



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela  
BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops  
pauloensis*: Um estudo da liberação de citocinas pró-  
inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matriz  
(MMP-9 e MMP-2)**

*Carolina de Freitas Oliveira*

UBERLÂNDIA – MG

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*: Um estudo da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matriz (MMP-9 e MMP-2)

*Carolina de Freitas Oliveira*

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2008**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*: Um estudo da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matriz (MMP-9 e MMP-2)

*Carolina de Freitas Oliveira*

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

**UBERLÂNDIA – MG**

**2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

- O48a Oliveira, Carolina de Freitas, 1984-  
Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*: um estudo da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matriz (MMP-9 e MMP-2) / Carolina de Freitas Oliveira. - 2008.  
86 f. : il.

Orientador: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.919:598.126

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*: Um estudo da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matriz (MMP-9 e MMP-2)

**Carolina de Freitas Oliveira**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:**

\_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**Examinadores:**

\_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Bianca Clissa

\_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Eloisa Amália Vieira Ferro

**Data da Defesa:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

*Dedico este trabalho a meus pais, que são o porto seguro da minha vida! Obrigada meu Deus por escolhê-los para mim!!!*

# Agradecimentos

À Deus, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

À professora Dr<sup>a</sup> Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela orientação e confiança durante todos estes anos. Você foi essencial para meu crescimento! Nunca vou me esquecer de você e do seu carinho sempre!!!

Aos meus pais, Luiza e Júnior, aos meus irmãos, Frá e Marco e ao Claudinho por sempre estarem me incentivando e dando forças quando eu desanimava e por todo o amor e compreensão. Vocês são essenciais para minha felicidade! Amo vocês!!!

À Daiana, amiga e companheira sempre presente, mesmo estando longe agora... Você também fez possível este trabalho! Obrigada por tudo! Seremos a “dupla dinâmica” por toda a vida, espero!!!

À Dr<sup>a</sup> Patrícia Bianca Clissa, pela parceria, pela grande contribuição a este trabalho e por todos os ensinamentos. Adorei te conhecer!!!

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Renata, Johara, Débora, Letícia, Dayane, Sâmela, Malson, Francis, Fábio, Luciana, Robson, Tomás e Luiz Fernando, pela convivência agradável e pelo auxílio no dia a dia do laboratório.

Ao pessoal do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, Dr<sup>a</sup> Maísa, Cristiani e Stela pelo auxílio nos experimentos e pela ótima convivência. Saudades!

À Mirian, por todos os ensinamentos e auxílio nos experimentos e análises. Obrigada pela amizade sempre!!!

À Dr<sup>a</sup> Tânia Machado de Alcântara pela parceria e sugestões na primeira parte do trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Ana Moura pela parceria e colaborações.

Ao Dr<sup>a</sup> Roberto Octaviano, pela experiência e garra que só acrescentaram ao nosso laboratório.

Às amigas Carol e Ana Paula pelo grande auxílio nas técnicas de Biologia Molecular. Adorei trabalhar com vocês!

À Dr<sup>a</sup> Maria Inês Homs Brandeburgo e à Dr<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi, pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pelo apoio técnico.

Aos funcionários Tianinha, Marlene, D. Nenzinha e Gerson pela disposição em ajudar sempre.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



# Sumário

<b>Apresentação .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I: Peçonhas botrópicas e seus efeitos .....</b>	<b>4</b>
1. Fundamentação Teórica.....	5
1.1. Características epidemiológicas e biológicas do envenenamento ofídico ...	5
1.2. Alterações teciduais locais induzidas pelo envenenamento botrópico .....	6
1.2.1. Resposta inflamatória .....	10
1.3. Características estruturais e funcionais das PLA <sub>2</sub> s .....	16
2. Referências Bibliográficas .....	21
<b>Capítulo II: Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente <i>Bothrops pauloensis</i>: Um estudo de liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matrix (MMP-9 e MMP-2). .....</b>	<b>35</b>
1. Introdução .....	40
2. Materiais e Métodos.....	42
2.1. Peçonha e toxinas .....	42
2.2. Animais .....	42
2.3. Atividade edematogênica .....	43
2.4. Atividade miotóxica .....	43
2.5. Análises histológicas .....	44

2.6. Extração de RNA .....	44
2.7. RT-PCR - Análise semi-quantitativa .....	45
2.8. Células peritoneais e cultura .....	46
2.9. Dosagem de citocinas .....	47
2.10. Análise estatística .....	48
3. Resultados .....	48
3.1. Atividade edematogênica .....	48
3.2. Atividade miotóxica .....	49
3.3. Análises histológicas .....	49
3.4. Expressão de MMPs .....	50
3.5. Efeito nas citocinas .....	51
4. Discussão .....	51
5. Agradecimentos .....	60
6. Referências .....	60
<b>Anexos .....</b>	<b>81</b>
Anexo I .....	82

# Lista de Legendas

1. Fotomicrografia de músculo gastrocnêmio de camundongo inoculado com CV ..... 73
2. Fotomicrografia de músculo gastrocnêmio de camundongo inoculado com BnSP-7 ..... 73
3. Expressão semi-quantitativa dos genes MMP-9 e MMP-2 em músculo gastrocnêmio de camundongo induzida pela BnSP-7 ..... 73
4. Liberação de citocinas por MPAC ..... 74
5. Liberação de citocinas pelo músculo gastrocnêmio ..... 74

# Lista de Figuras

1. Fotomicrografia de músculo gastrocnêmio de camundongo inoculado com CV ..... 75
2. Fotomicrografia de músculo gastrocnêmio de camundongo inoculado com BnSP-7 ..... 76
3. Expressão semi-quantitativa dos genes MMP-9 e MMP-2 em músculo gastrocnêmio de camundongo induzida pela BnSP-7 ..... 77
4. Liberação de citocinas por MPAC ..... 78
5. Liberação de citocinas pelo músculo gastrocnêmio ..... 79

# Lista de Tabelas

1. Indução de edema tempo-dependente e liberação de creatina quinase .... 80

# Lista de Abreviaturas

**PBS** - tampão fosfato salina

**FCS** - soro fetal bovino (fetal calf serum)

**MTT** - brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 difenil-tetrazolio

**MPAC** - células aderentes peritoneais de murinos (murine peritoneal adherent cells)

**i.m.** - intramuscular

**RNA** - ácido ribonucléico

**cDNA** - ácido desoxirribonucléico complementar

**BPB** - brometo de 4-bromophenacil

**CV** - peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (crude venom)

**PLA<sub>2</sub>** - fosfolipase A<sub>2</sub> (E.C.3.1.1.4)

**MMPs** - metaloprotases de matriz (matrix metalloproteinases)

**MEC** - matriz extracelular

**SVMPs** - metaloproteases de peçonha de serpentes (snake venom metalloproteinases)

**PAF** - fator de agregação plaquetária (platelet aggregation factor)

**CK** - creatina quinase (creatine kinase)

**HE** - hematoxilina-eosina (hematoxin-eosin)

# Apresentação

O envenenamento ofídico constitui um problema de saúde pública no Brasil devido à sua grande incidência e seqüelas deixadas nos acidentados. Na maioria dos casos o ataque é de serpentes do gênero *Bothrops*, conhecidas popularmente como jararacas. A letalidade desta peçonha não é tão alta, porém seu efeito no local da picada é bastante grave. Observa-se o surgimento de bolhas de sangue, necrose e hemorragia que muitas das vezes levam à amputação do membro afetado.

Atualmente, o único tratamento que se faz é a aplicação do soro antiofídico, que é eficiente para neutralizar os efeitos sistêmicos das toxinas da peçonha. No entanto, o soro não consegue neutralizar os efeitos locais do envenenamento, mesmo quando administrado imediatamente após o acidente. As toxinas da peçonha agem muito rapidamente no tecido afetado e induzem uma resposta inflamatória associada com a liberação de mediadores endógenos antes que o soro possa neutralizar a atividade dos vários componentes da peçonha.

Desta forma, o estudo dos componentes das peçonhas e suas atividades biológicas nos permitem compreender os mecanismos pelos quais elas causam a lesão, favorecendo assim, o desenvolvimento de terapias alternativas ao soro, que possam neutralizar os efeitos locais da peçonha.

Além disso, as toxinas da peçonha de serpentes podem funcionar como ferramentas importantes para o entendimento de uma variedade de processos biológicos, assim como funcionarem como base estrutural para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos com seus princípios de ação para outras patologias.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a lesão tecidual local e o processo inflamatório induzido pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Além disso, a evolução dos processos de degeneração e regeneração do músculo gastrocnemius também foi avaliada.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia ([www.cogeb.ufu.br](http://www.cogeb.ufu.br)). A dissertação foi dividida em: **Capítulo 1** – Revisão de literatura sobre os aspectos epidemiológicos e biológicos de envenenamento ofídico, alterações teciduais locais e resposta inflamatória induzidas pelo envenenamento botrópico, e características estruturais e funcionais das fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2s</sub>) e **Capítulo 2** – Aspectos da lesão tecidual local e da



regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*: Um estudo de liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matrix (MMP-9 e MMP-2). A formatação deste capítulo foi baseada nas normas da revista *Toxicon* (Anexo I).

# Capítulo I

Peçonhas botrópicas e seus efeitos

# 1. Fundamentação Teórica

## 1.1. Características epidemiológicas e biológicas do envenenamento ofídico

Os acidentes ocasionados por animais peçonhentos constituem problema de saúde pública (Soerensen, 1990) nos países tropicais em desenvolvimento, dadas à incidência, a gravidade e as seqüelas deixadas nos acidentados (Barraviera, 1991; Pinho & Pereira, 2001).

Das 20 famílias de serpentes conhecidas no mundo, nove são encontradas no Brasil, sendo as principais Boidae (10 espécies), Colubridae (189 espécies), Elapidae (18 espécies) e Viperidae (22 espécies). Destas, somente a Elapidae e a Viperidae são consideradas peçonhentas. A família Viperidae, maior responsável pelos acidentes ofídicos, é representada por três gêneros, *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops*, serpentes conhecidas popularmente como surucucus, cascavéis e jararacas, respectivamente (Barraviera, 1990; Cardoso, 2003).

Estima-se que acidentes ofídicos afetem mais de 2,5 milhões de pessoas anualmente no mundo, onde 100 mil dos casos resultam em morte (White, 2005). No Brasil a epidemiologia aponta para um perfil que se mantém inalterado ao longo dos últimos 100 anos. Ocorrem 19,000 a 22,000 acidentes ofídicos por ano, com letalidade ao redor de 0,45% (Ministério da Saúde, 2001). As serpentes do gênero *Bothrops* são as principais responsáveis por acidentes ofídicos no Brasil (90%), mas com reduzidos índices de letalidade (0,3%) (Ministério da Saúde, 2001; Silva et al., 2003).

A subespécie *Bothrops neuwiedi pauloensis*, conhecida como jararaca pintada ou boca de sapo, descrita por Amaral em 1925, habita preferencialmente áreas secas, campos e cerrados (Peters e Orejas, 1970). Uma revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* foi realizada por Silva (2000) e resultou na modificação das doze subespécies existentes para sete espécies distintas. Nessa reclassificação *Bothrops neuwiedi pauloensis* passou a ser denominada *Bothrops pauloensis*. Esta nova classificação foi aceita pela Sociedade Brasileira de

Herpetologia – SBH (2005). A serpente *Bothrops pauloensis* é encontrada nos estados de São Paulo, Sul de Goiás e Triângulo Mineiro (Campbell e Lamar, 1989).

A peçonha das serpentes do gênero *Bothrops* induz um quadro fisiopatológico caracterizado por efeitos locais e/ou sistêmicos (Gutiérrez e Lomonte, 1989; Kamiguti et al., 1996). Os efeitos locais freqüentemente incluem dor, edema, hemorragia local, inflamação e equimose (Mandelbaum et al., 1988; Mebs e Ownby, 1990; Gutiérrez e Lomonte, 1995; Voronov et al., 1999). Este quadro clínico na maioria das vezes evolui para necrose tecidual (Gutiérrez e Lomonte, 1989). Efeitos sistêmicos são representados por alterações na coagulação sangüínea, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico, alterações renais e hemorragias distantes dos locais da picada tais como hemorragia gengival, macro-hematúria, hemorragia uterina e gastrintestinal (Kamiguti et al., 1996).

Estes efeitos do envenenamento botrópico são atribuídos a uma variedade de toxinas presentes na peçonha, as quais incluem fosfolipases  $A_2$ , metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, L-aminoácido oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase, arginina esterase, hialuronidase e 5'-nucleotidase (Russel, 1980; Tu, 1988; Meier, 1990; Stocker, 1990). Estas proteínas constituem cerca de 90 a 95% do peso seco da peçonha, que também é constituída por citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e aminoácidos livres e lipídeos em menor proporção (Souza, et al 2001).

## **1.2. Alterações teciduais locais induzidas pelo envenenamento botrópico**

A lesão tecidual local induzida pelo envenenamento botrópico caracteriza-se por hemorragia, edema, inflamação e mionecrose. A magnitude destes efeitos depende do tipo de peçonha, da dose injetada e do hospedeiro. Em muitos casos, o dano tecidual é tão intenso, levando a conseqüências severas como lesão vascular e isquemia, as quais podem culminar com a amputação do membro afetado (Nishioka et al., 1992). Estes efeitos são causados pela ação combinada de vários componentes das peçonhas tais como metaloproteases (SVMPs), fosfolipases  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>s) e também pela ação de mediadores endógenos liberados

pela ação da resposta inflamatória (Gutiérrez, et al., 1989; Gutiérrez & Rucavado, 2000).

A necrose muscular ou mionecrose, efeito bastante comum após envenenamento botrópico, pode ocorrer devido à ação direta de fosfolipases  $A_2$  miotóxicas sobre as membranas plasmáticas de células musculares, ou indireta, como consequência de lesões vasculares e isquemia, causadas por metaloproteases hemorrágicas presentes nas peçonhas de serpentes.

O mecanismo pelo qual as metaloproteases hemorrágicas causam danos teciduais locais e ou sistêmicos se deve à sua ação proteolítica sobre proteínas da membrana basal (Bjarnason e Fox, 1994; Esclante et al., 2006). Essa ação enfraquece sua estabilidade mecânica e as forças hemodinâmicas biofísicas que normalmente operam na circulação, provocando uma distensão na parede capilar até que sua integridade seja rompida e ocorra o extravasamento de um modo explosivo, levando à hipóxia tecidual e, conseqüentemente, à morte celular (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Gutiérrez et al., 2005; Gutiérrez et al., 2006). Por esta hipótese, é sugerido que esta distensão e ruptura abruptas resultem na perda da integridade não só das células endoteliais, mas também dos componentes da membrana basal (Moreira et al., 1994; Gutiérrez et al., 2006). As lesões hemorrágicas também podem ser provocadas pelo efeito inibitório das SVMPs na agregação plaquetária (Bjarnason e Fox, 1994, Kamiguti, et al., 2003). Além disso, as SVMPs podem inibir a adesão das células endoteliais às proteínas da matriz extracelular culminando em um processo apoptótico (Tanjoni et al., 2005; Diaz et al., 2005; You et al., 2003).

Estudos para a compreensão dos mecanismos de ação das  $PLA_2$ s de peçonhas botrópicas sobre o tecido muscular vêm sendo realizados desde as últimas décadas. Estudos realizados com miotoxinas isoladas de *B. asper* e *B. numminifer* demonstraram que estas enzimas podem induzir mionecrose por agirem na membrana sarcoplasmática, induzindo desorganização dos componentes fosfolipídicos, que permitiriam a saída de moléculas intracelulares, como a creatina e a creatina quinase (Gutiérrez et al., 1986; Gutiérrez et al., 1989). Os efeitos celulares causados por fosfolipases  $A_2$  miotóxicas, segundo Harris (1991), são: (a) 0-1 hora: edema confinado ao espaço extravascular; (b) 1-3 horas: degeneração e hipercontração das miofibrilas e acúmulo de fagócitos na luz dos

vasos sanguíneos e no espaço perivascular; (c) 3-6 horas: invasão das fibras musculares necrosadas pelas células fagocíticas, colapso do potencial das fibras musculares e rompimento da membrana sarcoplasmática; (d) 6-24 horas: degeneração total das fibras musculares individuais. Estas enzimas podem destruir os terminais nervo-motores dos músculos, mas não interferem com as arteríolas, capilares, vênulas ou nervos intramusculares, o que permite a regeneração das fibras musculares lesionadas por estas toxinas, a partir de células satélites.

As células satélites fazem parte de uma população de células com grande atividade mitogênica que contribuem para o crescimento muscular pós-natal, o reparo de fibras musculares danificadas e a manutenção do músculo esquelético adulto. São células indiferenciadas e mononucleadas, cuja membrana basal está em continuidade com a membrana basal da fibra muscular (Harris, 2003). Estas células se tornam ativadas durante o processo degenerativo. As células filhas migram para formar cadeias de células satélites longitudinalmente organizadas na lâmina basal. A fusão das células leva à formação de uma nova fibra muscular multinucleada (Snow, 1977). Este processo é regulado por vários fatores transcricionais, incluindo Pax3 e Pax7, e fatores regulatórios miogênicos como Myf5, MyoD e miogenina (Dhawan e Rando, 2005; Charge e Rudnicki, 2004).

O mecanismo molecular pelo qual as PLA<sub>2</sub>s induzem mionecrose foi inicialmente proposto por Gutiérrez e Lomonte em 1995. Estes autores propuseram um modelo hipotético para o entendimento do mecanismo de ação das miotoxinas Lys49, que pode ser descrito da seguinte forma: 1- ligação da miotoxina a um sítio não identificado localizado na membrana sarcoplasmática; 2- interação eletrostática entre o sítio catiônico da toxina e grupos carregados negativamente na membrana; 3- penetração da miotoxina na bicamada lipídica por interação hidrofóbica mediada pela região citotóxica da molécula; 4- penetração da região citotóxica no centro da bicamada lipídica (o efeito seria a desorganização e ruptura da membrana, com conseqüente prejuízo na regulação da permeabilidade seletiva); 5- grande influxo de íons cálcio e início de uma variedade de mecanismos degenerativos.

Atualmente, muitos autores buscam esclarecer uma via intracelular e um possível sítio de ligação na membrana plasmática que poderia ser alvo dessas PLA<sub>2</sub>s. Dessa forma, vários estudos visam identificar na estrutura das PLA<sub>2</sub>s

resíduos de aminoácidos específicos que estariam envolvidos no reconhecimento celular, permitindo ação catalítica local da enzima a fim de iniciar o processo de transdução de sinais, o que levaria a formação de mensageiros celulares que modulariam a ação dessas enzimas ao nível celular.

O uso de peptídeos sintéticos evidenciou a região C-terminal (115-129) como efetora das atividades tóxicas em algumas PLA<sub>2</sub> Lys49 miotóxicas (Núñez et al., 2001; Lomonte et al., 2003a). Esta região combina aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos responsáveis pelo mecanismo de dano às membranas celulares. Segundo Lomonte et al. (2003b), os resíduos catiônicos interagiriam eletrostaticamente com grupos aniônicos de um sítioceptor (possivelmente fosfolipídeos da membrana negativamente carregados) enquanto os resíduos hidrofóbicos, especialmente os aromáticos, interagiriam e possivelmente penetrariam a bicamada fosfolipídica, resultando na sua desestabilização (Núñez et al., 2001). No entanto, este fato de um único peptídeo reproduzir todas as principais atividades tóxicas da molécula de origem, não impede a existência de outros domínios estruturais que possam participar ou complementar a ação do sítio tóxico efetor (Lomonte et al., 2003b). Em contraste, peptídeos da região C-terminal de algumas PLA<sub>2</sub> Asp49 miotóxicas não apresentaram atividade de dano direto na membrana, o que sugere que o mecanismo tóxico exercido por estas proteínas, que provavelmente envolve sua atividade catalítica como um passo relevante, seja diferente daquele utilizado pelas PLA<sub>2</sub> Lys49 miotóxicas (Núñez et al., 2001).

Kini (2003) propôs ainda que as diferentes ações farmacológicas induzidas pelas PLA<sub>2</sub>s se devem à capacidade que estas enzimas possuem de se ligar com alta afinidade a aceptores celulares, por meio de interações iônicas, hidrofóbicas e de van der Waals. Uma vez ligada ao seu alvo, essas enzimas podem induzir seus efeitos farmacológicos por mecanismos dependentes ou independentes de sua atividade catalítica.

Devido ao largo espectro de alvos específicos em vários tecidos e órgãos, a identificação destes sítios farmacológicos presentes na estrutura dessas enzimas se torna um campo vasto de investigações para as áreas da saúde e biotecnologia.

Envenenamentos botrópicos também são caracterizados pelo rápido desenvolvimento de edema e inflamação no local da picada. O edema induzido pelas peçonhas de serpentes é bioquimicamente heterogêneo e pode agravar

ainda mais o dano tecidual local. Em maior magnitude, o edema pode acentuar o efeito hipovolêmico e hipotensivo da peçonha e culminar em choque cardiovascular (Lomonte et al., 1993). O edema é provavelmente causado pelo efeito direto de toxinas hemorrágicas nos vasos sangüíneos, induzindo a liberação de mediadores endógenos, como a histamina, cininas, prostaglandinas, devido à ação de componentes da peçonha em mastócitos, cininogênio e fosfolipídios, respectivamente. Além disso, fosfolipases  $A_2$ , esterases e aminas biogênicas podem estar envolvidas na indução do edema (Gutiérrez, 1990).

Entre os vários mecanismos descritos na indução do edema podemos citar: a degranulação de mastócitos, com liberação de histamina e serotonina, recrutamento de células polimorfonucleares, com formação de radical superóxido, produção de prostaglandinas e leucotrienos (LTB<sub>4</sub>), liberação de bradicinina e óxido nítrico, potencialização da atividade da bradicinina por peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina, ativação do sistema complemento e liberação das anafilotoxinas C3a e C5a (Lomonte et al., 1993).

### **1.2.1 Resposta inflamatória**

A resposta inflamatória que se estabelece logo após o envenenamento também é de relevância para o progresso da lesão tecidual, uma vez que além das toxinas da peçonha presentes no local da picada existe também a participação de mediadores endógenos que podem contribuir com estas alterações.

A inflamação é a reação do organismo à invasão por agente infeccioso, por desafio com antígeno ou mesmo apenas uma lesão física. A resposta inflamatória compreende três eventos principais: (1) aumento do suprimento sangüíneo para a área; (2) aumento da permeabilidade capilar, ocasionado pela retração das células endoteliais, com conseqüente escape de moléculas maiores, permitindo, então, que os mediadores solúveis da imunidade atinjam o local da infecção; (3) migração de leucócitos dos capilares para os tecidos circundantes, sendo que na fase inicial da inflamação, os neutrófilos são particularmente prevalentes e, mais tardiamente no processo, os monócitos e linfócitos também migram para o local inflamado. (Ryan e Majno, 1997; Rosenfeld, 1971).



Dependendo da sua duração, as inflamações podem ser divididas em agudas e crônicas. Assim, as inflamações que duram desde poucos minutos até poucos dias são chamadas de agudas, enquanto as que persistem por semanas e meses são chamadas de crônicas. Do ponto de vista funcional e morfológico, as inflamações agudas caracterizam-se pelo predomínio de fenômenos exsudativos, ou seja, conseqüentes alterações na permeabilidade vascular, permitindo o acúmulo de líquido na região inflamada (edema), fibrina, leucócitos, especialmente neutrófilos, e hemácias. Nas inflamações crônicas, além destes elementos, ocorre proliferação de vasos, migração e proliferação de monócitos e linfócitos (Montenegro et al., 1999).

A resposta inflamatória envolve também a sinalização entre os vários leucócitos, além das células teciduais, que ocorre tanto por interações diretas célula-célula, envolvendo moléculas da superfície celular, quanto por citocinas. (Roitt et al., 2003).

As citocinas são pequenas “proteínas mensageiras” (8-80 kDa), mediadores solúveis da comunicação intercelular que, em associação aos hormônios e neurotransmissores, constituem uma linguagem química de sinalização que controla o desenvolvimento, o reparo tecidual e a resposta imune em organismos multicelulares (Arend e Gabay, 2004). Paralelamente a outros sinais oriundos do contato célula-célula ou célula-antígeno, as citocinas propiciam uma rede de controle das respostas imunes inatas e específicas, incluindo a inflamação, a defesa contra infecções virais, a proliferação de clones específicos e células T e B e o controle de suas funções. Elas atuam através da ligação a receptores específicos na membrana celular, estabelecendo uma cascata que leva à indução, ao favorecimento ou à inibição de inúmeros genes citocina-regulados no núcleo celular (Roitt et al., 2003).

A produção de citocinas pro e antiinflamatórias é controlada por um complexo mecanismo de *feedback*. As citocinas proinflamatórias são primeiramente responsáveis por iniciar um efeito contra um patógeno exógeno. Entretanto, uma produção excessiva desses mediadores pode contribuir significativamente para o choque, falência múltipla de órgãos, e morte (Van der Meide e Schellekens, 1996). Em contraste, as citocinas antiinflamatórias são cruciais para a regulação negativa do processo inflamatório e para a manutenção

da homeostase para o funcionamento correto dos órgãos vitais (Grard, et al., 1993).

Além da ação das citocinas, a resposta inflamatória é mediada por uma variedade de moléculas tais como prostaglandinas, radicais de oxigênio, óxido nítrico, tromboxanas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária (PAF). Estes mediadores são liberados por macrófagos, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e plaquetas (Voronov et al., 1999). As células endoteliais também são reguladoras da resposta inflamatória, controlando a adesão e migração de células inflamatórias, assim como a troca de flúidos entre a corrente sangüínea e o tecido lesionado. No entanto, uma ativação endotelial prolongada pode levar a uma inflamação descontrolada que é prejudicial e pode resultar em inflamação crônica (Kadl e Leitinger, 2005).

A lesão tecidual local observada no envenenamento botrópico desencadeia uma cascata de eventos iniciados pelo recrutamento de leucócitos para o local da picada. Leucócitos ativados liberam um amplo espectro de citocinas tais como IL-1, IL-6 e IL-8, que amplificam a resposta inflamatória contribuindo para o processo de necrose (Voronov et al., 1999).

A IL-1 é produzida principalmente por fagócitos mononucleares (macrófagos e monócitos) ocorre em duas formas moleculares: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Voronov et al., 1999; Roitt et al., 2003). Apesar da baixa homologia entre as duas formas (menos de 30%), elas se ligam ao mesmo receptor e desencadeiam atividades biológicas semelhantes (Cybulsky et al., 1998). A IL-1 atua na ativação de linfócitos, estimulação de macrófagos e adesão de leucócitos e células endoteliais. Além disso, ela regula a síntese de prostaglandinas, IL-6, IL-8, MMPs, óxido nítrico (Kida et al., 2005). A IL-6 é produzida por células T e B (linfócitos T e B) e macrófagos. Na imunidade inata, a IL-6 estimula a síntese de proteínas da fase aguda por hepatócitos durante o processo inflamatório. Na imunidade adaptativa, ela estimula o crescimento e diferenciação de linfócitos B (Hopkins, 2003; Roitt et al., 2003). A IL-8 é uma quimiocina liberada pelos monócitos atua na ativação de neutrófilos, na quimiotaxia, na angiogênese e na liberação de grânulos e superóxidos (Sandra et al., 1995).

A liberação de citocinas induzida por peçonha de serpentes ou toxinas delas isoladas foi anteriormente observada por muitos autores. Barros et al. (1998)

verificaram um aumento nos níveis de IL-6, IL-10 e INF- $\gamma$  no sangue causado pela peçonha de *Bothrops atrox*. Clissa et al. (2001) mostraram que a jararagina, uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, induz a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , embora níveis de IL-6 não foram encontrados. Rucavado et al. (2002) encontraram níveis elevados de IL-6 e IL-1 $\beta$  em músculo de ratos induzido por MT-III, um fosfolipase A<sub>2</sub> miotóxica isolada da peçonha de *Bothrops asper*. Níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  não foram observados. A peçonha de *B. asper* também induziu o aumento de IL-6 e TNF- $\alpha$  em flúido peritoneal (Zamuner et al., 2005). Fernandes et al. (2006) verificaram um aumento em produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  induzido por BaP1, uma metaloprotease isolada da peçonha de *B. asper*.

Além das citocinas, as metaloproteases de matriz (MMPs) são importantes mediadores da lesão tecidual e da inflamação de uma variedade de patologias (Shapiro, 1998; Nagase and Woessner, 1999), podendo assim representar um papel importante nas alterações locais induzidas pela peçonha; (Rucavado et al, 2002).

A matriz extracelular (MEC) é definida como uma rede complexa e dinâmica de componentes protéicos, proteoglicanos e glicoproteínas secretados que circundam os fibroblastos unindo as células e mantendo a estrutura tridimensional do corpo, conferindo, portanto, suporte mecânico para as células e integridade estrutural para os tecidos (Itoh e Nagase, 2002). Os componentes da matriz modulam o comportamento celular criando ambientes celulares influentes. A renovação (turnover) da MEC é parte integral de processos normais e patológicos como desenvolvimento, remodelamento tecidual, crescimento e diferenciação celular e invasão (Werb et al, 1996).

Proteases extracelulares são necessárias em diversos processos relacionados com o desenvolvimento normal e com doenças. A habilidade de degradar proteínas extracelulares é essencial para as células individuais interagirem com o ambiente ao redor e para organismos multicelulares se desenvolverem e funcionarem normalmente (Sternlicht e Werb, 2001).

A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares. Tais famílias incluem as serino-proteases, cisteína-proteases e metaloproteases da matriz (MMPs) (Benaud et al, 1998).

As MMPs são enzimas proteolíticas zinco-dependentes que estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, pois podem estar expressas em níveis baixos em tecidos normais e tornar-se alteradas em determinadas situações, como no ciclo endometrial, em processos de cicatrização, na cirrose hepática, em colagenoses e neoplasias, etc (Itoh e Nagase, 2002).

As MMPs constituem uma família de endopeptidases, com atividade hidrolítica de amplo espectro para as proteínas extracelulares. As MMPs pertencem a uma família de pelo menos 20 membros, produto de genes, homólogos ou pseudo-homólogos, relacionados entre si (Woessner, 1991). Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com critérios estruturais e funcionais, em cinco classes principais de diferente especificidade ao substrato: colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), gelatinases (MMP2 e MMP9), estromelinas (MMP3, MMP7, MMP10, MMP11 e MMP26) e metaloproteínas de membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 e MMP25), também conhecidas como MT1-MMP a MT6-MMP, respectivamente, e matrilsinas (Shingleton *et al*, 1996; Souza e Line, 2002).

Embora as MMPs sejam classificadas com base na sua afinidade por substrato, nota-se que há sobreposição entre as subclasses, em termos de suas afinidades. Além disso, as atividades das MMPs interferem umas com as outras na medida em que muitas delas podem ativar outras proenzimas, o que sugere que a ativação controlada das mesmas pode envolver uma cascata, englobando diferentes membros da família das MMPs (Cawston, 1998).

As MMPs possuem algumas características em comum, incluindo, dentre estas: 1) um domínio catalítico, que acomoda um átomo de  $Zn^{+2}$  no sítio ativo; 2) um domínio propeptídico, essencial para a manutenção de sua latência enzimática, e que é removido quando a enzima é ativada (Nagase and Woessner, 1999), conferindo uma de peso molecular de aproximadamente 10kDa (Woessner, 1991) e 3) um domínio translacional, peptídeo sinal que direciona o produto para secreção. A maioria das MMPs também possui um domínio C-terminal com uma seqüência de homologia a hemopexina, que constitui um sítio de ligação para os inibidores teciduais e também confere especificidade ao substrato. Elas diferem entre si pela especificidade ao substrato, tipos celulares e pelos agentes indutores (Dollery *et al*, 1995).

Em condições fisiológicas normais, há uma rigorosa regulação da secreção das MMP, as quais são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas, zimogênios, que posteriormente serão ativadas. Essa regulação ocorre apenas em momentos específicos, nos quais existem processos multifásicos de ativação dos zimogênios, além de haver vários inibidores sangüíneos e teciduais para monitorar a ação da proteinase (Woessner, 1991). O controle da quantidade de enzima ativa é feito pelos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs). O desequilíbrio entre MMP e TIMP pode resultar em várias patologias (Maskos e Bode, 2003). Além disso, as MMPs também são reguladas pela ativação da expressão gênica, que é regulada por proteínas extracelulares, citocinas, fatores de crescimento entre outros (Philip et al, 2004). Os níveis das MMP nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis, entretanto, sua expressão é substancialmente aumentada na maioria das neoplasias malignas, apresentando importante ação proteolítica nos processos de invasão e metástase (Hidalgo e Eckhardt,2001).

As principais ações das MMPs estão relacionadas ao remodelamento dos componentes da matriz extracelular, por meio da degradação do colágeno, da elastina e da fibronectina. Também participam do processo de migração de células normais, malignas e inflamatórias, bem como induzindo a angiogênese (Lamooreaux, 1998). Estão envolvidas também na cicatrização (Wolf *et al*, 1992), na reabsorção óssea (Delaisé *et al*, 1992), na involução mamária (Talhouk *et al*,1992) e em outras funções fisiológicas associadas a gravidez e parto (Jeffrey,1991). Recentemente, tem-se demonstrado que as MMPs também estão implicadas em processos patológicos variados como na artrite reumatóide (Harris, 1990), na esclerose múltipla, fibrose (Chandler *et al*, 1997), em algumas doenças cardiovasculares (Tamarina *et al*, 1997) e certas alterações hematológicas (Guedez *et al*, 1996).

As gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9 respectivamente, também conhecidas como colagenases, são algumas das endopeptidases que compõem o grupo das MMPs. Elas são distinguidas pela inserção de três repetições cabeça-cauda ricas em cisteína em seus domínios catalíticos (Sternlicht e Werb, 2001) e digerem gelatina, muitos tipos de colágenos, lamininas e outras várias proteínas extracelulares (Aimes e Quigley, 1995). A seqüência da MMP-2 inclui um domínio com uma tripla repetição de fibronectina tipo II inserida no seu domínio catalítico,

contribuindo para a ligação da enzima ao substrato. A MMP-9, estruturalmente, é a maior das gelatinases, incluindo três domínios de fibronectina e um domínio tipo colágeno tipo V (Woessner e Nagase, 2000).

A MMP-2 (72 kDa) é produzida principalmente a partir de células mesenquimais (fibroblastos), ainda que células epidérmicas, endoteliais, macrófagos e neutrófilos possam produzi-la em pequenas quantidades (Lamooreaux, 1998). Também é denominada colagenase tipo IV e, apesar de estar presente em níveis baixos de forma fisiológica (mantendo a homeostase do colágeno) (Kherif et al, 1999; Rucavado et al, 2002), quando ativada, pode degradar elastina insolúvel e degradar exageradamente o colágeno intersticial, além de participar da degradação da membrana basal do endotélio e de induzir a angiogênese (Agren, 1994).

A MMP-9 (92 kDa) é produzida por células inflamatórias ativadas (leucócitos polimorfonucleares, como neutrófilos, eosinófilos e monócitos/macrófagos) e células epidérmicas (especificamente queratinócitos), sua presença sempre traduzindo uma situação patológica. Suas ações são direcionadas à degradação do colágeno intersticial, à reepitelização, ao desenvolvimento e amplificação de processos inflamatórios e à angiogênese (Agren, 1994).

Trabalhos mostraram que a MMP-2 e a MMP-9 estão aumentadas em uma variedade de patologias, como a miocardose (Kherif et al, 1999), inflamação crônica (Tregrove et al, 1999), meningite (Leib et al, 2000), hemorragia e isquemia cerebral (Rosenberg, 1997; Gasche et al, 1999), entre outras. Rucavado et al (2002) reportaram um aumento apenas na MMP-9 induzido pelas toxinas BaP1 (metaloprotease) e MT-III (fosfolipase  $A_2$ ), isoladas da peçonha de *B. asper*, enquanto os níveis de MMP-2 permaneceram próximos ao controle de solução salina, ou seja, observou-se apenas a expressão constitutiva (Kherif et al, 1999).

### **1.3. Características estruturais e funcionais das PLA<sub>2</sub>s**

As fosfolipases  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>s) são enzimas de grande interesse médico-científico, devido ao seu envolvimento em grande variedade de doenças inflamatórias humanas e nos envenenamentos ofídicos e de abelhas. Possuem

importantes papéis no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares. Com a ação dessas enzimas, os fosfolipídeos são hidrolisados, desestruturando a membrana e comprometendo a sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especificamente na ligação 2-acil éster de 3-sn-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos (Arni & Ward, 1996; Kini, 2003). Os ácidos graxos liberados como ácido araquidônico e ácido oléico, podem ser importantes na estocagem de energia. O ácido araquidônico pode também funcionar como segundo mensageiro e como precursor de eicosanóides, que são potentes mediadores da inflamação e transdução de sinais (Dennis, 1997).

Estas enzimas, amplamente distribuídas na natureza, são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (Dennis, 1994). As PLA<sub>2</sub>s intracelulares estão frequentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolipídeos e outras funções celulares (Mukheerjee et al., 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exsudados inflamatórios e nas peçonhas de serpentes e artrópodes.

De acordo com Six e Dennis (2000) as fosfolipases A<sub>2</sub> extracelulares foram divididas em doze classes I a XII, com base no número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto. Balsinde et al. 2002 sugerem um novo sistema de classificação que organiza as PLA<sub>2</sub> de acordo com sua seqüência genética em 14 grupos distintos. As fosfolipases A<sub>2</sub> de serpentes estão todas reunidas nos grupos I e II, sendo estas proteínas de 119 a 143 resíduos de aminoácidos, com peso molecular variando entre 13 e 18kDa. As enzimas da classe I são encontradas em peçonhas de serpentes do gênero *Elapidae* e *Hydrophidae*, enquanto as da classe II são encontradas principalmente em peçonha de serpentes crotálicas e viperídeas (Ward et al., 2001).

As PLA<sub>2</sub>s representam uma classe de enzimas versáteis, considerando sua função, localização, regulação, mecanismo de ação, seqüência, estrutura e papel dos íons metálicos divalentes. Várias seqüências de PLA<sub>2</sub> estão depositadas em banco de dados e apresentam de 40 a 99% de similaridade na seqüência e no dobramento tridimensional, dados resolvidos por cristalografia de raios X e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Arni & Ward, 1996; Balsinde et al., 1999; Six & Dennis, 2000; Kini, 2003). A análise destas estruturas primárias

possibilitou a sugestão e a predição de determinantes estruturais de algumas atividades farmacológicas (Kini & Iwanaga, 1986; Kini & Evans, 1989; Ward et al., 1988). E agora, associada com resolução de estruturas tridimensionais, ampliou-se ainda mais o conhecimento das bases moleculares do mecanismo de ação destas toxinas.

A molécula de PLA<sub>2</sub> é estabilizada por sete ligações dissulfeto nas posições 11-77, 27-124, 29-45, 44-105, 51-96 e 84-98 (Harris, 1991). A divisão entre as classes I e II é baseada em dois critérios estruturais que são identificados na seqüência de aminoácidos: primeiro, nas enzimas da classe II falta a ligação Cys 11- Cys 77, mas aparece outra ponte dissulfeto alternativa, Cys 51- Cys 133; segundo, a classe I possui cerca de dois a três aminoácidos inseridos na região 52-65, chamado de “loop elapídico”, enquanto a classe II possui esta volta truncada, mas em adição apresenta de cinco a sete aminoácidos estendendo a região C-terminal (Arni e Ward, 1996).

A grande maioria das PLA<sub>2</sub>s miotóxicas isoladas de peçonhas de serpentes botrópicas, descritas até agora, são proteínas de caráter básico, ponto isoelétrico variando entre 7,0 e 10,0, que possuem atividade catalítica ou “não”, sobre substratos artificiais. As análises da composição em aminoácidos indicaram que essas miotoxinas são ricas em aminoácidos básicos e hidrofóbicos (Homs-Brandeburgo et al., 1988; Selistre et al., 1990; Lomonte et al., 1990; Díaz et al., 1995; Mancuso et al., 1995; Angulo et al., 1997). Apresentam também um alto número de resíduos de meia-cistina, o que sugere a presença de várias pontes dissulfeto intracadeia. As PLA<sub>2</sub>s tóxicas são muito estáveis, provavelmente como resultado da extensa ligação cruzada, tornando-as ativas em uma ampla faixa de pH e temperatura. Entretanto, várias PLA<sub>2</sub>s ácidas também já foram isoladas das peçonhas botrópicas, como por exemplo: SIIISPIIA, SIIISPIIB, SIIISPIIIA e SIIISPIIIB por Ketelhut et al., 2003; P1, P2 e P3 por Daniele et al., 1995; BP-PLA<sub>2</sub> por Rodrigues et al., 2007.

As miotoxinas isoladas dos venenos botrópicos pertencem ao grupo II das fosfolipases e podem ser subdivididas em dois subgrupos principais: (a) Asp49 que são as miotoxinas com atividade enzimática alta, cataliticamente ativas e (b) Lys49 que são as miotoxinas que possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (Ownby et al., 1999). A diferença nas propriedades



enzimáticas das duas classes de proteínas está baseada principalmente na presença do resíduo de aspartato (Asp) na posição 49 no primeiro grupo, quando comparado com a presença de lisina (Lys) na mesma posição da cadeia polipeptídica no outro grupo. A troca de aminoácidos é suficiente para causar a perda da habilidade da proteína em se ligar ao cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), um cofator essencial para fazer com que a enzima expresse sua atividade catalítica. Além das substituições na região do loop de ligação do cálcio, muitas PLA<sub>2</sub>s Lys49 apresentam resíduos variantes não encontrados nas PLA<sub>2</sub>s Asp49, que incluem Lys7, Lys78, Lys80, Lys115 e Lys116, que podem estar envolvidos com a toxicidade exercida por estas proteínas (Soares, 2000).

Além das PLA<sub>2</sub>s Lys49, outros variantes substituindo Asp49, que também possuem baixa ou nenhuma atividade enzimática, foram reportados: duas PLA<sub>2</sub>s Ser49, ammoditina L (Krizaj et al., 1991) e ecarfolina S (Polgar et al., 1996) e uma PLA<sub>2</sub> Arg49, zhaoermiatoxina (Mebs et al., 2006). Petan et al. (2007) concluíram que as PLA<sub>2</sub>s Ser49 miotóxicas evoluíram em direção à perda da capacidade de se ligar ao  $\text{Ca}^{2+}$  e da atividade enzimática para otimizarem o mecanismo de dano da membrana independente de  $\text{Ca}^{2+}$  e para aumentar sua especificidade na ação miotóxica. Da mesma forma, Murakami et al. (2008) verificaram que, apesar das diferenças entre as PLA<sub>2</sub>s Lys49 e Arg49, não há evidências estruturais que possam sugerir uma diferença no mecanismo de expressão de seus efeitos farmacológicos.

Independentemente da sua função catalítica primária, as fosfolipases A<sub>2</sub> de venenos de serpentes podem induzir diversos efeitos farmacológicos adicionais, como neurotoxicidade pré e/ou pós-sináptica, cardiotoxicidade, miotoxicidade, indução e/ou inibição da agregação plaquetária, edema, hemólise, anticoagulação, convulsão, hipotensão, efeito bactericida e anti-HIV (Bon et al., 1979; Fletcher et al., 1980; Fletcher et al., 1981; Huang, 1984; Alvarado & Gutiérrez, 1988; Lloret & Moreno, 1993; Yuan et al., 1993; Fuly et al., 1997; Páramo et al., 1998; Ownby, 1998; Soares et al., 1998; Fenard et al., 1999).

Durante os últimos 20 anos houve um grande interesse em se estudar componentes da peçonha que são responsáveis pela mionecrose, resultando no isolamento e caracterização estrutural e funcional de várias PLA<sub>2</sub> miotóxicas de peçonhas do gênero *Bothrops* (Basp-II por Francis et al, 1991; BthTX-I e BthTX-II

por Cintra et al, 1993; PrTX-I por Toyama et al, 1998; PrTX-II por Toyama et al, 2000; BnSP-6 e BnSP-7 por Rodrigues et al., 1998; MjTX-I e MjTX-II por Soares et al, 2000; SIII SPIIA por Ketelhut et al, 2003; BnpTX-I e BnpTX-II por Rodrigues et al, 2004).

Da peçonha de *B. pauloensis* já foram isoladas várias PLA<sub>2</sub>s. Duas fosfolipases A<sub>2</sub> Asp49 (Rodrigues et al., 2004), duas miotoxinas Lys49, BnSP-6 e BnSP-7 (Rodrigues et al., 1998) e uma fosfolipase A<sub>2</sub> ácida, Bp-PLA<sub>2</sub> (Rodrigues et al., 2007).

A PLA<sub>2</sub> denominada BnSP-7 (Rodrigues et al., 1998) é uma proteína com peso molecular entre 13,5 e 14 kDa, podendo apresentar-se na forma dimérica, e sua estrutura é essencialmente idêntica à estrutura das outras PLA<sub>2</sub>s Lys49 miotóxicas. Apresenta uma composição de aminoácidos com alto conteúdo de resíduos básicos e hidrofóbicos, sendo uma serina o resíduo de aminoácido N-terminal e apresentando também resíduos conservados das PLA<sub>2</sub>s Lys49 miotóxicas como Gly30, Gly33, His48, Lys49, Asp99 e a região 115-129. Seu ponto isoelétrico é 8.8 e ela é capaz de produzir necrose das fibras musculares de camundongos e não apresenta atividades fosfolipásica ou coagulante (Rodrigues et al., 1998; Soares et al., 2000; Magro et al., 2003). Soares et al 2000 fizeram uma alquilação do resíduo His48 da BnSP-7 com brometo de 4-bromofenacil brometo (BPB) e verificaram que esta modificação levou a uma diminuição das atividades miotóxica, bloqueio neuromuscular, indução de edema e atividade bactericida.

O reconhecimento da importância clínica do dano tecidual local em envenenamentos tem motivado um grande número de estudos sobre sua patogênese. Estes podem levar a uma melhor compreensão dos mecanismos que levam a necrose tecidual, o que poderia inspirar a criação de novos métodos terapêuticos. Em adição, o entendimento do mecanismo de ação de toxinas pode revelar mecanismos da injúria celular e tecidual que são comuns a outras condições patológicas.

## 2. Referências Bibliográficas

AGREN, M. S. Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol.* v. 131, p. 634-640, 1994.

AIMES, R. T.; QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific  $\frac{3}{4}$ - and  $\frac{1}{4}$ -length fragments. *J Biol Chem.* v. 270, p. 5872-5876, 1995.

ALVARADO, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* v. 36, p. 563-565, 1988.

AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pit-vipers. *Contr. Harvard Inst. Trop. Biol. Med.* v. 2, p. 1-65, 1925.

ANGULO, Y.; CHAVE, E.; ALAPE, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) scheledelii* from Costa Rica. *Arch Biochem Biophys.* v. 339, p. 260-266, 1997.

AREND, W. P.; GABAY, C. Cytokines in the rheumatic diseases. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* v. 30, p. 41-67, 2004.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A<sub>2</sub>- A structural review. *Toxicon.* v. 34, p. 827-841, 1996.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* v.39, p.175-189, 1999.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A<sub>2</sub> regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters.* v. 531, p. 2-6, 2002.

BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. *Arq. Bras. Méd.* v.65(4), p.345-355, 1991.

BARRAVIERA, B. *Venenos Animais - Uma visão integrada*, Rio de Janeiro: EPUC: Ed. de Publicações Científicas, 1990 p.411.

BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators of Inflammation*. v. 7, p. 339-346, 1998.

BENAUD, C.; DICKSON, R. B.; THOMPSON, E. W. Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat*. v. 50, p. 97-116, 1998.

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

BON, C.; CHANGEAUX, J. P.; JENG, T. W. Post-synaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* v. 99, p. 471-481, 1979.

CAMPBELL, J. A; LAMAR, W. W. The venomous reptiles of latin américa. *Cornell Univ. Press*, Ithaca.1989.

CARDOSO, J. L. C. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo-SP: Sarvier, 2003.

CAWSTON T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today*. v. 4, p. 130-137, 1998.

CHANDLER S, MILLER KM, CLEMENTS JM, LURY J, CORKILL D, ANTHONY DC, ADAMS SE, GEARING AJ. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunology*. v. 72, p. 155-161, 1997.

CHARGÉ, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* v. 84, p. 209-238, 2004.

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

CINTRA, A. C. O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R. Bothropstoxin-I: amino acid sequence and function. *J. Prot. Chem.* v. 12, p. 57-64, 1993.

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

CYBULSKY, M. I.; CHAN, M. K. W.; MOVAT, H. Z. Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor and the implications in gram-negative infection. *Lab. Invest.* v. 58, p. 365-371, 1998.

DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; FIDELIO, G. D. Kinetic and pharmacological characterization of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedi* venom. *Arch. Bioch. Bioph.* v. 318, p. 65-70, 1995.

DELAISSÉ J. M.; VAES, G. Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. *Biol Physiol of the Osteoclast. Boca Raton: CRC Press.* p. 289-314, 1992.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A<sub>2</sub>. *Minireview J. Biol. Chem.* v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E. A. History, classification, structure and function of phospholipase A<sub>2</sub>, Phospholipase A<sub>2</sub>: Basic and clinical aspects in inflammatory diseases. p. 1-10, 1997.

DHAWAN, J.; RANDO, T. A. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* v. 15, p. 666-673, 2005.

DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A<sub>2</sub> variant from *Bothrops asper* snake venom. *Natural Toxins*. v. 3, p. 26-31, 1995.

DÍAZ, C.; VALVERDE, L.; BRENES, O.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* v. 94, p. 520-528, 2005.

DOLLERY, C. M.; McEWAN, J. R.; HENNEY, A. M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Circ. Res.* v. 77, p. 863-868, 1995.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; FOX, J. W. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 455, p. 144-153, 2006.

FERNARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, J. C.; LAZDUNSKI, M.; DOGLIO, A. Secreted phospholipase A<sub>2</sub> a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J. Clin. Invest.* v. 104, p. 611-618, 1999.

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

FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C.; RYAN, M.; ROSENBERG, P. Comparison of relatively toxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja nigricolis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Hemachatus hemachatus* snake venom II. *Biochem. Pharmac.* v. 29, p. 1565-1575, 1980.

FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; YANG, C. C.; ROSENBERG, P. Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipases A<sub>2</sub> from elapid snake venoms. *Toxic Appl. Pharmac.* v. 59, p. 375-382, 1981.

FRANCIS, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, I. I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 284, p. 352-359, 1991.

FULY, A.L.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; CARLINI, C. R. Mechanism of inhibitory action on platelet activation of a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. *Thromb. Haemost.* v. 78, p. 1372-1380, 1997.

GASCHE, Y.; FUJIMURA, M.; MORITA-FUJIMURA, Y.; COPIN, J. C.; KAWASE, M.; MASSENGALE, J.; CHAN, P. H. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J. Cerebral Blood Flow Metab.* v. 19, p. 1020-1028, 1999.

GERARD, C.; BRUYNS, C.; MARCHANT, A. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.* v. 177, p. 547-550, 1993.

GUEDEZ L, LIM MS, STETLER-STEVENSON WG. The role of metalloproteinases and their inhibitors in hematological disorders. *Critical Rev Oncog*. v. 7, p. 205-225, 1996.

GUTIÉRREZ, J. M., CHAVES, F., GENE, J. A., LOMONTE, B., CAMACHO, Z., SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by basic myotoxin isolated from the venom of snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon*. v. 27, p. 735-45, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B., CHAVES, F., MORENO, E., CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 84C, p. 159-164, 1986.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*. v. 51, p.211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan*. v. 52, p. 37-38, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, J.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *Microvasc Res*. v. 71, p. 55-63, 2006.

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

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

HARRIS, J. B. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> and regeneration of skeletal muscles. *Toxicon*. v. 42, p. 933-945, 2003.

HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Pharmacol Ther*. v. 31, p. 79-102, 1991.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* v. 93, p.178-193, 2001.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; SIMIONI, L.R.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon.* v. 26, p. 615-627, 1988.

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

HUANG, H. C. Release of slow reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A<sub>2</sub> of *Vipera russelli* snake venom. *Toxicon.* v. 22, p. 359-365, 1984.

ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinase in cancer. *Essays Biochem.* v. 38, p. 21-36, 2002.

JEFFREY, J. J. Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin Perinatol.* v. 15, p. 118-126, 1991.

KADL, A.; LEITINGER, N. The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation. *Antioxid Redox Signal.* v. 7(11-12), p. 1744-54, 2005.

KAMIGUTI, A. S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *Medline.* v. 549, p. 129-134, 2003.

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

KETELHUT, D. F. J.; HOMEM DE MELO, M.; VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie.* v. 85, p. 983-991, 2003.



KHERIF, S.; LAFUMA, C.; DEHAUPAS, M.; LACHKAR, S.; FOURNIER, J. G.; VERDIERE-SAHUQUÉ, M.; FARDEAU, M.; ALAMEDDINE, H. S. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and *mdx* muscles. *Dev Biol.* v. 205, p. 158-170, 1999.

KIDA, Y.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, T.; TAKESHITA, A.; OKAMATSU, Y.; HANAZAWA, S.; YASUI, T.; HASEGAWA, K. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NFkappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine.* v. 29, p. 159-168, 2005.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of action of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon.* v.24, p. 827-840, 2003.

KINI, R. M.; IWANAGA, S. Structure-function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon.* v. 24, p. 527-541, 1986.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur J Biochem.* v. 202, p. 1165-1168, 1991.

LAMOOREAUX, W. J.; FITZGERALD, M. E. C.; REINER, A.; HATY, K. A.; CHARLES, S. T. Vascular endothelial growth factor increase release of gelatinase A and decrease release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res.* v. 55, p. 29-42, 1998.

LEIB, S. L.; LEPPERT, D.; CLEMENTS, J.; TAUBER, M. G. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun.* v. 68, p. 615-620, 2000.

LLORET, S.; MORENO, J. J. Oedema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A<sub>2</sub> purified from porcine pancreas and snake venoms. *Toxicon.* v. 31, p. 949-956, 1993.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. Na overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from croalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* v. 42, p. 885-901, 2003.  
LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops a trox* snake venoms. *Toxicon.* v. 28, p. 1137-1146, 1990.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. *Toxicon*. v. 42, p. 307-312, 2003.

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

MAGRO, A. J.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M. Crystal structures of BnPS-7 and BnSP-6, two Lys-49-phospholipases A<sub>2</sub>: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v. 311, p. 713-720, 2003.

MANCUSO, L. C.; CORREA, M. M.; VIEIRA, C. A.; CUNHA, O. A. B.; LCHAT, J. J.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; OWNBY, C. L.; GIGLIO, J. R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon*. v. 33, p. 615-626, 1995.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venom of three species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*. v. 26, p. 379-385, 1988.

MASKOS, K; BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol*. v. 25, p. 241-266, 2003.

MEBS, D.; KUCH, U.; CORONAS, F. I.; BATISTA, C. V.; GUMPRECHT, A.; POSSANI, L. D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese pitviper *Zhaoermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin. *Toxicon*. v. 47, p. 797-811, 2006.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharmac. Ther.* v. 48, p. 223-236, 1990.

MEIER, J. Venoms snakes. In: Medical use of snake proteins. p.1-32, 1990.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia Processos Gerais. 4 ed, 1999. 320 p.

MOREIRA, L.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon*. v. 32, p. 976-87, 1994.

MUKHERJEE, A. B., MIELE, L., PATTABIRAMAN, N. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes regulation and physiological role. *Biochem. Pharmacol.* v. 48, p. 1-10, 1994.

MURAKAMI, M. T.; VIÇOTI, M.M.; ABREGO, J.R.; LOURENZONI, M.R.; CINTRA, A. C.; ARRUDA, E. Z.; TOMAZ, M. A.; MELO, P. A.; ARNI, R. K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA<sub>2</sub>-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA<sub>2</sub> homologues. *Toxicon*. v. 49, p. 378-87, 2007.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 21491-21494, 1999.

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.

NUÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon*. v. 39, p. 1587-1594, 2001.

OWNBY, C. L. ARAÚJO, H. S. De. WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. *Toxicon*. v.37, p.411-445, 1999.

OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* v.17, p.1003-1009, 1998.

PÁRAMO, L.; LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDÁ, J.; BENGOCHEA, J. A. ; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Bactericidal activity of Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. *Eur. J. Biochem.* v. 235, p. 452-461, 1998.

PETAN, T.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue decreases its Ca<sup>2+</sup>-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. *Biochemistry*. v. 46, p. 12795-12809, 2007.

PETERS, J. A.; OREJAS-MIRANDA, B. Catalogue of the neotropical Squamata. *Part 1. Snakes. V. S. Natl. Mus. Bul.* v. 297, p.1-6, 1970.

PHILIP, S.; BULBULE, A.; KUNDU, C. G. Matrix metalloproteinase-2: mechanism and regulation of NK-kappaB-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion. *Glycoconj J.* v. 21, p. 429-441, 2004.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. *Rev. Assoc. Méd. Brás.* v. 47(1), p. 24-29, 2001.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A<sub>2</sub>: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A<sub>2</sub>, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). *Biochem J.* v. 319, p. 961-968, 1996.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L.B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon.* v. 50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, V. M., HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, *Toxicon.* v. 44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comp Bioch Physiol.* v.121, p. 215-222, 1998.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia.* São Paulo : Manole, 6. ed, 2003, 481p.

ROSENBERG, G. A.; NAVRATIL, M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology.* v. 48, p. 921-926, 1997.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: *Venomous and their venoms*. (BUCHERL, W. and BUCKLEY, E. E., eds). *New York: Academic Press*, v. 2, p. 345-403, 1971.

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

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

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. *Am. J. Pathol.* v. 86, p. 185-274, 1997.

SANDRA, P. F.; SUZANA, B. V. M. Participação de moléculas de adesão no desenvolvimento da resposta inflamatória. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paul.* v. 1, p. 80-89, 1995.

SAÚDE, M. D. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. Brasília, 2001.

SBH. 2005. Lista de espécie de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em:  
<http://www2.Sbherpetologia.org.br/checklist/répteis.htm>

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A. B.; DE SOUZA, G. E. P.; Giglio, J. R.. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*. v. 28, p. 261-273, 1990.

SHAPIRO, S. D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* v. 10, p. 602-608, 1998.

SHINGLETON, W. D.; HODGES, D. J.; BRICK, P.; CAWSTON, T. E. Collagenase: a key enzyme in collagen turnover. *Biochem. Cell Biol.* v. 74, p. 759- 775, 1996.

SILVA, C. J.; JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon*. v. 41, p. 251-255, 2003.

SILVA, X.V. *Revisão sistemática do complexo Bothrops neuwiedi (Serpentes, Viperidae, Crotalinae)*. São Paulo. Tese de doutorado - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (1B-USP), 2000. 134p.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1488: 1-19, 2000.

SOARES, A. M.; GUERR-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 A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Biochemistry and Biophysics.* v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, 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 edematogenic activity. *Toxicon.* v.36, p.503-514, 1998.

SOERENSEN, B. *Animais Peçonhentos: Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento, Distribuição geográfica no Continente Americano*. São Paulo/Rio de Janeiro: Editora Livraria Atheneu, 1990. 138p.

SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. *J Appl Oral Sci.* v. 10, p. 1-6, 2002.

Souza, J. R. F.; Monteiro, R. Q.; Castro, H. C.; Zingali, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon*, v. 39, p. 787-792, 2001.

SNOW, M. H. Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing II. An autoradiographic study. *Anat. Rec.* v. 188, p. 201-217, 1977.  
STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulates cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* v. 17, p. 463-516, 2001.

STOCKER, K. Composition of venoms snakes. In: Medical use of snake proteins. p.33-56, 1990.

TALHOUK, R. S.; BISSELL, M. J.; WERB, Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol.* v. 118, p. 1272-1282, 1992.

TAMARINA, N. A.; McMILLAN, W. D.; SHIVELY, V. P.; PEARCE, W. H.;  
Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and  
normal aorta. *Surgery*. v. 122, p. 264-272, 1997.

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

TRENGOVE, N. J.; STACEY, M. C.; MACAULEY, S.; BENNET, N.; GIBSON, J.;  
BURSLEM, F.; MURPHY, G.; SCHULTZ, G. Analysis of the acute and chronic  
wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg*.  
v. 7, p. 442-452, 1999.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J. R.;  
MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a Lys-49 phospholipase A<sub>2</sub>  
homologue from *Bothrops piraja* venom. *Biochimie*. v. 82, p. 245-250, 2000.

TOYAMA, M. H.; SOARES, A. M.; VIEIRA, C. A.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.;  
GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin  
from *Bothrops pirajai* snake venom and its biological activity after alkylation with p-  
bromophenacyl bromide, *J. Protein Chem*. v. 17, p. 713-718, 1998.

TU, A. T. Snake venoms: general background and composition. In: *Venoms:  
Chemistry and Molecular Biology*. p.1-19, 1988.

VAN DER MEIDE, P. H.; SCHELLEKENS, H. Cytokines and the immune  
response. *Biotherapy*. v. 8, p. 243-249, 1996.

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.

WARD, R. J., OLIVEIRA, A. H., BORTOLETO, R. K., ROSA, J. C., FACA, V. M.,  
GREENE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys-49  
phospholipase A<sub>2</sub> homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*.  
*Prto. Expr. Purif*. v. 21, p. 134-140, 2001.

WARD, R. J.; RODRIGUES ALVES, A.; RUGGIERO NETO, J.; ARNI, R. K.; CASARI, G. A sequence space analysis of phospholipase A<sub>2</sub>. *Prot. Eng.* v. 11, p. 285-294, 1988.

WERB, Z.; ASHKENAS, J.; MACAULEY, A.; WESEN, J. F. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stroma-epithelial interactions during mammary gland development. *Braz J Med Biol Res.* v. 29, p. 1087-1097, 1996.

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

WOESSNER JF JR. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* v. 5, p. 2145-2154, 1991.

WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. 1 ed., New York. Oxford University Press 2000.

WOLF, C.; CHENERD, M. P.; DURAND DE GROSSOUVRE, P.; BELLOCQ, J. P.; CHAMBON, P.; BASSET, P. Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* v. 99, p. 870-872, 1992.

YOU, W. K.; SCO, H. J.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J. Biochem.* v. 134, p. 739-749, 2003.

YUAN, Y.; JACKSON, S. P.; MITCHELL, C. A.; SALEM, H. H. Purification and characterization of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub>: a potent inhibitor of aggregation platelet. *Thromb. Res.* v. 70, p. 471-481, 1993.

ZAMUNER, S. R.; TEIXEIRA, C. F. P. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators of Inflammation.* v. 11, p. 351-357, 2002.

ZAMUNER, S. R.; ZULLIANI, J.P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. 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.



# Capítulo II

Aspectos da lesão tecidual local e da regeneração induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*: Um estudo da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da expressão de metaloproteases de matriz (MMP-9 e MMP-2).

## Resumo

Envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* São caracterizados por lesão tecidual local proeminente devido à mionecrose, hemorragia e edema. A lesão tecidual aguda induzida por essas peçonhas ocorre devido à ação de diferentes toxinas presentes nas peçonhas, entre elas as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) miotóxicas possuem um importante papel. Este estudo avaliou a progressão da lesão tecidual local e da inflamação induzidas pela BnSP-7, uma miotoxina isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. A expressão de MMPs (MMP-9 e MMP-2) durante os processos de degeneração e regeneração do músculo gastrocnêmio também foi investigada. A lesão tecidual local foi caracterizada por edema, necrose e inflamação avaliada até 24 horas após a inoculação de BnSP-7. A regeneração das miofibrilas, analisada ao microscópio óptico, foi observada de 72 horas à 2 semanas. A MMP-9 foi expressa nos mesmos intervalos de tempo em que observou-se o músculo em regeneração, sugerindo um envolvimento desta MMP no processo de regeneração. A MMP-2 foi expressa em todos os tempos testados. Os níveis das citocinas IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  no músculo gastrocnêmio e em MPAC (células peritoneais aderentes murinas) foram avaliados após estímulo com BnSP-7, BnSP-7 modificada com BPB e a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*. As citocinas liberadas em maior quantidade pelo músculo gastrocnêmio e pelas MPAC foram IL-1 $\beta$  e IL-8, respectivamente. A liberação de TNF- $\alpha$  não foi significativa em ambos os modelos experimentais, quando comparado ao controle. Os resultados mostraram também que a modificação da BnSP-7 com BPB levou a uma diminuição da liberação das citocinas quando comparado à BnSP-7 nativa. Foi demonstrado então que a BnSP-7 induz a formação de edema e aumento da

liberação de CK, citocinas (IL-6, IL-8, IL-1- $\beta$ ) e expressão de MMP-9. Assim esta miotoxina pode estar agindo como um estímulo pro - inflamatório, induzindo a produção e liberação de citocinas pelas células inflamatórias e pelas células satélite, o que representa um importante papel no processo inflamatório e, conseqüentemente, na evolução da lesão tecidual local e da regeneração.

Palavras-chave: miotoxina, fosfolipase  $A_2$ , peçonha de serpentes, metaloproteases de matriz, inflamação, citocinas, BnSP-7.

**Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom: A study of release of pro-inflammatory cytokines and expression of Matrix Metalloproteinases (MMP2 and MMP9).**

Carolina de Freitas Oliveira<sup>a</sup>, Daiana da Silva Lopes<sup>b</sup>, Mirian Machado Mendes<sup>a</sup>;  
Homs-Brandeburgo, M. I. <sup>a</sup>, Hamaguchi, A<sup>a</sup>, Ana Maria Moura da Silva<sup>b</sup>, Patrícia  
Bianca Clissa<sup>b</sup>, Tânia Machado de Alcântara<sup>c</sup>, Veridiana M. Rodrigues<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG,  
Brazil;

<sup>b</sup> Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

**\*Corresponding author:** Prof. Dr. V.M. Rodrigues. E-mail: veridiana@ingeb.ufu.br; Tel.: +3432182203, Fax: 0055 3432182203#24.

---

**Abstract**

Envenomations caused by *Bothrops* snake venoms are characterized by prominent local tissue damage due to myonecrosis, hemorrhage and edema. The acute muscle damage observed in the envenoming can be due the action of different toxins present in the venom, between them, the myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) show an important role. In the present study, the progression of local tissue damage and inflammation induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom was evaluated. We further investigated the MMPs expression (MMP-2 and MMP-9) during process of degeneration and

regeneration of the gastrocnemius skeletal muscle. Local tissue damages were characterized by edema, necrosis and inflammation evaluated until 24 h after inoculation of BnSP-7. The regeneration of myofibers, analyzed by light microscopy, was observed from 72 hours to 2 weeks after inoculation of toxin. The expression of MMP-9 occurred at the same times intervals of regenerating muscle, suggesting that this MMP is involved with the regeneration process. MMP-2 was expressed at all times tested. The IL-8, IL-6, IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokines levels were analyzed on mice gastrocnemius muscle and MPAC (murine peritoneal adherent cells) after BnSP-7, BnSP-7 modified with BPB and *Bothrops pauloensis* crude venom inoculation. The cytokines released in higher levels by mice gastrocnemius muscle and MPAC were IL-1 $\beta$  and IL-8, respectively. The release of TNF- $\alpha$  wasn't significative in both models. The results showed also that the modification of BnSP-7 with BPB decreased the release of IL-8, IL-6 and IL-1  $\beta$  when compared to native BnSP-7. We have demonstrated that BnSP-7 induces an increase in edema, release of CK, cytokines (IL-6, IL-8, IL-1-1 $\beta$ ) and expression of MMP-9. This way, this myotoxin can be acting as pro-inflammatory incentives, inducing cytokine production and liberation from the inflammatory and satellite cells, that present important role in inflammatory process and, consequently, in the evolution of local tissue damage and regeneration.

Key words: myotoxin, phospholipases  $A_2$ , snake venom, matrix metalloproteinases, inflammation, cytokine, BnSP-7.

---

## 1. Introduction

Local tissue damage induced by the bothropic poisoning is characterized by hemorrhage, edema, inflammation and myonecrosis (Nishioka et al., 1992). Muscle necrosis can occur due to direct action of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> on plasma membranes of muscle cells. Beyond those effects, the regeneration was also verified after treatment of mice muscles with myotoxins (Harris, 2003; Vignaud et al., 2005).

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

Increments in cytokines release induced by snake venom or isolated toxins were found by many authors. Barros et al. (1998) verified an increase on blood IL-6, IL-10 and INF- $\gamma$  caused by *Bothrops atrox* snake venom. Clissa et al. (2001) showed that jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, induces the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the supernatant of murine peritoneal cells in culture, although IL-6 levels were not detected. Rucavado et al. (2002) found increased levels of IL-6 and IL-1 $\beta$  in mice muscle induced by MT-III, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* venom. Levels of TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$

were not detected. *B. asper* snake venom also induced increase of IL-6 and TNF- $\alpha$  in peritoneal fluid (Zamuner et al., 2005). Fernandes et al. (2006) verified an increase on production of IL-1 and TNF- $\alpha$  induced by BaP1 in the peritoneal exudate, a metalloproteinase isolated from *B. asper* snake venom.

Chaves et al. (2005) concluded that TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 do not play a significant role in the acute local pathological alterations induced by the poison of *B. asper*. Moreover, they suggest that the local production of these cytokines has a participation in the local inflammatory reaction, setting the stage for the removal of necrotic tissue by inflammatory cells, and promoting tissue repair, regeneration and revascularization. Besides, IL-6 may have a role in the expression of ICAM-1 after injection of *B. jararaca* venom, being relevant for firm adhesion of neutrophils (Zamuner and Teixeira, 2002).

The matrix metalloproteinases (MMPs) are also important mediators of tissue damage and inflammation of a variety of pathologies (Shapiro, 1998; Nagase and Woessner, 1999), thus they could have an important role in local alterations induced by the venom (Kherif et al., 1999; Rucavado et al., 2002).

Several studies showed that MMP-2 and MMP-9 are increased in a variety of pathologies, as myonecrosis (Kherif et al, 1999), chronic inflammation (Tregrove et al, 1999), meningitis (Leib et al, 2000), hemorrhage and cerebral ischemia (Rosenberg, 1997; Gasche et al, 1999), among others. Rucavado et al (2002) reported an increase of MMP-9 in gastrocnemius muscle induced by the toxins BaP1 and MT-III, isolated from *B. asper* venom, suggesting a role not in induction of injury but in inflammatory response and regeneration.

In the present study, the progression of local tissue damage and inflammation induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops pauloensis*

snake venom was evaluated. We further investigated the MMPs expression (MMP-2 and MMP-9) during process of degeneration and regeneration of the gastrocnemius skeletal muscle.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Venom and toxins**

Crude venom of *Bothrops pauloensis* was obtained from the Pentapharm serpentarium, Minas Gerais, Brazil. Myotoxin BnSP-7 (Rodrigues et al., 1998) and BnSP-7-BPB (BnSP-7 with the alkylation of His 48 by brometo de 4-bromophenacil (BPB) were kindly provided from Prof. Dr. Andreimar Martins Soares from Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto from Universidade de São Paulo. Proteins were estimated by the method of Bradford (1976).

### **2.2. Animals**

BALB/c male mice were obtained from Biotério Central do Instituto Butantan and maintained under standard conditions (temperature  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , relative humidity  $60 \pm 5\%$ , 12 h light/dark cycle) with diet and water *ad libitum*. The experimentation protocol was approved by the Committee of Ethics for the Use of Animals of the Instituto Butantan (protocol number 003/2001) and it is in



agreement with the ethical principles of animal experimentation adopted by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **2.3. Edema inducing-activity**

Groups of four male BALB/c mice (18-22 g) were injected in the subplantar region with the crude venom and the myotoxin BnSP-7 (10  $\mu$ g/10  $\mu$ L). Control animals received an injection of PBS under identical conditions. After 30', 1h, 3hs, 6hs e 24hs the edema at the paw was measured using a low pressure pachymeter (CALIPER). Zero time points were subtracted from all the values and the differences were expressed as media percentage  $\pm$  S.D.

### **2.4. Myotoxic activity**

The assay of creatine kinase (CK) was carried out using the CK-NAC kinetic kit from Bioclin. Myotoxin BnSP-7 (50  $\mu$ g/25  $\mu$ L or crude venom (25  $\mu$ g/25  $\mu$ L) were injected intra-muscularly in groups of four BALB/c male mice (18-22 g). Control animals received an injection of 25  $\mu$ L PBS under identical conditions. After time intervals of 1, 3, 6 and 24 hours after injection, blood was collected from cardiac puncture and the plasma creatine kinase activity was determined. Activity was expressed in U/L, one unit defined as the phosphorylation of 1  $\mu$ mol of creatine /min at 25 °C.

## 2.5. Histological Analysis

Myotoxic activity was also evaluated on the basis of morphologic alterations induced by i.m. injections of the myotoxin BnSP-7 (50 µg/25 µL) or crude venom (25 µg/25 µL) in the left gastrocnemius skeletal muscle of BALB/c male mice (18-22 g, n = 3). Control animals received an injection of 25 µL PBS under identical conditions. After time intervals of 1, 3, 6, 24 and 72 hours, 1 and 2 weeks of injection the animals were sacrificed in CO<sub>2</sub> chamber and a small section of the central region of the muscle was excised. The material was then soaked in fixing solution (10% formaldehyde in PBS, v/v) and dehydrated by increasing concentrations of ethanol and processed for inclusion in paraffin. The resulting blocks were sliced in 6.0 µm thick sections, stained with 0.25% (w/v) hematoxylin-eosin (HE) or Masson and examined under a light microscope.

## 2.6. RNA extraction

Total RNA was extracted from gastrocnemius muscle by Tri-Reagent (Sigma) method following the manufacture's instructions, after i.m. injection of 50 µg of BnSP-7 or 50 µL of PBS at different time intervals (1, 3, 6, 24, 72 hours and 1 and 2 weeks). RNA extraction was carried out in an RNase-free environment. RNA was quantified by reading the absorbance at 260 nm according to the method described by Sambrook et al. (1989).

## 2.7. Semi-quantitative RT-PCR analysis:

These experiments were accomplished according to Baldo, C. (2004) with modifications. The reverse transcription of 1 µg RNA was carried out using M-MLV RT reverse transcriptase (2 U/µL) (Invitrogen), oligo (dT)<sub>15</sub>, primers (6.3 pmol/ µL), dNTP (0.2 mM), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM) and 0.5 U RNaseOUT Ribonuclease inhibitor (Recombinant).

For the polymerase chain reaction (PCR), the cDNA (2 µL) obtained was incubated with 0.05 U/µL Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0.5 mol/µL of 3' and 5' primers, 0.2 mM dNTP, 200 mM, 10x Tris-HCl buffer and 2 mM MgCl<sub>2</sub>.

The RT-PCR conditions for the MMP-9 were: 37°C for 1 hour (RT-reaction), 95°C for 5 min (hot start) followed by 36 cycles at 94°C for 40 sec (denaturing), 58°C for 40 sec (annealing temperature), and 72°C for 50 sec (extension). PCR conditions for the MMP-2 were: 37°C for 1 hour (RT-reaction), 95°C for 5 min (hot start) followed by 38 cycles at 94°C for 40 sec (denaturing), 60°C for 40 sec (annealing temperature), and 72°C for 50 sec (extension). PCR conditions for the β actin were: 37°C for 1 hour (RT-reaction), 95°C for 5 min (hot start) followed by 28 cycles at 94°C for 40 sec (denaturing), 58°C for 40 sec (annealing temperature), and 72°C for 50 sec (extension). Semi quantitative RT-PCR was established by terminating reactions at intervals of 28, 30, 33, 36, 38 and 40 cycles for each primer pair to ensure that the PCR amplicons were within the linear portion of the amplification curve. PCR products were detected on 2% agarose electrophoresis using as nucleotide size markers the 100 bp Ladder (Invitrogen). The primers used were β-Actin (forward 3' AACCTAAGGCCAACCGTGA; reverse 5' ATGCCACAGGATTCCATACC; 490 bp), MMP-2 (forward 3'

GTTGGCAGTGCAATACCTGA; reverse 5' GGTATCCATCTCCATGCTCC; 404 bp) and MMP-9 (forward 3' CATCGAACTTCGACACTGAC; reverse 5' GCCACGACCATACAGATACT; 212 bp). The primer for the protein  $\beta$ -actina was positive control of the reaction since this protein is expressed constitutively by the cells.

The relative abundance of the genes was obtained by the reason among the reading of optical densitometry of genes MMP-9 or MMP-2 for the constitutive gene.

## **2.8. Peritoneal cells and culture**

The MPAC (murine peritoneal adherent cells) experiments were accomplished according to Clissa et al. (2001). The production of peritoneal exudates cells from 18 to 22 g male BALB/c mice was elicited by intraperitoneal injection of 1 mL Brewer's thioglycollate medium (Difco Laboratories). Five days later, the cells were collected from the mouse peritoneal cavity in 5 mL of complete RPMI medium (Gibco) containing 2 IU/mL of Heparin (Roche). The pooled cells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then resuspended in complete RPMI containing 5% heat-inactivated Fetal Calf Serum (FCS) (Bio-Whittaker). The cells were cultured in 24 well ( $5 \times 10^5$  cells/well) cell culture plates, incubated at 37°C in the presence of CO<sub>2</sub> for 2 h. After incubation, they were washed three times with PBS, to remove non-adherent cells, and RPMI containing 5% FCS was added to each well. Approximately 95% of the remaining adherent cells were macrophages as determined by morphology.

Viable cells were quantified by the presence in live cells of mitochondrial succinyl dehydrogenase, by adding the enzyme substrate 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma) to the adhered cells. After 24 hours from stimulation with 2.5, 5.0, and 10.0 µg/mL of BnSP-7, BnSP-7-BPB or CV culture supernatants were discarded and the cells remaining on the plate were incubated with 200 µL of MTT (5 mg/mL in PBS) for 90 min at 37°C. The plates were then washed with PBS, and 200 µL/well of dimethyl sulfoxide (Sigma) were added. One hour later, the optical density was determined at 490 nm. The absorbance obtained using non-treated cells was used as 100% viability.

## **2.9. Cytokine measurement**

For this assay MPAC were stimulated with 5 µg/ml of crude venom, BnSP-7 or BnSP-7-BPB in duplicate. After 2, 4, 6, 8 and 24 hours the supernatants were collected and stored at -20° C for subsequent measurement by ELISA. Treatments with PBS were used at zero time as control.

We also tested the induction of cytokine on gastrocnemius muscle. 10 µg/10 µl of crude venom, BnSP-7 or BnSP-7-BPB were injected in the left gastrocnemius muscle of BALB-c male mice (18-22 g, n = 3). Control animals received an injection of 10 µl PBS under identical conditions. After 2, 4, 6, 8 and 24 hours the animals were sacrificed, the muscle was extracted, added to 200µl of PBS, perforated and homogenized with a glass stem in the own tube eppendorf. Then, more 300µl of PBS was added and samples were centrifuged 12000xg, 5 minutes (Laborzentrifugem 2K 15-Sigma). The supernatants were collected and stored at -20° C for subsequent measurement by ELISA.

Cytokine levels in the cells supernatants and gastrocnemius muscle supernatants were measured by ELISA, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). The monoclonal and polyclonal antibodies against IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and KC (the mice cytokine corresponding to the human cytokine IL-8) were from R&D Systems. Cytokine concentrations were calculated by interpolation of the regression curve of known amounts of recombinant cytokines (rIL-6, rIL-1 $\beta$ , rTNF- $\alpha$  and rKC from R&D System) and reported as ng/ml.

## **2.10. Statistical Analysis**

The experiments accomplished in triplicate were analyzed by one way ANOVA followed by the test of Dunnett, while experiments made in duplicate were analyzed by one way ANOVA followed by the test of Tukey. Differences were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . The results are expressed as the average of the triplicate or duplicate plus the standard deviation.

## **3. Results**

### **3.1. Edematogenic activity**

There was a significant increase of mice paws inoculated with CV or BnSP-7, evidencing the presence of edema (Table I). The maximum edema percentage

obtained by the CV was of 79%, 1 hour after inoculation, while the myotoxin BnSP-7 presented a maximum increase after 30 minutes (77%).

### **3.2. Myotoxic activity**

Table I also shows a significant increase in the release of creatine kinase induced by BnSP-7 when compared to CV and PBS control. The maximum of release was observed 3 hours after inoculation of CV and BnSP-7, corresponding to 515.4 and 4,147.5 U/L, respectively. The activity of CK for control group was of approximately 47 U/L.

### **3.3. Histological analysis**

Figures 1 and 2 show histological sections of mice gastrocnemius muscle extracted 1, 3, 6, 24, 72 hours, 1 and 2 weeks after the inoculation with PBS, 25 µg CV or 50 µg BnSP-7.

In comparison with control PBS, the muscles inoculated with CV presented swollen and with great extravasation of erythrocytes, characterizing a hemorrhagic effect. After 3 hours, it was observed an inflammatory infiltrate, composed mainly of neutrophils that increased progressively up to 72 hours. The tissue necrosis was evidenced mainly between 24 and 72 hours. Myocytes in regeneration were observed after one week of CV inoculation. In this period, it can be noticed a decrease of edema, hemorrhage, necrosis and leukocyte infiltrate, which became composed mainly by macrophages. The muscle cells in regeneration showed a reduced size with large and central nuclei, with prominent nucleolus. The process

of repair of the muscle fibers is followed by formation of fibrous connective tissue, evidenced by the presence of granulation tissue in slides stained with Masson (Figures 1G, 1H).

In comparison with the control PBS, in the first 3 hours after the inoculation of myotoxin BnSP-7 the muscle presented swollen (spaced fibers), with a lot of necrotic cells and discreet inflammatory infiltrate constituted predominantly by neutrophils. The edema decreased progressively until 6 hours, while the inflammatory exudate increased progressively up to 72 hours, being located mainly in the endomysium. After 24 hours, the number of necrotic cells decreased (Figures 2E, 2F, 2G). From 72 hours to 2 weeks the inflammatory infiltrate became multifocal, being characterized practically by macrophages and the edema and necrosis have disappeared. In that period, were visualized myocytes in regeneration and the presence of granulation tissue (Masson-Figure 2E), composed of inflammatory cells, fibroblasts and newly formed and forming vessels.

### **3.4. Expression of MMPs**

The RT-PCR reactions showed that MMP-9 expression was gradually increased from 72 hours to one week and started to decrease two weeks after inoculation of BnSP-7 in the gastrocnemius muscle, reaching the highest level of expression at one week. No significant levels of MMP-9 induced by PBS were detected (Figura 3B). MMP-2 expression was verified in all times tested, with a decrease at 3, 6 and 24 hours after stimulus by both BnSP-7 and PBS (Figura 3C).



### 3.5. Effect on cytokines

Exposure of MPAC and gastrocnemius muscle to toxins took to an increase of all cytokines tested, however the release of TNF- $\alpha$  wasn't significant (results not showed).

MPAC levels of IL-6 reached peak 8 hours after stimuli by BnSP-7, while for muscle the peak was at 2 hours. BnSP-7-BPB decreased successfully IL-6 levels when compared to BnSP-7 in both experimental models (Figures 4A and 5A, respectively). MPAC levels of IL-8 reached peak 6 hours after stimuli by BnSP-7, while for muscle the peak was at 2 hours. BnSP-7-BPB also decreased IL-8 levels when compared to BnSP-7 (Figures 4B and 5B, respectively). MPAC levels of IL-1 $\beta$  reached peak 6 hours after stimuli by BnSP-7, while for muscle the peak was at 4 hours. BnSP-7-BPB wasn't so successful to diminish levels of IL-1 $\beta$  when compared to BnSP-7 since it was observed at only one time interval of each experiment (Figures 4C and 5C, respectively). BnSP-7 induced higher cytokines release in MPAC while in gastrocnemius muscle the CV was able to induce higher levels of all cytokines.

## 4. Discussion

Bothropics myotoxins induce serious muscle damage soon after the intramuscular injection, characterized mainly by edema, inflammation and mionecrose. (Gutiérrez et al., 1989; Nishioka et al., 1992; Gutiérrez & Rucavado,

2000). Thus, the pathogenesis of these effects is being very studied through the morphologic and biochemical alterations in the affected muscle (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Rodrigues et al., 2001; Harris, 2003; Rucavado et al., 2002; Rodrigues et al., 2007).

In this work it was verified that both crude venom and myotoxin BnSP-7 were able to induce significant increase of mice paw, characterizing the edema. For Zuliani et al. (2004) and Landucci et al. (1998) fosfolipases  $A_2$  increase the microvascular permeability and the blood flow in mice and rat paw causing the edema. The edema formation can also be broadly linked to mast cells activation (Cirino et al., 1989; Landucci et al., 1998). Mast cells are inflammatory cells located close to blood vessels, nerves, epithelium and smooth muscles and they express and release type II fosfolipases  $A_2$ , that have the function of modulating it's degranulation (Zuliani et al., 2004). The discovery that mast cells activation by bothropstoxin-I, a fosfolipase  $A_2$  Lys-49 isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom (Homsí-Brandeburgo et al., 1988), was inhibited by heparin suggests that the positive charge of this toxin is the major responsible factor for its pharmacological properties (Landucci et al., 1998). Other studies showed that the initial edema (30 minutes) is inhibited by pretreatment with ciproheptadin, indicating the participation of histamine or serotonin in the process, while the late edema (5 hours) is inhibited with pretreatment with aspirin, suggesting the prostaglandins participation (Gutiérrez et al., 1986). Besides, Landucci et al. (1998) suggest that phospholipids hydrolysis by phospholipases  $A_2$  is not essential for edema formation, in other words, the phospholipases may have a pharmacological domain independent from catalytic site (Kini & Evans, 1989; Kini, 2003), explaining then the role of BnSP-7 Lys-49 in the induction of this effect.

The muscle damage showed that first intervals of time after inoculation of crude venom or BnSP-7 were characterized by edema, necrosis and inflammation and, just for CV, hemorrhage. This bleeding is due to the action of hemorrhagic toxins, like metalloproteinases, present in the crude venom (Gutiérrez et al., 1995) that cause lesions on the walls of the small blood vessels (Oshaka et al., 1979; Ownby et al., 1990). The mechanism for which hemorrhagic metalloproteinases causes systemic or local tissue damage is due to their proteolytic action in proteins of the basal membrane (Bjarnason and Fox, 1994; Escalante et al., 2006). This action weakens the mechanical stability and hemodynamic biophysical forces that usually operate in the circulation, provoking a distention in the capillary wall until the integrity is broken and extravasation occurs in an explosive way, leading to tissue hypoxia and, consequently, to cellular death (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Gutiérrez et al., 2005; Gutiérrez et al., 2006). So, it is suggested that this distention and abrupt rupture result in the loss of the integrity not only of endothelial cells, but also of the components of the basal membrane (Moreira et al., 1994; Gutiérrez et al., 2006). Bleeding injuries can also be provoked by the inhibitory effect on platelet aggregation by SVMPs (Bjarnason and Fox, 1994, Kamiguti, et al., 2003). Besides, SVMPs induce the separation of endothelial cells from extracellular matrix proteins and its apoptosis (Tanjoni et al., 2005; Diaz et al., 2005; You et al., 2003).

The mionecrosis caused by CV and BnSP-7 was assayed by levels of creatine kinase in the serum of mice injected with these toxins. The enzyme creatine kinase is found in high concentrations in the heart, skeletal muscles and in the brain. Thus, when the muscle tissue is damaged in some way the levels of CK in the blood increase. The myotoxin BnSP-7 induced a larger release of the enzyme creatine kinase than crude venom.

The myotoxicity induced by snake venoms can be caused by the indirect action of hemorrhagins, that cause injury to blood vessels leading to ischemia and, consequently, to cellular death; or it can be caused by the direct action of phospholipases  $A_2$  by rupture of plasma membranes leading to alteration on permeability and this way they provoke cellular damage. The myonecrosis induced by CV and BnSP-7 begins 1 hour after the inoculation. This effect observed in the treated muscles with CV can also be due to the direct action of  $PLA_2$ s Lys49 on plasma membrane. It is believed that its action in the muscle plasma membrane is due to areas of its structure that recognize acceptor sites negatively charged, both for low as high affinity in the muscle membrane, and to areas that interact and penetrate in the lipid bilayer promoting destabilization of the membrane through an independent mechanism of the catalytic action, practically absent in those proteins. This action results in an influx of calcium, that begins a variety of degenerative mechanisms as alterations in the cytoskeleton, mitochondrial damages, proteases and calcium-dependent phospholipases activation and hypercontraction of myofibers, that consequently cause more cellular damages, taking to necrosis of muscular fibers (Harris, 2003; Gutiérrez and Ownby, 2003).

The use of synthetic peptides evidenced the C-terminal region (115-129) as responsible for the toxic activities in some myotoxic  $PLA_2$  Lys49 (Núñez et al., 2001; Lomonte et al., 2003a). This region combines cationic and hydrophobic amino acids responsible for the cellular membranes damage mechanism. The cationic residues would interact electrostatically with anionic groups of an acceptor site possibly membrane phospholipids negatively loaded (Lomonte et al., 2003b), while the hydrophobic residues, especially the aromatic ones, would interact with and possibly penetrate the phospholipidic bilayer, resulting in its destabilisation

(Núñez et al., 2001). However, the fact of a single peptide plays all the main toxic activities of the origin molecule, does not prevent the existence of other motifs that can participate or complement the action of toxic effector site (Lomonte et al., 2003(b)). In contrast, C-terminal peptides of some myotoxic PLA<sub>2</sub> Asp49 showed no activity of membrane direct damage, suggesting that the toxic mechanism exercised by these proteins, that probably involves its catalytic activity as an important step, is different from that used by myotoxic PLA<sub>2</sub> Lys49 (Núñez et al., 2001).

The results obtained by histological analyses confirm the high levels of CK liberated by gastrocnemius muscle. Soares et al. (2000) also verified an increase in CK plasma levels induced by BnSP-7. Rodrigues et al. (1998) showed necrosis of gastrocnemius muscle 24 hours after inoculation of BnSP-7, while BnSP-7 modified with BPB did not produce any visible necrosis.

Our histological analysis, as well as in other studies (Gutiérrez et al., 1991; Gutiérrez & Lomonte, 1989; Harris, 1991, Harris, 2003), also showed that myonecrosis is followed by the invasion of inflammatory infiltrate in abundance and by regeneration in the affected muscle.

The efficiency of local circulation is essential for complete muscle regeneration, since it allows the arrival in the damaged region of macrophages that phagocytose necrotic cells, as well as nutrients and O<sub>2</sub> to supply the intense metabolic activity of the regeneration phase (Harris, 2003). Since CV caused intense hemorrhage, as shown previously, the reinnervation and the regeneration of the blood vessels in the muscle are essential for the regeneration process (Vignaud et al., 2005; Harris, 2003). Besides, in this slower process of regeneration it is common the emergence of many fibroblasts and fibrosis

(Gutiérrez & Lomonte, 1995). This dense organization of ECM difficults further cell migration and regeneration, thus resulting in a terminal residual fibrotic state within the muscle (Bedair et al., 2007).

The myotoxin BnSP-7 did not cause damage to blood vessels, nerves or basal lamina, witch stays intact in the periphery of the muscle cells, therefore favoring a fast and efficient regenerative process also evidenced in this work. The muscle tissue inoculated with CV or the myotoxin BnSP-7 has the capacity of regeneration of its fibers after 72 hours before the inoculation of these samples. It is possible that the venom and toxins themselves begin a vigorous regenerative process of the muscular fibers due to their chemotactic properties, recruiting macrophages and activating satellites cells (Harris, 2003). Although the morphological structure of muscle injected with BnSP-7 or CV showed in regeneration, its function was not verified in the present work. Vignaud et al. (2005) verified that some slow-twitch muscle contractile properties were not fully recovered even by 12 weeks after treatment by snake venom *Notechis scutatus scutatus*.

The satellites cells, precursory of the regenerate muscle cells, are located between the plasma membrane and the basal lamina of muscle fibers and they are surrounded by ECM components including laminins, fibronectin and type-IV collagen. These cells are very resistant to aggressions of several different natures, remaining intact to the attack, for instance of phospholipases  $A_2$ , and they are activated and enter into division during the degenerative processes (Harris, 2003). Being activated they are known to express MMPs, especially gelatinases witch target collagen-IV and laminins. An elevated level of MMPs production is thought to result in cell migration into injured areas with subsequent differentiation and

fusion of satellite cells into myofibers, characterizing the regeneration (Kherif et al., 1999, Fahime et al., 2000). Our data showed an increase in expression of MMP-9 from 72 hours to two weeks after inoculation of BnSP-7 demonstrating that MMP-9 may have a role on regeneration process, since we see regenerating muscle fibers at these same times in our histological analyses.

Kherif et al. (1999) demonstrated by *in situ* hybridization that MMP-9 mRNA is produced by inflammatory cells, predominantly polymorphonuclear leukocytes, and by putative activated satellite cells. Besides other cells usually found in histological studies of injured muscles like macrophages and mast cells are known to store and produce MMP-9 in response to different stimuli from necrotic tissue, representing one important source of this MMP.

We also observed expression of MMP-2 in our experiments. Many types of cells are able to produce MMP-2 such as skeletal muscle, endothelial and fibroblast cells (Guérin and Holland, 1995). The decrease at 3, 6 and 24 hours after stimulus by both BnSP-7 and PBS is being investigated. Both PBS and BnSP-7 expressed MMP-2 in all times tested. Kherif et al. (1999) hypothesize that a constant MMP-2 activation may intervene during muscle regeneration.

Although the expression of MMPs was evidenced during tissue degeneration and regeneration process induced by BnSP-7, the respective active or latent forms were not detected in the present study. Kherif et al. (1999) showed that skeletal muscle produce both MMP-2 and MMP-9 gelatinases as latent and/or active forms, but with differential patterns related to the time course of muscle necrosis and regeneration. The same way, Rucavado et al. (2002) found by zymography and a specific enzymatic assay that MMPs in muscle homogenates corresponded predominantly to the latent forms, therefore lacking activity.

The MMPs can also contribute to inflammatory processes regulating physical barriers, modulating inflammatory mediators such as cytokines and chemokines, and establishing chemokine gradients in inflamed tissues that regulate the movement of leukocytes at sites of infection or injury. MMPs can either promote or repress inflammation by the direct proteolytic processing of inflammatory cytokines and chemokines to activate, inactivate or antagonize chemokine function (Manicone and McGuire, 2008). Thus, our findings of increased levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 on muscle homogenate and MPAC suggest an involvement of these cytokines with MMPs and regeneration. MMP-2 and MMP-9 can activate the IL-1 $\beta$  precursor to the active form (Schonbeck et al., 1998) leading then to stimulation of macrophages essential for regenerating process, once they remove the necrotic cells allowing occupation of new myofibers. Interestingly, IL-1 $\beta$  up-regulates MMP-9 (Brenner et al., 1989). MMP-9 process IL-8 in a product that have more potent chemoattractant activities (Van den Steen et al., 2000) promoting then activation of neutrophils. In addition these cytokines also induce the expression of MMPs (Sarén et al., 1996).

Raised levels of pro-inflammatory cytokines have been detected in the serum of human victims or in experimental models following *Bothrops* envenoming (Barravieira et al., 1995; Barros et al., 1998; Cardoso et al., 2001; Clissa et al., 2001; Carneiro et al., 2002; Rucavado et al., 2002; Cruz et al., 2005; Chaves et al., 2005; Fernandes et al., 2006; Zuliani et al., 2004; Chacur et al., 2004; Zamuner et al., 2005). Our present findings showed an increase of IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  for both experimental models, MPAC and gastrocnemius muscle, induced by toxins and crude venom, although these values were higher for gastrocnemius muscle. These



cytokines are important in the regeneration processes since they activate many inflammatory cells.

The modification of BnSP-7 with BPB decreased significantly the release of all cytokines in almost all times tested for both MPAC and muscle. These results reaffirm the conclusion made by Soares et al. (2000) that the alkylation of BnSP-7 His 48 with BPB leads to a reduction of pharmacological effects, suggesting that this modification induces conformational changes in molecule regions different from the catalytic site, since Lys49 PLA<sub>2</sub> lack enzymatic activity.

We conclude that both experimental models used in this work succeed on showing the profile of pro-inflammatory cytokine release of all toxins tested. We have demonstrated that BnSP-7 induces an increase in edema, release of CK, cytokines (IL-6, IL-8, IL-1-1 $\beta$ ) and expression of MMP-2 and MMP-9. This way, this myotoxin can be acting as pro-inflammatory stimulus, inducing cytokine production and liberation from the inflammatory and satellite cells, which present important role in the inflammatory process and, consequently, in the evolution of local tissue damage and regeneration. Future studies using antibodies anti-cytokine or anti-inflammatories are of extreme importance for the understanding of inflammatory mechanisms induced by this toxin. The MMPs must also be more studied since they seem to play an important role on cell migration and regeneration process. In addition, studies of the pathogenesis of local tissue damage on envenomation can take to a better understanding of the mechanisms that lead to tissue necrosis and later regeneration, what could inspire the creation of new therapeutic methods. Thus, the understanding of the mechanism of action of snake venom toxins can reveal mechanisms of cellular and tissue injury that are common to other

pathological conditions, like degenerative diseases (Duchennes's muscular dystrophy), allowing the development of alternative therapies

## 5. Acknowledgements

The authors wish to thank Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho for technical assistance and FAPEMIG, CNPq and FAPESP of Brazil for financial suport. This work was performed as partial requirement for the MsC degree of Carolina de Freitas Oliveira at the Universidade Federal de Uberlândia.

## 6. References

Baldo, C., 2004. Lesão tecidual e inflamação induzidas pela Neuwiedase: Uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops neuwiedi pauloensis*. (manuscript in preparation).

Barravieira, B., Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, I.A., Maira, D.A., 1995. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins*. 1, 11-22.

Barros, S.F., Friedlanskaia, I., Petricevich, V.L., Kipnis, T.L., 1998. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators of Inflammation*. 7, 339-346.

Bedair, H., Liu, T.T., Kaar, J.L., Badlani, S., Russell, A.J., Li, Y., Huard, J., 2007. Matrix metalloproteinase-1 therapy improves muscle healing. *J Appl Physiol*. 102, 2338-2345.

Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. *Pharmac. Ther.* 62, 325-372.

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

Brenner, D.A., O'Hara, M., Angel, P., Chojkier, M., Karin, M. L., 1989. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Nature*. 337, 661-663.

Cardoso, D.F., Lopes-Ferreira, M., Faquim-Mauro, E., Macedo, M. S., Farsky, S.H.P., 2001. Role of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators of Inflammation*. 10, 125-133.

Carneiro, A.S., Ribeiro, O.G., Franco, M., Cabrera, W.H.K., Vorraro, F., Siqueira, M., Ibañez, O.M., Starobinas, N., 2002. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*. 40, 1571-1579.

Chacur, M., Milligan, E.D., Sloan, E.M., Wieseler-frank, J., Barrientos, R.M., Martin, D., Poole, S., Lomonte, B., Gutiérrez, J. M., Maier, S. F., Cury, Y., Watkins, L. R., 2004. Snake venom phospholipase A<sub>2</sub> (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. *Pain*. 108, 180-191.

Chaves, F., Teixeira, C.F.P., Gutiérrez, J.M., 2005. Role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon*. 45, 171-178.

Cirino, G., Peers, S.H., Wallace, J.L., Flower, R.J., 1989 A study of phospholipase A<sub>2</sub> induced oedema in rat paw. *Eur. J. Pharmacol*. 166, 505-510.

Clissa, P.B., Laing, G.D., David, R., Theakston, G., Mota, I., Taylor, M. J., Moura-Da-Silva, A.M., 2001. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon*. 39, 1567-1573.

Cruz, A.H., Mendonça, R.Z., Petricevich, V.L., 2005. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. *Mediators of Inflammation*. 6, 349-359.

Díaz, C., Valverde, L., Brenes, O., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., 2005. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *J. Cell. Biochem*. 94, 520-528.

Escalante, T., Shannon, J., Moura-Da-Silva, A.M., Gutiérrez, J.M., Fox, J.W., 2006. Novel insight into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. *Arch. Biochem. Biophys*. 455, 144-153.

Fashime, E. EL., Torrente, Y., Caron, N.J., Bresolin, M.D., Tremblay, J.P., 2000. In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp Cell Res*. 258, 279-287.

Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2006. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon*. 47, 549-559.

Gasche, Y., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Copin, J.C., Kawase, M., Massengale, J., Chan, P.H., 1999. Early appearance of activated matrix

metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J. Cerebral Blood Flow Metab.* 19, 1020-1028.

Guérin, C.W., Holland, P.C., 1995. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. *Dev. Dyn.* 202, 91-99.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Chaves, F., Moreno, E., Cerdas, L., 1986. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.* 84, 159-164.

Gutiérrez, J.M., Chaves, F., Gene, J.A., Lomonte, B., Camacho, Z., Schosinsky, K., 1989. Myonecrosis induced in mice by basic myotoxin isolated from the venom of snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon.* 277, 35-45.

Gutiérrez, J.M., Lomonte B., 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan.* 51, 211-223.

Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Díaz, C., Cintra, A.C.O., Homsí-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., 1991. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A<sub>2</sub> isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Mol. Pathol.* 55, 217-229.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., 1995. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom, *Mem. Inst. Butantan.* 33, 1405-1474.

Gutiérrez, J.M., Romero, M., Núñez, J., Chaves, F., Borkow, G., Ovadia, M., 1995. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Exp Mol Pathol.* 62, 28-41.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role the pathogenesis of local tissue damage. *Biochemie.* 82, 841-850.

Gutiérrez, J.M., Ownby, C.L., 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon.* 42, 915-931.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon.* 45(8), 997-1011.

Gutiérrez, J.M., Núñez, J., Escalante, T., Rucavado, A., 2006. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *Microvasc Res.* 71, 55-63.

Harris, J.B., 2003. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> and regeneration of skeletal muscles. *Toxicon.* 42, 933-945.

Harris, J.B., 1991. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. *Pharmacol Ther.* 31, 79-102.

Homsí-Brandeburgo, M.I., Queiroz, L.S., Santo-Neto, H., Simioni, L.R., Giglio, J.R., 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*. 26, 615-627.

Kamiguti, A.S., Gallagher, P., Marcinkiewicz, C., Theakston, R.D., Zuzel, M., 2003. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett.* 549, 129-134.

Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J.G., Verdier-Sahuqué, M., Fardeau, M., Alameddine, H.S., 1999. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: a study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev Biol.* 205, 158-170.

Kini, R.M., Evans, H.J., 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. *Toxicon*. 27, 613-635.

Kini, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of action of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Toxicon*. 24, 827-840.

Landucci, E.C.T., Castro, R.C., Pereira, M.F., Cintra, A .C.O., Giglio, J.R., Marangoni, S., Oliveira, B., Cirino, G., Antunes, E., De Nucci, G., 1998. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A<sub>2</sub> homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.* 343, 257-263.



Leib, S.L., Leppert, D., Clements, J., Tauber, M.G., 2000. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect Immun.* v. 68 p. 615-620.

Lomonte, B., Angulo, Y., Calderón, L., 2003a. Na overview of lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from croalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon.* 42, 885-901.

Lomonte, B., Angulo, Y., Santamaría, C., 2003b. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. *Toxicon.* 42, 307-312.

Manicone, A.M., McGuire, J.K., 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin Cel Devl Biol.* 19, 34-41.

Moreira, L., Borkow, G., Ovadia, M., Gutiérrez, J.M., 1994. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon.* 32, 976-87.

Nagase, H., Woessner, J.F., 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274, 21491-21494.

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

Núñez, C.E., Angulo, Y., Lomonte, B., 2001. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. *Toxicon.* 39, 1587-1594.

Oshaka, A., 1979. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. *Hand. Exp. Pharmac.* 52, 480-546.

Ownby, C.L., Nikai, T., Imai, K., Sugihara, H., 1990. Pathogenesis of haemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). *Toxicon.* 23, 837-846.

Rodrigues, R.S., Izidoro, L.F., Teixeira, S.S., Silveira, L.B., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M.I., Selistre-de-Araújo, H.S., Giglio, J.R., Fuly, A.L., Soares, A.M., Rodrigues, V.M. 2007. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon.* 50(1), 153-65.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Mancin, A.C., Fontes, M.R.M., Homsí-Brandeburgo, M.I., Giglio, J.R., 1998. Geographic variations in the composition of

myotoxins from *Bothrops neuwied* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comparative Biochemistry Physiology*. 121, 215-222.

Rodrigues, V.M., Soares, A.M., Andrião-Escarso, S.H., Franceschi, A.M., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2001. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie*. 83(6), 471-479.

Rosenberg, G.A., Navratil, M., 1997. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*. 48, 921-926.

Rucavado, A., Escalante, T., Teixeira, C.F.P., Fernandes, C.M., Díaz, C., Gutiérrez, J.M., 2002. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators of Inflammation*. 11, 121-128.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning Laboratory Manual* 2.ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sarén, P., Welgus, H.G., Kovanen, P.T., 1996. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J. Immunol.* 157, 4159-4165.

Schonbeck, U., Mach, F., Libby, P., 1998. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol.* 161, 3340-3346.

Shapiro, S.D., 1998. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 10, 602-608.

Soares, A.M., Guerr-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 A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys.* 378, 201-209.

Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Saldanha-Gama, R.F., Freitas, M.S., Barja-Fidalgo, C., Amarante-Mendes, G.P., Moura-DA-Silva, A.M., 2005. Jararhagin, a snake venom toxin, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis.* 10, 851-861.

Trengove, N.J., Stacey, M.C., Macauley, S., Bennet, N., Gibson, J., Burslem, F., Murphy, G., Schultz, G., 1999. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg.* 7, 442-452.

Van Den Steen, P.E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J., Opdenakker, G., 2000. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal

processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood*. 96, 2673-2681.

Vignaud, A., Hourdé, C., Torres, S., Caruelle, J.P., Martelly, I., Keller, A., Ferry, A., 2005. Functional, cellular and molecular aspects of skeletal muscle recovery after injury induced by snake venom from *Notechis scutatus scutatus*. *Toxicon*. 45, 789-801.

Voronov, E., Apte, R.N., Soler, S., 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation, *J. Venom. Anim. Toxins*. 5, 5-33.

You, W.K., Sco, H.J., Chung, K.H., Kim, D.S., 2003. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J. Biochem*. 134, 739-749.

Zamuner, S.R., Teixeira, C.F.P., 2002. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators of Inflammation*. 11, 351-357.

Zamuner, S.R., Zulliani, J.P., Fernandes, C.M., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2005. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*. 46, 806-813.

Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2004. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon*. 45, 335-346.

## Figure Captions

**Figure 1:** Photomicrography of fine cross cuts with 6,0  $\mu\text{m}$  of thickness of left mice gastrocnemius muscle, after 1, 3, 6, 24 and 72 hours, 1 and 2 weeks. The alterations were induced by 25 $\mu\text{g}$  of crude venom (CV) of *Bothrops pauloensis* dissolved in 50 $\mu\text{l}$  of PBS.

**A:** PBS. (200 x), **B, C, D, E, F, H:** CV  $\rightarrow$  1, 3, 6, 24 and 72 hours, respectively. (400 x), **G, H:** CV  $\rightarrow$  1 and 2 weeks, respectively. (200x)

I = Inflammatory infiltrate, H = Hemorrhage, N = Necrosis, E = Edema, CN = Central Nuclei, GT = Granulation Tissue, HE = Hematoxilin and Eosin, M = Masson.

**Figure 2:** Photomicrography of fine cross cuts with 6,0  $\mu\text{m}$  of thickness of left mice gastrocnemius muscle, after 1, 3, 6, 24 and 72 hours, 1 and 2 weeks. The alterations were induced by 50  $\mu\text{g}$  of the myotoxin BnSP-7 isolated from *Bothrops pauloensis* crude venom dissolved in 50 $\mu\text{l}$  of PBS.

**A, B, C, D, F:** BnSP-7  $\rightarrow$  1, 3, 6, 24 hours and 2 weeks, respectively. (200 x), **E, G:** BnSP-7  $\rightarrow$  72 hours and 1 week, respectively (400 x).

I = Inflammatory infiltrate, N = Necrosis, E = Edema, CN = Central Nuclei, GT = Granulation Tissue, HE = Hematoxilin and Eosin, M = Masson

**Figure 3:** Semi-quantitative expression of genes MMP-9 and MMP-2 in the gastrocnemius muscle of mice BALB/c inoculated with 25  $\mu\text{g}$  of BnSP-7. **A-** Standard electrophoretic on agarose gel 2% of fragments obtained by RT-PCR. **B-** Optical densitometry of gene MMP-9 obtained by RT-PCR. **C-** Optical densitometry of gene MMP-2 obtained by RT-PCR. \* The relative abundance of the genes was obtained by the reason among the reading of optical densitometry of genes MMP-9 or MMP-2 for the constitutive gene ( $\beta$ -actin).

**P1, P3, P6, P24, P72, P1w, P2w:** Control animals injected with 25  $\mu\text{L}$  of PBS, and sacrificed after 1, 3, 6, 24 and 72 hours, 1 and 2 weeks respectively.

**B1, B3, B6, B24, B72, B1w, B2w:** Animals injected with 25  $\mu\text{g}$  of BnSP-7, and sacrificed after 1, 3, 6, 24 and 72 hours, 1 and 2 weeks respectively.

**M:** 100-pb ladder marker

**Figure 4:** Release of cytokines by MPAC. MPAC were stimulated with 5 µg/ml of crude venom (CV), BnSP-7 or BnSP-7-BPB. After 2, 4, 6, 8 and 24 hours the supernatants were collected and stored at -20° C for subsequent measurement by ELISA: A = IL-6, B = IL-8, C = IL-1β. Treatments with PBS were used at zero time as control. The experiments were accomplished in duplicate and analyzed statistically by ANOVA followed by the test of Tukey. The symbols represents significant difference (p<0.05) between: BnSP-7 and BPB (\*), BnSP-7 and CV (#), BPB and CV (°). Results are presented by the average ± SD.

**Figure 5:** Release of cytokines by gastrocnemius skeletal muscle. Gastrocnemius muscle was injected with 10 µg/10 µL of crude venom, BnSP-7 or BnSP-7-BPB. Control animals received an injection of 10 µl PBS under identical conditions. After 2, 4, 6, 8 and 24 hours the animals were sacrificed and the muscle was extracted, processed and the supernatants were collected and stored at -20° C for subsequent measurement by ELISA: A = IL-6, B = IL-8, C = IL-1β. The experiments were accomplished in triplicate and analyzed statistically by ANOVA followed by the test of Dunnett, where the symbol \* represents a significant difference (p <0,05) among the experimental groups (BnSP-7, BPB, CV) and the group control (PBS), the symbol # represents a significant difference (p <0,05) among BnSP-7 and BPB. Results are presented by the average ± SD.



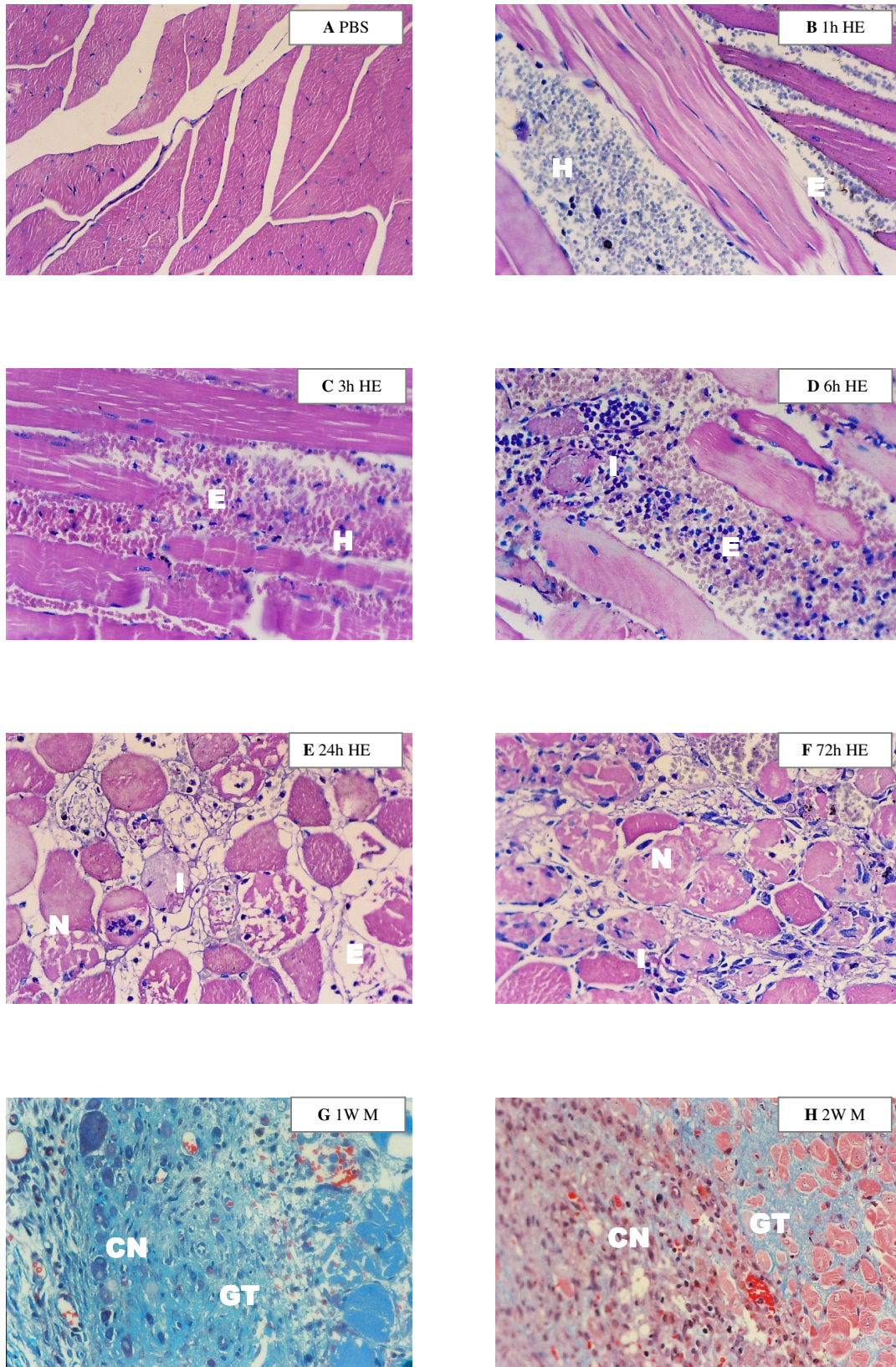


Figure 1

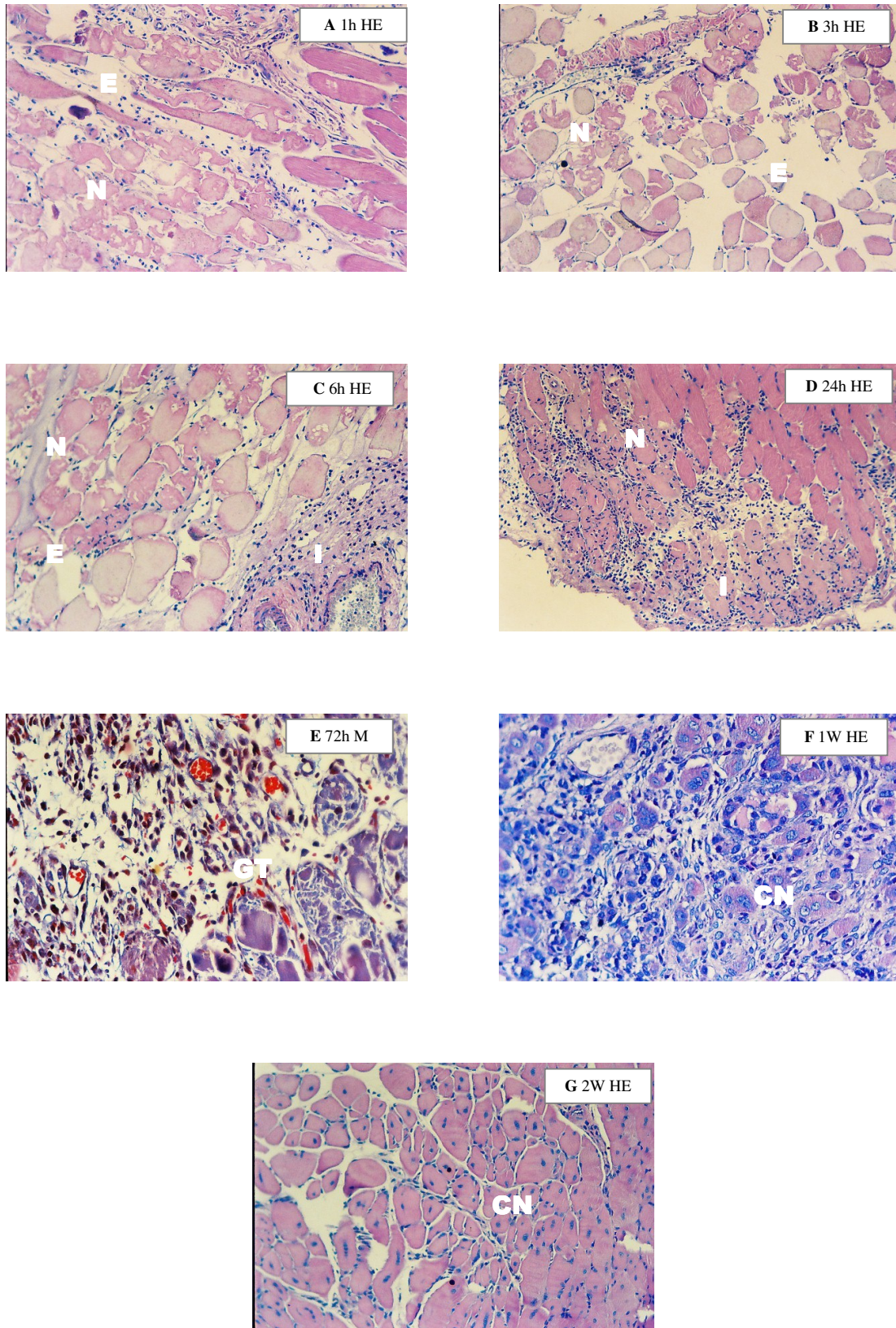
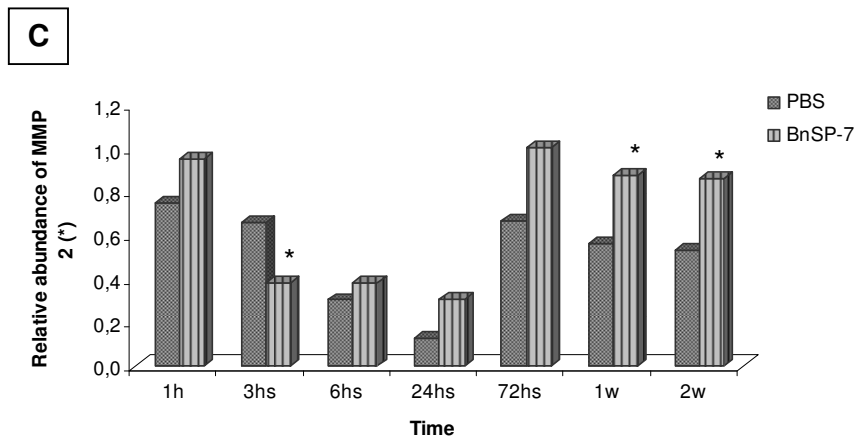
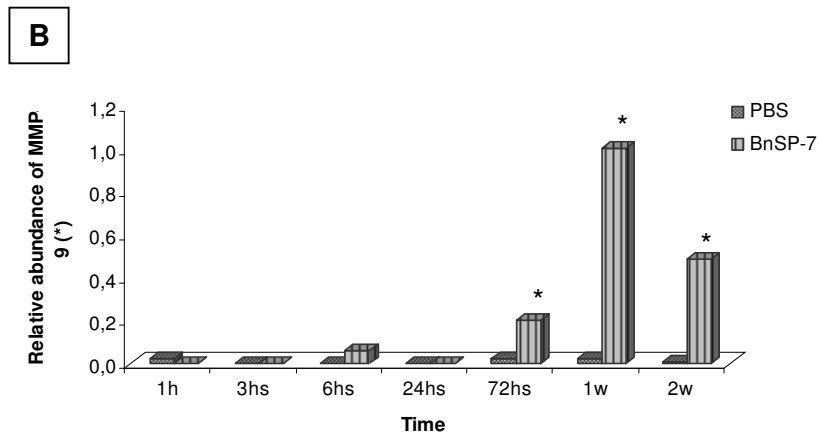
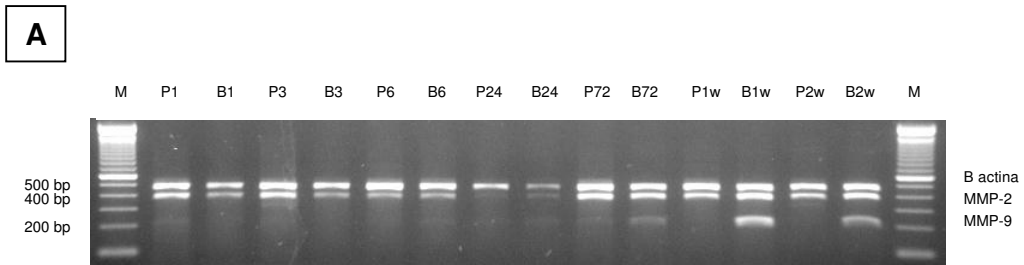


Figure 2



**Figure 3**

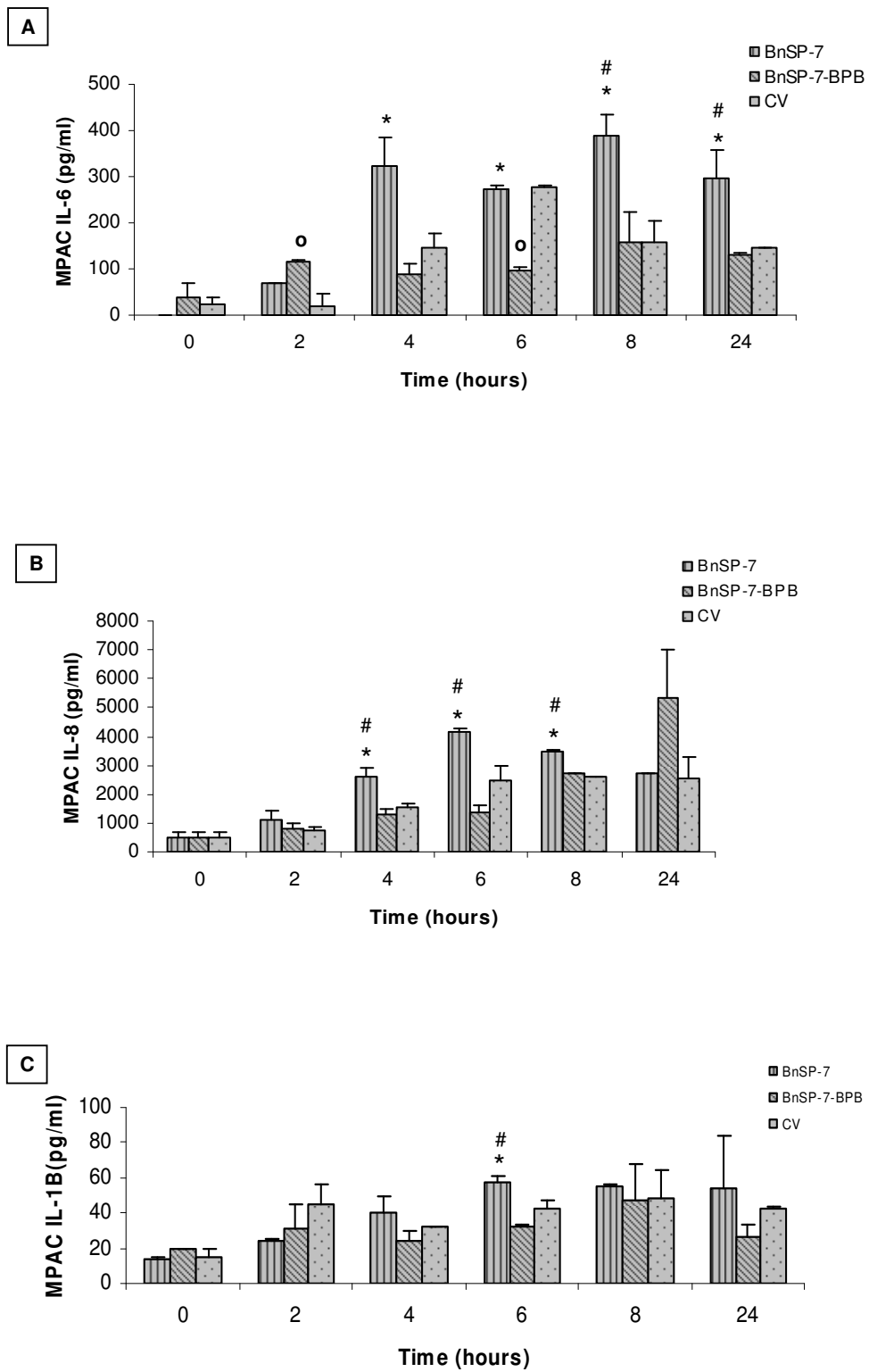


Figure 4

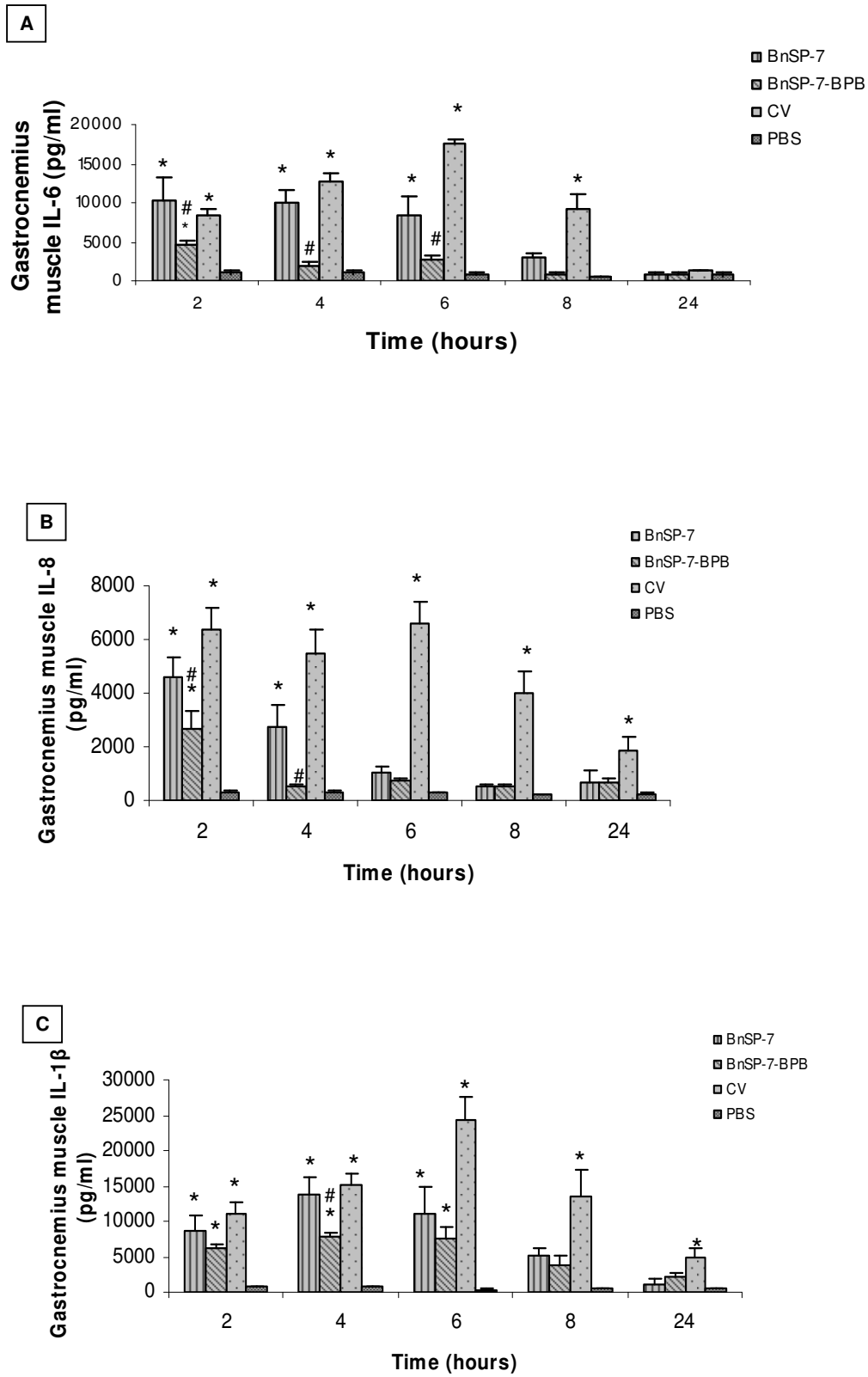


Figure 5

## Tables

**Table I:** Induction of time-dependent edema<sup>a</sup> and creatine kinase release<sup>b</sup>.

	EDEMA (%)					CK (U/mL)			
	0,5h	1h	3h	6h	24hs	1h	3h	6h	24hs*
<b>PBS</b>	2.5 ± 0.7	16.5 ± 7.8	7.0 ± 1.1	14.7 ± 5.8	5.9 ± 0.7	170 ± 11,4	32,5 ± 11,6	22,6 ± 9,3	70,2 ± 5,7
<b>BnSP-7</b>	77.1 ± 1,3	70.4 ± 8.8	66.2 ± 2.3	48.3 ± 10.2	33.1 ± 4.2	3747,3 ± 56,6	4147,5 ± 113,3	2833,3 ± 572,4	149,0 ± 73,3
<b>CV</b>	76.0 ± 3.5	79.0 ± 12.7	62.5 ± 7.8	49.0 ± 1.4	30.5 ± 1.7	361,6 ± 116,8	515,4 ± 125,9	469,5 ± 11,4	264,4 ± 68,7

**a:** After inoculation of 25µg/50µL of CV from *Bothrops pauloensis* or 50µg/50 µL of myotoxin BnSP-7 in mice paw, the increase of paw area was measured with a low pressure pachymeter (0.5, 1, 3, 6 and 24 hours) and expressed in percentage of induced edema. **b:** Mice were injected with 25 µg of CV from *Bothrops pauloensis* or 50µg of myotoxin BnSP-7 in gastrocnemius muscle, sacrificed after 1, 3, 6 and 24 hours. The activity was expressed in U/L. Animals injected with 50 µL of PBS were used as control.

The experiments were analyzed statistically by ANOVA followed by the test of Dunnett. All results represented significant difference ( $p < 0,05$ ) among the experimental groups (BnSP-7 and CV) and the group control (PBS). The results are presented by the average ± SD (n=3). \*Differences of the time 24hs were not significative.

Anexos

## Anexo I

### TOXICON

([http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/259/authorinstructions](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/259/authorinstructions))

An Interdisciplinary Journal on the Toxins Derived from Animals, Plants and Microorganisms - Official Journal of The International Society on Toxinology

### Guide for Authors

#### Manuscript Preparation

**General:** Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. All numbers should be numbered consecutively. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.



**Paper length:** Toxicon has set no standard length for papers, but the Editors insist upon a clear presentation of data in as concise a form as is consistent with good reporting. The fragmentation of a report into several short papers is discouraged.

**Abstracts:** There should be an abstract of no more than 200 words.

**Text:** Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (introduction, materials and methods, results and discussions), Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

**Units:** Units of measure must be clearly indicated.

**Symbols:** The Latin name must be given for all animal and plant species. Trade names or abbreviations of chemicals may be used only when preceded by the chemical or scientific name. Thereafter, trade names, common names or abbreviations should be used.

**Mathematical equations:** Compound numbers should be in bold face Arabic numerals or underscored.

**Conflict of interest :** Toxicon requires full disclosure of all potential conflicts of interest. All sources of funding supporting the work are to be declared. At the end of the manuscript text (and in the cover letter of the manuscript), under a subheading "Conflict of Interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest." Signed copies of the Toxicon Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded [here](#). In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript. The corresponding author is responsible for sharing this document with all co-authors. Each and every co-author must sign an individual disclosure form. The corresponding author is responsible for uploading their form and those of their co-authors.

**References:** All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Since Peterson (1993) has shown that?" or "This is in the agreement with results obtained later (Kramer, 1994)"). For three or more authors use the first author followed by "et al.", in the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

**Illustrations:** All illustrations should be provided in camera-ready form, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

**Line drawings:** Good quality printouts on white paper produced in black ink are required. All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

**Photographs:** Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable. Photographs must be kept to a minimum.

Colour: Where colour printing is required the author will be charged for colour printing at the current colour printing costs.

**Tables:** Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed

below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).