p. 915–931, 2003.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.; WARREL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.*, v. 3, p. 150, 2006.

HADDAD, J.J. On the enigma of pain and hyperalgesia: a molecular perspective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 353, p. 217–224, 2007.

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

HERNÁNDEZ, R. et al. Poor regenerative outcome after skeletal muscle necrosis induced by *Bothrops asper* venom: alterations in microvasculature and nerves. *PLoS One*, v. 6, p. 19-34, 2011.

HOFSTRA, C.L. et al. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 305, p. 1212–1221, 2003.

HUANG, J.F.; THURMOND, R.L. The new biology of histamine receptors. *Curr. Allergy. Asthma. Rep.*, v. 8, p. 21–27, 2008.

ISBISTER, G.K. et al. Human anti-snake venom IgG antibodies in a previously bitten snake-handler, but no protection against local envenoming. *Toxicon*, v. 55, p. 646-9, 2009.

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

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, v. 60, p. 520-530, 2012.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, v. 17, p. 93–105, 1993.

LOPES, D.S. et al. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon*, v. 54, p. 42–49, 2009.

MAGRO, A.J. et al. Influence of quaternary conformation on the biological activities of the Asp49-phospholipases A₂s from snake venoms. *Protein Pept Lett.*, v. 16, p. 852-859, 2009.

MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, tissues and diseases: Principles of general pathology*. Oxford: New York, 2^a ed., 2004, 1005p.

MAMEDE, C.C.N. et al. Histological and Ultrastructural Analyses of Muscle Damage Induced by a Myotoxin Isolated from *Bothrops alternatus* Snake Venom. *Protein & Peptide Letters*, v. 20, p. 192-199, 2013.

MAMEDE, C.C.N. *Caracterização bioquímica e funcional de uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente Bothrops moojeni*. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

MARCUSSI, S. et al. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*, v. 28, p. 2328-2339, 2007.

MARKLAND Jr., F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 3–18, 2013.

MCMAHON, S.B.; CAFFERTY, W.B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.*, v. 192, p. 444–462, 2005.

MENALDO, D.L et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biochimie*, v. 94, p. 2545-2558, 2012.

MENALDO D.L. et al. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. *International Immunopharmacology*, v. 15, p. 764–771, 2013.

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

MONTENEGRO, M.R., FRANCO, M. *Patologia: processos gerais*. São Paulo : Atheneu, 4^a ed., 2004, 320p.

MORAIS, N.C.G. et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Toxicon*, v. 60, p. 1251–1258, 2012.

MOREIRA, V. et al. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicon*, v. 60, p. 12-20, 2012.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.E.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, p. 2893-2905, 2007.

MOURA-DA-SILVA, A.M. et al. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie*, v. 90, p. 484–492, 2008.

MURAKAMI, M.; KUDO I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A₂s. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 525, p. 87, 2003.

NADUR-ANDRADE, N. et al. Effects of photobiostimulation on edema and hemorrhage induced by *Bothrops moojeni* venom. *Lasers Med Sci.*, v. 27, p. 65-70, 2012.

NASCIMENTO, N. G. et al. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*, v. 55, p. 343–352, 2010.

NUNES, D.C.O. et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 154, p. 226–233, 2011.

OHLER, M. et al. The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. *Journal of Proteome Research.*, v. 9, p. 2422–2437, 2010.

OLIVEIRA, C.F. et al. 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.

OLIVEIRA, L.M. F. et al. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. *Toxicon*, v. 76, p. 282–290, 2013.

OLIVEIRA-Jr, N.G. et al. Toxicological and Histological Evaluation of *Bothrops itapetiningae* Venom. *Journal of Herpetology*, v. 46, p. 653–657, 2012.

OLIVO, A. et al. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon*, v. 49, p. 670–677, 2007.

OWNBY, C.L. et al. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon*, v. 37, p. 411-445, 1999.

PASCHOAL, T.S. *Caracterização bioquímica e funcional de uma Fosfolipase A₂ isolada da peçonha de Bothrops alternatus*. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

PATRÃO-NETO, F.C. et al. Dexamethasone antagonizes the in vivo myotoxic and inflammatory effects of *Bothrops* venoms. *Toxicon*, v. 69, p. 55–64, 2013.

PERCHUC, A.M et al. Isolation and characterization of two new Lys49 PLA₂s with heparin neutralizing properties from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 6, p. 1080-1092, 2010.

PEREIRA, D.F.C. Caracterização funcional da BaltMTX, uma miotoxina isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

PICOLO, G. et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res.*, v. 32, p. 1221-1228, 2002.

PONCE-SOTO, L.A. et al. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 4, p. 585-593, 2007.

QUEIROZ, G.P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*, v. 52, p. 842–851, 2008.

QUEIROZ, M. R. et al. Rapid Purification of a New P-I Class Metalloproteinase from *Bothrops moojeni* Venom with Antiplatelet Activity. *BioMed Research International*, p. 1-12, 2014.

QUEIROZ, M.R et al. Biological characterization of a myotoxin phospholipase A2 homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 1, p. 49-58, 2011.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 142, p. 328–346, 2006.

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

REIS, F.P. et al. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 158, p. 352–357, 2014.

RODRIGUES, R.S. et al. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*, v. 50, p. 153–165, 2007.

RODRIGUES, V.M. et al. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie*, v. 83, p. 471–479, 2001.

RODRIGUES, V.M. et al. Structural and functional characterization of neuwiedase, a non-hemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 381, p. 213–224, 2000.

RUCAVADO, A. et al. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Exp. Mol. Pathol.*, v. 63, p. 186–199, 1995.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A; KRIZAJ I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, v. 57, p. 627–645, 2011.

SANTOS-FILHO, N.A et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 8, p. 908-917, 2008.

SARAVIA-OTTEN, P. et al. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. *Toxicon*, v. 44, p. 749–764, 2004.

SCHIMD-SCHONBEIN, G.W. Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 8, p. 93-131, 2006.

SERRANO, S.M.T. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*, v. 5, p. 501–510, 2005.

SERRANO, S.M.T. et al. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 39746–39756, 2006.

SERRANO, S.M.T. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 19–26, 2013.

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

SETÚBAL, S.S. et al. Action of Two Phospholipases A₂ Purified from *Bothrops alternatus* Snake Venom on Macrophages. *Biochemistry*, v. 78, p. 194-203, 2013.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA, I.R.F. et al. BJ-PI2, A non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1820, p. 1809–1821, 2012.

SILVEIRA, L.B. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *In Press*, 2012.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO J.R. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure-Function Relationship. *Current Organic Chemistry*, v. 8, p. 1677-1690, 2004.

SOUSA, B.B. *Caracterização estrutural e funcional de uma toxina de serpente brasileira com ação na hemostasia*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

SOUZA, L.G. et al. Low-level laser therapy reduces edema, leukocyte influx and hyperalgesia induced by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Clin Exp Med Lett.*, v. 52, p. 97-102, 2011.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. v. 54, p. 988–997, 2009.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor. *Toxicon*, v. 32, p. 419–426, 1994.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon*, v. 42, p. 947–962, 2003.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 181-184, 2005.

TORRES, F. S. et al. Bmoo FIBMP-I: A New Fibrinogenolytic Metalloproteinase from *Bothrops moojeni* Snake Venom. *International Scholarly Research Network*, 2012.

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

VAN ARMAN, C.G. et al. Some details of the inflammationcaused by yeast and carrageenin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 150, p. 328-333, 1965.

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.

WANDERLEY, C.W.S. et al. *Bothrops jararacussu* snake venom-induces a local inflammatory response in a prostanoid- and neutrophil-dependent manner. *Toxicon*, v. 90, p. 134-147, 2014.

ZAMUNER, S.R. et al. 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.

ZULIANI, J.P. et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon*, v. 45, p. 335–346, 2005.

ZYCHAR, B.C. et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*, v. 55. p. 227-234, 2010.

Capítulo III

Estudo comparativo de efeitos inflamatórios locais induzidos pela peçonha das serpentes *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni

* Este capítulo foi escrito utilizando os critérios de publicação da revista Toxicon (www.journals.elsevier.com/toxicon).

Resumo

O envenenamento botrópico é caracterizado por graves danos locais, desencadeados pela toxicidade dos componentes da peçonha e agravados pela consequente inflamação induzida. Neste trabalho foi realizada uma análise comparativa dos efeitos inflamatórios locais causados pela peçonha das serpentes *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni*. O edema, a hiperalgesia e a miotoxicidade foram avaliados pela injeção intraplantar ou intramuscular destas peçonhas botrópicas na pata de animais experimentais. A ação tóxica dos componentes da peçonha e a participação de diferentes mediadores inflamatórios nestes efeitos também foram avaliadas. Este estudo mostrou que a intensidade dos efeitos provocados pela peçonha de *B. alternatus* é relativamente menor que a de *B. moojeni*. A reação inflamatória induzida por *B. moojeni* é mediada pela ação de eicosanoides, histamina e óxido nítrico, com significativa participação de bradicinina na hiperalgesia e miotoxicidade. Esses mediadores também contribuem para os efeitos locais causados por *B. alternatus*. Entretanto, a ineficiente modulação anti-inflamatória, indica que a histamina, o óxido nítrico e os leucotrienos têm uma menor participação na inflamação induzida por esta peçonha. Nossos resultados demonstram também a efetiva participação de metaloproteases e fosfolipases A₂ na reação inflamatória local das peçonhas botrópicas avaliadas, e indicam a contribuição de serinoproteases nos efeitos inflamatórios causados por *B. moojeni*.

Palavras-chave: Peçonha de serpente, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni*, inflamação, proteases e fosfolipases A₂

Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations

Carla C. N. Mamede^{1,2,3*}; Bruna B. de Sousa^{1,2}; Déborah F. C. Pereira¹; Mariana M. dos Santos¹; Mayara R. de Queiroz^{1,2}; Nadia C. G. de Moraes^{1,2}; Samela A. P. B. Vieira¹, Leonilda Stanziola^{2,3}; Fábio de Oliveira^{1,2,3}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil. ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil. ³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

*Corresponding author: Av. Pará, 1720, Bairro Umuarama; CEP 38400-902 - Uberlândia, MG - Brazil; Tel. (fax): +553432258554. E-mail address: ccnmamede@icbim.ufu.br

Abstract

Bothropic envenomation is characterised by severe local damage caused by the toxic action of venom components and aggravated by induced inflammation. In this comparative study, the local inflammatory effects caused by the venoms of *B. alternatus* and *B. moojeni*, two snakes of epidemiological importance in Brazil, were investigated. The toxic action of venom components induced by bothropic venom was also characterised. Herein, the oedema, hyperalgesia and myotoxicity induced by bothropic venom were monitored for various lengths of time after venom injection in experimental animals. The intensity of the local effects caused by *B. alternatus* venom is relatively smaller than *B. moojeni* venom. Furthermore, the inflammatory reaction induced by *B. moojeni* venom is mediated by eicosanoid action, histamine and nitric oxide, with significant participation of bradykinin on the hyperalgesic and myotoxic effects of this venom. These mediators also contribute to inflammation caused by *B. alternatus* venom. However, the inefficient anti-inflammatory effects of some local modulation suggest that histamine, leukotrienes and nitric oxide have little role in the oedema or myonecrosis caused by *B. alternatus* venom. Our results indicate that metalloproteases and phospholipases A₂ have a central role in the inflammatory reaction induced by bothropic venoms, but serine proteases also contribute to the local effects of *B. moojeni* venom.

Keywords: snake venom, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni*, inflammation, proteases, phospholipases A₂

1. Introduction

Snake venom is a rich source of proteins and peptides that induce a large variety of pharmacological and toxic effects. Bothropic envenomation is characterised by intense local inflammatory manifestation associated with oedema, myonecrosis, pain and haemorrhage (Teixeira, et al., 1994; Brasil, 2009; Gutiérrez, et al., 2009). The pathologies caused by snakebites are considered a public health challenge. Nevertheless, the mechanism of action of the components involved in the local effects are not well understood (Gutiérrez, 2012). Moreover, these effects are not effectively neutralised by conventional antivenom serum therapy, which can contribute to an increase in the number of victims with permanent incapacity (Gutiérrez, et al., 1998; Isbister, et al., 2009; Queiroz, et al., 2008).

The venomic composition of *B. alternatus*, a representative venomous snake widespread in Brazil, revealed that proteolytic enzymes play important roles in the pathological events of envenoming by these snakes (Cardoso, et al., 2010). The *B. alternatus* venom is also a rich source of proteases and cytotoxins that influence the severe haemorrhagic disturbances, tissue damage and inflammatory response (Ohler, et al., 2010). *B. moojeni*, another important Brazilian snake, is responsible for most ophidian accidents reported in the Minas Gerais State. The envenomation caused by these snakes is characterised by severe local oedema and myonecrosis, which are frequently associated with a vast array of active enzymes present in these venoms (Nishioka, et al., 1992; Lima, et al., 2009; Nascimento, et al., 2010).

Several studies have reported on the pathogenesis caused by envenomation of different bothropic venoms. (Gomes, et al., 2009; Costa, et al., 2010; Morais, et al., 2012; Mamede, et al., 2013). Bothropic venoms contain multiple components that induce tissue lesion and inflammation (Bonavita, et al., 2006; Teixeira, et al., 2009; Zychar, et al., 2010). Snake venom metalloproteases (SVMPs) cause direct damage to the microvessels, with consequent increments in permeability and extravasation, leading to vascular disturbances such as oedema and haemorrhage (Fox, et al., 2008; Markland Jr., et al., 2013). SVMPs are also

able to activate specific inflammatory cells and mediators frequently associated with hyperalgesia (Teixeira, et al., 2005; Lopes, et al., 2009; Zychar, et al., 2010). The inflammatory effects induced by phospholipases A₂ (PLA₂) from snake venoms are primarily related to enzymatic activity on the membrane phospholipids and the release of eicosanoid precursors (Dennis, et al., 2011). However, a large variety of biological effects to be triggered by PLA₂, such as myotoxicity, nociceptive response and other proinflammatory effects (Chacur, et al., 2003; Teixeira, et al., 2003).

Therefore, the local effects induced by bothropic venoms are the result of multifactorial and synergic actions of toxins, which are as yet poorly understood. Above all, studies with snake venom have greatly helped understanding of snakebite envenomation and the role of specific agents in inflammatory processes. Thus, in this work, we investigated the oedematogenic, hyperalgesic and myotoxic effects induced by *B. alternatus* and *B. moojeni* venoms. We also evaluated the contribution of SVMPs, PLA₂ and serine proteases to the local effects caused by these venoms. In addition, the involvement of inflammatory mediators was also characterised.

2. Material and methods

2.1. Animals

The experimental animals, male Wistar rats (200-250 g) and Swiss mice (20-25 g) were obtained from the Federal University of Uberlândia (UFU - Brazil). The animals were housed in a temperature-controlled room (23 °C) on an automatic 12 h light/dark cycle (6:00 a.m. – 6:00 p.m. of light phase). Food and water were freely available until the beginning of the experiments. All experiments were performed 3 animals/group. After the tests, the animals were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine, according ethical parameters approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU - Protocol number 108/12).

2.2. *Venom and chemicals*

The crude venoms from *Bothrops alternatus* (Balt_v) and *Bothrops moojeni* (Bmoo_v) were acquired from Bioagents Serpentarium (Brazil). The venoms were dissolved in sterile saline (1.0 mg/mL) in the moment of the experimental procedures. Protein concentration of the venoms was performed according to Bradford (1976). Carrageenan (inflammatory agent), promethazine (Prom - H1 histamine receptor antagonist), indomethacin (Indo - cyclooxygenases inhibitor), nordihydroguaiaretic acid (Nor - both cyclooxygenases and lipoxygenases inhibitor) and 2,4'-dibromoacetophenone (BAP - phospholipases A₂ inhibitor) were purchased from Sigma-Aldrich (United States). N^G-Monomethyl-L-arginine acetate (L-NMMA - nitric oxide synthase inhibitor) and icatibant (HOE - selective B₂ bradykinin receptor antagonist) were purchased from Tocris Bioscience (United Kingdom). Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF - serine proteases inhibition) and 1,10-phenanthroline (Phe - metalloprotease inhibition) were purchased from AMRESCO Life Science Research (United States).

2.3. *Analysis of local inflammatory effects*

2.3.1. *Chemical treatments*

The following enzymatic activities were performed in order to establish the inhibition of the specific classes of enzymes from snake venoms. SVMPs activity was evaluated by the local haemorrhagic effect. The crude or treated venoms (30 - 60 µg/0.1 mL) were injected intradermically (i.d.) into the dorsal skin of mice. After 3 hours the animals were sacrificed, the skins were removed and the area of haemorrhage on the internal surface of the skin was measured with the aid of a low-pressure pachymeter (Nikai, et al., 1984; Borkow, et al., 1997). The snake venoms serine proteases (SVSPs) activity was characterised by the capacity of coagulating the fibrinogen solution up to 120s (Smolka, et al., 1997). Clotting times were determined by mixing the crude or treated venoms (30 - 60 µg/0.1 mL) with 200 µL of fibrinogen solution (3 mg/ml) at 37°C. The fibrinogen-clotting formation was monitored by a coagulometer (CLOTIMER, Brazil). The PLA₂ activity was evaluated in vitro by indirect haemolysis in agar containing erythrocytes and egg

yolk induced by crude or treated venoms (30 - 60 µg/0.1 mL) (Gutiérrez, et al., 1988). After 48h incubation, at room temperature, the diameter of the hemolytic spot was measured by low-pressure pachymeter. All experiments were carried out in triplicate. Sterile saline was used as negative control.

The inhibition of specific enzymatic activities of the snake venoms was evaluated by chemical treatments. Samples of venoms (1.0 mg/mL) were incubated with 10 mM Phe for SVMPs inhibition, 20 mM PMSF for SVSPs inhibition or 20 mM BAP for PLA₂ inhibition for 1 hour at 37°C (Lundblad, 1971; Borkow, et al., 1997; Diaz-Oreiro, et al., 1997). After the chemical pretreatment, the venoms were administered in animals and the progress of oedema, hyperalgesia and myotoxicity were monitored as described below. In these tests, an equal volume of each inhibitor was injected into the contralateral paw for control purpose.

2.3.2. *Pharmacological treatments*

The participation of some inflammatory pathways in local effects induced by venoms was analysed by pharmacological treatments. The oedematogenic and hyperalgesic responses induced by carrageenan (250 µg/paw) was used as positive control group for assess the efficacy of the pharmacological treatments and to made dose-response of drugs (Van Arman, et al., 1965; Chacur et al., 2001). Group of rats were pre-treated with specific inhibitors or receptors antagonists inflammatory mediators. To investigate the involvement of arachidonic acid metabolites, the animals received 8 mg/kg of the indomethacin, a nonselective cyclooxygenase -1 and -2 (COX-1/COX-2) inhibitor and 100 mg/kg of the nordihydroguaiaretic acid, a cyclooxygenases and lipoxygenases inhibitor, both administered intraperitoneally (i.p.), 30 min before of the injection of the control or venoms. The contribution of histamine was evaluated by injection i.p. of 15 mg/kg promethazine, a histamine type 1 receptor (H₁) antagonist, 30 min before of the injection of the control or venoms. The participation of bradykinin and of nitric oxide (NO) were evaluated by administration of 5 µg/paw of HOE, a bradykinin type 2 receptor (B₂) antagonist and 100 µg/paw of L-NMMA, a non-specific inhibitor of nitric oxide synthase (NOs), respectively, both simultaneously

injected (i.pl.) with the control or venoms. After the pharmacological treatments, the progress of oedema, hyperalgesia and myotoxicity were monitored as described below.

2.3.3. Oedematogenic and hyperalgesic effects

The oedema formation and hyperalgesic reaction were monitored simultaneously for different times after injection of the crude or treated venoms into the subplantar surface (i.pl.) paw rats. Different doses of the venoms (5, 15 and 30 µg/0.1 mL) were injected of right hind paw rats. An equal volume of sterile saline was injected into the contralateral paw for control purpose. The volumes of both paws were measured using the plethysmometer (Ugo Basile, Italy) (Van Arman, et al., 1965). The nociceptive threshold was measured according to the paw pressure test (Randall and Selitto, 1957). Results were calculated as the difference between both paws and expressed as percentage of increased volume or sensitivity to pain relative to values before injection venoms. To reduce the stress, the rats were habituated to the apparatus one day before the experiments.

2.3.4. Myotoxic activity

The crude or treated venoms (30 - 60 µg/0.1 mL) were injected into the right gastrocnemius muscle of mice for evaluation of the myotoxicity by CK activity. Control animals received an injection of sterile saline under identical conditions. After 3 hours of the venoms injection, the animals were sacrificed; blood samples were collected by cardiac puncture and centrifuged for the obtention of the plasma (Angulo, et al., 2000). Creatine kinase (CK) activity was determined using 50 µL of plasma incubated for 5 min at room temperature with 1.0 ml of the reagent according to the kinetic CK-NAC LiquiUV protocol (InVitro, Brazil). Activity was expressed as U/L, with one unit corresponding to the phosphorylation of 1 nmol of creatine per minute at 25°C.

2.3.5. Statistical analysis

The statistical analyses were carried out by ANOVA followed by Bonferroni's test (Prism 5.0, GraphPad Software Inc, USA). Data are presented as

mean \pm standard error ($n = 3$), differences with p values of less than 5% were considered significant ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. *Analysis of efficacy the chemical and pharmacological treatments*

Table I shows that chemical treatment of *Balt_v* and *Bmoo_v* with 10 mM Phe, 20 mM PMSF or 20 mM BAP resulted in effective inhibition of metaloproteases, serine proteases and phospholipases A₂. The SVMP activity induced by 60 μ g of *Balt_v* was abolished with Phe and significantly reduced with PMSF. Similar results were obtained for SVSP activity; fibrinogen-clotting was significantly inhibited when *Balt_v* was treated with Phe and PMSF. However, only the *Balt_v*-induced PLA₂ activity was inhibited with BAP treatment. Besides this, the enzymatic activities induced by 30 μ g of *Bmoo_v* were specifically inhibited by Phe, PMSF and BAP, respectively. The same procedures were also carried out on 10 mM Phe, 20 mM PMSF and 20 mM BAP, and no significant induction of enzymatic activities was shown when compared with untreated venoms (data not shown). Additionally, these results indicate that the enzymatic activities induced by half doses of *Bmoo_v* can be even more potent than those induced by *Balt_v*. Based on these results, all subsequent experiments were performed with those pretreated venoms.

Carrageenan was used as the positive control to characterise the dose-response for pharmacological treatment, as demonstrated in **Table II**. The intraplantar injection of carrageenan (250 μ g/paw) into rats' hind-paws caused maximum oedema (64%) and hyperalgesia (40%) between 2 and 3 hours after injection. Doses of 8.0 mg/kg indomethacin (Indo) (COX-inhibitor), 100 mg/kg nordihydroguaiaretic acid (Nor) (COX/LOX-inhibitor), 15.0 mg/kg promethazine (Prom) (H₁-antagonist), 100 μ g/paw L-NMMA (NOS-inhibitor) and 5 μ g/paw HOE (B₂-antagonist) were able to neutralise the oedematogenic and hyperalgesic responses. Based on these results, subsequent pharmacological treatments were performed with these doses of the drugs.

Table I: Analysis of efficacy the chemical treatments.

Chemical treatment	SVMPs activity ¹		SVSPs activity ²		PLA ₂ activity ³	
	Balt _v	Bmoo _v	Balt _v	Bmoo _v	Balt _v	Bmoo _v
Crude venom	184.00 ± 39.46	116.70 ± 25.67	46.00 ± 1.52	20.67 ± 0.33	6.00	10.00 ± 2.00
Venom + Phe	Zero*	Zero*	119.70 ± 0.33*	18.33 ± 0.67	6.00	10.00 ± 2.00
Venom + PMSF	16.67 ± 16.67*	112.70 ± 21.67	>120*	101.30 ± 18.67*	6.00	10.00 ± 2.00
Venom + BAP	125.70 ± 8.67	77.33 ± 6.67	16.67 ± 9.66	7.67 ± 0.33	2.67 ± 0.33*	0.83 ± 0.17*

The crude venoms (1,0 mg/mL) were treated with 10 mM Phe, 20 mM PMSF or 20 mM BAP. The enzymatic activities were performed by administration of the 60 µg Balt_v and 30 µg Bmoo_v.

¹SVMP activity was evaluated by the local haemorrhagic effect (area of haemorrhagic spot in mm²) induced by the i.d. injection of venoms. ²SVSP activity was evaluated by the time (s) of the coagulating the fibrinogen solution. ³PLA₂ activity was evaluated by indirect haemolysis effect (diameter of haemolytic spot in mm). Each value is the mean ± SEM of 3 tests. * P < 0,05 P < 0.05 were considered significant, compared with crude venom group.

Table II: Analysis of efficacy the pharmacological treatments.

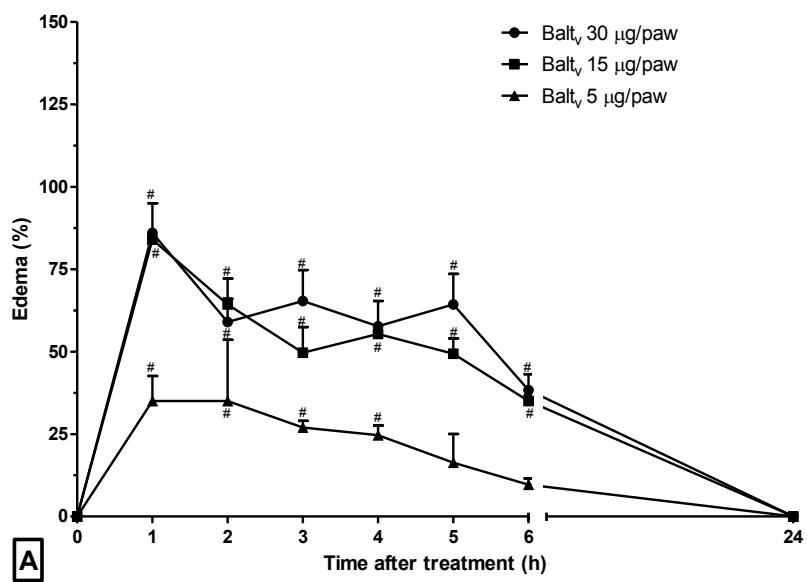
Pharmacological treatment	Edema (%)	Hyperalgesia (%)
Positive control	64.00 ± 8.02	40.67 ± 4.81
Indomethacin (8.0 mg/kg)	13.00 ± 2.08*	12.33 ± 3.33*
Nordihydroguaiaretic acid (100 mg/kg)	12.00 ± 4.04*	2.67 ± 2.67*
Promethazine (15 mg/kg)	21.00 ± 4.00*	12.67 ± 2.33*
HOE (10 µg/paw)	13.00 ± 7.94*	20.67 ± 3.18*
L-NMMA (100 µg/paw)	38.30 ± 5.21	12.67 ± 6.36*

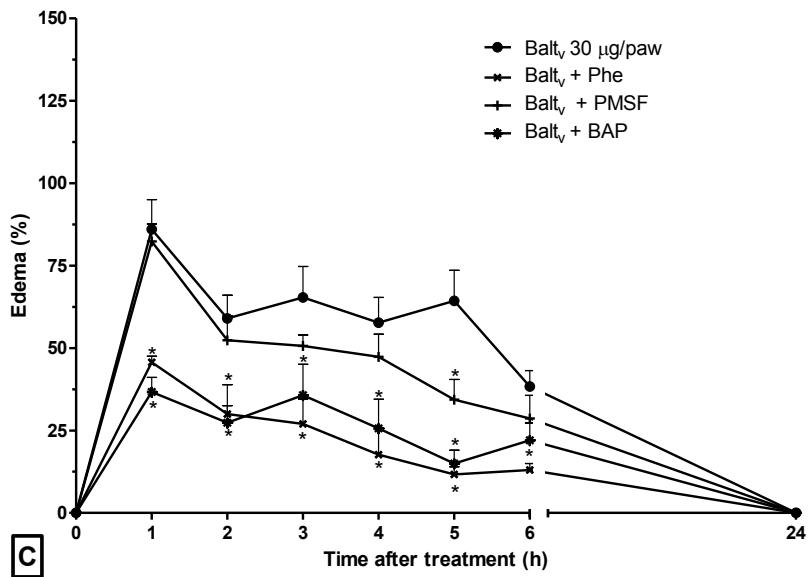
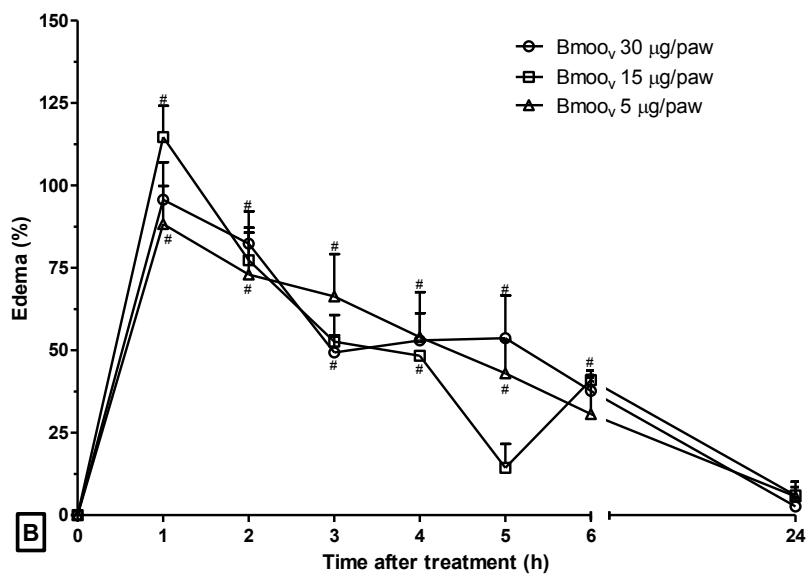
Groups of rats were treated with indomethcin (8.0 mg/kg, i.p.), nordihydroguaiaretic acid (100 mg/kg, i.p.) and promethazine (15 mg/kg, i.p.) 30 min before of the injection (i.pl.) of the positive control (250 µg/paw carrageenan); HOE (10 µg/paw) and L-NMMA (100 µg/paw) were simultaneously injected (i.pl.) with the control in hind paw rats. Oedema was evaluated by increase in paw volume after 2 hours and hyperalgesia by sensitivity to pain after 3 hours the positive control injection. Each value is the mean ± SEM of 3 tests, expressed as %. * P < 0.05 were considered significant, compared with positive control group.

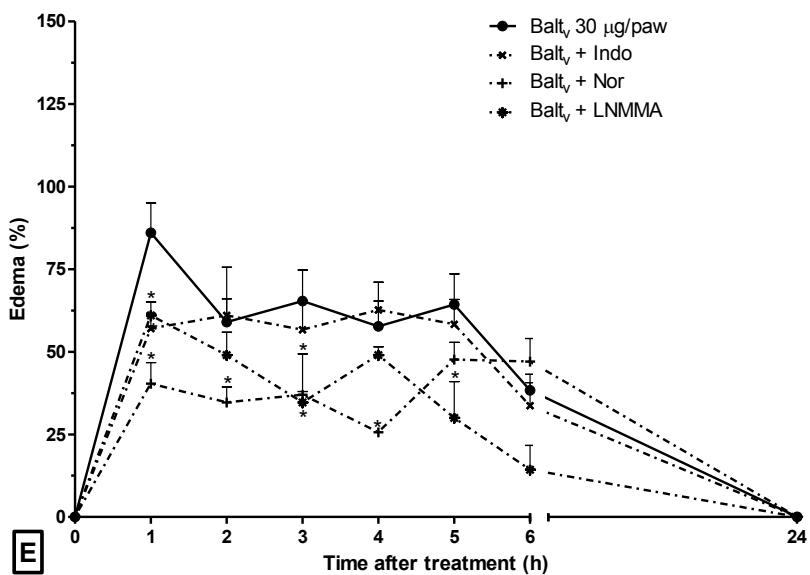
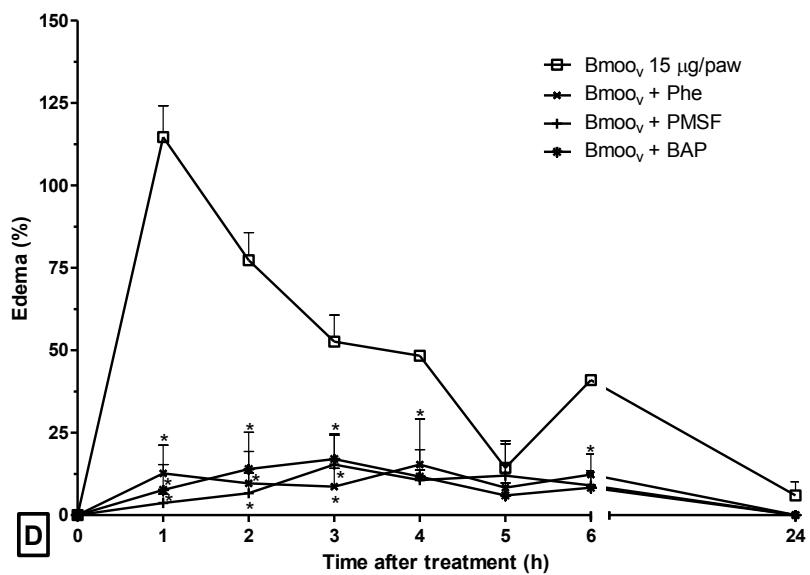
3.2. Analysis of local inflammatory effects induced *Balt_v* and *Bmoo_v*

3.2.1. Oedematogenic effect induced by crude or treated venoms

The intraplantar injection of the *Balt_v* and *Bmoo_v* (5 – 30 µg/paw) caused severe time-dependent oedema in the rats. The maximum increase in hind-paw swelling occurred at 1 hour after injection of both venoms, and gradually decreased thereafter, disappearing within 24 hours (Figs. 1A-B). The maximal oedematogenic effect caused by *Balt_v* (86% at 30 µg/paw) was significantly reduced by Phe and BAP treatment, whereas PMSF slightly reduced the effect at 5 hours (Fig. 1C). All doses of *Bmoo_v* caused strong oedema of similar intensity (90 - 115%), which was effectively neutralised by all chemical treatments (Fig. 1D). Besides this, pharmacological modulation with Indo, Nor and LNMMA statistically reduced the peak footpad swelling induced by *Balt_v* and *Bmoo_v* (Figs. 1E-F). The treatment with Prom was also effective in reducing the oedema caused by *Bmoo_v* (Fig. 1F), but had no effect on the *Balt_v* (data not show). HOE was not able to reduce the oedematogenic effect induced by the venoms (data not show).







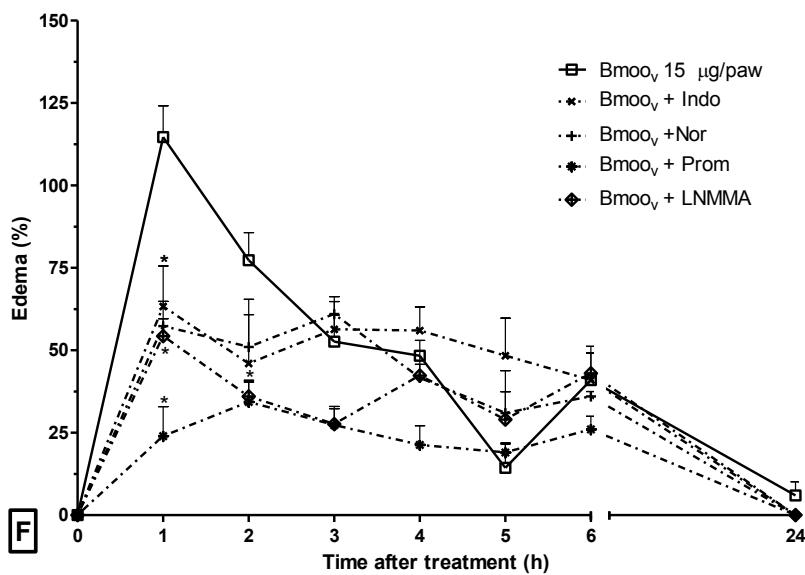
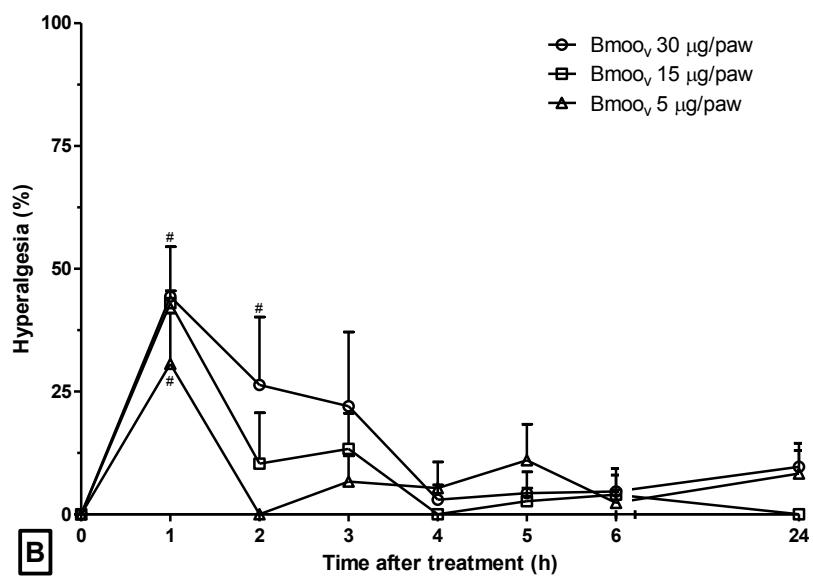
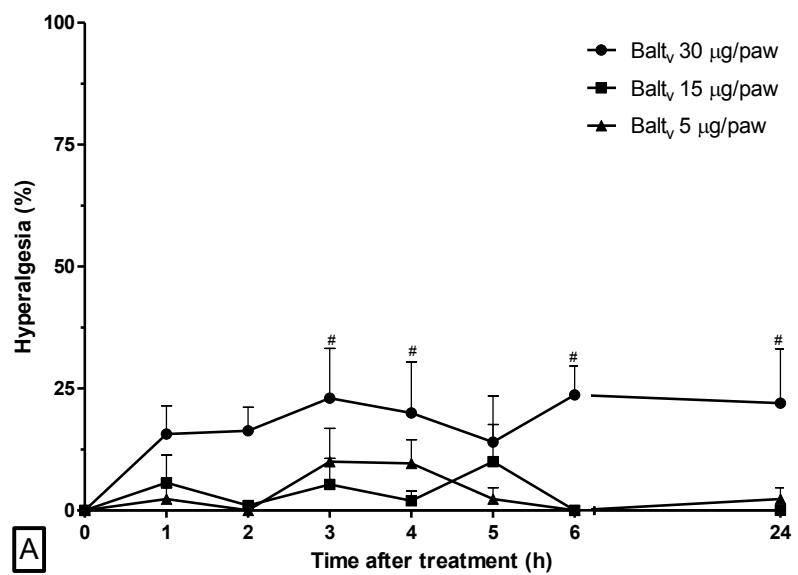
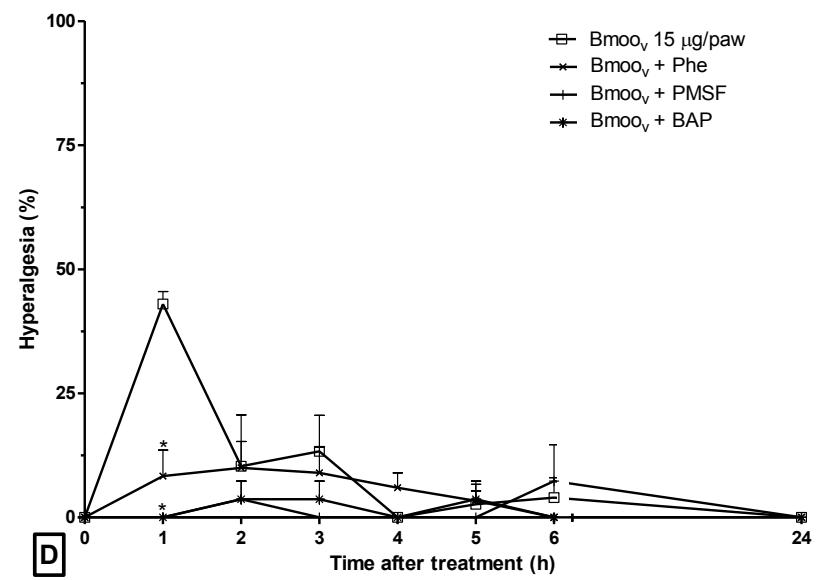
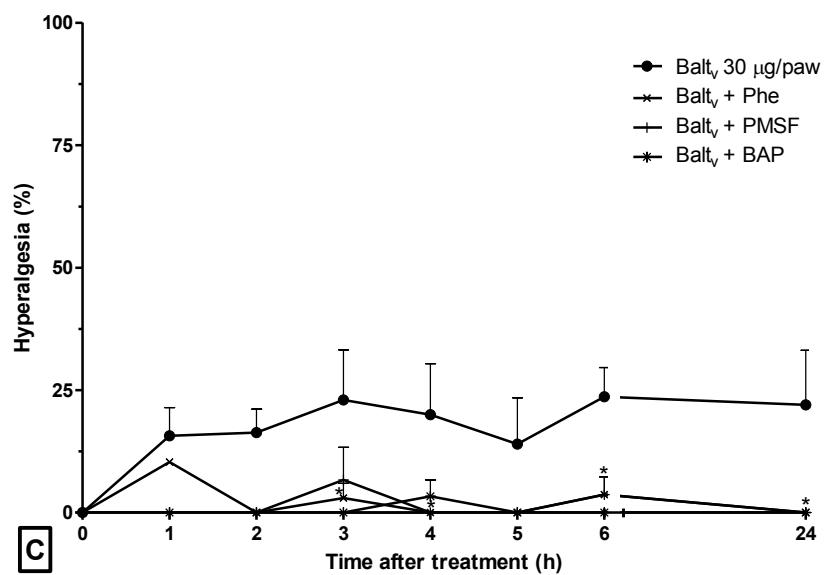


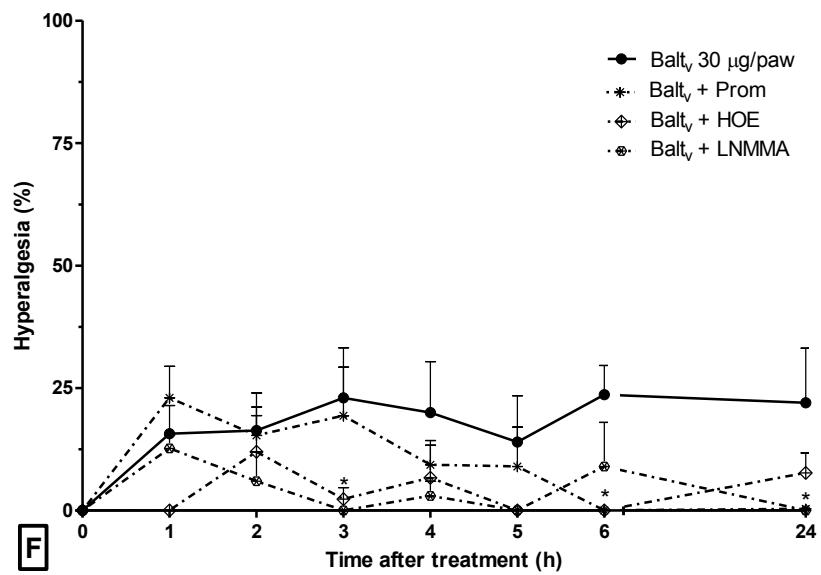
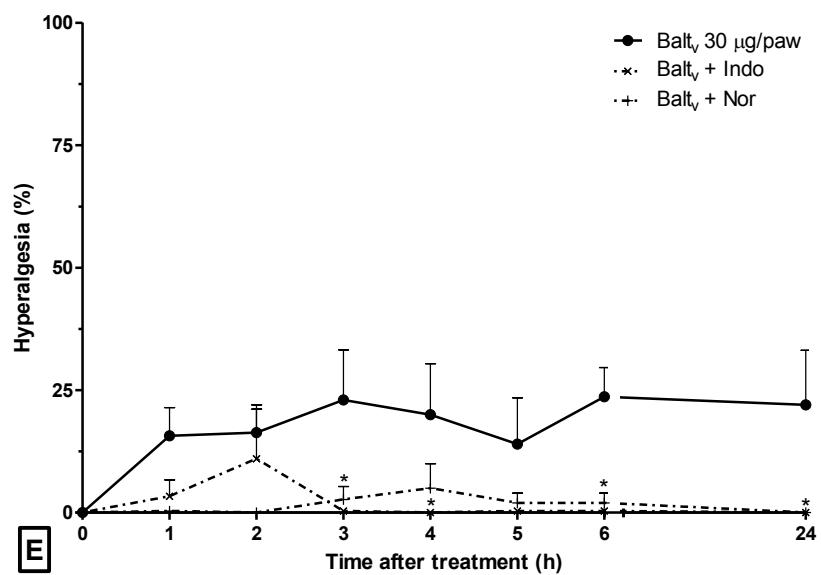
Figure 1: Comparison of Oedema induced by crude or treated venoms. **A-B:** Oedema response. The oedema caused by crude venoms (5–30 µg/paw) was determined by increase the volume in right hind paw rats compared with the control contralateral paw. **C-D:** inhibitors treatments. The venoms were pretreated with 10 mM Phe, 20 mM PMSF or 20 mM BAP and injected in footpad for compared with the oedema formation induced by untreated venoms. **E-F:** Pharmacological treatments. Groups of rats were treated with Indo (8.0 mg/kg), Nor (100 mg/kg) and Prom (15 mg/kg) 30 min before of the injection (i.p.) of the control or venoms, HOE (10 µg/paw) and L-NMMA (100 µg/paw) were simultaneously injected (i.pl.) with the control, Balt_v (30 µg/paw) or Bmoo_v (15 µg/paw). Oedema was measured by a plethysmometry and expressed in percentage of increase volume in relation to initial values. Each point is the mean ± SEM of 3 values. P < 0.05 were considered significant, compared with relative volume of paws before venom injection (#) or crude venom group (*).

3.2.2. Hyperalgesic effect induced by crude or treated venoms

The intraplantar injection of Balt_v and Bmoo_v (5 – 30 µg/paw) induced differential time-courses of the hyperalgesic effect. Fig. 2A shows that Balt_v (30 µg/paw) caused a significant increase in the sensitivity to pain (around 25%) from the first hour, which remained until 24 hours after injection. Bmoo_v caused a higher increase in the sensitivity to pain than Balt_v. Bmoo_v (15 and 30 µg/paw) induced a peak of hyperalgesic response (around 40%) 1 hour after injection, which disappeared 4 hours after injection (Fig. 2B). The hyperalgesia induced by both venoms was effectively inhibited by all chemical and pharmacological treatments (Figs. 2C-H).







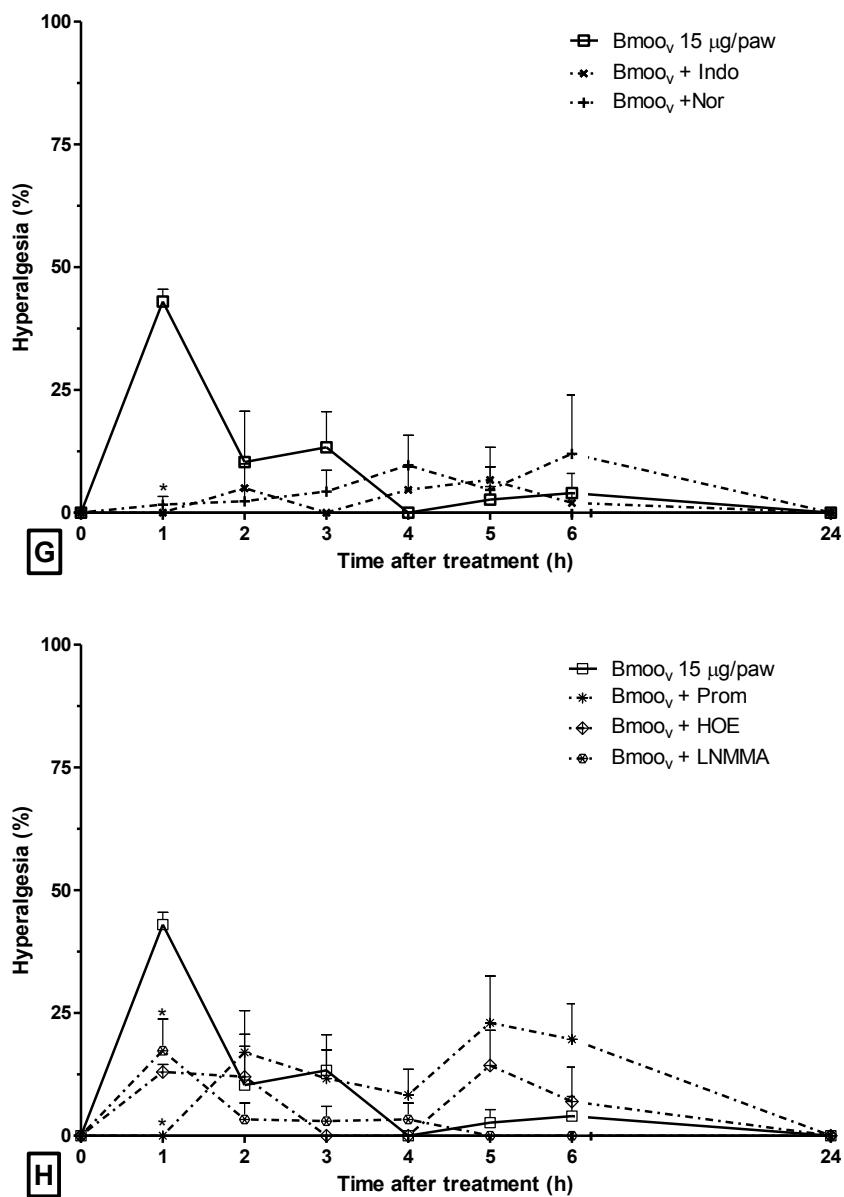


Figure 2: Comparison of hyperalgesia induced by crude or treated venoms. **A-B:** The hyperalgesia caused by crude venoms (5–30 µg/paw) was determined by increase in the sensitivity to pain in right hind paw rats compared with the control contralateral paw. **C-D:** Inhibitors treatments. The venoms were pretreated with 10 mM Phe, 20 mM PMSF or 20 mM BAP and injected in foodpad for compared with the hyperalgesic response induced by untreated venoms. **E-H:** Pharmacological treatments. Groups of rats were treated with Indo (8.0 mg/kg), Nor (100 mg/kg) and Prom (15 mg/kg) 30 min before of the injection (i.p.) of the control or venoms, HOE (10 µg/paw) and L-NMMA (100 µg/paw) were simultaneously injected (i.pl.) with the control, Bmoo_v (30 µg/paw) or Bmoo_v (15 µg/paw). Hyperalgesia was measured by pressure test and expressed in percentage of increase in the sensitivity to pain relative to values before injection venoms. Each point is the mean ± SEM of 3 values. P < 0.05 was considered significant, compared with relative nociceptive threshold of paws before venom injection (#) or with the crude venom group (*).

3.2.3. Myotoxic activity induced by crude or treated venoms

Intramuscular injection of *Balt_v* and *Bmoo_v* caused myotoxic effects in mice, as demonstrated by an increase in plasma CK activity (Fig. 3). Three hours after injection, *Balt_v* (60 µg) induced a slight increase in CK activity to 302.67 ± 59.95 U/L compared with 1375.67 ± 194.05 U/L for *Bmoo_v* (30 µg). The chemical treatments failed to reduce the myotoxic effect induced by *Balt_v*. Curiously, the treated *Balt_v* showed an increase in myotoxicity compared with untreated *Balt_v*. In contrast, all chemical treatments significantly reduced the potent myotoxicity induced by *Bmoo_v*. The myotoxic activity induced by *Bmoo_v* was virtually abolished when treated with BAP. On the other hand, treatment with Phe and PMSF was able to inhibit myotoxic activity by about 50%. Moreover, pharmacological modulation with Indo, Prom and HOE inhibited 42, 35 and 22% of the CK activity induced by *Balt_v*, respectively. All anti-inflammatory treatments were able to reduce the myotoxicity caused by *Bmoo_v* by more than 50% (Fig. 3B).

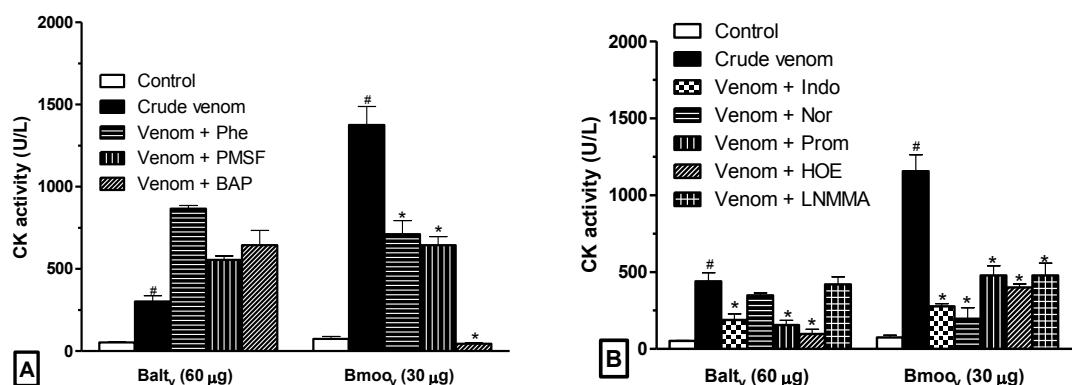


Figure 3: Comparison of myotoxic activity induced by crude or treated venoms. The myotoxic effect induced by crude or treated *Balt_v* (60 µg) and *Bmoo_v* (30 µg) was measured by increased in plasma CK activity after 3 hours compared with control group. **A:** Inhibitors treatments. The venoms were pretreated with 10 mM Phe, 20 mM PMSF or 20 mM BAP and injected in muscle for compared with the CK activity induced by untreated venoms. **B:** Pharmacological treatments. Groups of rats were treated with Indo (8.0 mg/kg), Nor (100 mg/kg) and Prom (15 mg/kg) 30 min before of the injection (i.p.) of the control or venoms, HOE (10 µg/paw) and L-NMMA (100 µg/paw) were simultaneously injected (i.m.) with the control, *Balt_v* or *Bmoo_v*. CK activity was determined in plasma collected from mice and expressed as U/L. Each bar is the mean \pm SEM of 3 values. $P < 0.05$ compared with relative control group ([#]) or crude venom group (^{*}) were considered statistically significant.

4. Discussion

Bothropic envenomation is characterised by severe local damage caused by the toxic action of venom components and aggravated by the induction of inflammation (Chacur, et al., 2001; Teixeira, et al., 2005; Bonavita, et al., 2006; Nascimento, et al., 2010; Zychar, et al., 2010). In this work, we describe a comparative study of the local inflammatory effects caused by the venoms of *B. alternatus* and *B. moojeni*, two snakes of epidemiological importance in Brazil.

Firstly, we investigated the contribution of different classes of enzymes on the effects (haemorrhagic, coagulant and PLA₂ activities) caused by envenomation. Both venoms were pretreated with inhibitors of SVMPs, SVSPs and PLA₂. Our results showed that Bmoo_v has higher PLA2 and SVSP activities than Balt_v. On the other hand, Balt_v has more SVMP activity than Bmoo_v (Table I). Our results are in agreement with the literature. Several studies have shown that SVMPs and PLA₂ are the main agents that induce local lesions from bothropic accidents (Gonçalves, et al., 2000; Gutiérrez, et al., 2003; Teixeira, et al., 2003; Zychar, et al., 2010). In addition, some studies have shown that SVSPs contribute little to the manifestation of local effects (Saravia-Otten, et al., 2004; Zychar, et al., 2010; Serrano, 2013). The pharmacological treatments used to investigate the participation of several mediators in the pathogenesis of the local effects the venom were also analysed. The choice of the doses of medication used were those determined as most efficiently counteracting the effects caused by carrageenan, a proinflammatory polysaccharide used as a positive control for induction of oedema and hyperalgesia in experimental animals (Van Arman et al., 1965). Our results showed that all the pharmacological treatments tested reduced the oedema and hyperalgesia caused by carrageenan (Table II).

The effects of the toxic action of the components of venoms may be aggravated by subsequent activation and persistence of the inflammatory reaction at the site of injury (Zamuner, et al., 2005; Cardoso, et al., 2003). In this work, we characterised the oedematogenic and hyperalgesic effects induced by both venoms, relating them to the inflammatory response. Our results showed that intraplantar injection (5–30 µg/paw) of both Balt_v and Bmoo_v induced an intense

footpad oedema, characterised by an increase in the volume of rat paw in the first hour after injection of venom, and remaining for up to 6 hours (Fig. 1A, 1B). The injection of both *Balt_v* and *Bmoo_v* also increased the sensitivity to pain. Although the injection of *Balt_v* induced a low level of hyperalgesia, it persisted for up to 24 hours after injection (Fig. 2A). Unlike *Balt_v*, *Bmoo_v* caused an increase in sensitivity to pain only in the period 1 to 3 hours after injection (Fig. 2B). Similar studies with venoms of other *Bothrops* snakes have also confirmed the rapid formation of oedema, usually accompanied by pain (Lomonte, et al., 1993; Faria, et al., 2001; Picolo, et al., 2002).

These results demonstrate that the oedematogenic and hyperalgesic effects caused by *Bmoo_v* are considerably more potent than those caused by *Balt_v*. These effects are mainly linked to the proteolytic and cytotoxic actions of venom on tissue components (Rodrigues, et al., 2001; Chacur, et al., 2003; Teixeira, et al., 2003; Gay, et al., 2005; Gomes, et al., 2009).

SVMPs, for example, may act directly on the microvasculature, causing vascular injury and blood leakage, and activating inflammatory mediators and nociceptive receptors (Bjarnason, et al., 1994; Gutiérrez, et al., 2000; Lopes, et al., 2009; Teixeira, et al., 2005; Zychar, et al., 2010). In addition, PLA₂ may act on the membrane of endothelial or muscle cells and contribute to the deterioration of local manifestations of envenomation (Chacur, et al., 2003; Barbosa, et al., 2003; Harris, 2003; Teixeira, et al., 2003; Gutiérrez, et al., 2009a). The difference in the intensity of local effects may be related to the variability of the protein composition and prevalence of haemorrhagic and myotoxic components in the bothropic venoms (Nishioka, et al., 2000; Queiroz, et al., 2008; Ohler, et al., 2010).

Our results are in agreement with the literature and suggest that SVMPs and PLA₂ have an important role in the induction of hyperalgesia (Fig. 2C/D) and oedema (Fig. 1C/D) caused by bothropic envenomation. However, our results show that the SVSPs significantly contributed to the formation of oedema (Fig. 1C, 1D) and hyperalgesic (Fig. 2C, 2D) effects induced by both *Balt_v* and *Bmoo_v*. The SVMPs and PLA₂ seem to have a primary role in the formation of oedema, while SVSPs contribute to the permanence of these effects caused by *Balt_v*, since treatment with PMSF was only able to inhibit the increase of the volume of the paw

of rats some hours after injection of venom. The results described by Menaldo et al. (2013) correlate with our findings. These authors showed that two SVSPs isolated from *B. pirajai* venom are involved in formation of oedema and in a hyperalgesic response. Other studies of the characterisation of isolated proteins from bothropic venom have shown that PLA₂ and SVMPs cause a peak of oedema and hyperalgesia in the first hour after injection (Rodrigues, et al., 2001; Chacur, et al., 2003; Teixeira, et al., 2003; Gay, et al., 2005; Gomes, et al., 2009)..

Considering that SVMPs and PLA₂ are frequently associated with muscular damage, we examined the involvement of these enzymes on venom-induced myotoxicity (Harris, 2003; Gay, et al., 2005; Gutiérrez, et al., 2010). Myonecrosis is one of the most significant local effects of bothropic envenomation (Gutiérrez, et al., 2010; Bernarde, 2014). It can be caused by the direct action of PLA₂ on the membrane of the muscle cell, or by an indirect mechanism of vascular degeneration, cell damage and inflammatory reaction triggered by SVMPs and other components present in the venom (Gutiérrez, et al., 2003; Gutiérrez, et al., 2009a; Dennis, et al., 2011; Markland Jr., et al., 2013). The myotoxicity induced by Bmoo_v was more intense than Balt_v; Bmoo_v (30 µg) caused a myotoxic effect about five times greater than Balt_v (60 µg) (Fig. 3A, 3B). In addition, our results have shown that phospholipase inhibitors (BAP) completely abolished the myonecrosis caused by Bmoo_v, while serine (PMSF) and metalloprotease (Phe) inhibitors partially inhibited this effect (Fig. 3A). These data suggest that PLA₂ are the main components of the venom responsible for myonecrosis, while serine and metalloproteases have a secondary role in myotoxicity.

Interestingly, plasma CK levels were increased when Balt_v was pretreated with the enzymatic inhibitors (BAP, Phe and PMSF) (Fig. 3B). Our results indicated that these inhibitors do not interfere with haemorrhagic, coagulant and haemolytic activities, when tested alone (data not shown). However, we suggest that they can cause muscle damage when they are associated with Balt_v (Fig. 3A). Some studies have shown a strong contribution of the non-enzymatic components in Balt_v-induced myonecrosis (Nisenbom, et al., 1986; Ponce-Soto, et al., 2007; Mamede, et al., 2013; Setúbal, et al., 2013). In contrast, Gay et al. (2013) showed that SVMPs have a key role in the development of myonecrosis induced by Balt_v.

These authors showed that monospecific antibodies against baltergin, a metalloproteinase, were efficient in neutralising the myotoxicity of *Balt_v* from Argentina. Although our results are divergent, they reaffirm that variation in the composition of venom can influence the differentiation of their biological effects. This variability and complexity of venoms may be due to ontogenetic and geographic variations and has implications for the treatment of snakebites (Furtado, 1987; Chippaux, et al., 1991; Ohno, et al., 1998; Da Rocha, et al., 2005; Gutiérrez, 2009).

Herein, we observe that the local changes induced by the venom of both *Balt_v* and *Bmoo_v* are mediated by a synergic action of different inflammatory mechanisms. Pharmacological treatment was used to assess the role of these mediators in local effects caused by bothropic venom. The treatment with drugs that inhibit eicosanoid synthesis indicates the involvement of lipid mediators of the inflammatory effects induced by both *Balt_v* and *Bmoo_v* (Figs. 1E/F, 2E/G, 3B). Eicosanoids are important vasoactive mediators and chemotactics derived from arachidonic acid. Arachidonic acid derived from hydrolysis of membrane phospholipids by the action of PLA₂ can be degraded by lipoxygenase (LOX), giving rise to leukotrienes, or by cyclooxygenase (COX), which catalyses the biosynthesis of prostaglandins and thromboxanes (Murakami, et al. 2003; Majno & Joris, 2004; Cabral, 2005).

We also observed the involvement of histamine, bradykinin and nitric oxide in inflammation induced by both *Balt_v* and *Bmoo_v*, using Promethazine, HOE and L-NMMA, respectively (Figs. 1F, 2E/H, 3B). Interestingly, the treatment with a selective H₁ histamine receptor antagonist was not able to reduce the edema induced by *Balt_v*, indicating a minor role of histamine in this effect. Histamine is considered the principal mediator that causes increased vascular permeability in the inflammatory process. Its vasoactive action is due to sensitivity of H₁ receptors on endothelial cells. Histamine causes vasodilation and oedema formation, when associated with kinins and other mediators contributing to activation of nociceptors (Hofstra, et al., 2003; Huang, et al., 2008). The start and persistence of inflammatory reaction at the site of injury is mediated mainly by the action of bradykinin, prostaglandins and nitric oxide (Sherwood et al., 2004; Schimdt-

Schonbein, 2006). Our results are in agreement with the literature and suggest that these mediators of the inflammatory response participate in oedematogenic and hyperalgesic effects induced by *Balt_v* and *Bmoo_v*. Nascimento et al. (2010) also noted the participation of those mediators in oedema induced by *Bmoo_v*. The same authors highlighted the important contribution of mast cells in the release of histamine and in the potentiation of the effects in the first hour of treatment.

The muscular lesion caused by *Balt_v* and *Bmoo_v* in mice was efficiently neutralised by a COX-inhibitor and H₁ and B₂ antagonists, indicating that eicosanoids, histamine and bradykinin have an important role in the myotoxic effect of bothropic venom. Leukotrienes and nitric oxide were also involved in myotoxicity of *Bmoo_v*. On the other hand, it appears that these mediators are not involved in myonecrosis caused by *Balt_v*, since Nor (LOX inhibitor) and L-NMMA (NOs-inhibitor) were not able to reduce the release of CK. These findings are different from those of Chacur et al. (2001) and Faria et al. (2001). Those authors suggest that leukotrienes are the predominant mediators in the inflammatory response caused by the venoms of *B. lanceolatus* and *B. asper* snakes.

Finally, we showed that the oedema, hyperalgesia and myotoxicity induced by *Balt_v* are relatively smaller than those caused by *Bmoo_v*. We also verified the participation of SVMPs and PLA₂ in all local effects induced by both *Balt_v* and *Bmoo_v*, and we identified the contribution of SVSPs from *Bmoo_v* in the pathogenesis of these effects. In addition, we found that the inflammatory reaction induced by *Bmoo_v* is mediated by eicosanoid action, histamine and nitric oxide, with significant participation of bradykinin on the hyperalgesic and myotoxic effects of this venom. These mediators also contribute to inflammation caused by *Balt_v*. However, the inefficient anti-inflammatory effects of some local modulation suggest that histamine, leukotrienes and nitric oxide have little role in the oedema or myonecrosis of *Balt_v*.

Acknowledgments

The authors thank the technical and financial support by Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- ANGULO, Y. et al. Isolation and characterization of myotoxin II from *Atropoides* (*Bothrops*) nummifer snake venom, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 32, p. 63-71, 2000.
- BARBOSA, A.M. et al. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, v. 42, p. 515–523, 2003.
- BERNARDE, P.S. *Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil*. São Paulo: Anolisbooks, 2014, 224 p.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.*, v. 14, p. 352–372, 1994.
- BONAVITA, A.G. et al. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon*, v. 47, p. 885–893, 2006.
- BORKOW, G.; GUTIERREZ, J.M.; OVADIA, M. Inhibition of the hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. *Toxicon*, v. 35, p. 865–877, 1997.

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica*. 7. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

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

CARDOSO, J.L.C. et al. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003, 468 p.

CARDOSO, K.C. et al. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genomics*, v. 11, p. 1-22, 2010.

CHACUR, M. et al. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, v. 39, p. 1173-1181, 2001.

CHACUR, M. et al. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, v. 41, p. 667-678, 2003.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, v. 29, p. 1279-1303, 1991.

COSTA, J.O. et al. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, v. 55, p. 1365-1377, 2010.

DA ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Dulméril, Bibron & Dulméril em função da distribuição

geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae) *Re. Bras. Zoologia*, v. 22, p. 383-393, 2005.

DENNIS, E.A et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.*, v. 111, p. 6130-6185, 2011.

DIAZ-OREIRO, C.; GUTIERREZ, J.M. Chemical modification of histidine and lysine residues of myotoxic phospholipases A₂ isolated from enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon*, v. 35, p. 241–252, 1997.

FARIA, L. et al. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. *Toxicon*, v. 39, p. 825-830, 2001.

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

FURTADO, M.F.D. *Contribuição ao estudo do veneno de Bothrops moojeni (HOGE, 1965) em função da idade das serpentes*. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Biociências, Universidade de São Paulo, 1987.

GAY, C. et al. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*, v. 46, p. 546–554, 2005.

GAY, C. et al. Effect of monospecific antibodies against baltergin in myotoxicity induced by *Bothrops alternatus* venom from northeast of Argentina. Role of metalloproteinases in muscle damage. *Toxicon*, v. 63, p. 104–111, 2013.

GOMES, M.S.R. et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 53, p. 24–32, 2009.

GONÇALVES, L.R.C.; MARIANO, M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediat. Inflamm.*, v. 9, p. 101–107, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*, v. 26, p. 411–413, 1988.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, v. 36, p. 1529–1538, 1998.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of Proteomics*, v. 72, p. 165–182, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 958–975, 2009a.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Tissue pathology induced by snake venoms: How to understand a complex pattern of alterations from a systems biology perspective? *Toxicon*, v. 55, p. 166–170, 2010.

GUTIÉRREZ, J.M. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. *Toxicon*, v. 60, p. 676–687, 2012.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, v. 42, p. 915–931, 2003.

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

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

HOFSTRA, C.L. et al. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 305, p. 1212–1221, 2003.

HUANG, J.F.; THURMOND, R.L. The new biology of histamine receptors. *Curr. Allergy. Asthma. Rep.*, v. 8, p. 21–27, 2008.

ISBISTER, G.K. et al. Human anti-snake venom IgG antibodies in a previously bitten snake-handler, but no protection against local envenoming. *Toxicon*, v. 55, p. 646-9, 2009.

LIMA, J.S. et al. Perfil dos acidentes ofídicos no norte do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Soc. Brasil. Med. Tropical*, v. 45, p. 561-564, 2009.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*, v. 17, p. 93–105, 1993.

LOPES, D.S. et al. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. *Toxicon*, v. 54, p. 42–49, 2009.

LUNDBLAD, R.L. A rapid method for the purification of bovine thrombin and the inhibition of the purified enzyme with phenylmethylsulfonyl fluoride. *Biochemistry*, v. 10, p. 2501-2506, 1971.

MAJNO, G.; JORIS, I. *Cells, tissues and diseases: Principles of general pathology*. Oxford: New York, 2^a ed., 2004, 1005p.

MAMEDE, C.C.N. et al. Histological and Ultrastructural Analyses of Muscle Damage Induced by a Myotoxin Isolated from *Bothrops alternatus* Snake Venom. *Protein & Peptide Letters*, v. 20, p. 192-199, 2013.

MARKLAND Jr., F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 3–18, 2013.

MENALDO D.L. et al. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. *International Immunopharmacology*, v. 15, p. 764–771, 2013.

MORAIS, N.C.G. et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Toxicon*, v. 60, p. 1251–1258, 2012.

MURAKAMI, M.; KUDO I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A₂s. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 525, p. 87, 2003.

NASCIMENTO, N. G. et al. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*, v. 55, p. 343–352, 2010.

NIKAI, T. et al. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (Western Diamondback Rattlesnake). *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 321, p. 309–319, 1984.

NISENBOM, H.E.; SEKI, C.; VIDAL, J. Phospholipases A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. *Toxicon*, v. 24, p. 1137-1144, 1986.

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

NISHIOKA, S.A. et al. Occupational injuries with captive lance headed vipers (*Bothrops moojeni*): experience from a snake farm in Brazil. *Trop. Med. Int. Health*, v. 5, p. 507–510, 2000.

OHLER, M. et al. The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. *Journal of Proteome Research.*, v. 9, p. 2422–2437, 2010.

OHNO, M. et al. Molecular evolution of snake toxins: is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, v. 59, p. 307–64, 1998.

PICOLO, G. et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. *Braz J Med Biol Res.*, v. 32, p. 1221-1228, 2002.

PONCE-SOTO, L.A. et al. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 4, p. 585-593, 2007.

QUEIROZ, G.P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*, v. 52, p. 842–851, 2008.

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

RODRIGUES, V.M. et al. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie*, v. 83, p. 471–479, 2001.

SARAVIA-OTTEN, P. et al. Membrane independent activation of fibroblast proMMP-2 by snake venom: novel roles for venom proteinases. *Toxicon*, v. 44, p. 749–764, 2004.

SCHIMD-SCHONBEIN, G.W. Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 8, p. 93-131, 2006.

SERRANO, S.M.T. The long road of research on snake venom serine proteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 19–26, 2013.

SETÚBAL, S.S. et al. Action of Two Phospholipases A₂ Purified from *Bothrops alternatus* Snake Venom on Macrophages. *Biochemistry*, v. 78, p. 194-203, 2013.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.*, v. 18, p. 385-405, 2004.

SMOLKA, M.B. et al. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*, v. 36, p. 1059–1063, 1997.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*. v. 54, p. 988–997, 2009.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor. *Toxicon*, v. 32, p. 419–426, 1994.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon*, v. 42, p. 947–962, 2003.

TEIXEIRA, C.F.P. et al. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100, p. 181-184, 2005.

VAN ARMAN, C.G. et al. Some details of the inflammation caused by yeast and carrageenin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 150, p. 328-333, 1965.

ZAMUNER, S.R. et al. 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.

ZYCHAR, B.C. et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*, v. 55. p. 227-234, 2010.

Anexo

Histological and ultrastructural analyses of muscle damage induced by a myotoxin isolated from *Bothrops alternatus* snake venom

(Research article)

Histological and Ultrastructural Analyses of Muscle Damage Induced by a Myotoxin Isolated from *Bothrops alternatus* Snake Venom

Carla Cristine Neves Mamede^{a,c}, Mayara Ribeiro de Queiroz^{a,c}, Kelly Cortes Fonseca^{a,c}, Nadia Cristina Gomes de Moraes^{a,c}, Saulo Antônio Gomes Filho^a, Marcelo Emilio Beletti^b, Leonilda Stanziola^{b,c} and Fábio de Oliveira^{b,c*}

^a*Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil;* ^b*Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia-MG, Brazil;* ^c*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil*

Abstract: Muscular necrosis is a serious consequence of *Bothrops* snake bites that may lead to permanent loss of tissue or function. Myonecrosis may be due to injury to blood vessels, destabilization and/or rupture of plasma membrane, and inflammatory mechanisms triggered by different proteins from the snake venom. In this work we describe the isolation and partial functional characterization of a myotoxin from *B. alternatus* snake venom. The myotoxin was isolated by a combination of ion exchange and gel filtration chromatography and displayed a molecular weight of approximately 15,000, as estimated by SDS-PAGE under reducing conditions. In non-reducing conditions a protein band of approximately 25,000 was also observed, suggesting that its native form is a homodimer. The myotoxin induced myonecrosis, but had no proteolytic and phospholipase A₂ activities. The myotoxic activity was assessed on the basis of the histological and ultrastructural alterations induced by the toxin in the gastrocnemius skeletal muscle of Swiss mice. The toxin led to a series of drastic degenerative events characterized by extensive cellular destruction, loss of the arrangements of skeletal fibers, intense infiltration of inflammatory cells, fatty degeneration and hemorrhage. Electron microscopy analyses revealed that the myotoxin caused cell swelling, mitochondrial alterations and dilation of the sarcoplasmic reticulum, but did not affect the integrity of the muscle cell membranes. The myonecrosis caused by this toxin was related to the perturbation in the membrane permeability, intracellular alterations and inflammatory reaction.

Keywords: *Bothrops alternatus*, histopathology, myotoxin, myonecrosis, skeletal muscle, ultrastructural alterations.

1. INTRODUCTION

Bothrops snake venoms induce predominantly local myonecrosis associated with other effects, such as edema, hemorrhage and pain. The local pathology may evolve to gangrene and tissue loss requiring amputation of the affected member [1]. The myotoxicity may be caused by injury to blood vessels, inflammatory responses and, consequently, cellular death [2, 3, 4]. Myonecrosis may occur by the direct action of myotoxic components on muscle cells and/or indirectly by proteases and other toxic components, which cause hemorrhages, blistering and coagulation alterations [5, 6, 7].

Myotoxic components or myotoxins from snake venoms are low molecular weight proteins that induce direct cytotoxicity to skeletal muscle cells [8]. They have been divided into three main groups: myotoxic peptides [9], cardiotoxins [10] and myotoxic phospholipases A₂. The most important muscle-damaging components from *Bothrops* venoms are phospholipases A₂ (PLA₂) [3]. These enzymes specifically catalyze the hydrolysis of fatty acid ester bonds at position 2 of 1,2-diacyl-sn-3-phosphoglycerides and the presence of

specific amino acid residues in the catalytic site is essential to calcium-binding and to the mechanism of action [11]. Myotoxic PLA₂s isolated from *Bothrops* venom are classified into Asp49 PLA₂s, which contain an Asp residue at position 49, and Lys49 PLA₂s, which contain a Lys residue instead. Asp49 PLA₂s show catalytic activity on artificial substrates while Lys49 PLA₂s show little or no activity [12, 13].

Myotoxic PLA₂s and other myotoxins have different mechanisms to induce alterations of the plasma membrane, consequently leading to physiological changes of cells and tissues. The damage induced by myotoxic PLA₂s may occur by membrane disruption through enzymatic phospholipid degradation or by destabilization of the membrane through a mechanism that is independent of the catalytic action [3].

The alterations induced by snake venom myotoxins may serve as a model for studies of injury and repair of muscles, and be used as a pharmacological model for production of more efficient antivenoms [14]. In this work, we describe the isolation and partial functional characterization of a myotoxin from *B. alternatus* snake venom. We aimed to investigate the morphological changes of the skeletal muscle induced by this myotoxin by light and electron microscopic analyses.

*Address correspondence to this author at the Instituto de Ciências Biomédicas/ Universidade Federal de Uberlândia - Av. Para 1720 - Bloco 2A - 2º andar - Campus Umuarama- Uberlândia - MG - CEP 38400-902; Tel/Fax: +55-34-3218-2200; E-mail: foliveira@umuarama.ufu.br

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Desiccated *B. alternatus* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais - São Paulo, Brazil). Acrylamide, ammonium bicarbonate, ammonium persulfate, bromophenol blue, β -mercaptoethanol, *N,N*-methylene-bis-acrylamide, osmium tetroxide, plumb citrate, sodium dodecyl sulphate (SDS), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED) and uranyl acetate were purchased from Sigma Chemical Co. (USA). Glycine, Tris, molecular weight markers (LMW: low molecular weight) for electrophoresis, diethylaminoethanol-Sepharose (DEAE-Sepharose) and Sephadex G-75 chromatographic media were from GE Healthcare (Sweden). Epon resin was purchased from Fluka (Switzerland). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Animals

The experimental animals, male Swiss mice ($20\text{ g} \pm 5\text{ g}$), were obtained from the Federal University of Uberlândia (Uberlândia - Minas Gerais, Brazil). The animals were housed in a temperature-controlled room (23°C) on an automatic 12 h light/dark cycle (6:00 AM - 6:00 PM of light phase). Food and water were freely available until the beginning of the experiments. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU, Protocol number 028/09).

2.3. Isolation of Myotoxin

B. alternatus crude venom (200 mg) was dissolved in 0.05 M ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8 (Ambic), and clarified by centrifugation at $10,000 \times g$ for 10 min. The supernatant was applied to a DEAE-Sepharose column ($1.7 \times 15\text{ cm}$) previously equilibrated with Ambic and eluted with a convex concentration gradient (0.05 - 1.0 M) of the same buffer. The third fraction, called A3, was applied to a Sephadex G-75 ($1.0 \times 100\text{ cm}$) column previously equilibrated with Ambic. Both chromatographic methods were carried out at a flow rate of 20 mL/h. Fractions of 3.0 mL/tube were collected, monitored by absorbances at $\lambda = 280\text{ nm}$, pooled and lyophilized.

2.4. Biochemical Characterization

The molecular weight of the isolated myotoxin was determined by electrophoresis in 14% polyacrylamide gels under denaturing conditions (SDS-PAGE) [15]. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer, pH 8.3, containing 0.01% SDS. Gels were stained with 0.2% (w/v) Coomassie Blue R-250 in acetic acid:methanol:water (1:5:5, v/v/v). The relative molecular mass of the isolated myotoxin was estimated by Kodak 1D image analysis software (USA). Protein concentration was determined according to a microbiuret method described by Itzhaki and Gill, using bovine serum albumin as standard [16].

2.5. Functional Characterization

Proteolytic activity was assayed on azocasein as previously described by Mário *et al.* [17]. Samples of $10\text{ }\mu\text{g}$ of

myotoxin were incubated with 2 mL of azocasein solution (1 mg/mL) in 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0, 4 mM CaCl₂ for 30 min. The reaction was stopped by the addition of 3 mL of 5% (v/v) trichloroacetic acid (TCA) and the mixture was left standing for 20 min at room temperature before centrifugation (10,000 g) for 10 min. The proteolytic activity was estimated by reading the absorbance of the clear supernatant at 366 nm. One unit azocaseinolytic activity was defined as the amount of enzyme which produces an absorbance increase of 0.01 units per minute.

Phospholipase A2 activity assay was performed as described by Dole [18]. Crude egg yolk phospholipid diluted 1:5 in 0.1 M Tris-HCl, 0.01 M CaCl₂, pH 8.5, 1% Triton X-100, was used as substrate. Isolated myotoxin was added to 10 mL of substrate and incubated at 37°C for 15 min. Free fatty acids were extracted and titrated with 0.018 M NaOH.

2.6. Histological Analysis of Myonecrosis

Myotoxic activity was evaluated through morphological alterations induced by intramuscular injections of $50\text{ }\mu\text{g}$ of either isolated myotoxin (in a volume of $50\text{ }\mu\text{L}$ sterile saline) or *B. alternatus* crude venom into the right gastrocnemius muscle of mice ($n = 4$). Control animals received an injection of sterile saline ($50\text{ }\mu\text{L}$) under identical conditions. Twenty four hours after the injection, the animals were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine, and a section of the muscle was excised and fixed in 10% formaldehyde solution. The tissue was dehydrated by increasing concentrations of ethanol and processed for inclusion in paraffin. Sections 5 μm -thick were stained with hematoxylin-eosin (HE) and examined under a light microscope.

2.7. Ultrastructural Analysis of Myonecrosis

Myonecrosis was also evaluated according to Cheville [19]. Four mice were euthanized with overdose of ketamine/xylazine and gastrocnemius muscle was excised after perfusion of phosphate buffered saline (PBS). Explanted muscles were kept in 0.5 mL of DMEM medium, 10% fetal bovine serum, plus $25\text{ }\mu\text{g}$ isolated myotoxin in $50\text{ }\mu\text{L}$ of PBS. PBS alone was used as negative control. This strategy was used to remove the inflammatory effect on the tissue due to injury induced by the isolated myotoxin. At different time intervals (2 and 12 h) after treatment, the tissue was processed according to Bozzola and Russell [20]. Muscles were fragmented to approximately $1\text{-}2\text{ mm}^3$ in size and fixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 24 h. Fragments were washed with the same buffer, post-fixed in osmium tetroxide, dehydrated in increasing concentrations of acetone (50 to 100%) and included in Epon resin. Slices, cut in ultramicrotome, were contrasted with uranyl acetate and lead (II) citrate and analyzed in transmission electronic microscope Zeiss EM 109 (Zeiss, Germany).

3. RESULTS

3.1. Isolation and Biochemical Characterization of Myotoxin

Myotoxin from *B. alternatus* was purified by a combination of ion exchange and molecular exclusion chromatographies. *B. alternatus* venom was fractionated in DEAE-

Sephadex ion exchange chromatography resulting in 10 protein fractions, named A1 to A10 (Fig. 1A). Myonecrosis was observed in fraction A3. This fraction was further purified by size exclusion chromatography using Sephadex G-75 resin and resulted in a major peak that showed myotoxic activity (Fig. 1B). Isolated myotoxin represented 4.0% (w/w) of the initial desiccated venom (data not shown). Electrophoretic (SDS-PAGE) analyses indicated that the isolated myotoxin was highly purified, and had one band of about 15,000, under reducing conditions and 25,000, under non-reducing conditions, respectively (Fig. 1C).

3.2. Functional Characterization

Isolated myotoxin induced myotoxic activity in gastrocnemius muscle. However, proteolytic and phospholipase A₂ activities were not detected with the assayed substrates.

Histological and Ultrastructural Analysis of the Myonecrosis

Histological evaluation by light microscopy showed similar morphological alterations in gastrocnemius muscle caused by both the crude venom of *B. alternatus* and the isolated myotoxin (Fig. 2). Myonecrosis induced by both

preparations was characterized by extensive cellular destruction, prominent inflammatory cells infiltrate, with polymorphonuclear cells and mononuclear leukocytes, and hemorrhage.

Electron microscopy analysis revealed that 2 h after the treatment of the muscle with isolated myotoxin cell swelling occurred, as observed by the separation of skeletal fibers and sarcolemma, mitochondrial alterations and dilation of the sarcoplasmic reticulum, but without interference in the integrity of the cell membrane (Fig. 3E-J). Similar effects occurred 12 h after the treatment, with the addition of mitochondrial swelling, formation of internal vacuoles, and rupture of mitochondrial membrane. Disruption of the plasma membrane was not observed (Fig. 3K-N). The gastrocnemius muscle explants induced by isolated myotoxin showed myonecrosis regardless of the inflammatory reaction. The control muscles did not show evidences of ultrastructural alterations (Fig. 3A-D).

4. DISCUSSION

Muscle damage is a frequent manifestation in snake bite envenomations [21]. Myotoxins act mainly on skeletal mus-

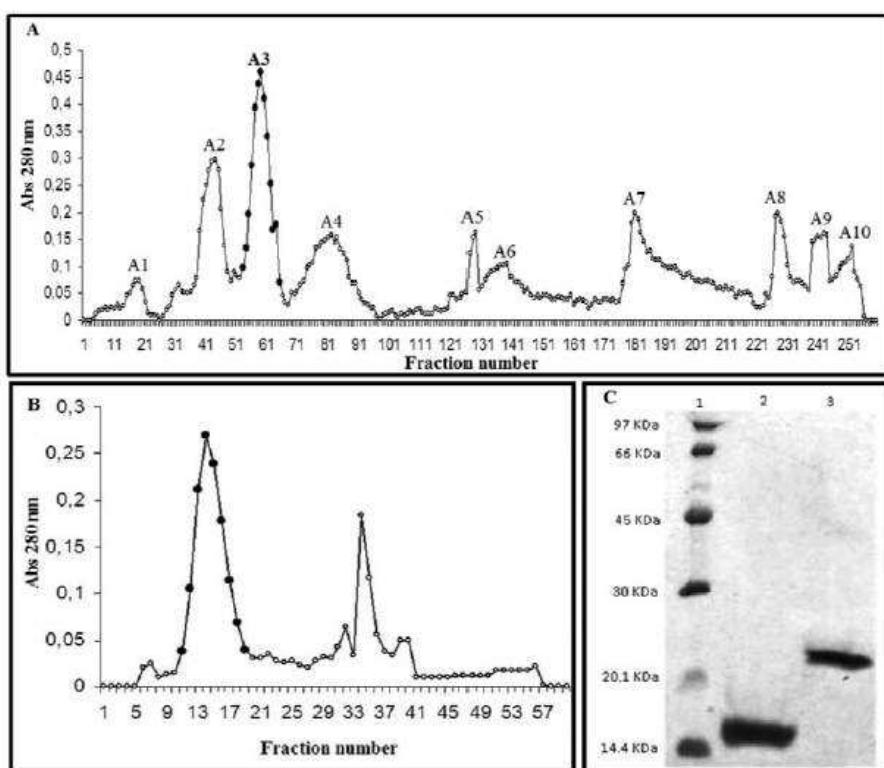


Figure 1. Purification of myotoxin from *B. alternatus* venom. (A) Fractionation on DEAE-Sephadex chromatography: *B. alternatus* crude venom (200 mg) was fractionated by ion exchange column (1.7 x 15 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/hour with convex gradient ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) from 0.05 to 1.0 M. (B) Purification on Sephadex G-75: the fraction A3 was applied to a column (1.0 x 100 cm) of Sephadex G-75 and elution was carried out with 0.05 M of the same buffer at a flow rate of 20 mL/hour. The major peak indicated by the closed circle represents the isolated myotoxin. (C) Electrophoretic analysis (SDS-PAGE). Lanes: (1) LMW marker; (2) reduced myotoxin and (3) non-reduced myotoxin.

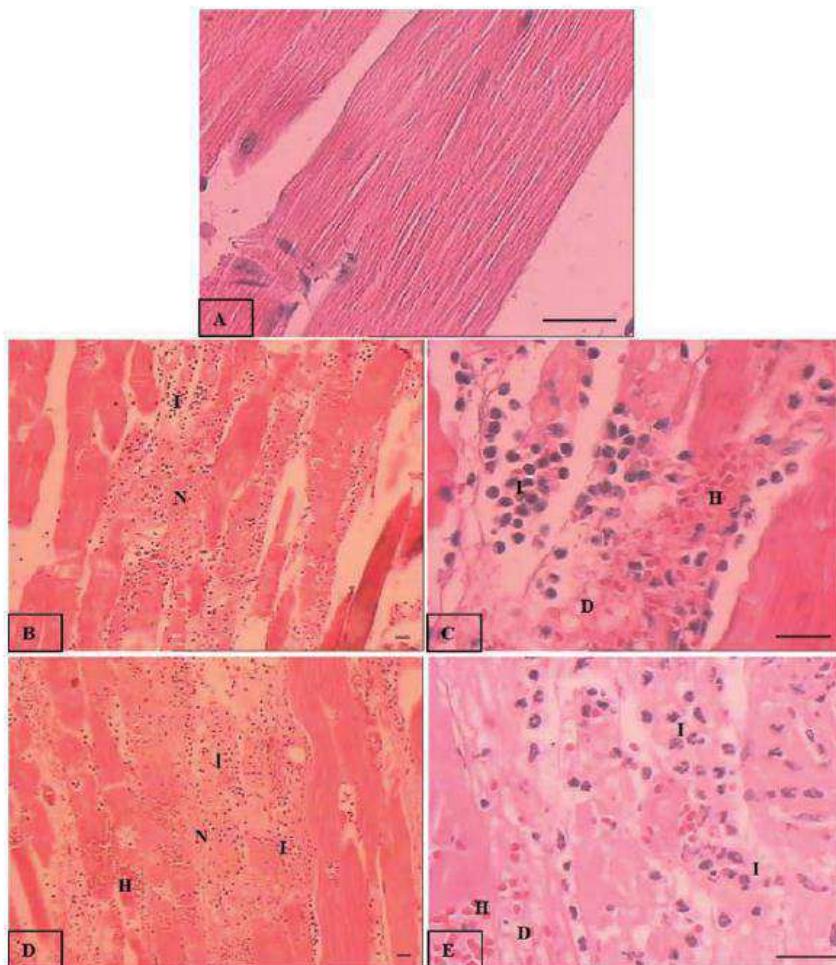


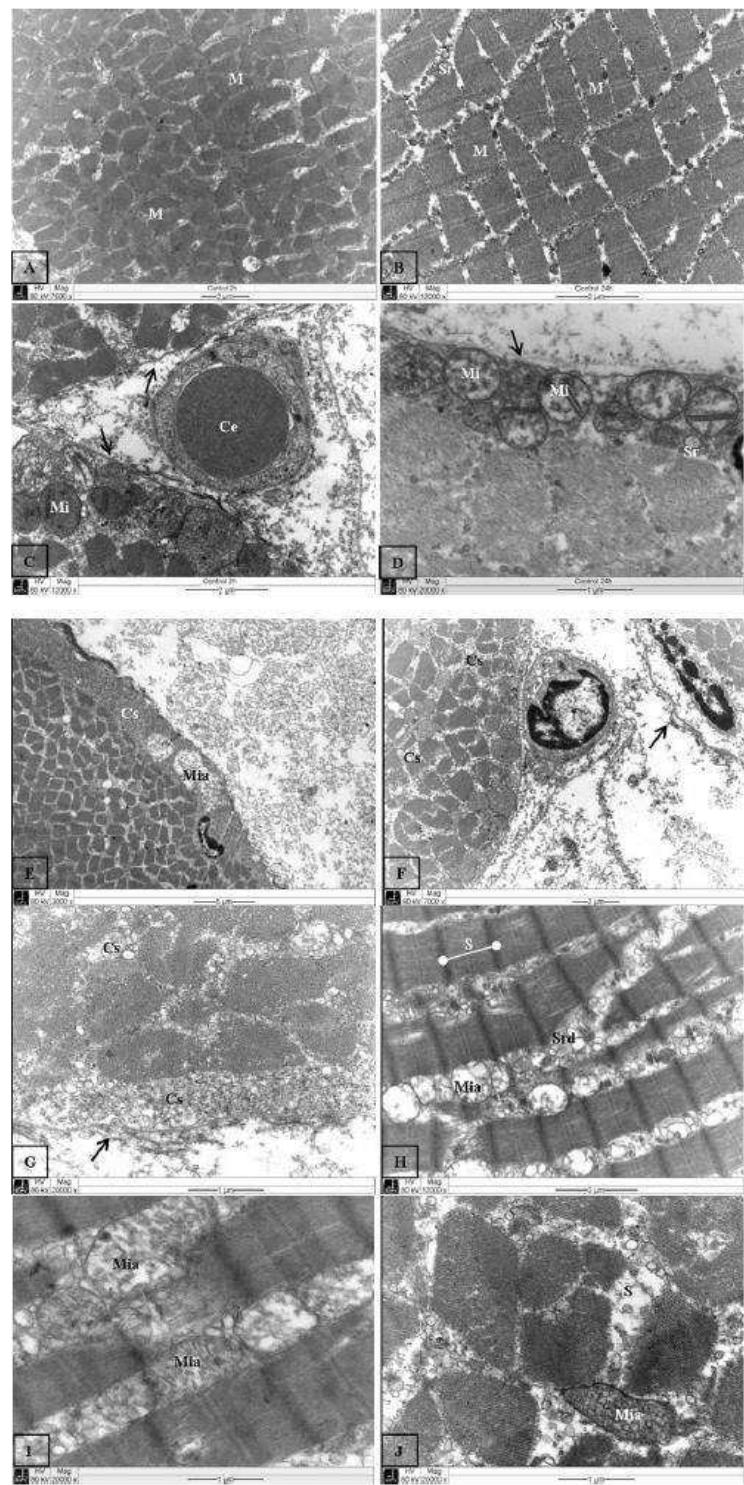
Figure 2. Histological analyses of myonecrosis. Micrographs of sections of mice gastrocnemius muscle 24 hours after injection of 50 μ g crude venom of *B. alternatus* or isolated myotoxin, dissolved in 50 μ L sterile saline, stained with hematoxylin-eosin. (A) Control mice were injected with sterile saline alone: normal integral fibers are observed. (B-C) and (D-E) Muscle sections of mice injected with *B. alternatus* crude venom and isolated myotoxin, respectively, showing hemorrhage (H), fatty degeneration (D) and necrosis (N) due to drastic skeletal fibers degeneration and inflammatory cells infiltrate (I). Scale bar = 100 μ m (A-B-D) and 50 μ m (C-E).

cles causing extensive damage; it can still exert other effects, such as anticoagulation, affect platelet aggregation, edema, pain and extensive inflammatory reaction that evolve to necrosis [6, 22, 23, 24]. Different myotoxic components have been isolated from *Bothrops* snake venom, such as phospholipases A₂ BmooTX-I [22], BmooMTx [25] and BnSP-7 [26].

In the present work, a myotoxin from *B. alternatus* was isolated by a combination of ion and size exchange chromatographies (Fig. 1A and B). The isolated myotoxin induced myonecrosis, and it did not show to have proteolytic and phospholipase A₂ activities. Isolated myotoxin migrated in SDS-PAGE as a protein of approximately 15,000 under reduced conditions. In non-reducing conditions a protein band of approximately 25,000 was also observed. These data sug-

gest that this myotoxin occurs as a homodimer in native conditions. Several myotoxins isolated from bothrops venoms have molecular weight of about 13,500, such as MjTX-II [27], BbTX-II and -III [28]. Furthermore, very commonly myotoxic PLA₂ is found to undergo oligomerization, mainly dimerization, which has been understood as a strategy to increase its binding affinity and specificity to the target [27, 29, 30, 31].

It is already known that some PLA₂ toxins has little or no enzymatic activity due to the presence of Lys residue at position 49, which drastically affects the ability of this protein to bind Ca²⁺ [13, 32]. The major toxic action of Lys49 PLA₂ is determined by its C-terminal region, which includes a variable combination of positively-charged and hydropho-



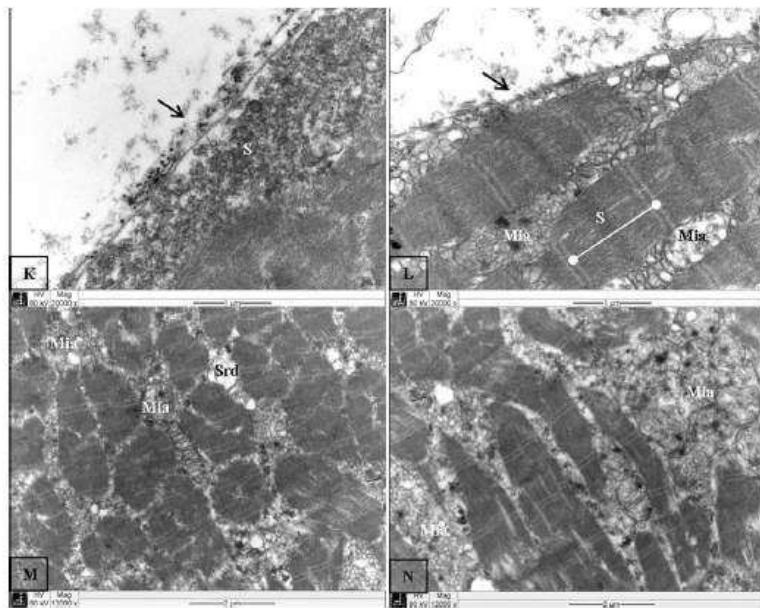


Figure 3. Ultrastructural analysis of myonecrosis: electron micrographs of mouse muscle explants after treatment with PBS as control (A-D) or the isolated myotoxin (E-N) for 2 h (A-C; E-J) or 12 h (B-D; K-N). Normal myofibrils (M), mitochondria (Mi), capillary with erythrocyte (Ce), cell swelling (Cs), mitochondrial alteration (Mia), dilation of the sarcoplasmic reticulum (Srd), and sarcomere (S) are indicated. Integrity of the membrane is indicated with arrows.

bic/aromatic residues that interact preferentially with negatively-charged phospholipid bilayers and promote membrane destabilization [31, 33]. The characteristics presented by the isolated myotoxin of our study, such as absence of catalytic activity on phospholipids, indicate that it probably is a Lys49 PLA₂ myotoxin.

Ponce-Soto *et al.* described a Lys49 PLA₂, named BaTX, isolated from the same venom [34]. Both toxins, myotoxin isolated by us and BaTX, presented same molecular weight. Our results showed that these toxins are different. BaTX is a basic protein with a pI 8.6 while the enzyme isolated in this work is acidic because it was retained on an anion exchange column (DEAE-Sepharose) and then eluted with the increasing ionic strength (peak 3).

In this work we investigated the changes of the skeletal muscle induced by this myotoxin by light and electron microscopy analyses. Muscle degenerative effects caused by myotoxin are followed by an acute inflammatory response, with recruitment of leukocytes and release of chemical mediators, and are frequently associated with edema and pain [3, 6, 35]. However, myotoxic PLA₂ does not seem to cause vascular lesions or hemorrhage. This effect is rather related with the action of proteinases of snake venoms [7, 36, 37]. Indeed, hemorrhage induced by the isolated myotoxin seems to be a secondary effect to necrosis and fatty degeneration may be related to toxicity.

Histological examinations showed important morphological alterations in the gastrocnemius muscle of mice caused by both the crude venom and the isolated myotoxin. Like *B. alternatus* crude venom, isolated myotoxin induced a

drastic myonecrosis, which was characterized by extensive cellular destruction, loss of the arrangements of skeletal fibers, intense infiltration of inflammatory cells (mainly polymorphonuclear leukocytes), fatty degeneration and hemorrhage (Fig. 2). Experimental studies of the effects of bothropic venom proteins, such as Bhaltermin from *B. alternatus* [38], BmooTX-I from *B. moojeni* [22], and BnSP-7 from *B. (neuwiedi) pauloensis* [4], on skeletal muscle have demonstrated similar pathological alterations. These proteins have also been shown to cause degeneration of muscle cells.

Electron microscopy analyses revealed that the isolated myotoxin caused cell swelling, mitochondrial alterations and dilation of the sarcoplasmic reticulum, but no changes were evidenced in the transverse tubules (T tubules), plasma membrane and myofibrils of the muscle cells (Fig. 3). These ultrastructural alterations were observed regardless of the inflammatory response, evidencing that they are effects caused directly by the myotoxin alone. Mitochondria swelling progressed to altered cristae, formation of internal vacuoles and disruption of membranes. Some toxins damage mitochondria by interference with oxidative phosphorylation or electron transport in mitochondrial cristae, leading rapidly to ATP depletion and swelling [19]. In severe swelling, excess water uptake transforms mitochondria into structureless vacuoles and these organelles may be massively enlarged. These events are rapidly translated into damage to mitochondria and consequent tissue necrosis [19]. Intracellular alterations in skeletal fibers are commonly caused by PLA₂ from snake venoms [3, 23, 39, 40]. Mitochondrial and reticulum alterations may be a consequence of Ca²⁺ influx due to

loss of control of plasma membrane permeability and depolarization [3]. Our results suggest that the isolated myotoxin alters the plasma membrane permeability, which triggers subsequent intracellular events. This observation corroborates the hypothesis that the damage induced by myotoxic Lys49 PLA₂ on muscles is a mechanism independent of phospholipids hydrolysis. Finally, myofibrils degeneration and necrosis in muscle explants is not observed under electron microscopy probably due to the absence of inflammatory reaction (Fig. 3).

5. CONCLUSION

Myonecrosis caused by the myotoxin isolated in this study seemed to be related to the perturbation of the membrane permeability, intracellular alterations and inflammatory reaction.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Jonny Yokosawa for correcting the English. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil.

REFERENCES

- [1] Nishioka, S.A.; Silvera, P.V.P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1992, **47**, 805-810.
- [2] Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of the local tissue damage. *Biochemie*, 2000, **82**, 841-850.
- [3] Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 2003, **42**, 915-931.
- [4] Oliveira, C.F.; Lopes, D.S.; Mendes, M.M.; Homsi-Brandenburg, 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*, 2009, **43**, 560-569.
- [5] Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 1995, **33**, 1405-1424.
- [6] Teixeira, C.; Cury, Y.; Moreira, V.; Picolo, G.; Chaves, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon*, 2009, **54**, 988-997.
- [7] Sajevic, T.; Leonardi, A.; Krizaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, 2011, **57**, 627-645.
- [8] Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L.; Odell, G.V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*, 1984, **22**, 115-128.
- [9] Fox, J.W.; Elzinga, M.; Tu, A.T. Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin I isolated from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry*, 1979, **15**, 678-684.
- [10] Fletcher, J.E.; Lizzo, F.H. Contracture induction by snake venom cardiotoxin in skeletal muscle from humans and rats. *Toxicon*, 1987, **25**, 1003-1010.
- [11] van Deenen, L. L. M.; de Haas, G. H. The substrate specificity of phospholipase A₂. *Biochem. biophys. Acta*, 1963, **70**, 538-553.
- [12] Ami, R.K.; Ward, R.J. Phospholipase A₂: a structural review. *Toxicon*, 1996, **34**, 827-841.
- [13] Soares, A.M.; Fontes, M.R.M.; Giglio, J.R. Phospholipases A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. *Curr. Org. Chem.*, 2004, **8**, 1677-1690.
- [14] Gutiérrez, J.M.; Ponce-Soto, L.A.; Marangoni, S.; Lomonte, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: comparaison between crototoxin, crototoxin B and Lys49 PLA₂ homologue. *Toxicon*, 2008, **41**, 80-92.
- [15] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [16] Itzhaki, R.F.; Gill, D.M. A microbiuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, 1964, **9**, 401-410.
- [17] Mâo, S.G.; Mayara, R.Q.; Carla, C.N.M.; Mirian, M.M.; Amélia, H.; Maria, I.H.B.; Marcelo, V.S.; Elaine, N.A.; Mariana, S.C.; Fábio, O.; Vendiana, M.R. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Compar. Biochem. Physiol. Part*, 2011, **153**, 290-300.
- [18] Dole, V.P. Relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.*, 1956, **35**, 150-154.
- [19] Cheville, N.F. *Ultrastructural Pathology: an introduction to interpretation*. Iowa State University Press: Ames, 1994.
- [20] Bozzola, J.J.; Russell, L.D. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*, 2nd ed.; Jones and Bartlett Publishers: Sudbury, 1998.
- [21] Warrell, D.A. Clinical features of envenoming from snakebites. In: *Envenomings and Their Treatments*; Bon, C. and Goyffon, M. Eds.; Fondation Marcel Mérioux: Lyon, 1996, pp. 63-76.
- [22] Santos-Filho, N.A.; Silveira, L.B.; Oliveira, C.Z.; Bernardes, C.P.; Menaldo, D.L.; Fuly, A.L.; Arantes, E.C.; Sampao, S.V.; Mamede, C.C.N.; Beletti, M.E.; Oliveira, F.; Soares, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin D₂ inductor phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, 2008, **52**, 908-917.
- [23] Montecucco, C.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, **65**, 2897-2912.
- [24] Kim, R.M. *Venom phospholipase A₂ enzymes*. John Wiley & Sons: Chichester, 1997.
- [25] Queiroz, M.R.; Mamede, C.C.; Fonseca, K.C.; Canabrava, L.C.M.N.; França, L.V.; Silva, M.C.; Stanzola, L.; Beletti, M.E.; Canabrava, H.A.N.; Oliveira, F. Biological characterization of a myotoxic phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. *J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.*, 2011, **17**, 49-58.
- [26] Soares, A.M.; Gerá-Sá, R.; Borja-Oliveira, C.R.; Rodrigues, V.M.; Rodrigues-Simioni, L.; Rodrigues, V.; Fontes, M.R.M.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Giglio, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **378**, 201-209.
- [27] Soares, A.M.; Rodrigues, V.M.; Homsi-Brandenburg, M.I.; Toyama, M.H.; Lombardi, F.R.; Ami, R.K.; Giglio, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogetic activity. *Toxicon*, 1998, **36**, 503-14.
- [28] Huancahuire-Veja, S.; Ponce-Soto, L.A.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S. Structural and functional characterization of braziliotoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brasili* snake. *Toxicon*, 2009, **54**, 818-827.
- [29] Kaiser, I.I.; Gutiérrez, J.M.; Plummer, D.; Aird, S.D.; Odell, G.V. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Archs. Biochem. Biophys.*, 1990, **278**, 319-325.
- [30] Pereira, M.F.; Novello, J.C.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Landucci, E.T.; Oliveira, B.; Marangoni, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A₂ activity. *J. Protein Chem.*, 1998, **17**, 381-386.
- [31] Montecucco, C.; Rossetto, O. On the quaternary structure of taipoxin and textilotoxin: the advantage of being multiple. *Toxicon*, 2008, **51**, 1560-1562.
- [32] Lomonte, B.; Angulo, Y.; Caldern, L. An overview of Lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their

- structural determinants of myotoxic action. *Toxicol.* 2003, **42**, 885-901.
- [33] Diaz, C.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Gené, J.A. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A2, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991, **1070**, 455-460.
- [34] Ponce-Soto, L.A.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Rodrigues-Simioni, L.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1770**, 585-593.
- [35] Chacur, M.; Longo, I.; Picolo, G.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Guerra, J.L.; Teixeira, C.F.P.; Cury, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicol.* 2003, **41**, 667-678.
- [36] Gopalakrishnakone, P.; Hawgood, B.J. Morphological changes induced by crototoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicol.* 1984, **22**, 791-804.
- [37] Harris, J.B.; Vater, R.; Wilson, M.; Cullen, M.J. Muscle fibre breakdown in venom-induced muscle degeneration. *J. Anat.*, 2003, **202**, 363-372.
- [38] Costa, J.O.; Fonseca, K.C.; Mamede, C.C.N.; Beletti, M.E.; Santos-Filho, N.A.; Soares, A.M.; Arantes, E.C.; Hirayama, S.N.S.; Selis-De-Araújo, H.S.; Fonseca, F.; Henrique-Silva, F.; Penha-Silva, N.; Oliveira, F. Bhaltermin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicol.* 2010, **55**, 1365-1377.
- [39] Gutiérrez, J.M.; Ownby, C.L.; Odell, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.*, 1984, **40**, 367-379.
- [40] Gopalakrishnakone, P.; Dempster, D.W.; Hawgood, B.J.; Elder, H.Y. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crototoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. *Toxicol.* 1984, **22**, 85-98.

Received: November 13, 2011

Revised: June 16, 2012

Accepted: June 22, 2012