



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



**Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

Estudo da interação da metaloprotease BmooMP α -I, isolada da peçonha de
Bothrops moojeni (HOGE, 1965; Viperidae), com a citocina pró-inflamatória TNF- α .

MARAISA CRISTINA SILVA

UBERLÂNDIA – MG

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Estudo da interação da metaloprotease BmooMP α -I, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* (HOGE, 1965; Viperidae), com a citocina pró-inflamatória TNF- α .

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

MARAISA CRISTINA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO DE OLIVEIRA

CO-ORIENTADOR: PROF.DR. TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO

**UBERLÂNDIA – MG
2012**

Ao meu amor, Karlos,

Pela dedicação e paciência em todos os momentos difíceis.

Obrigada por caminhar, sonhar, lutar ao meu lado, me dar apoio,

Compreender a minha ausência,

Você sabe o quanto eu caminhei pra chegar até aqui,

Obrigada principalmente pelo seu amor incondicional.

Ainda que eu falasse a língua dos homens,

Que eu falasse a língua dos anjos

Sem amor eu nada seria...

Agradecimentos

Agradeço a **DEUS** pela vida que me foi concedida, pelas oportunidades e conquistas alcançadas.

Por me dar forças nos vários momentos difíceis e olhar pelo meu crescimento.

Aos meus pais, **ERCI e VANILDA**, vocês são a minha fonte de inspiração que ensinaram tudo de bom que aprendi em minha vida.

A você **MÃE** que me recebeu desde pequena com seu abraço caloroso e com sábias palavras me ensinou lutar pelos meus objetivos e, sempre com seu sorriso fácil e alegre me deu forças para continuar.

A você **PAI** pela proteção, carinho e principalmente por me ensinar a ter fé. Obrigada por me orientar em meu feito de lutas e incertezas, mas também de muitas esperanças e sonhos.

Aos meus irmãos, **CARLA e DOUGLAS**, com vocês que compartilho em minha vida tantos momentos bons de risadas, brincadeira, festas e, claro meus problemas.

Aos meus colegas do **LABORATÓRIO DE IMUNOPARASITOLOGIA**, pelo trabalho compartilhado, as dúvidas, o aprendizado, as brincadeiras que me fizerem sorrir. Obrigada principalmente pelo apoio nas horas difíceis, somente com ele e a amizade de vocês consegui chegar até aqui. Não citarei nomes para não cometer injustiça com ninguém todos vocês foram muito importantes pra mim e, hoje são meus amigos de coração.

Ao meu orientador, **Dr. JOSÉ ROBERTO MINEO**, por me receber como aluna, pela oportunidade de trabalho, pelo incentivo, por compreender minhas dificuldades, pelo apoio nos momentos de dúvidas. Foi ótimo caminhar ao lado da nossa equipe.

Ao meu co-orientador, **Dr. FÁBIO DE OLIVEIRA**, pelo carinho, atenção e apoio.

Ao professor, **Dr. TIAGO WILSON PATRIARCA MINEO**, pelas idéias que me socorreram no momento de sufoco, obrigada pela inestimável ajuda, que possibilitou a concretização deste trabalho.

Aos **funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia, pela colaboração na resolução dos problemas e amizade.

Apoio Financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de Minas Gerais



Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Universidade Federal de Uberlândia



Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT)



*Quando não houver saída
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída
Nenhuma idéia vale uma vida...*

*Quando não houver esperança
Quando não restar nem ilusão
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós
Algo de uma criança...*

*Enquanto houver sol
Ainda haverá
Enquanto houver sol*

*Quando não houver caminho
Mesmo sem amor, sem direção
A sós ninguém está sozinho
É caminhando
Que se faz o caminho...*

*Quando não houver desejo
Quando não restar nem mesmo dor
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós
Aonde Deus colocou...*

*Enquanto houver sol
Ainda haverá ...*

Enquanto houver sol (Titãs)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BmooMP α -I: metaloprotease da classe P-I isolada da serpente *Bothrops moojeni*.

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

IgG: anticorpos policlonais.

Fab: porção variável dos anticorpos.

Fc: porção constante dos anticorpos.

SVSPs: serinoproteases.

SVMPs: metaloproteases.

TR: trombina.

DFP: diisopropilfluorfosfato.

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoreto.

kDa : KiloDaltons.

RER: retículo endoplasmático rugoso.

ADAM: família de proteínas de mamíferos.

ADAMTS: família de proteases secretadas com motivo trombospondina tipo-1.

MMPs: metaloproteases de matrix extracelular.

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida.

PCR:

cDNA:

bp: pares de bases.

pI: ponto isoelétrico.

PRRs: receptores de reconhecimento padrão.

PAMPs: padrões moleculares associados ao patógenos.

DAMPs: padrões moleculares associados aos danos.

TLRs: receptores *Toll-like*.

TNF- α : fator de necrose tumoral – alfa.

TNFIIs: inibidores de TNF.

BMDM: macrófagos derivados de medula óssea.

AMBIC: Bicarbonato de amônio.

ng: nanogramas.

μ g: microgramas.

mg: miligramas.

mM: milimolar.

μ L: microlitros

PBS-T: tampão salina fostado-tween.

PBS-T-M: tampão salina fostado-tween suplementado com molico 1%.

DO: densidade óptica.

ELISA: Teste imunoenzimático indireto.

CBEA: Centro de Bioterismo e Experimentação Animal.

CEA: Comitê de ética em pesquisa animal.

UFU: Universidade Federal de Uberlândia.

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

1D.SDS-PAGE: Eletroforese unidimensional.

2D. SDS-PAGE: Eletroforese bidimensional.

mA :mili amperagem.

V: voltagem.

TCA: ácido tricloro acético 15 %.

BSA: soroalbumina bovina.

H_2O_2 : água oxigenada.

ABTS: 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline ácido sulfônico.

DAB: 3,3'-tetrahidrocloreto de diaminobenzidina.

TMB: tetrametilbenzidina.

nm: nanômetros.

EDTA: Ácido etilenodiaminotetrácetico.

SDS: dodecil sulfato de sódio.

pAb:anticorpos policlonais.

PBS-T-BSA: PBS-T suplementado com BSA 1%.

TCA: ácido tricloro acético.

i.p: via intraperitoneal

RPMI: meio de cultivo celular

SFB: soro fetal bovino.

LCCM: meio condicionado de células L929.

MTT: azul de tiazolil.

LPS: Lipopolissacarídeo - agonista de TLR4.

IE: agonista de NOD/1.

FSL-1: agonista de Toll-6/2.

SUMÁRIO

RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 GERAL	34
3.2 ESPECÍFICOS:.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

A inflamação é um processo essencial para manutenção da homeostase, envolvendo eventos vasculares, migração e ativação de leucócitos. No entanto, suas manifestações exacerbadas, geralmente mediadas pelo aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), podem resultar em doenças crônicas, como artrite reumatoíde, fibrose pulmonar e reações de hipersensibilidade. O presente estudo teve por objeto avaliar se a enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, apresenta algum papel na resposta inflamatória em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Foi realizado o isolamento da enzima BmooMP α -I, a partir da peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni*, utilizando colunas de cromatografia DEAE Sephadex, Sephadex G-75 e Benzamidina-Sepharose. A eletroforese bidimensional (2D) demonstrou grau de pureza, massa molecular (M_r) e ponto isoelétrico (pI) de um trímero proteíco em condições redutoras (~23,6 kDa; ~21,2 kDa e ~18,7 kDa; pI na faixa de 7,24 a 7,33) e em condições não redutoras somente um spot protéico pode ser evidenciado (~23,0 kDa; pI 6,82). Foi realizado a imunização de coelhos da raça nova Zelândia para obtenção de anticorpos policlonais da classe IgG anti-BmooMP α -I. O ensaio imunoenzimático indireto (iELISA) confirmou a presença dos anticorpos IgG policlonais anti-BmooMP α -I no soro dos animais imunizados. Suas especificidade e reatividade cruzada com os抗ígenos (enzima BmooMP α -I e peçonha bruta de *B. moojeni*) foram confirmadas por *Immunoblot* 1D. Os anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I neutralizaram a atividade azoproteolítica induzida pela peçonha bruta de *B. moojeni* e enzima pura (BmooMP α -I) em 27% e 100%, respectivamente, na razão 1:15 (m/m). Camundongos BALB/c na presença da metaloprotease BmooMP α -I exibiram uma redução na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, sugerindo um perfil de resposta anti-inflamatória. Os níveis de TNF- α determinados pelo método de ELISA foram reduzidos significativamente na presença da enzima BmooMP α -I, sugerindo que a mesma exerce uma ação proteolítica sobre o TNF- α , que foi confirmada pelo desaparecimento desta citocina dentre o perfil de bandas proteicas no SDS-PAGE. O ensaio com macrófagos ativados com agonistas de PRRs, demonstrou uma redução níveis de TNF- α secretado pelos macrófagos após o seu tratamento com a enzima BmooMP α -I. Em conclusão, a enzima BmooMP α -I apresenta um perfil antiinflamatório de reposta imunológica, resultante da sua ação direta sobre a citocina pró-inflamatória TNF- α .

Palavras-chaves: *Bothrops moojeni*, BmooMP α -I, TNF- α , anticorpos policlonais, macrófagos derivados de médula óssea (BMDMs).

ABSTRACT

Inflammation is an essential process for maintaining homeostasis, involving vascular events, migration and activation of leukocytes. However, its manifestations exacerbated, usually mediated by increased levels of TNF- α , can result in chronic diseases such as rheumatoid arthritis, pulmonary fibrosis and hypersensitivity reactions. The present study aimed to assess whether the enzyme BmooMP α -I, a metalloprotease isolated from the venom of *Bothrops moojeni*, could play any role in the inflammatory response in experimental models *in vitro* and *in vivo*. We carried out the isolation of the enzyme BmooMP α -I from crude venom of the *Bothrops moojeni*, using DEAE Sephadex column chromatography, Sephadex G-75 and Benzamidine-Sepharose. The 2D electrophoresis showed purity, molecular mass (Mr) and isoelectric point (pI) of a proteic trimer under reducing conditions (~23.6 kDa, ~ 21.2 kDa and ~18.7 kDa, pI in the range of 7.24-7.33) and nonreducing conditions only one spot protein can be demonstrated (~23.0 kDa; pI 6.82). Immunization was performed in New Zealand rabbits to obtain polyclonal IgG anti-BmooMP α -I, enzyme immune assay (iELISA) confirmed the presence of polyclonal IgG anti-BmooMP α -I in serum of immunized rabbits. Their specificity and cross reactivity with antigens (enzyme BmooMP α -I and crude venom of *B. moojeni*) was confirmed by immunoblot 1D. The polyclonal antibody anti-BmooMP α -I neutralized azoproteolytic activity induced by crude venom of *B. moojeni* and pure enzyme (BmooMP α -I) in the 27% and 100%, respectively, in 1:15 (w/w) ratios. BALB/c mice in the presence of the metalloproteinase BmooMP α -I exhibited a reduction in leukocyte migration into the peritoneal cavity, suggesting a profile of anti-inflammatory response. The levels of TNF- α determined by ELISA were significantly reduced in the presence of the enzyme BmooMP α -I, suggesting that it exerts a proteolytic role on TNF- α , which was confirmed by the disappearance of the its bands on SDS-PAGE profile. Further, experiments done with activated macrophages PRRs agonists demonstrated a reduction of TNF- α secreted by macrophages after treatment with the enzyme BmooMP α -I. In conclusion, the enzyme BmooMP α -I presents a profile of anti-inflammatory immune response, resulting from direct action on the pro-inflammatory cytokine TNF- α .

Keywords: *Bothrops moojeni*, BmooMP α -I, TNF- α , polyclonal antibodies, bone marrow-derived macrophages (BMDMs).

1. INTRODUÇÃO

Maraisa Cristina Silva

1.1 Serpentes

As serpentes são animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, classe Reptilia, ordem Squamata, sub-ordem Serpentes. Elas constituem o segundo grupo mais diversificado dos répteis, com aproximadamente 2700 espécies (POUGH *et al.*, 1999). No Brasil, já foram catalogadas 371 espécies de serpentes, agrupadas nas seguintes famílias: Anomalepididae (representada por 7 espécies), Leptotyphlopidae (14 espécies), Typhlopidae (6 espécies), Aniliidae (1 espécie), Tropidophiidae (1 espécie), Boidae (12 espécies), Colubridae (34 espécies), Dipsadidae (241 espécies), Elapidae (27 espécies) e Viperidae (28 espécies) (BÉRNILS, 2010).

Elas podem ser classificadas em dois grandes grupos básicos: as peçonhentas (inoculadoras de peçonha) e as não peçonhentas, ambas encontradas no Brasil (Cardoso *et al.*, 2003). Entre as serpentes peçonhentas temos duas famílias: Elapidae e Viperidae (SILVA, JORGE, RIBEIRO, 2003).

A família Elapidae encontra-se amplamente distribuída pelo mundo, com aproximadamente 250 espécies. Os elapídeos têm espécies famosas, como as “najas” asiáticas e africanas, e as temidas “mambas” do continente africano. Nas Américas, a família está representada pelas “cobras corais”, das quais, são reconhecidas 22 espécies na fauna brasileira, a maioria pertencendo ao gênero *Micrurus*, com aproximadamente 18 espécies distribuídas por todo o Brasil.

São animais de pequeno porte, com tamanho de até 1 metro. São caracterizadas visualmente por apresentarem anéis vermelhos, pretos e brancos. Essas serpentes são bem menos agressivas, têm habitat subterrâneo, apresentam presa inoculadora pequena e não têm a mesma possibilidade de abertura da boca que outras serpentes. As corais verdadeiras possuem presas inoculadoras de peçonha (CARDOSO *et al.*, 2003). Raramente causam acidentes e quando o fazem, geralmente picam os dedos da mão de indivíduos que as manipulam (FUNASA, 1998).

A família Viperidae apresenta cerca de 250 espécies distribuídas pelo mundo e 28 espécies distribuídas pelo Brasil. Abrange os gêneros *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Caudisona*, *Lachesis* e *Rhinocerophis* (BÉRNILS, 2010), sendo facilmente identificadas pela cabeça triangular, recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo, além da presença de fosseta loreal entre o olho e a narina (FUNASA, 2001). Os principais representantes desta família são as jararacas, surucucus e cascavéis (Figura 1)

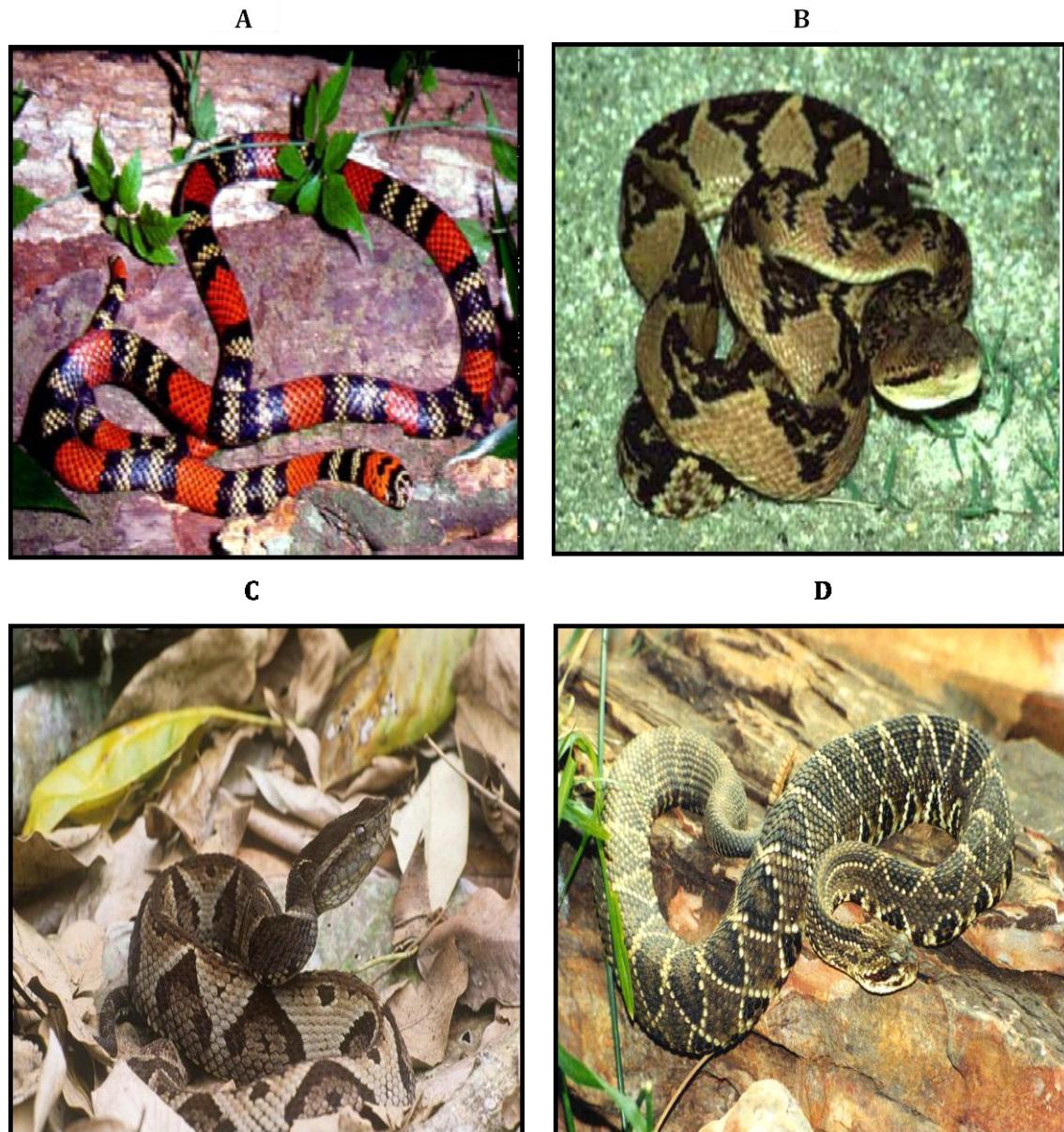


Figura 1: **A)** Exemplar da espécie *Micrurus frontalis* conhecida popularmente como “cobra coral”, serpente brasileira da família Elapidae. **B)** Exemplar da espécie *Lachesis muta*. **C)** Exemplar da espécie *Bothrops pirajai* e **D)** Exemplar da espécie *Crotalus durissus*. Serpentes brasileiras da família Viperidae. Fonte: <<http://www.fororeptiles.org/fotos>>.

1.2 *Bothrops moojeni*

A espécie *Bothrops moojeni* (Figura 2) é um representante da família Viperidae descrito por Hoge (1965), conhecida popularmente como caiçaca, apresenta uma distribuição geográfica restrita às áreas de formação aberta, estendendo-se do Brasil central até o sul do Estado do Paraná (HOGE, ROMANO, 1972; CAMPBELL, LAMAR, 1989).

B. moojeni possui tamanho médio, longevidade média de 15 anos, é encontrada em áreas ripárias, incluindo a borda e o interior da mata de galerias e brejos. É ativa praticamente ao longo de todos os meses do ano, principalmente durante a noite. Alimenta-se de pequenos mamíferos, aves, lagartos, serpentes e anfíbios. Para capturar suas diferentes presas dispõem de uma armadilha eficiente: abanam a ponta da cauda que, como se fosse uma isca, acaba atraindo as presas que rapidamente são mortos (SAWAYA *et al.*, 2008). È uma espécie vivípara, com dimorfismo sexual, a fêmea apresenta a cauda mais curta que a do macho e uma reprodução sazonal (NOGUEIRA *et al.*, 2003).

Esta serpente é responsável pela maioria dos acidentes botrópicos na cidade de Uberlândia e região, segundo dados do Departamento de clínica Médica do Hospital das Clínicas da cidade de Uberlândia, dos 90 acidentes ofídicos registrados no período de 1993 a 1995, 68 (75%) foram causados pelo gênero *Bothrops* (SILVA *et al.*, 2003).



Figura 2: Exemplar da espécie *Bothrops moojeni*. Fonte: Guia Ilustrado de Animais do Cerrado de Minas Gerais. CEMIG. 2.º edição Editora: Editare 2003.

1.3 Os acidentes ofídicos

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas representam significativo problema de Saúde Pública, especialmente em países tropicais, pela freqüência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam (PINHO, PEREIRA, 2001). Em geral, sua ocorrência está relacionada a fatores climáticos e aumento da atividade humana no campo, seja profissional ou a lazer (FUNASA, 2001).

A peçonha é inoculada via subcutânea através das presas da serpente. Os componentes da peçonha geralmente atingem a circulação pelos vasos linfáticos, embora as moléculas de baixa massa molecular possam ser absorvidas diretamente nos capilares. Os efeitos do envenenamento por serpentes são muito variáveis e dependentes de vários fatores como tipo, saúde e tamanho da serpente, além da quantidade injetada e condições biológicas da vítima (TAVASSI *et al.*, 2008).

Segundo o Ministério da Saúde no Brasil foram registrados, em 2010, 29.635 acidentes por serpentes, dentre os quais 85% foram ocasionados por serpentes peçonhentas, 4% por não-peçonhentas e 11% por serpentes não identificadas. A incidência registrada foi de 15,5 acidentes/100.000 habitantes e, a taxa de letalidade foi de 0,5%. A região Norte (9.191) é onde há a maior ocorrência de acidentes ofídicos, seguida pelas regiões Nordeste (8.238) e Sudeste (6.343). A maior parte dos acidentes ocorre nos meses mais quentes e chuvosos, janeiro a maio. O sexo mais acometido é o masculino, com 77% das notificações e a faixa etária é entre 20 e 49 anos (51,3%). Mais de 80,3% dos acidentes ocorreram na zona rural. Mais de dois terços dos acidentes ofídicos ocorrem nos pés e pernas (19.964). A serpente com maior letalidade é a cascavel, com taxa de 1,1%. Os acidentes botrópicos foram os de maior incidência, com 72,5% do total de casos notificados ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação).

Os acidentes provocados por serpentes botrópicas caracterizam-se por efeitos locais e sistêmicos. Os efeitos sistêmicos mais comuns são: a indução do estado de choque principal causa de morte, distúrbios na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrointestinais, náuseas, vômitos e hematúria (RUSSELL *et al.*, 1979). Ainda, em nível sistêmico, são observadas sudorese, hipotensão arterial e hipotermia (CARDOSO *et al.*, 1993).

Quanto ao efeito local destacam-se dor, edema, hemorragia local e necrose tecidual aparecendo logo depois da inoculação da peçonha (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

O procedimento terapêutico utilizado no tratamento de acidentes ofídicos é a soroterapia. O soro antiofídico é uma mistura de imunoglobulinas ou anticorpos resultantes da sensibilização de animais (geralmente cavalos) por aplicações sucessivas de doses da peçonha bruta acrescidas de substâncias adjuvantes que aumentam seu potencial antigênico (FUNASA, 2001). Após a obtenção do anticorpo (IgG) puro a partir do plasma animal é feita a clivagem da molécula IgG com a enzima pepsina obtendo-se então a fração F(ab) 2 dando origem ao soro-hiperimune (LALLO, THEAKSTON, 2003). A fração Fab é o fragmento do anticorpo que se liga aos抗ígenos, enquanto que a região Fc promove as funções de fixação do complemento e ligação de monócitos (ABBAS, LICHTMAN, 2003).

O soro antibotrópico é obtido através da imunização de cavalos com uma mistura da peçonha das serpentes *Bothrops jararaca* (50%), *Bothrops jararacussu* (12,5%), *Bothrops moojeni* (12,5%), *Bothrops neuwiedi* (12,5%) e *Bothrops alternatus* (12,5%). Essa mistura de peçonhas revela-se como bons imunógenos capazes de produzir anticorpos que neutralizam a atividade letal de outras peçonhas botrópicas (CARDOSO *et al*, 2003).

A administração, geralmente, é realizada por infusão intravenosa lenta (LALOO, 2005). A literatura demonstra que pacientes submetidos à soroterapia tiveram um retorno dos níveis hemostáticos 6 horas após sua administração. No entanto, a lesão local causada por estes peçonhas, não é neutralizada eficientemente pelo soro (CARDOSO *et al*, 1993). Dessa forma, estudos visando uma melhoria na eficácia desse soro têm se intensificado, nos últimos anos.

1.4 As peçonhas ofídicas

Nas serpentes, a peçonha é uma adaptação evolutiva para imobilização, morte e digestão das presas, secundariamente usado para defesa, são produzidas em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar grande quantidade de substâncias biologicamente ativas (TAKEDA, TAKEYA, IWANAGA, 2012).

As peçonhas de serpentes consistem de uma complexa mistura de proteínas e peptídeos (90-95% de seu peso seco) tóxicos e não tóxicos, que podem apresentar função enzimática ou não (SCHMIDT *et al.*, 1976). A porção não protéica é representada por íons metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas e em menor proporção, lipídeos e aminoácidos livres (CHIPPAUX *et al.*, 1991). A composição quantitativa e qualitativa da peçonha pode variar de acordo com fatores como: espécie, idade, estação do ano, e dieta (FUNASA, 2001).

A família Viperidae possui dentição do tipo solenóglifa, ou seja, o par de dentes para inoculação de peçonha dos indivíduos é longo, dianteiro e curvado para trás, se movimentando para frente no momento do bote (Figura 3) (FUNASA, 2001).

A complexa lesão causada pela peçonha da família Viperidae deve-se à somatória dos efeitos isolados dos diferentes componentes, com ações biológicas distintas ou com ação sinérgica (OLIVEIRA *et al.*, 1999).

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas) atua de formas diferentes ao penetrar no organismo animal podendo causar a ação proteolítica, a coagulante e a hemorrágica (ARCOLINI, 2006).

A ação proteolítica, possivelmente, decorre da atividade de proteases, hialuronidases e fosfolipases (FUNASA, 2001). A ação coagulante ocorre através do consumo do fibrinogênio (fator da coagulação do sangue), havendo deposição de microcoágulos principalmente nos pulmões e rim (FUNASA, 2001). As manifestações hemorrágicas são decorrentes da ação das “hemorraginas”, que provocam lesões na membrana basal dos capilares levando ao extravasamento de sangue pelos capilares sanguíneos (AZEVEDO-MARQUES, CUPO, HERING, 2003).

A peçonha de serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis) é muito potente (seis vezes mais potente que o da jararaca) tendo ação miotóxica, neurotóxica e anticoagulante (FUNASA, 2001).

A atividade miotóxica, devido à crotoxina, produz lesões no tecido muscular esquelético levando à liberação de mioglobina para o sangue e mioglobinúria (TOKARNIA, PEIXOTO,

2006). As frações neurotóxicas produzem efeitos no sistema nervoso inibindo a liberação de acetilcolina causando as paralisias motoras (FUNASA, 2001). A ação anticoagulante é derivada da fração da peçonha do tipo “*trombin-like*”, o sangue torna-se incoagulável pelo consumo do fibrinogênio (ETTINGER, FELDMAN, 1997).

A peçonha de serpentes do gênero *Lachesis* (surucucu e surucutinga) possui ações proteolítica (necrosante), coagulante, hemorrágica e neurotóxica. As enzimas proteolíticas podem induzir a liberação de substâncias vasoativas, tais como bradicinina e histamina, que podem levar ao choque. A ação neurotóxica é de difícil interpretação fisiopatológica. A atividade hemolítica se expressa sob a forma de hemoglobinúria (TOKARNIA, PEIXOTO, 2006).

A peçonha de serpentes do gênero *Micrurus* (corais), apresenta um efeito do tipo neurotóxico, com os sintomas parecidos com os da cascavel, com a diferença de também atacar o aparelho respiratório, causando a parada do diafragma, levando à morte por asfixia (ETTINGER, FELDMAN, 1997).

Estas biomoléculas são paradoxais, pois possuem uma natureza maléfica e terapêutica. Um mesmo complexo enzimático pode provocar alterações na homeostase e em determinadas situações levar ao óbito, bem como prevenir, tratar e até curar distúrbios dos sistemas de coagulação e fibrinólise, hipertensão arterial, câncer, antimicrobianos, imunossupressores entre outras atividades.

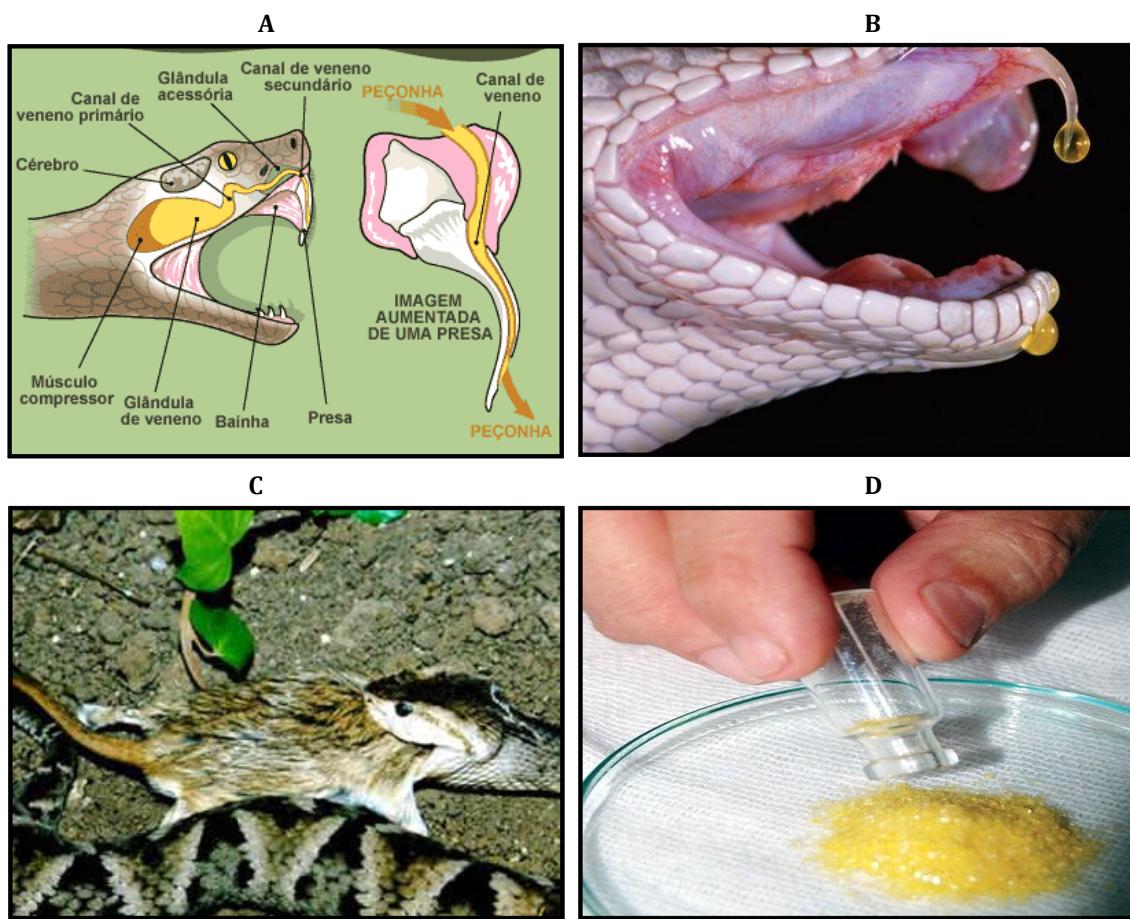


Figura 3: A) Aparato da peçonha de serpente. Em destaque as principais estruturas envolvidas no processo de produção e inoculação da peçonha. B) Dentes inoculadores de peçonha da família Viperidae. C) Serpente engolindo a presa após inoculação da peçonha. D) Peçonha bruta liofilizada após extração, disponível comercialmente. Fonte: <<http://www.brasilescola.com/upload/e/ofidismo>>

1.5 As proteases de serpentes

As proteases são presentes na peçonha de várias serpentes. São classificadas estruturalmente como serinoproteases (SVSPs) e metaloproteases (SVMPs). A peçonha da maioria das serpentes contém pelos menos 30% de SVMPs (TAKEDA, TAKEYA, IWANAGA, 2012). No gênero *Bothrops*, particularmente, a peçonha é composta por pelo menos 50% de metaloproteases, sugerindo um papel significativo no envenenamento e sua patogênese (FOX *et al.*, 2006).

As serinoproteases (SVSPs) são enzimas com atividade tipo trombina (“trombin-like”). Estas enzimas causam paradoxalmente, coagulação sanguínea *in vitro* e incoagulabilidade *in vivo* por depletar o fibrinogênio circulante, competindo com a trombina (TR) pela hidrólise do fibrinogênio (KAMIGUTI, SANO-MARTINS, 1995). Tais enzimas possuem um resíduo de serina altamente reativo, o qual exerce um papel crítico na catálise. Inibidores dessas proteases como diisopropilfluorofosfato (DFP) e o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) reagem com a serina do sítio ativo, inativando irreversivelmente essas proteases (MARKLAND, 1998).

As metaloproteases (SVMPs) são endopeptidases dependentes de zinco, com tamanho variando de 20 a 100 kDa. Elas são sintetizadas no citoplasma das células secretoras na glândula de peçonha, transferidas para o retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi e finalmente transportada via grânulos de secreção para o lúmen da glândula (WARSHAWSKY *et al.*, 1973). As SVMPs são secretadas em uma forma latente que requer ativação para desenvolver atividade proteolítica (MATRISIAN, 1990). Agentes quelantes como o EDTA e 1,10 fenantrolina podem inibí-las, eliminando completamente sua atividade (BJARNASON, FOX, 1989).

As SVMPs podem ser agrupadas em quatro classes P-I á P-IV, baseado na organização do domínio estrutural e massa molecular. As proteínas da classe P-I possuem um domínio metaloprotease (Domínio M) caracterizado por uma seqüência de resíduos de aminoácidos conservados (HEXXHXXXGXXH). O domínio M é responsável por sua ação enzimática e apresenta massas moleculares baixas, de 25 kDa, e geralmente com baixa, ou nenhuma atividade hemorrágica. As proteínas da classe P-II consiste de domínio catalítico de tamanho médio e domínio “desintegrin-like” de 10 kDa. As proteínas da classe P-III, conhecidas como potentes hemorraginas de cerca de 55 kDa, apresentam um terceiro domínio rico em cisteína em torno de 14 kDa. As proteínas da classe P-IV, são representadas por proteínas de massa molecular de 95 kDa e baixa atividade hemorrágica, possui em adição aos domínios da classe P-

III, uma ponte dissulfeto ligando um polissacarídeo tipo lectina de 15 kDa (BELLO *et al.*, 2006). O domínio 'lectin-like' é reconhecido por receptores de adesão plaquetária e glicoproteínas de matriz e do plasma (WIJEYEWICKREMA *et al.*, 2005).

Em 2008, Fox e Serrano modificaram a classificação anterior baseados na presença ou ausência de domínios não proteinase observados nos transcritos de mRNA. Classificaram como PIIa enzimas da classe PII que liberam o domínio semelhante à desintegrina em seu estado nativo, a PIIb para enzimas que não liberam o domínio semelhante à desintegrina, PIIc para enzimas PII diméricas, PIId e PIIe metaloproteases que possuem o domínio desintegrina sem ter o domínio metaloprotease, a PIIIa para enzimas PIII que têm domínios semelhantes à desintegrina ricos em cisteína, PIIIb para enzimas que liberam seus domínios semelhantes à desintegrina e ricos em cisteína, PIIIc para SVMPs da classe PIII cujas estruturas se organizam na forma de dímeros e PIId que contém o domínio semelhante a lectina.

SVMPs possuem uma relação filogenética mais próxima com família de proteínas de mamíferos (ADAM-desintegrinas e metaloproteases) e sua subclasse ADAMTS (família de proteases secretadas com motivo trombospondina tipo-1), em conjunto formam a família ADAM/adamalisina/reprolisina ou grupo M12B de zinco metaloproteases (MEROPS classification, <http://merops.sanger.ac.uk/>) (TAKEDA, TAKEYA, IWANAGA, 2012) (Figura 4).

A família de proteínas ADAM pertence à classe de glicoproteínas, ancoradas a membrana e suas principais funções são adesão célula-célula e/ou célula-matriz e sinalização celular (TAKEDA, TAKEYA, IWANAGA, 2012). ADAMTS são expressas em uma ampla variedade de espécies desde os humanos até os vermes. Suas funções incluem processamento de colágeno, degradação de proteoglicanos presente nas articulações, angiogênese e hemostasia (APTE, 2009).

Além das ADAMs/ADAMTSs e SVMPs, tem sido também descritas as MMPs (metaloproteases de matrix extracelular), que possuem um sitio catalítico similar às demais e podem apresentar-se ancoradas na superfície da célula ou secretadas na forma de zimogênio (BODE *et al.*, 1993; RA, PARKS, 2007). O conjunto destas metaloproteases compreende um amplo grupo de proteínas pertencentes à superfamília metzincina (grupo M10A) (MEROPS classification, <http://merops.sanger.ac.uk/>), que têm em comum um domínio de ligação de zinco com estruturas muito semelhantes entre si (WANG *et al.*, 2005). O sítio ligante de zinco da família metzincina tem uma seqüência de aminoácidos conservada (HEBXHXBGBXH) onde H é histidina, E é ácido glutâmico, G é glicina, B é um resíduo hidrofóbico e X é um aminoácido qualquer (TAKEDA, TAKEYA, IWANAGA, 2012).

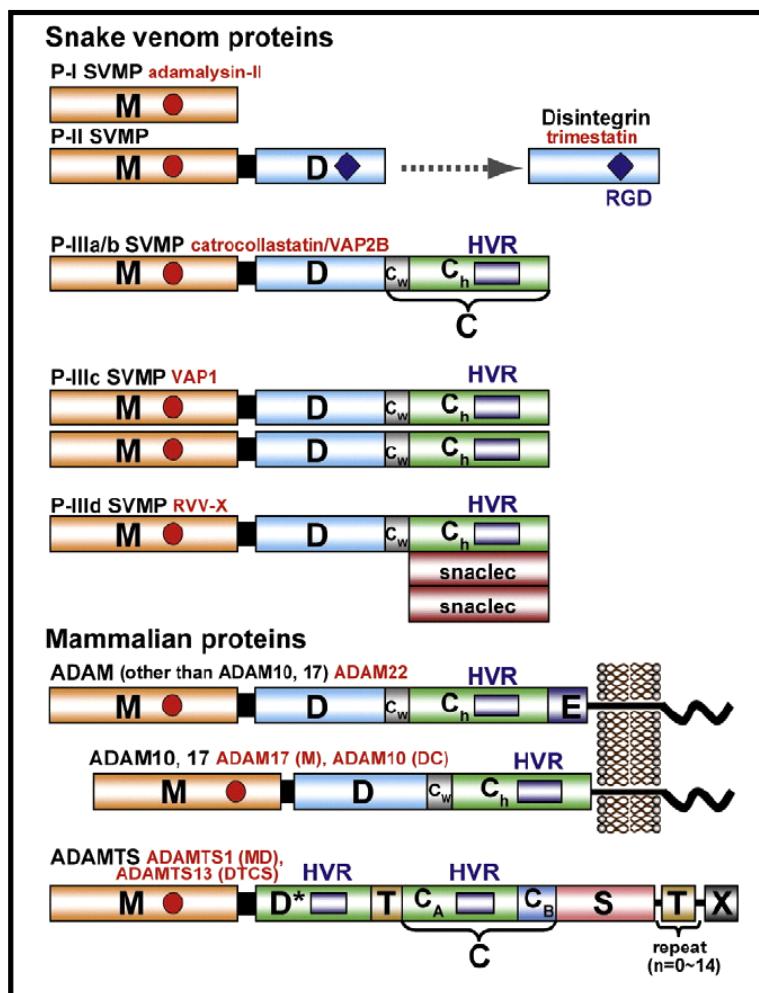


Figura 4: Diagrama esquemático da estrutura dos domínios das SVMPs e moléculas relacionadas. Cada domínio ou subdomínio é representado por diferentes cores. M, metaloprotease; D, domínio desintegrina; C domínio rico em cisteína; Cw, subdomínio dobrado rico em cisteína; snaclec, domínio 'lectin-like' da peçonha de serpente; E, domínio "(EGF)-like" ligante do fator de crescimento epidermal; T, motivo trombospondina tipo-1 (TSP); S, domínio de espaço; X, domínio variável entre as ADAMTSs. Exemplos de cada uma das classes das SVMPs e ADAMs/ADAMTSs, as quais a estrutura cristalina foi determinada, são indicadas pelas letras vermelhas. A classe P-III das SVMPs são divididas em subclasses (IIIa-IIIId) baseado em suas distintas modificações pós-transducionais. Na família ADAMTS, D*, domínio 'lectin-like'; C, domínio rico em cisteína é subdividido no N-terminal no subdomínio C_h (CA) e domínio C-terminal (C_B). A família ADAMTS também possui em seu N-terminal os domínios M, D, T, C, S, e outros domínios variáveis na região C-terminal. Fonte: TAKEDA, TAKEYA, IWANAGA, 2012.

As SVMPs podem exercer diferentes atividades biológicas. Elas podem estar associadas com hemorragia ou a quebra do sistema hemostático, que são mediadas pela atividade proteolítica do domínio M. SVMPs causam hemorragia por distúrbio na interação entre as células endoteliais e membrana basal, devido à degradação de proteínas de membrana de células do endotélio como integrinas, cadelinas (proteínas de adesão dependentes de cálcio) e componentes da membrana basal como fibronectina, lâminina, nidogênio, colágeno tipo IV (FOX, SERRANO, 2008).

A atividade hemorrágica das SVMPs está entre os fatores de maior letalidade nos acidentes ofídicos. Algumas SVMPs não possuem atividade hemorrágica, mas atuam em diferentes mecanismos de quebra da hemostase com efeito pro ou anticoagulante como, por exemplo, fibrinogenases, fibrolases, ativadoras da atividade pró-trombina, inibidores da agregação plaquetária, apoptóticas ou com atividades pró-inflamatórias (FOX, SERRANO, 2008).

1.6 BmooMP α -I

BmooMP α -I é uma protease isolada da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e caracterizada em estudos anteriores por Bernardes e colaboradores (2008) e Akao e colaboradores (2010).

Bernardes e colaboradores (2008) isolaram a protease por passos cromatográficos seqüenciais em resina de troca iônica (DEAE-Sephacel), gel filtração (Sephadex-G75) e afinidade (Heparina-agarose). A protease BmooMP α -I corresponde a 8,71% da peçonha de *B. moojeni*. A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 14% demonstrou uma massa molecular em torno de 24,5 KDa. O produto da reação com a transcriptase reversa, após a amplificação por PCR, produz um fragmento de cDNA de 615 bp que codificam para a proteína madura contendo 205 resíduos de aminoácidos com massa molecular relativa de aproximadamente 23,279 e pI teórico de 6,3.

A seqüência dos resíduos de aminoácidos que compõe a proteína madura, BmooMP α -I, foi determinada pelo seqüenciamento automático dos peptídeos produzidos pela digestão da proteína com tripsina e a leitura da seqüência foi realizada no espectrômetro de massa (Q. TOF MicroTM) (Figura 5).

```

gaacaacaaaaattctccccaaagatacattgagctcgtagtagttgcagatcacgggatg
E Q Q K F S P R Y I E L V V V A D H G M
ttcaagaaaatacacaacagcaatttaataactataagaaaaatgggtacatgaaatggtcaac
F K K Y N S N L N T I R K W V H E M V N
agtatgaatgggttttacagatctgttagatgtgactgcttcactggctaacctagaagtt
S M N G F Y R S V D V T A S L A N L E V
tggtccaagaaaagatttgtatcaacgtgcagaaaagattcaagagaaaactttaagtcattt
W S K K D L I N V Q K D S R E T L K S F
ggagaatggagagagagatggctgcctcgcatatgtcatgataatgctcagttactc
G E W R E R D L L P R I S H D N A Q L L
acggccatagtcttcgtatggccatactataggaaagagcttacactggcggcatgtgcgac
T A I V F D G H T I G R A Y T G G M C D
ccgaggcattctgttaggatgttatggatcatatgtccaaaaatcttcaggttgcagtt
P R H S V G V V M D H S P K N L Q V A V
acaatggccatgagctgggtcataatctggcatcatcatatggaaatcagtgtcat
T M A H E L G H N L G M H H D G N Q C H
tgcgatgtgttcatgcataatggctgatagtctaaagcgttagtacttctatgagtc
C D A A S C I M A D S I S V V L S Y E F
agcgtttagtgcagaatcaatatcagacgtatcttactaaggataaccacaatgcatt
S D C S Q N Q Y Q T Y I T K H N P Q C I
ctcaacgagcccttg
L N E P L

```

Figura 5: Seqüência de cDNA e resíduos de aminoácidos deduzidos a partir da protease BmooMP α -I. Os resíduos de aminoácidos da seqüência linear da proteína estão sublinhados. Fonte: BERNARDES *et al.*, 2008.

O alinhamento da protease BmooMP α -I com outras metaloproteases da peçonha de serpentes mostrou que a enzima possui uma similaridade de 70-92% com proteínas isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*, *Agkistrodon*, *Crotalus* e *Lachesis* (BERNARDES *et al.*, 2008).

A protease BmooMP α -I exibe atividade fibrinog(eno)lítica, quando incubada com o fibrinogênio, cliva a cadeia A- α e em seguida a cadeia B- β e não demonstra nenhum efeito sobre a cadeia γ . Este padrão de hidrólise classifica-a como uma α -fibrinogenase. Na fibrina, a enzima hidrolisa somente a cadeia β . Também exerce um efeito proteolítico sobre a azocaseína.

Na presença de EDTA, a enzima BmooMP α -I, tem seu atividade fibrinog(eno)lítica inibida sugerindo que a mesma pertence a classe das metaloproteases.

Quando administrada via i.p (intraperitoneal) em camundongos, a enzima causa um ação anticoagulante sobre o sangue devido a depleção de fibrinogênio circulante, no entanto é desprovida das atividades hemorrágica e “*trombin-like*”, sugerindo seu amplo potencial como agente terapêutico para o tratamento e prevenção de tromboses arteriais.

Akao e colaboradores (2010) isolaram e determinaram a estrutura cristalina da metaloprotease BmooMP α -I. A estrutura foi determinada sobre um ângulo de resolução de 1,76 Å. O modelo final consiste de 200 resíduos de aminoácidos, 151 moléculas solventes (água) e um íon zinco e um íon cálcio.

A estrutura geral da enzima BmooMP α -I, conserva todas as características das metaloproteases(SVMPs) de classe P-I, é formada por 5 elementos de folha β , 4 longas α -hélices e um curto segmento N-terminal em α -hélice estabilizada por três pontes dissulfeto (Cys117-Cys197, Cys157-Cys181 e Cys159-Cys164) localizados na região C-terminal. Na estrutura oblato elipsoidal, a folha β é curva e dobrada entre as hélices α 2 e α 4 no sítio côncavo e a hélice α 3 no sítio convexo (Figura 6).

O sítio catalítico é localizado na interface do domínio superior (acima do resíduo N-terminal 150) e domínio inferior (abaixo do resíduo C-terminal 50, como é comumente observado em outras metzincinas como a adamalisina-II (GOMIS-RU *et al.*, 1994), H2-proteinase (KUMASAKA *et al.*, 1996) e acutolisina A (GONG *et al.*, 1998).

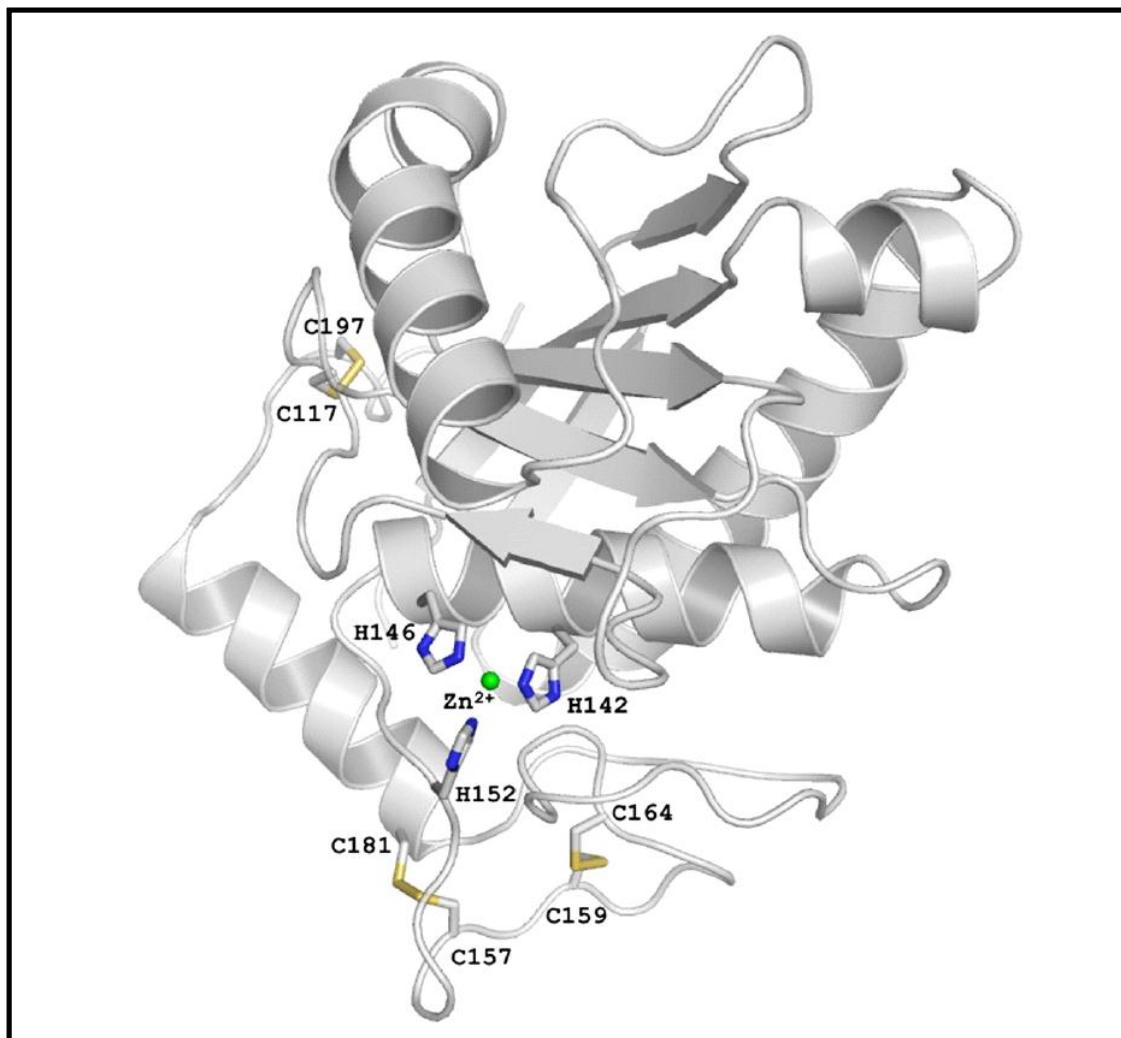


Figura 6: Representação esquemática da estrutura da enzima BmooMP α -I. As pontes dissulfeto e as três histidinas catalíticas estão destacadas em alças elevadas. O íon zinco está representado como uma esfera. Átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e zinco são mostrados nas cores cinza, amarelo, azul e verde, respectivamente. Fonte: AKAO *et al.*, 2010.

Assim como acutolisina A e adamalisina-II, o íon cálcio foi identificado na região de cruzamento do N-terminal e C terminal do lado oposto ao sítio ativo. O íon cálcio é heptacoordenado pelos O δ 1Asn²⁰⁰, OCys¹⁹⁷, O δ 1Asp¹⁹³, O δ 2Asp¹⁹³, O ϵ 1Aps⁹, OW⁵ e OW¹⁰, e é considerado estruturalmente importante para estabilidade do domínio proteolítico.

O sítio de ligação do zinco exibe uma coordenação octaédrica distorcida, configuração atípica quando comparada a de outras SVMPs, como H2-proteinase e adamalisina-II, apresentando um sítio de ligação do zinco em coordenação tetraédrica (Figura 7).

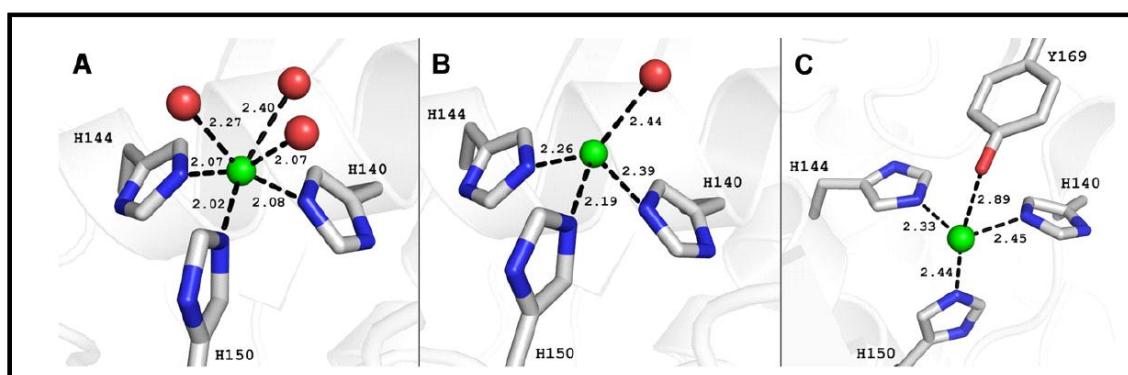


Figura 7: A) Coordenação geométrica do sítio de ligação do zinco na enzima BmooMP α -I, B) adamalisina-II e C) acutolisina A. Os resíduos de aminoácidos são representados em alças elevadas, a molécula solvente em vermelho e as interações em linhas pontilhadas pretas. Fonte: AKAO *et al.*, 2010.

1.7 Inflamação

A inflamação é a resposta do organismo à invasão por um agente infeccioso, por um desafio com antígeno ou uma lesão física. Independente da causa a inflamação pode ser entendida como uma reação à quebra da homeostase (TEIXEIRA *et al.*, 2009). A resposta inflamatória compreende três eventos principais (1) aumento do suprimento sanguíneo para área afetada; (2) aumento da permeabilidade capilar, ocasionando a retração das células endoteliais, permitindo, então a liberação de mediadores inflamatórios que irão atingir o local da infecção; (3) migração dos leucócitos dos capilares para os tecidos circundantes, sendo que na fase inicial, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas e prevalentes e, mais tarde, os monócitos e linfócitos migram para o local (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As inflamações podem ser divididas em agudas e crônicas, dependendo do tempo de duração do processo. As inflamações agudas são caracterizadas por um tempo de duração de pouco minutos até poucos dias; enquanto que as inflamações crônicas persistem por semanas ou meses (MONTENEGRO *et al.*, 1999).

A resposta inflamatória aguda, sob o ponto de vista morfológico e funcional caracteriza-se pelo predomínio de fenômenos exsudativos, ou seja, alteração na permeabilidade vascular, com acúmulo de líquido na região afetada (edema), fibrina, leucócitos e hemácias, seguidos pela fagocitose de componentes celulares e, dor local (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

A resposta inflamatória crônica, além destes elementos, envolve a proliferação dos vasos, formação de granulomas e tecidos linfóides terciários. A área inflamada é infiltrada por células como fagócitos mononucleares, linfócitos, fibroblastos e em alguns casos granulócitos (MEDZHITOV, 2008).

Além dos componentes celulares, a resposta inflamatória envolve também a sinalização celular que ocorre tanto por interação direta célula a célula, envolvendo tanto moléculas de superfície celular (moléculas de adesão), quanto por mediadores inflamatórios como as quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas e eicosanóides. Estes mediadores são elementos chaves para “orquestrar” todos os eventos da resposta a lesão física (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

1.8 O sistema imune na resposta inflamatória

Após a quebra da homeostase no organismo, este começa a responder aos estímulos que levaram ao desequilíbrio, ou seja, emite sinais de alerta para o sistema imune com intuito de reparar e reconstruir os danos causados pela lesão (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

O primeiro evento da ativação celular é o reconhecimento celular. Na presença de um agente infeccioso, por exemplo, o sistema imune faz o reconhecimento por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que são os sensores da imunidade inata, envolvidos na detecção de padrões moleculares associados ao patógenos (PAMPs). PRRs podem reconhecer também moléculas endógenas com concentrações elevadas em resposta ao estresse ou ao dano tecidual, então comportando como sensores de *alarmins* (mediadores de degranulação e morte celular). Portanto, os PRRs são os sensores de PAMPs e *alarmins*, os quais juntos formam um grupo constituído pelos padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) (BIANCHI, 2007).

Entre os PRRs temos os membros da família de receptores *Toll-like* (TLRs) que são os responsáveis por reconhecer macromoléculas derivadas de patógenos, derivados de componentes das bactérias e parede celular de vírus em crescimento (LEE, AVALOS, PLOEGH, 2012).

A família de receptores *Toll-like* (TLRs) foi previamente descrita na espécie *Drosophila melanogaster*, a mosca de frutas. As moléculas *Toll* foram caracterizadas inicialmente, como receptores transmembrânicos do tipo I com papel importante no desenvolvimento dorso-ventral do embrião de *Drosophila* (ROEDER *et al.*, 2004). Moscas geneticamente deficientes em moléculas *Toll* apresentavam uma capacidade reduzida de defesa contra fungos e bactérias Gram-positivas, ressaltando sua importância no reconhecimento e resposta contra estes patógenos (ALARCO *et al.*, 2004).

Posteriormente, pelo menos 11 tipos de receptores *Toll-like* (TLRs) análogos aos de *Drosophila* foram identificadas em mamíferos. Os humanos expressam dez TLRs (TLR1 a TLR10) funcionais, enquanto que vinte TLRs (TLR1 a TLR9 e TLR11 a TLR13) foram relatados em camundongos. Ligantes têm sido determinados para todos os TLRs, exceto TLR10 e TLR12 e TLR13 de camundongos. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11 residem na membrana plasmática, onde reconhecem patógenos de superfície. Por outro lado, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são encontrados no ambiente intracelular e, são responsáveis pelo reconhecimento de ácido nucléico (LEE, AVALOS, PLOEGH, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1: Localização e ligantes de TLRs.

TLR	Localização celular	Ligantes fisiológicos	Ligantes sintéticos
TLR1- TLR2	Membrana plasmática	Lipopolissacarídeo (LPS)	Pam3CSK4
TLR-2	Membrana plasmática	Peptidioglicano, Fosfolipomanose, tGPI-mucinas, hemaglutinina, porinas, Lipoarabinomanose, Glucoroxilomanose ,HMGB1.	ND
TLR-2- TLR-6	Membrana plasmática	Lipopeptídeos, LTA, zimozan	FSL1, MALP2, Pam2CSK4
TLR-3	Endossomo	dsRNA	PolyI:C
TLR-4	Membrana plasmática	LPS, VSV glicoproteína G, proteína de fusão RSV, proteína de envelope MMTV, manose, Glucoroxilomanose, Glicosilinositolfosfolípideos, HSP60,HSP70,fibrinogênio, níquel, HMGB1.	ND
TLR-4- TLR-2	Endossomo	OxLDL,fibrilas β amilóides	ND
TLR-5	Membrana plasmática	Flagelina	ND
TLR-7	Endossomo	ssRNA	Imiquimode, Resiquimode, Loxoribine
TLR-8	Endossomo	ssRNA	Resiquimod
TLR-9	Endossomo	DNA	CpG-A, CpG-B e CpG-C ODNs
TLR-11 (camundongo)	Membrana plasmática	Profilina	ND

*dsRNA, RNA de fita dupla; FSL-1 [S-(2,3-bispalmitoyloxypropyl)-CGDPKHSPKSF]; HMGB1, proteína 1 de alta mobilidade; HSP, Proteína causadora de choque térmico; LTA, ácido lipoteicóico; MALP2, lipopeptídeo de 2kDa ativador de macrófagos; MMTV, vírus do tumor mamário de camundongo; ND, não determinado; ODN, oligodeoxinucleotídeo; oxLDL, lipoproteína de baixa densidade oxidada; polyI:C, ácido poliinosínico-policitidílico ; RSV, vírus respiratório sincicial; ssRNA, RNA de fita simples; tGPI-mucinas, glicoproteína de *Trypanosoma cruzi* ligante de mucina ancorada ao glicofosfatidilinositol; TLR, receptor *Toll-like*; VSV, vírus da estomatite vesicular. Fonte: LEE, AVALOS, PLOEGH, 2012.

Os TLRs são constituídos de um domínio extracelular LRR (Domínio rico em repetidas unidades de leucinas), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático TIR (domínio receptor de interleucina-1) (KUMAR, KAWAI, AKIRA, 2009).

O domínio LRR dos TLRs consiste de 16–28 unidades repetidas do motivo LRR em *tandem* e está envolvido no reconhecimento de, por exemplo, proteínas (flagelina e porina) de bactérias, açúcares (zimosan) de fungos, lipídeos (LPS-lipopolissacarídeo; lipídeo A e LTA –ácido lipoteóico) de bactérias, ácidos nucléicos (CpG- contendo DNA) de bactérias e RNA de vírus, além das proteínas e peptídeos, lipoproteínas e lipopeptídeos de diversos patógenos; derivados de lipídeos de micobactéria e, complexos derivados de proteínas, peptídeos ou açúcar e lipídeos (diacil lipopeptídeos) de micoplasma (KUMAR, KAWAI, AKIRA, 2009).

O domínio TIR dos TLRs consiste de aproximadamente 150 aminoácidos, com homologia a região citoplasmática do receptor de IL-1. O domínio TIR interage com moléculas adaptadoras contendo o domínio TIR como MyD88 (Gene 88 de diferenciação da resposta primária mielóide); TIRAP (Proteína adaptadora contendo TIR, também conhecido como MAL (MyD88-adaptor-like); TRIF (Proteína adaptadora contendo TIR induzida por IFN (interferon- β), também conhecida como TICAM1 (molécula adaptadora contendo TIR-1) e, TRAM (molécula relacionada ao adaptador TRIF, também conhecida como TICAM2) (KUMAR, KAWAI, AKIRA, 2009).

A ligação dos DAMPs aos domínios TLRs resulta em uma cascata de sinalização que ativa as MAPKs (proteínas quinases mitógeno ativadas) e transcrição do fator nuclear κB (NF-κB) e fatores de regulação de interferons (IRFs) e, estes fatores de transcrição induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons do tipo I (IFNs), respectivamente (LEE, AVALOS, PLOEGH, 2012) (Figura 8).

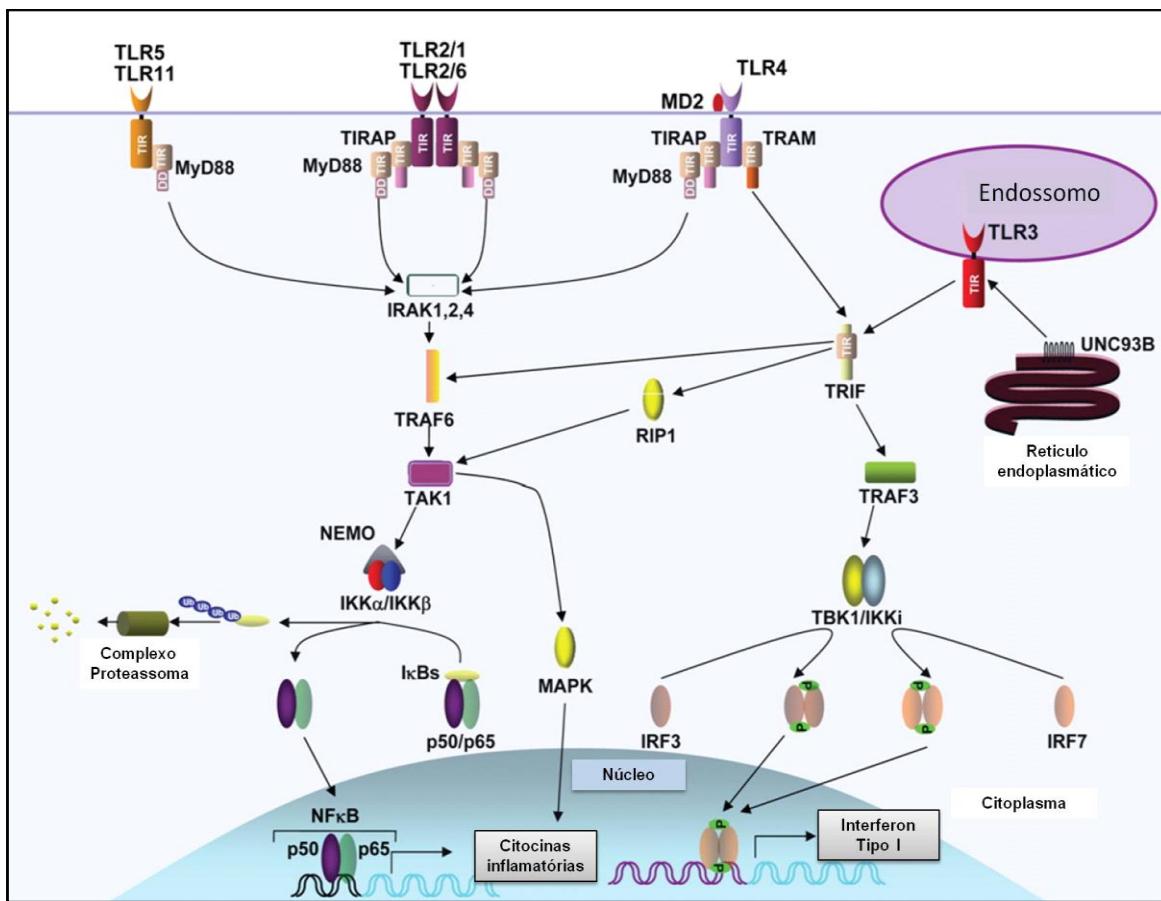


Figura 8: Sinalização de TLR nas células dendriticas e macrófagos. O acoplamento de TLRs aos seus respectivos ligantes inicia a sinalização. MyD88 recruta a família de proteínas IRAK e TRAF6. TRAF6 ativa TAK1, que ativa o complexo IKK formado por IKK α , IKK β e NEMO/IKK γ e, fosforila I κ Bs. I κ Bs fosforiladas são ubiquitinadas e direcionadas para a degradação no proteassoma e, NF- κ B (subunidades p50 e p65) é translocado para o núcleo. TAK1 também ativa a via de sinalização por MAPK. TRIF recruta RIP1 e TRAF6. A ativação de MAPK e NF- κ B inicia a transcrição de genes de citocinas inflamatórias. TRIF interage com TRAF3 e, ativa TBK1/IKKi, que fosforila IRF3 e IRF7. Após a fosforilação IRF3 e IRF7 são translocados para o núcleo e iniciam a transcrição de IFNs tipo I. Fonte: KUMAR, KAWAI, AKIRA, 2009, modificado.

As citocinas são pequenas “proteínas mensageiras” (8-80 KDa) secretadas por células da imunidade inata e imunidade adaptativa, que permitem a comunicação intercelular, em associação aos hormônios e neurotransmissores, constituem a linguagem química de sinalização que controla o desenvolvimento, o reparo tecidual e a resposta imune dos organismos multicelulares (ARENDS, GABAY, 2004). Paralelamente a outros sinais oriundos do contato célula a célula ou célula-antígeno, as citocinas proporcionam uma rede de controle das respostas imune inata e imunidade adaptativa, incluindo a inflamação, a defesa contra infecções virais, a proliferação de clones específicos de células T e B e o controle de suas funções (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Além das citocinas a resposta inflamatória também é mediada por uma variedade de outras moléculas tais como prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), tromboxanas, leucotrienos e o fator de agregação plaquetária, liberados pelos macrófagos, neutrófilos, mastócitos, eosinófilos, linfócitos e plaquetas (KADAL, LEITINGER, 2005).

Todos estes passos de recrutamento de células para o local da inflamação são regulados por moléculas de adesão celular (ICAMs) presentes nos leucócitos e células endoteliais. Neutrófilos e monócitos são recrutados da circulação sanguínea para os sítios de infecção por moléculas de adesão presentes nas células endoteliais e quimiotáticas produzidas em resposta à infecção. Macrófagos residentes reconhecem os patógenos e, secretam as citocinas TNF- α , IL-1 e quimiocinas. TNF- α , IL-1 atuam nas células endoteliais dos capilares sanguíneos adjacentes ao local da infecção e, dentro de 1 a 2 horas induzem a expressão da molécula da adesão E-selectina, também conhecida como molécula de adesão de leucócitos endoteliais tipo-1 (ELAM-1) ou CD62E. E-selectina reconhece um grupo de carboidratos ricos em ácido siálico, glicanas e outras glicoproteínas expressas nos leucócitos (ABBAS, LICHTMAN, 2003)

Esta ligação entre os leucócitos e células endoteliais mediada por E-selectina é uma interação de natureza fraca facilmente interrompida pelo fluxo sanguíneo, assim os leucócitos soltam-se e rolam na superfície endotelial. TNF- α , IL-1 também induz nas células endoteliais a expressão de ligantes para integrinas, principalmente a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1, o ligante para integrina VLA-4) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, ligante para as integrinas LFA-1 e MAC-1), inicialmente expressas com baixa afinidade e em uma fase mais tardia com a produção de quimiocinas, ocorre sua expressão com interações de alta afinidade (ABBAS, LICHTMAN, 2003).

Após a uma adesão firme entre leucócitos e células endoteliais mediada pelas integrinas, os leucócitos param o processo de rolamento e fixam na superfície endotelial no sítio da infecção. Quiomiocinas atuam então nos leucócitos aderentes e atraem outras células para o local da infecção, ocorrendo um rápido acúmulo de infiltrado leucocitário característico da resposta inflamatória. Apesar de elucidarmos tipicamente a inflamação causada por patógenos, o mecanismo de migração celular é semelhante para os outros estímulos (DAMPs) que causam a resposta inflamatória (ABBAS, LICHTMAN, 2003).

Paralelamente as moléculas de adesão, temos também a atuação das metaloproteases de matriz (MMPs), que são as proteínas que participam da degradação da matriz extracelular (MEC). A matriz extracelular é 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. A renovação da MEC é a parte integrante dos processos normais de crescimento, diferenciação, desenvolvimento celular e remodelamento tecidual e, alguns processos patológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Em condições fisiológicas, as MMPs ativas são precisamente reguladas em nível de transcrição, ativação de precursores zimogênios, interagindo com componentes específicos da MEC e inibidas por fatores endógenos (TIMPs - inibidores teciduais de MMPs). O desequilíbrio entre MMPs e TIMPs pode resultar em várias patologias, devido à alta expressão de MMPs como artrite, câncer, arteriosclerose, aneurisma, nefrites, úlceras tissulares e fibroses (VISSE, NAGASE, 2011).

Após o fim do processo de inflamação, a fase de reparo envolve o decréscimo de mediadores pro - inflamatórios e antiinflamatórios secretados principalmente por macrófagos residentes e recrutados, bem como a apoptose de granulócitos e posteriormente a remoção de monócitos. Este episódio é completado pela eliminação destes mediadores por meio de sua saída pelo sistema linfático com a remoção de fluidos e debris celulares do compartimento intersticial (SERHAN, SAVILL, 2005).

1.9 Participação do TNF- α na resposta inflamatória e patologias associadas ao desequilíbrio de sua produção

O fator de necrose tumoral (TNF- α) foi descoberto no início da década de 1960, como uma endotoxina induzida no soro por algum fator que causou lise de células tumorais. No entanto, a verdadeira identidade do TNF não ficou clara até 1984, quando Aggarwal e colaboradores relataram pela primeira vez, o isolamento de dois fatores citotóxicos: o primeiro, derivado de macrófagos (massa molecular de 17 kDa), foi nomeado TNF, e o segundo, derivado de linfócitos (20 kDa), foi nomeado de linfotoxina (VERHELST, CARPENTIER, BEYAERT, 2011). Devido ao fato de que estes fatores citotóxicos apresentam uma homologia de 50% na sua seqüência de aminoácidos e um mesmo receptor de ligação, eles foram nomeados de TNF- α e TNF- β . A partir de seqüências de proteínas geradas por cDNAs com homologia para TNF- α , foram identificados um total de 19 membros da superfamília de TNF, juntamente com 29 receptores e diversas moléculas que interagem com o domínio citoplasmático destes receptores (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

O principal efeito fisiológico de TNF- α é promover a resposta imunológica e inflamatória pelo recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção promovendo sua ativação. Em baixas concentrações, TNF- α atua nas células endoteliais promovendo a vasodilatação e estimulando a secreção pelos leucócitos das citocinas e quimiocinas, contribuindo no combate a infecção local (VITALE, ANDRADE, RIBEIRO, 2007).

Apesar da molécula TNF- α ser essencial no combate a infecções, o desequilíbrio na sua produção está ligado a várias patologias como o câncer, as doenças neurológicas, as doenças pulmonares e autoimunes (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

TNF- α e câncer

As atividades carcinogênicas de TNF- α são mediadas por sua habilidade de ativar o fator de transcrição NF- κ B (perfil pró-inflamatório), que promove a superexpressão de genes ligados a sobrevivência da célula tumoral, proliferação, angiogênese e metástase. Diversos tipos de tumores expressam constitutivamente TNF- α , como câncer de ovário, câncer de mama. A maioria das células que expressam TNF- α exibem ativação constitutiva do NF- κ B, estas células tumorais são dependentes de NF- κ B, sua sobrevivência é dependente da presença deste fator (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

TNF-α e doenças neurológicas

Tanto TNF-α como seus receptores são expressos nas células da micróglia no cérebro. Embora a ativação de NF-κB por TNF-α é de suma importância para a sobrevivência destas células no cérebro, o TNF-α induz sinais pró-inflamatórios, os quais podem estar associados à depressão, transtorno bipolar, epilepsia, mal de Alzheimer, mal de Parkinson e esclerose múltipla. Da mesma forma, a ligação de Fas tem mostrado uma indução seletiva da expressão de quimiocinas, por exemplo, IL-8 e MCP-1 (proteína-1 com ação quimiotática sobre os monócitos) em células humanas de astroglioma de cultura (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

TNF-α e doenças cardiovasculares

TNF-α junto com outras moléculas inflamatórias é conhecido pelo seu papel na iniciação e progressão de doenças cardiovasculares. Apesar de células cardíacas normais não expressarem TNF-α, a falha do coração produz elevados níveis de TNF-α. Evidências indicam que a manutenção e excessiva produção de TNF-α pioram as doenças cardíacas. Relatos de casos de pacientes com desordens inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (RA) e psoríase, exibem índices elevados de mortalidade que não podem ser explicados por fatores de risco isolados. Tal fato fornece indícios de que vias inflamatórias talvez possam contribuir para o aumento do risco de várias doenças cardiovasculares.

Dados epidemiológicos sugerem que TNF-α está diretamente envolvido em patofisiologias vasculares, agravando em aproximadamente 50% a mais o risco de morte por acidente cardiovascular em pacientes com RA em relação a população normal (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

TNF-α e doenças pulmonares

TNF-α tem sido correlacionando com diversas doenças pulmonares como asma, bronquites crônicas, doenças pulmonares de obstrução crônica (COPD), injúria aguda do pulmão e síndrome da angustia respiratória aguda. TNF-α é expresso em vias áreas de asmáticos e tem mostrado um papel de amplificação da inflamação asmática devido à interação com NF-κB, AP-1e, outros fatores de transcrição. Em modelos experimentais, TNF-α está associado com doenças pulmonares de obstrução crônica, apresentando um quadro de infiltrado inflamatório nos pulmões, fibrose pulmonar e enfisema (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

TNF- α e doenças autoimunes

Os membros da família TNF desempenham um papel chave nas doenças autoimunes como uveitis, esclerose múltipla, lúpus eritromatoso sistêmico, artrites, psoríases e doença de Crohn. Estas patologias estão relacionadas com a falta de regulação da expressão de diversos membros da família TNF e seus receptores, causando quadros intensos de inflamação e complicações aos doentes.

Os membros da superfamília TNF são protótipos para o desenvolvimento de drogas, como mostra a recente aprovação e expansão do mercado de bloqueadores de TNF utilizados no tratamento de artrite reumatóide, psoríase, doença de Crohn e osteoporose (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

1.10 Imunoterapia baseada no uso de anticorpos anti-TNF

Inibidores de TNF (TNFIs) estão entre as primeiras drogas biológicas utilizadas com sucesso na extração da teoria para prática clínica. Até o momento, há cinco inibidores disponíveis no mercado para o tratamento de artrite reumatóide (RA), três são protótipos de anticorpos monoclonais: infliximab, adalimumab e golimumab. Infliximab é uma proteína química composta de porções variáveis de camundongos e região constante de humanos. Golimumab e adalimumab são anticorpos humanos, produzidos utilizando a tecnologia do DNA recombinante. O quarto agente, etanercept, é uma fusão de proteínas contendo dois domínios do receptor extracelular TNFR2 e o fragmento Fc (domínios CH2 e CH3) da imunoglobulina 1 humana (IgG1). Certolizumab é um fragmento de Fab conjugado a glicol (PEG) humanizado, o conjugado PEG de 40-kDa aumenta a meia vida do inibidor. Em todos estes inibidores, a região Fc está ausente para que não ocorra ativação de funções biológicas que poderiam causar danos, como lise dependente de complemento e citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) (THALAYASINGAM, 2011).

Os inibidores de TNF (TNFIs) atuam bloqueando as citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a artrite reumatóide, por diferentes mecanismos de ação, como neutralização de linfotoxinas, indução de apoptose das células inflamatórias, sinalização reversa por via citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) (THALAYASINGAM, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Desde os tempos remotos, a área médica procura elucidar através das pesquisas, as possíveis causas de uma determinada doença e a melhor maneira de tratá-la. Entre estas patologias, as doenças inflamatórias crônicas, estão entre as mais graves. A artrite reumatóide, por exemplo, afeta cerca de 1 a 2% da população adulta dos países ocidentais. Uma possibilidade encontrada pelos laboratórios de pesquisa farmacêuticos para o tratamento das doenças é o desenvolvimento de novas drogas a partir de produtos naturais. Moléculas bioativas são isoladas a partir de extratos vegetais, “venenos” de origem vegetal, peçonha de animais marinhos e terrestres e, metabólitos secundários de bactérias. Estas biomoléculas funcionam como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, cujo efeito terapêutico é geralmente obtido de maneira diferente dos agentes terapêuticos convencionais, com menos efeitos colaterais, por exemplo. As peçonhas ofídicas constituem em um dos alvos destas pesquisas há alguns anos, com exemplos de sucesso como Captopril e derivados – o primeiro fármaco inibidor do sítio ativo da ECA (enzima conversora de angiotensina I), e uma das drogas de maior sucesso no tratamento da hipertensão, cujo protótipo, foi um polipeptídeo isolado da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. As peçonhas ofídicas constituem um complexo de moléculas tóxicas e não tóxicas, selecionadas naturalmente para um alvo específico, a fim de causar alterações no sistema fisiológico da vítima. Devido à alta especificidade de seu alvo, as toxinas das peçonhas das serpentes têm sido cada vez mais usadas como ferramentas farmacológicas, por meio do isolamento, caracterização bioquímica, determinação de sua estrutura e ações biológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar se a enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, apresenta algum papel na resposta inflamatória em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Purificar a metaloprotease BmooMP α -I presente na peçonha bruta de *B. moojeni*, por meio de métodos cromatográficos seqüenciais nas resinas DEAE-Sephacel, Sephadex-G75 e Benzamidina-Sepharose;
- Analisar o seu grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional e bidimensional;
- Produzir anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I e analisar sua especificidade e determinar sua reatividade cruzada com as proteínas presentes na peçonha bruta de *B. moojeni*;
- Neutralizar a atividade azoproteolítica induzida pela peçonha bruta de *B. moojeni* e a protease BmooMP α -I com os anticorpos policlonais anti- BmooMP α -I;
- Avaliar a resposta inflamatória induzida pela enzima BmooMP α -I em camundongos BALB/c;
- Caracterizar a atividade proteolítica da metaloprotease BmooMP α -I sobre o substrato TNF- α ;
- Analisar a citotoxicidade da enzima BmooMP α -I em cultura *in vitro* de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM);
- Determinar o efeito da protease BmooMP α -I sobre o TNF- α secretado pelos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da peçonha:

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents, em Batatais-SP, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin.

4.2 Animais:

4.2.1 Coelhos

Coelhos machos da raça Nova Zelândia, com peso entre 2-2,5 Kg, os quais foram mantidos no Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sala com temperatura e ventilação controladas, recebendo água e ração. Após a última imunização, os animais foram eutanasiados no próprio biotério, por meio da utilização de dióxido de carbono e posteriormente foi coletado o sangue por punção cardíaca. O procedimento experimental foi realizado de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade de São Paulo (Protocolo de aprovação CEUA: 10.1.1547.53.6).

4.2.2 Camundongos

Camundongos BALB/c com seis a dez semanas de idade foram obtidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em condições padronizadas de criação. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), os quais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo CEUA-UFU Nº. 013/09)

4.3 Purificação da enzima BmooMP α -I

A enzima BmooMP α -I foi purificada de acordo com o método descrito por Bernardes e colaboradores (2008), com modificações. Cerca de 400 mg de peçonha bruta de *B. moojeni* foram dissolvidos em 4 mL de tampão bicarbonato de amônio (Sigma Chem. Co) a 50 mM (pH 7,8) e centrifugado a 10,000 x g por 10 min. A solução sobrenadante foi cromatografada em coluna DEAE – Sephacel (Sigma Chem. Co) (1,7 x 15 cm), previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio a 50 mM (pH 7,8) e eluida com um gradiente convexo/crescente de concentração (0,05-0,3 M) do mesmo tampão.

A segunda fração da cromatografia anterior, denominada E2, foi ressuspensa em tampão bicarbonato de amônio a 50 mM, pH 7,8 e aplicada em uma coluna Sephadex - G75 (Amersham Pharmacia Ltda) (1 x 100cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A segunda fração resultante da cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75), denominada E2G2, foi ressuspensa em 5,0 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 e aplicada em uma resina de Benzamidina Sepharose (Amersham Pharmacia Ltda) (20 X 15 cm). As amostras foram eluídas com tampão glicina 50 mM pH=3,0 . As frações resultantes foram delimitadas e avaliadas quanto ao grau de pureza em eletroforese.

Todas as cromatografias foram realizadas coletando-se frações de 3,0 mL cada, com um fluxo de 20 mL/hora. A absorbância de cada fração foi acompanhada em 280 nm no espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer plus), sendo os gráficos foram construídos, as amostras selecionadas reunidas em “pools”, dosadas, liofilizadas e armazenadas a - 20°C até o momento de uso.

4.4 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas da peçonha bruta e das frações isoladas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando como proteína padrão a soroalbumina bovina (Sigma Chem. Co).

4.5 Eletroforese unidimensional (1D. SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 ou 18% foi realizada conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5% em pH 6,8 contendo 0,125M de Tris-HCl e 0,1% de SDS e um gel de separação a 12% ou 18% em pH 8,8 e 0,1% de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

Amostras contendo de 5 a 50 µg de proteínas foram dissolvidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8; glicerol 20%; SDS 4% e azul de bromofenol 0,2% como corante, na ausência de agente redutor). As proteínas foram completamente dissociadas por imersão da amostra durante 3 a 5 minutos em água fervente. Foram aplicados no gel cerca de 5 a 30 µL de amostras protéicas dissolvidas no mesmo tampão. As amostras foram separadas utilizando um sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA)

As proteínas foram coradas por 15 minutos numa solução de *Coomassie Blue R-250* a 0,2 % (m/v) dissolvidas em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v) e descoradas em água: etanol:

ácido acético (6:3:1 v/v). A massa molecular relativa da enzima purificada foi estimada pelo software de análise de imagem Kodak 1D. O padrão de massa molecular utilizado foi o kit da "BenchMarck™ Protein Ladder".

Em um segundo momento, as amostras protéicas resultantes da degradação de TNF- α foram submetidas à SDS-PAGE e coloração pela prata conforme técnica descrita por Blumm e colaboradores (1980)

4.6 Eletroforese bidimensional (2D. SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % com agente desnaturante (SDS) bidimensional foi realizada conforme a técnica descrita por Adessi e colaboradores (2005). A enzima BmooMP α -I foi analisada condições redutoras e não redutoras. Na eletroforese bidimensional em condições redutoras a amostra foi preparada incubando-se 20 μ L de amostra (125 μ g de BmooMP α -I) diluídos em água acrescido de 0,75 μ L tampão IPG (pH-3 a 10) e 105 μ L De Streak solution (DTT 40mM, uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%). Na eletroforese bidimensional em condições não-redutoras a amostra foi preparada incubando-se 20 μ L de amostra (125 μ g de BmooMP α -I) diluídos em água acrescido de 0,75 μ L tampão IPG (pH-3 a 10) e tampão C (uréia 8M, azul de bromofenol 0,002%, CHAPES 2%).

Em seguida, tiras de 7 cm de gradiente de pH imobilizado (ReadyStrip™ IPG strips, pH 3-10) foram hidratadas com as amostras da enzima BmooMP α -I em condições redutoras e não redutoras por 24 horas a temperatura ambiente. A separação em primeira dimensão (1D) foi realizada com a focalização isoelétrica de acordo com as etapas programadas: 300 V por 2 h, 1000 V por 1h, 5000 V por 1h:30 mim e 2500 V por 30 mim.

Após a focalização isoelétrica, as tiras imobilizadas com a proteína foram equilibradas com tampão de equilíbrio (uréia 6M, SDS 2%, Tris-HCl 50mM pH=8,8, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,001%, DTT 130mM) durante 15 mim.

Em seguida, as tiras foram posicionadas na superfície do gel de poliacrilamida 12% juntamente com a solução padrão de massa molecular (BenchMarck™ Protein Ladder) adicionado em paralelo e então fixadas com solução de agarose (0,5%) e azul de bromofenol (0,003%) diluídos em tampão de corrida.

A eletroforese foi realizada sob corrente constante 26 mA e 250V por 1h. Subseqüentemente, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue coloidal G-250 e descorado com ácido acético 7% para posterior análise dos spots. A análise dos géis bidimensionais foi realizada utilizando o software ImageMaster 2D Platinum 7 (GE, Healthcare, Uppsala, Suécia).

4.7 Imunização dos coelhos e produção anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I

Para a imunização e produção de anticorpos foram utilizados dois coelhos machos (2,2 a 2,5 Kg), da raça Nova Zelândia, seguindo o modelo descrito por Rodrigues e colaboradores (2001). Antes da imunização foi feita a sangria prévia dos animais para se certificar, por meio do teste de ELISA, que os animais não possuíam anticorpos contra a protease.

Os coelhos foram imunizados em 4 pontos distintos por via intramuscular, coxa, e subcutânea, dorso, num intervalo de 30 dias. A primeira dose foi administrada na concentração de 500 μ g/mL, acrescentando-se adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., EUA) (v/v). As doses de reforço foram administradas na concentração de 250 μ L/mL juntamente com adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Co., EUA) (v/v). Cada animal recebeu uma dose de 1 mL.

Após duas imunizações de reforço foi realizada a coleta de sangue do animal pelo lobo da orelha. O soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20 °C. Em seguida, foi realizado o teste de ELISA para comprovar a presença de anticorpos contra a protease. Após três dias a partir da última aplicação foi coletado o sangue por punção cardíaca para purificação dos anticorpos. Os soros obtidos dos dois coelhos foram reunidos em um único *pool*.

4.8 Purificação de anticorpos policlonais

O soro dos coelhos foi fracionado por cromatografia de afinidade utilizando a resina Proteína A Sepharose. A resina Proteína A liga a região Fc das imunoglobulinas por meio de sua interação com a cadeia pesada, a eluição das imunoglobulinas foi feita por variação de pH. A amostra com proteínas plasmáticas não identificadas foram eluídas com tampão Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,5. Os anticorpos policlonais (IgGs) anti-BmooMP α -I foram eluídas com tampão ácido (0,1M glicina-HCl, pH=3,0). Imediatamente após a coleta as frações obtidas foram neutralizadas com tampão Tris 1M, pH=8 .

4.9 Teste imunoenzimático indireto (ELISA)

O teste imunoenzimático indireto ELISA foi realizado segundo modelo descrito por OIE (2000), com algumas modificações, para a determinação da reatividade específica contra a enzima BmooMP α -I e titulação das imunoglobulinas G obtidas das amostras de soro de coelhos. Previamente, placas de ELISA de 96 poços (Corning Incorporated Costar® 3590, NY, EUA)

foram sensibilizadas com 50 µL/poço da protease BmooMP α -I (5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M, pH 9,6) *overnight* a 4°C.

Após o bloqueio com 1% de soroalbumina bovina (BSA) em tampão salina fosfato-tween (PBS-T) por 30 minutos a 37°C, as amostras de soro de coelho diluídas 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 foram adicionadas (100 µL / poço) em duplicata, incubando-se por 1 hora a 37°C. Entre cada etapa da reação, foram realizados ciclos de três lavagens com PBS-T para remoção do excesso de reagentes, usando uma lavadora automática de microplacas.

Subseqüentemente, o conjugado enzimático IgG-Peroxidase anti-coelho produzidos em cabra diluídos 1:500, 1:1000 e 1:2000 em PBS-T foram adicionados 100 µL/poço na duplicata e a atividade enzimática foi avaliada, após prévia incubação da reação por 1 hora a 37°C, pela adição do substrato enzimático consistindo de H₂O₂ 0,03% e cromógeno 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline ácido sulfônico (ABTS) 0,01M em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0).

A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm utilizando um leitor de placas. A concentração do antígeno frente às diluições do conjugado foi avaliada de acordo com os índices da fórmula: S/R (razão entre a média de D.O dos soros controles positivos e negativos) x 100.

4.10 Immunoblot

Amostras contendo 15 µg de peçonha bruta de *B. moojeni* e da enzima BmooMP α -I foram inicialmente separadas em SDS-PAGE 12% sob condições não-redutoras.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm, Millipore, Bedford, EUA) e bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) por 2 horas à temperatura ambiente. Subseqüentemente, a imunoglobulina G anti-BmooMP α -I foi diluída 1: 500 em PBS-T (tampão salina fosfato-tween) contendo 1% de leite desnatado (PBS-T-M) e incubadas *overnight* a 4°C. Como controle da reação foi utilizado uma imunoglobulina G irrelevante de coelho.

Após seis lavagens de 5 minutos com PBS-T, as membranas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o conjugado anti-IgG coelho/peroxidase (Sigma-Aldrich, UK) (1:2000). Um novo ciclo de seis lavagens em PBS-T foi realizado e a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático H₂O₂ adicionado ao cromógeno DAB, como descrito pelo fabricante. As marcações antigênicas foram analisadas utilizando o programa computacional de análise de imagens (Kodak 1D software) e comparadas com padrões de pesos moleculares.

4.11 Ensaio de neutralização

O ensaio de neutralização da atividade proteolítica sobre a azocaseína pelos anticorpos policlonais foi realizada incubando-se previamente amostras na razão de 1:5, 1:10, 1:15 (m/m) de peçonha bruta *B. moojeni* (5 µg) ou enzima BmooMP α -I (50 µg) com anticorpos policlonais anti- BmooMP α -I por 120 minutos a 37°C. Em seguida, as amostras foram adicionadas a 400 µL do tampão Tris-HCl 50 mM pH = 7,8 em NaCl 150 mM e incubadas por 60 minutos com 500 µL de uma solução de azocaseína (1 mg/mL).

A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético 15 % (TCA) e as absorbâncias das amostras foram lidas a 405 nm. Uma unidade de atividade azocaseinolítica corresponde a um acréscimo de 0,01 em absorbância 405 nm nas condições de reação acima definidas.

4.12 Indução da inflamação peritoneal

Grupo de cinco camundongos machos BALB/c (18–22 g) foram injetados via intraperitoneal (i.p) com doses de 50 µg BmooMP α -I dissolvidas em 1mL de PBS estéril ou 1mL de tioglicolato de sódio (Difco™ fluid tioglycollate medium) 3% ou 1mL de tioglicolato 3% e 24 horas depois 50 µg BmooMP α -I dissolvidas in 1mL de PBS estéril. Grupos controles receberam somente PBS. Após 3 dias, os animais foram mortos por descolamento cervical e o exsudado inflamatório foi coletado pela lavagem com 3 mL de PBS estéril, pH 7.2. Alíquotas de todas as amostras foram utilizadas para a contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer. Os resultados foram expressos como número de células peritoneais totais por mL.

4.13 Ensaio de degradação de TNF- α murino

Para determinar o efeito da metaloprotease BmooMP α -I na degradação de TNF- α murino foi utilizado o kit de ELISA (DY 410-R & D Systems). Placas de 96 poços (Corning Incorporated Costar® 3590, NY, EUA) foram sensibilizadas com 0,8 µg/mL de anticorpo de captura (anti-TNF- α de camundongo) e incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (tampão salina fosfato-tween, pH 7.2), placas foram bloqueadas com BSA 1% (soro albumina bovina a 1%) em PBS-T por 1 h a temperatura ambiente.

Em um segundo momento (pré-incubação do TNF- α com a enzima BmooMP α -I) nos tubos Eppendorfs foram misturados 30 µL de TNF- α murino recombinante (1000 pg/mL) com 30 µL de BmooMP α -I (12 µg) ou 30 µL de BmooMP α -I (12 µg) inativada com 30 µL de 10 mM de solução de EDTA (BmooMP α -I (i)), ou 30 µL de BmooMP α -I (12 µg) previamente tratada com

anticorpo policlonal na razão (1:10) (BmooMP α -I(pAb)) por 2 horas a 37°C. Cada uma das amostras foi incubada por 45 minutos a 37°C com o substrato (TNF- α murino recombinante). Controles negativos foram incubados somente com PBS estéril.

Em paralelo, também foram misturados as mesmas amostras com o anticorpo de captura e incubados por 45 minutos a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T para remover o excesso de reagentes e as amostras de cada incubação foi adicionada em cada uma das placas, paralelamente a adição da curva-padrão e foram incubadas por 1 h a 37°C.

Em sequência, foi adicionado às placas o anticorpo de detecção (TNF- α anti-camundongo biotinilado produzido em cabra), diluído em PBS-T suplementado com BSA 1% (PBS-T-BSA), e incubado por 2h a temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T. No último passo, foram adicionados 50 μ L de Streptavidina-HRP em cada poço, as placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T. A atividade enzimática foi mensurada pela adição do substrato H₂O₂ 0,03% e o cromógeno TMB (tetrametilbenzidina). A reação foi interrompida pela adição de 25 μ L por poço de ácido sulfúrico 2N. A densidade óptica (DO) foi lida a 450 nm usando o leitor de placas Spectramax M2/M2^e (Molecular Devices). Os resultados foram expressos pelos níveis de TNF- α nas amostras testes em relação ao controle e porcentagem de degradação de cada amostra teste em referência ao controle.

4.14 Atividade proteolítica da enzima BmooMP α -I sobre TNF- α murino

A atividade proteolítica foi testada misturando-se 12 μ g/ μ L, 6 μ g/ μ L e 3 μ g/ μ L da enzima BmooMP α -I com 0,7 ng TNF- α murino recombinante (DY 410-R & D Systems) diluídos em PBS incubados a 37°C por 45 minutos. Como controle negativo, utilizou-se da incubação somente com PBS estéril. A atividade proteolítica foi analisada por SDS-PAGE (18%). Os resultados foram expressos pela porcentagem de degradação de TNF- α em cada amostra teste em relação ao controle.

4.15 Diferenciação de células derivadas da medula óssea

Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram gerados a partir de células tronco de medula óssea como previamente descrito por Marim e colaboradores (2010). As células tronco proveniente de camundongos BALB/c foram cultivadas em placas plásticas de 10 cm por sete dias em meio RPMI 1640 contendo 15 mM de HEPES, 2 g de bicarbonato de sódio/litro, 1 mM de L-glutamina e suplementado com 20% de soro fetal bovino e 30% de meio condicionado de

células L929 (LCCM). BMDM foram removidos da superfície das placas sob ganho gelo (30 minutos) por pipetagem vigorosa com PBS estéril gelado. Em seguida, os BMDM foram centrifugados a 500 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspensos em 10 mL de meio de cultivo, composto por RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5% de LCCM e 2 mM de L-glutamina. As células foram contadas e adicionadas (2×10^5) em placas de cultura de 96 poços 12 h antes do procedimento experimental.

4.16 Determinação dos níveis de TNF- α secretados por macrófagos ativados com agonistas de PRRs

Para determinar o efeito da protease BmooMP α -I sobre o TNF- α secretado pelos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e intensidade da sua modulação sobre a resposta imune, 2×10^5 células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços, em triplicata por 24 horas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, o meio foi retirado e adicionado 100 μ L/poço dos agonistas: 10 μ g/mL FSL-1 [Pam2CGDPKHPKSF] (InvivoGen), agonista de Toll-6/2; 1 μ g/mL IE, agonista de NOD/1; e 1 μ g/mL LPS-EK [LPS from *E. coli* K12] (InvivoGen), agonista de Toll-4. Após incubação por 3 h em condições de cultura (37°C e 5% CO₂), foram acrescentados às placas 100 μ L/poço da enzima BmooMP α -I em diluição dupla seriada (12 a 1,5 μ g /mL), seguida de nova incubação por 48 horas em condições de cultura (37°C e 5% CO₂). Como controle negativo, células foram incubadas somente com meio. Após esta incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados para a quantificação de TNF- α por ELISA.

4.17 Análise da viabilidade celular dos macrófagos ativados

A análise da viabilidade celular dos macrófagos ativados com os agonistas de PRRs e tratados com enzima BmooMP α -I foi determinada pelo ensaio de MTT, como descrito por Mosmann e colaboradores (1983). Foram adicionados 10 μ L de azul de tiazolil (MTT) na concentração de 5 mg/mL em 90 μ L de meio RPMI completo, 4 horas antes do final da cultura. O sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram, então, solubilizadas com 100 μ L/poço de solução 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm no leitor de placas Spectramax M2/M2^e (Molecular Devices). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

4.18 Quantificação de TNF- α por ELISA

Os sobrenadantes do ensaio com macrófagos foram coletados após 48 horas de incubação com os diferentes estímulos em condições de cultura (37°C e 5% CO₂) e os níveis de TNF- α foram mensurados por kit ELISA comercial (BD OpTEIA™ BD Biosciences).

Os ensaios foram efetuados em comum acordo as instruções do fabricante. As reações foram reveladas com estreptoavidina conjugada com peroxidase, seguindo de adição do substrato peróxido de hidrogênio e do cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) (BioRad, Hercules, CA, USA). As microplacas foram lidas no leitor de placas Spectramax M2/M2e (Molecular Devices) a 450 nm. A concentração da citocina foi calculada por curva padrão de citocina recombinante murina. A Figura 9 apresenta um fluxograma de todos os experimentos realizados no presente estudo, da obtenção inicial do extrato bruto da peçonha de *B. moojeni* à quantificação dos níveis de TNF- α secretados por macrófagos estimulados por agonistas dos PRRs.

4.19 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism software versão 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). O método *One-Way* ANOVA seguido por análise posterior pelo teste de Bonferroni foi aplicado para análise da neutralização da atividade azoproteolítica pelos anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I, da resposta inflamatória na cavidade peritoneal e no ensaio de degradação de TNF- α murino.

O teste *two-Way* ANOVA, seguido por análise posterior pelo teste de Bonferroni, foi utilizado para comparar a produção de TNF- α nos sobrenadantes de macrófagos submetidos aos diferentes tratamentos.

As diferenças obtidas nas mensurações efetuadas no presente estudo foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (MINEO *et al.*, 2005). No mínimo três experimentos independentes foram realizados em dias diferentes.

4.20 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de laboratório e de cultura, bem como manuseio de material biológico contaminado, utilização de vidraria, equipamentos e reagentes químicos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO *et al.*, 2005).

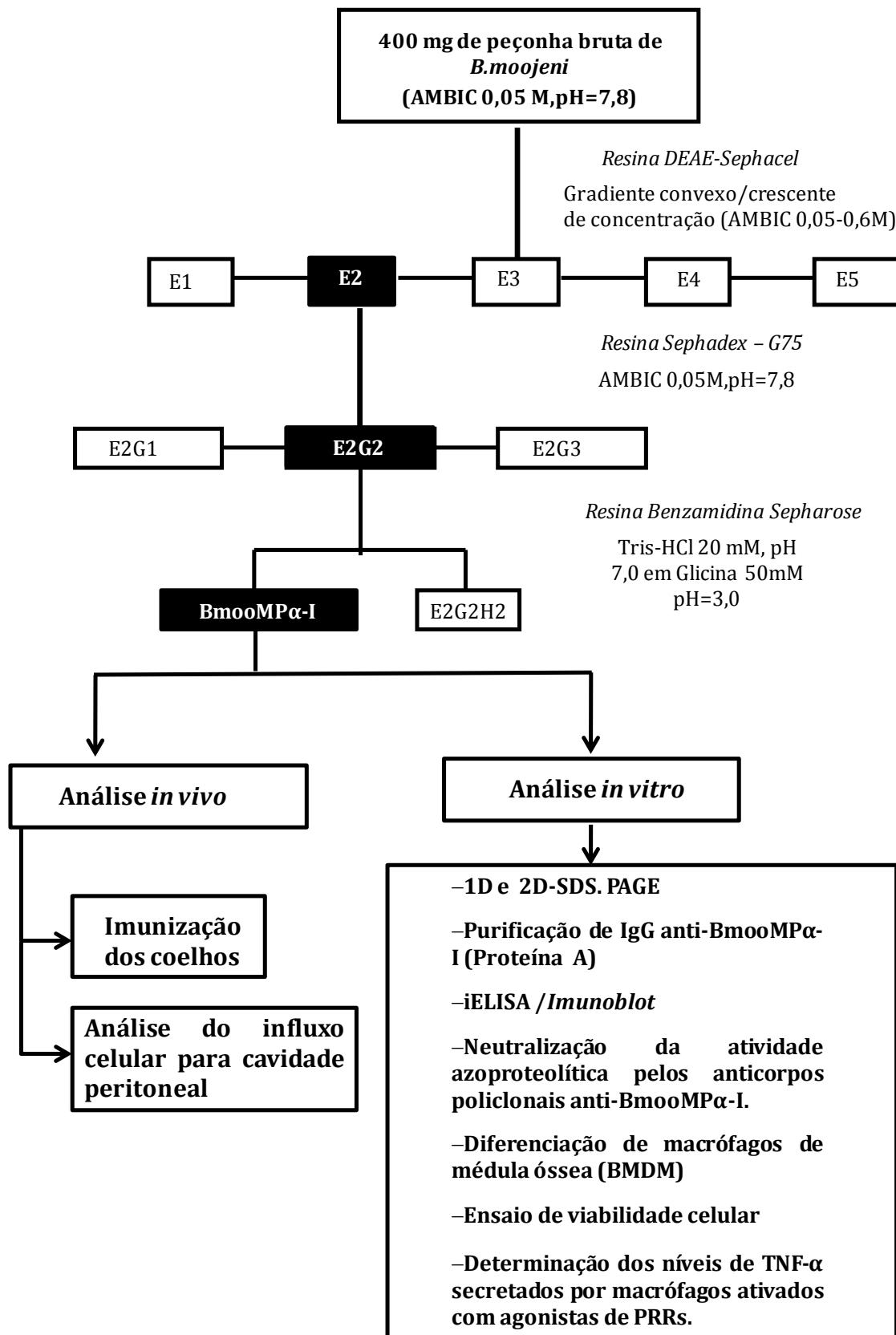


Figura 9: Fluxograma do processo de purificação e ensaios biológicos realizados com a metaloprotease BmooMP α -I.

5. RESULTADOS

5.1 Purificação da enzima BmooMP α -I

A cromatografia da peçonha bruta de *B. moojeni* em resina de troca iônica DEAE-Sephacel (Figura 10A) resultou na separação de cinco frações protéicas principais, denominados de E1 a E5. As proteínas presentes na fração E2 apresentaram uma elevada atividade proteolítica. O que despertou um maior interesse pela fração, nos levando a uma tentativa de purificar a proteína responsável por tal atividade e investigar outras atividades biológicas. Em seguida, a fração E2 foi submetida a um novo passo de purificação em resina de exclusão molecular Sephadex-G75 (Figura 10B), a qual resultou em três picos principais (E1G1, E2G2 e E3G3). O Pico E2G2 foi novamente aplicado em uma resina de afinidade Benzamidina Sepharose (Figura 10C), resultando em dois outros picos, sendo o primeiro pico a enzima de interesse BmooMP α -I.

Após o fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni*, pelos passos cromatográficos seqüenciais em resina DEAE-Sephacel, Sephadex-G75 e Benzamidina-Sepharose, as amostras da enzima purificada BmooMP α -I e peçonha bruta de *B. moojeni* foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para visualização de seus componentes protéicos e avaliação do seu grau de pureza. De acordo com o perfil eletroforético mostrado na Figura 11, observamos que o processo de purificação foi realizado com sucesso e a enzima BmooMP α -I apresentou um excelente grau de pureza e um massa molecular de ~23 kDa.

Para confirmar a pureza, massa molecular e ponto isoelétrico da enzima BmooMP α -I, amostras das preparações obtidas foram analisadas sob condições não-redutoras e redutoras em 2D.SDS-PAGE. Em condições redutoras, na presença de DTT e tiouréia, a metaloprotease BmooMP α -I formou tripeptídeos de massas moleculares ~22,4 KDa, ~21,2KDa e ~18,7KDa e pontos isoelétricos (pI) na faixa de 7,24-7,33 (Figura 12A). Em condições não-redutoras, ausência de DTT e tiouréia, a metaloprotease apresentou um único spot protéico com massa molecular de ~ 22,36 KDa e pI de 6,82 (Figura 12B).

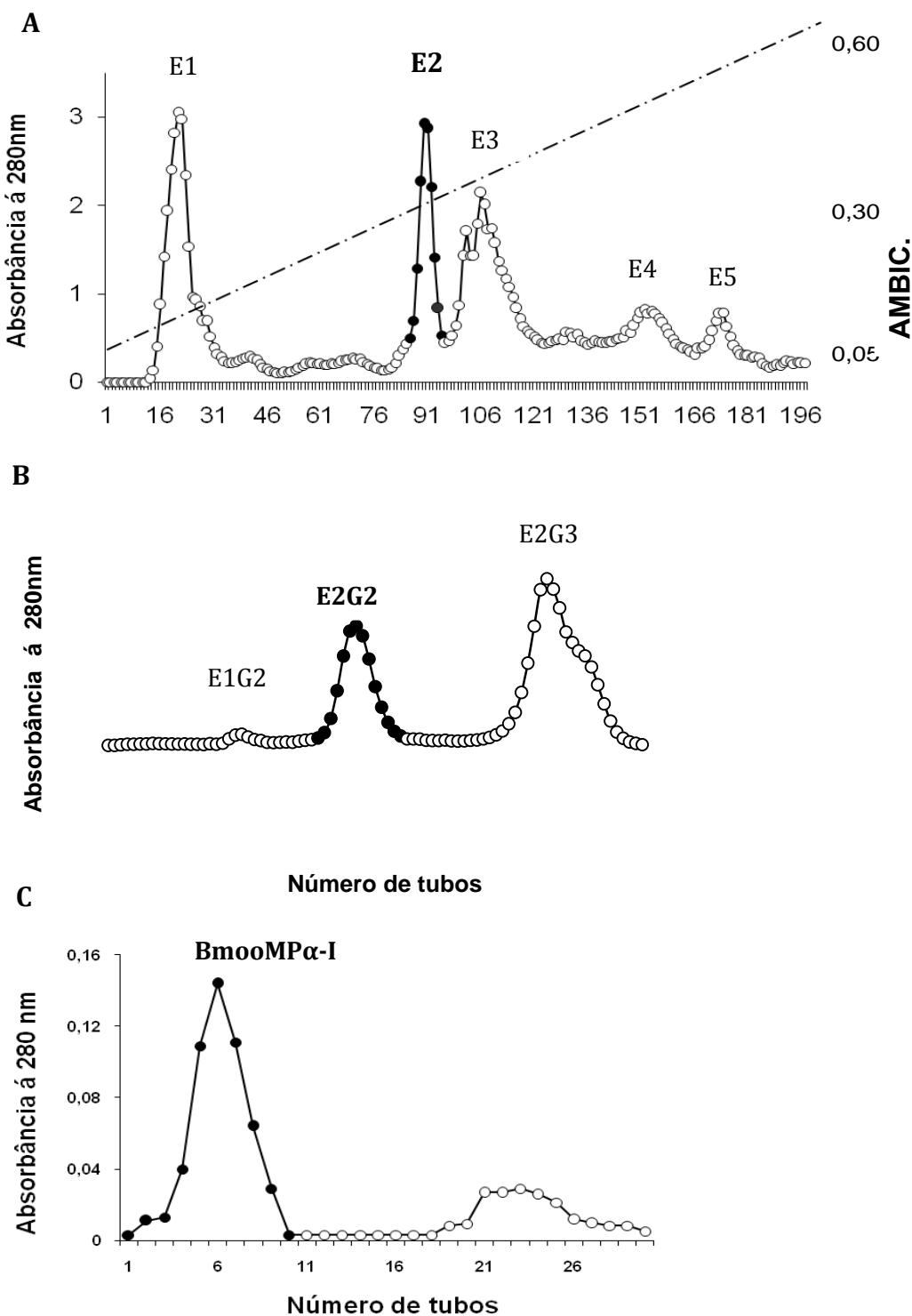


Figura 10: A) Fracionamento de 400 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em coluna de DEAE Sephadex (1,7 x 15,0 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05-0,6M) do mesmo tampão. B) Cromatografia da fração E2 em coluna de Sephadex G-75 (1,0 x 100 cm), equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. C) Cromatografia da fração E2G2 em coluna Benzamidina Sepharose (20 x 15cm). As amostras foram eluídas com tampão glicina a 50 mM pH 3,0, num fluxo de 20 mL/h, a temperatura ambiente. Frações de 3 mL foram coletadas.

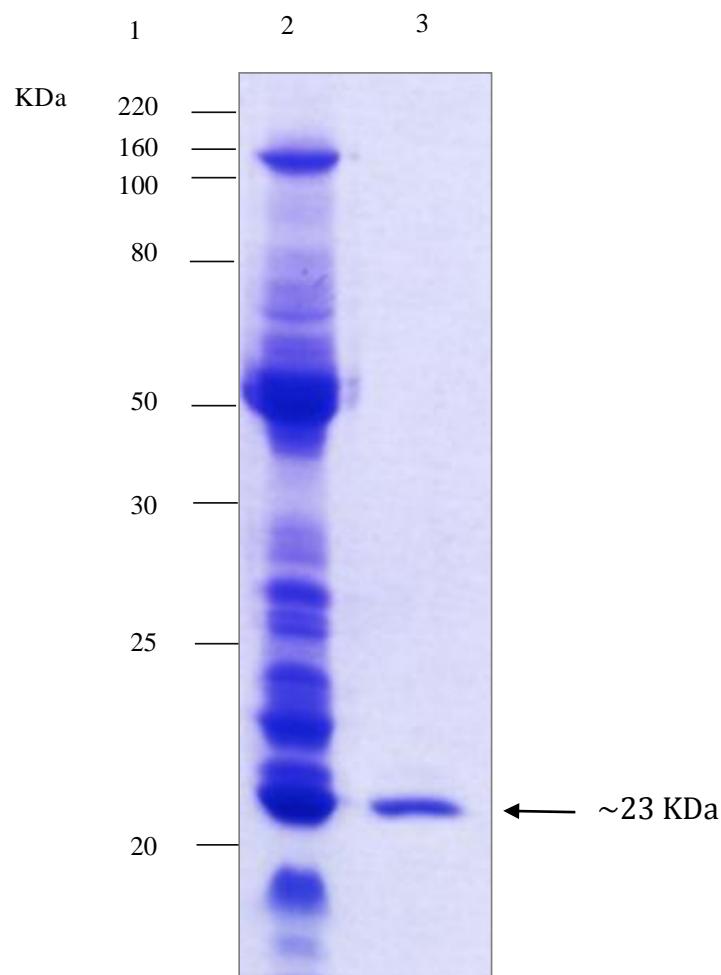


Figura 11: Eletroforese unidimensional (1D) em gel de poliacrilamida a 12% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e da enzima BmooMP α -I. 1- Massas moleculares de referência. 2- Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*. 3- Enzima BmooMP α -I em condições não-redutoras. Foram aplicados 20 μ L contendo 5 μ g de cada amostra no SDS-PAGE.

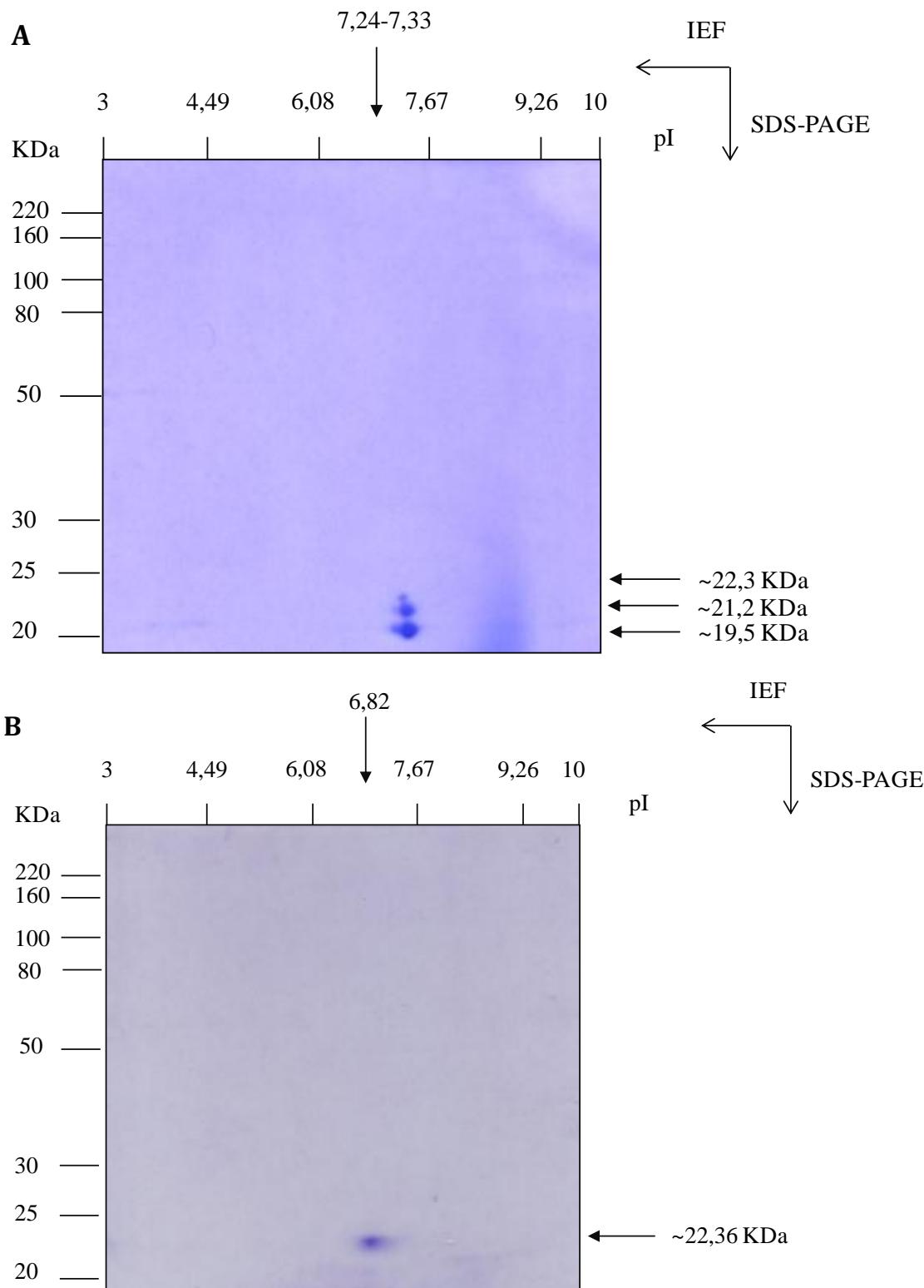


Figura 12: Eletroforese bidimensional (2D) em gel de poliacrilamida a 12% com agentes desnaturantes. **A)** Enzima BmooMP α -I em condições redutoras (na presença de DTT 40 mM, tiouréia 2M). **B)** Enzima BmooMP α -I em condições não-redutoras (na ausência de 40mM, tiouréia 2M). A análise dos géis 2D foi realizada utilizando o software *ImageMaster 2D Platinum* 7 (GE, Healthcare, Uppsala, Suécia).

5.2 Produção, Titulação e Purificação de anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I

A reatividade específica dos anticorpos de coelhos contra a protease BmooMP α -I foi confirmada pela reação positiva de ELISA em amostra de soro obtida em sangria de prova, com índice de reatividade de 5,4 (dados não mostrados). Após a confirmação da reatividade específica das imunoglobulinas G, as amostras de soro de coelhos foram fracionadas por cromatografia de afinidade utilizando a resina Proteína A Sepharose. Como demonstrado na Figura 13, a partir do perfil obtido, foram eluídas com tampão Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,5 as proteínas plasmáticas não ligantes na resina (Pico 1), enquanto que foram eluídas com tampão ácido (0,1M glicina-HCl, pH = 3,0) as IgGs anti-BmooMP α -I (Pico 2). Imediatamente após a coleta, as frações obtidas foram neutralizadas com tampão Tris 1M, pH=8 para a proteção do estado nativo destas imunoglobulinas.

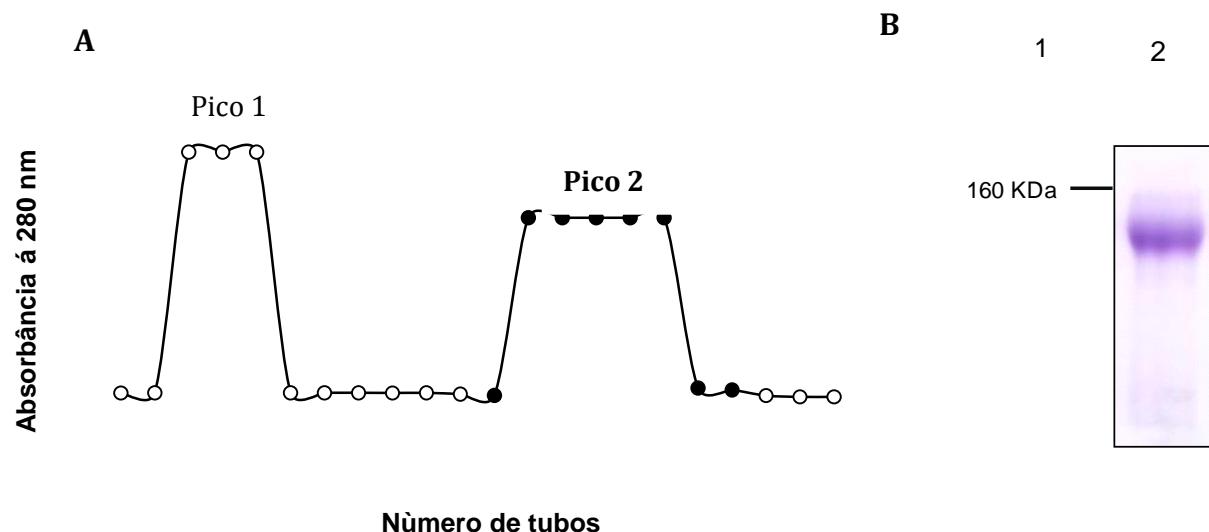


Figura 13. Fracionamento de amostra de soro de coelhos da raça Nova Zelândia por cromatografia de afinidade em resina Proteína A Sepharose para obtenção das imunoglobulinas da classe IgG. **A)** A amostra com proteínas plasmáticas não ligantes (Pico 1) e anticorpos policlonais da classe IgG anti-BmooMP α -I (Pico 2). As amostras foram eluídas num fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3 mL foram coletadas. **B)** SDS-PAGE 8% (w/v). Linha: 1-Padrão de massa molecular; 2- IgG anti-BmooMP α -I.

Após a purificação dos anticorpos policlonais, foi realizada a titulação das imunoglobulinas G obtidas das amostras de soro de coelhos pelo método ELISA (Figura 14). A diluição ótima dos anticorpos policlonais foi avaliada de acordo com os índices da fórmula: S/R (razão entre a média de D.O dos soros controles positivos e negativos) x 100 foi de 1:400 e do conjugado imunoenzimático 1:1000.

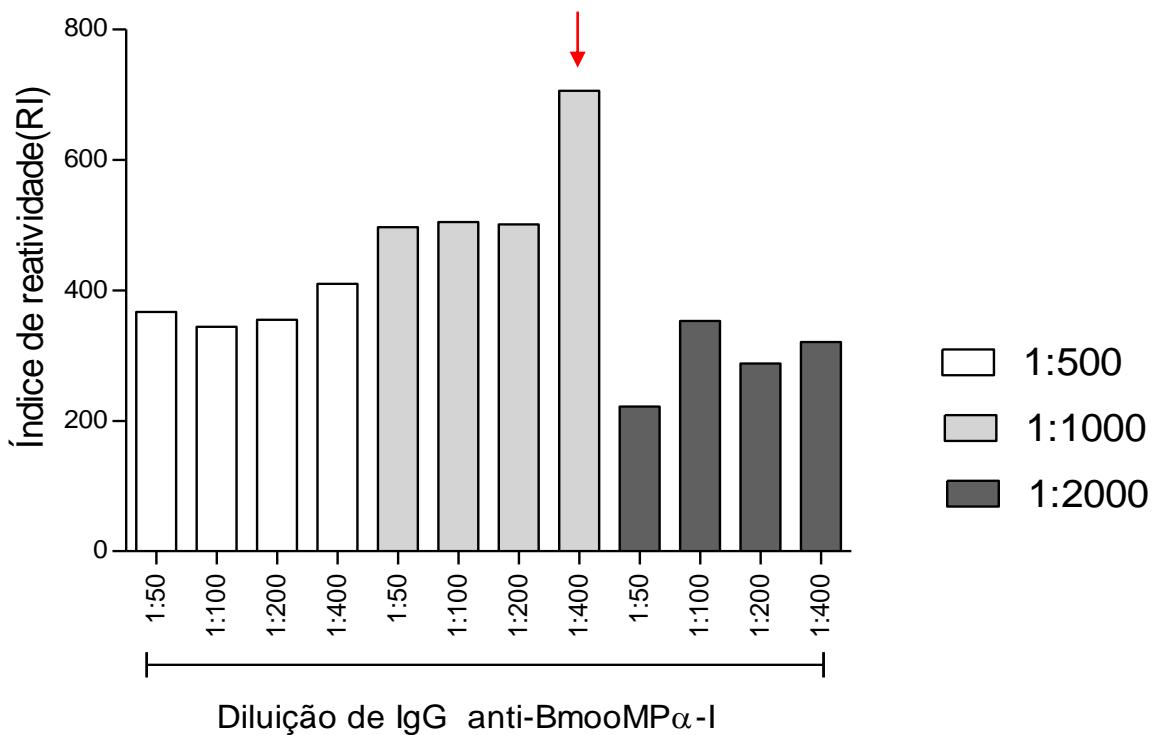


Figura 14: Resultado do ensaio ELISA indireto para a titulação das imunoglobulinas G obtidas a partir da purificação em resina de Proteína A Sepharose em amostras do soro de coelhos imunizados com a enzima BmooMP α -I. IgG anti-BmooMP α -I foi diluída na razão 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 (v/v) e incubada com conjugado (IgG de cabra anti-IgG de coelho – Peroxidase) diluído na razão de 1:500 (representado pelas colunas brancas), 1:1000 (representado pelas colunas cinzas) e 1:2000 (representados pelas colunas cinza escuro). O índice de reatividade foi calculado de acordo com a fórmula: S/R (razão entre a média de D.O dos soros controles positivos e negativos) x 100. A seta vermelha indica as condições ótimas de diluição estabelecidas neste ensaio.

5.3 Immunoblot

A análise das marcações antigênicas utilizando programa computacional de imagens Kodak 1D e comparadas com marcadores de massa molecular em KDa demonstraram que os anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I purificados em resina de proteína A possuem uma reatividade cruzada específica com as bandas de massa molecular de ~45 KDa, ~25 KDa, ~14 KDa presentes na peçonha bruta de *B. moojeni* e uma reação de alta especificidade entre o antígeno e anticorpos testados (enzima BmooMP α -I/anticorpos policlonais anti- BmooMP α -I), revelada pela coloração intensa da banda protéica da enzima no *Immunoblotting*. Na reação controle os mesmos抗ígenos foram incubados com IgG irrelevante de coelho e não apresentaram nenhuma marcação antigênica (Figura 15).

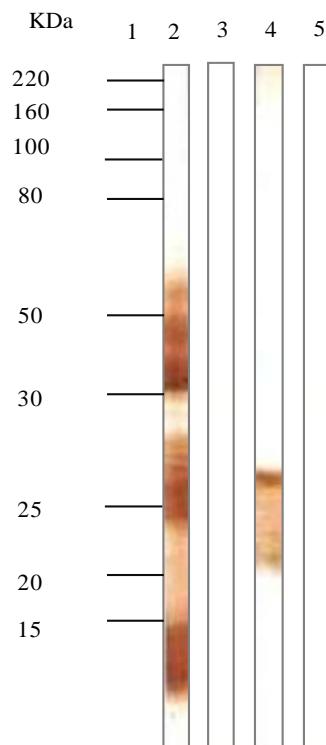


Figura 15: *Immunoblot* de抗ígenos peçonha bruta de *B. moojeni* e enzima BmooMP α -I testados com anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I purificados em resina de proteína A. Linha 1 - Marcadores de massa molecular de 220 KDa a 15 KDa. Linha 2 - 15 μg de peçonha bruta de *B. moojeni* incubados com IgG anti-BmooMP α -I. Linha 3 - 15 μg de peçonha bruta de *B. moojeni* incubados com IgG irrelevante de coelho. Linha 4 - 15 μg de BmooMP α -I incubados com IgG anti-BmooMP α -I. Linha 5 - 15 μg de BmooMP α -I incubados com IgG irrelevante de coelho.

5.4 Ensaio de neutralização

No ensaio de neutralização da atividade azoproteolítica induzida pela peçonha bruta de *B. moojeni* e metaloprotease BmooMP α -I pelos anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I, observou-se que anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I foram capazes de neutralizar a atividade azoproteolítica induzida pela peçonha bruta em 22% para a razão 1:5, 24% para a razão 1:10 e 30% para razão 1:15 (Figura 16A-B).

Quando os anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I foram incubados com enzima pura BmooMP α -I, estes foram capazes de neutralizar a atividade azoproteolítica induzida pela metaloprotease em 67% para a razão 1:5, 90% para a razão 1:10 e 100% para razão 1:15 (Figura 16C-D).

Foi observado que anticorpos policlonais possuem uma atividade inibitória dose-dependente, ou seja, a porcentagem de neutralização aumenta de acordo com o acréscimo em massa de anticorpos policlonais em relação aos抗ígenos, e são específicos e biologicamente ativos contra a enzima BmooMP α -I, a partir da qual foram originados.

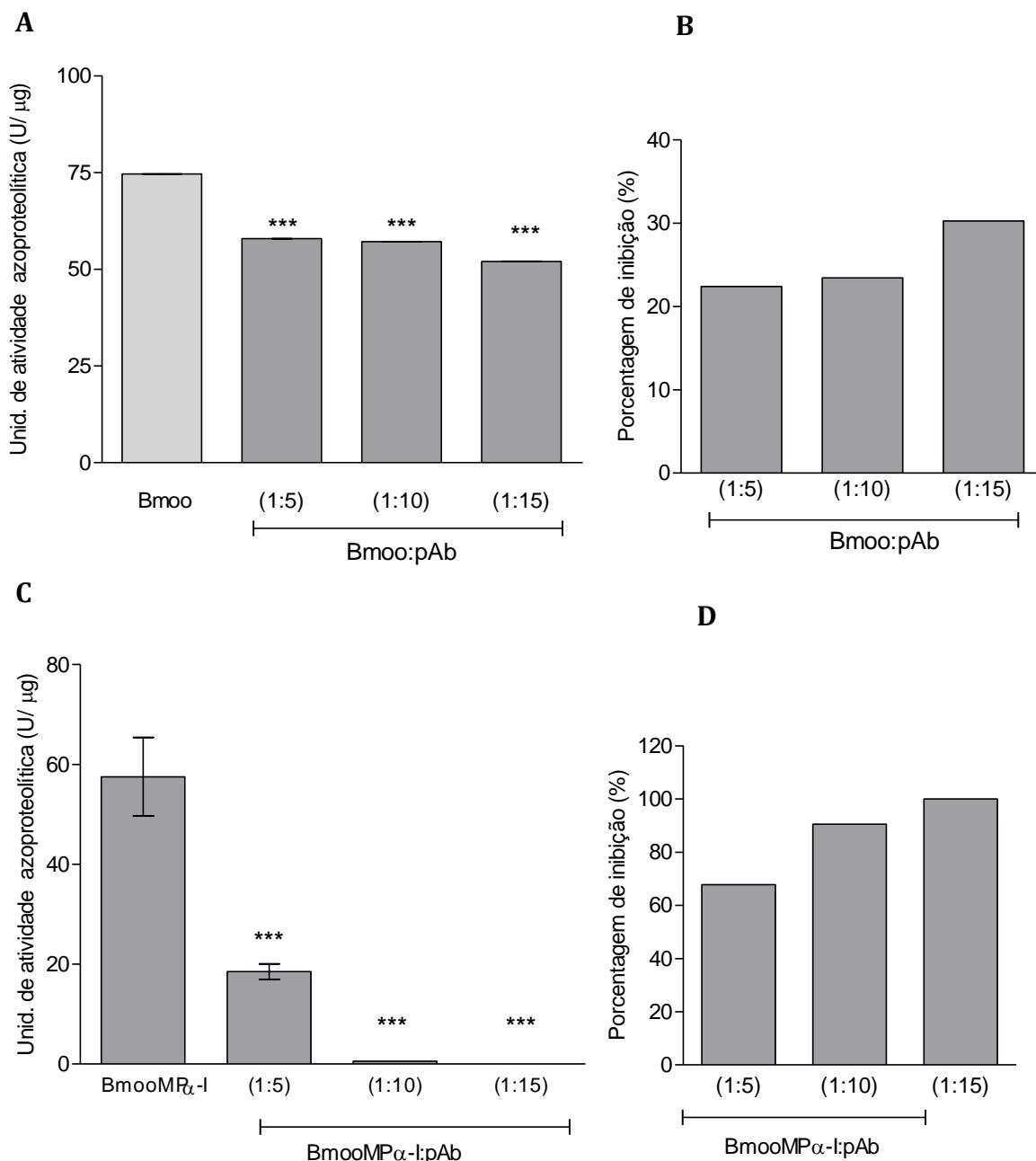


Figura 16: Neutralização da atividade azoproteolítica pelos anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I. **A)** Proteólise da azocaseína pela peçonha bruta de *B. moojeni* (10 μ g) e com a mesma massa pré-incubada com anticorpos policlonais na razão de 1:5, 1:10 e 1:15 (m/m) por 120 min. a 37°C. Atividade proteolítica foi testada no substrato azocaseína por 60 mim. **B)** Porcentagem de inibição da atividade azocaseinolítica da peçonha bruta de *B. moojeni* pelos anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I na razão de 1:5, 1:10 e 1:15 (m/m). **C)** Proteólise da azocaseína pela enzima BmooMP α -I (50 μ g) e da mesma massa desta enzima pré-incubada com anticorpos policlonais BmooMP α -I na razão de 1:5, 1:10 e 1:15 (m/m) por 120 min. a 37°C. Atividade proteolítica foi testada no substrato azocaseína por 60 mim. **D)** Porcentagem de inibição da atividade azocaseinolítica da enzima BmooMP α -I pelos anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I na razão de 1:5, 1:10 e 1:15 (m/m). * indica relevância estatística ($p<0,05$) em relação ao controle não tratado (teste One-Way ANOVA seguido por análise posterior pelo teste de Bonferroni. N amostral: 3.

5.5 Indução da inflamação peritoneal

A contagem do número de células peritoneais totais dos grupos: controle (PBS estéril), tioglicolato 3%, tioglicolato 3% tratados 24 horas depois com 50 µg de BmooMP α -I e tratados somente com 50 µg de BmooMP α -I estimulados via i.p, revelou um maior número de células peritoneais no grupo tratado com tioglicolato 3% (média de células peritoneais totais $2902 \times 10^4 / mL$) em comparação com o grupo controle (média de células peritoneais totais $765 \times 10^4 / mL$) (Figura 17). O grupo estimulado com tioglicolato 3% e tratado com BmooMP α -I reduziu a média de células totais para $558 \times 10^4 / mL$ (80% a menos de migração celular tendo como referência o grupo tioglicolato - dado não mostrado) e quando administramos somente a enzima BmooMP α -I temos uma média de células totais de $125 \times 10^4 / mL$ (95% a menos de migração celular tendo como referência o grupo tioglicolato - dado não mostrado).

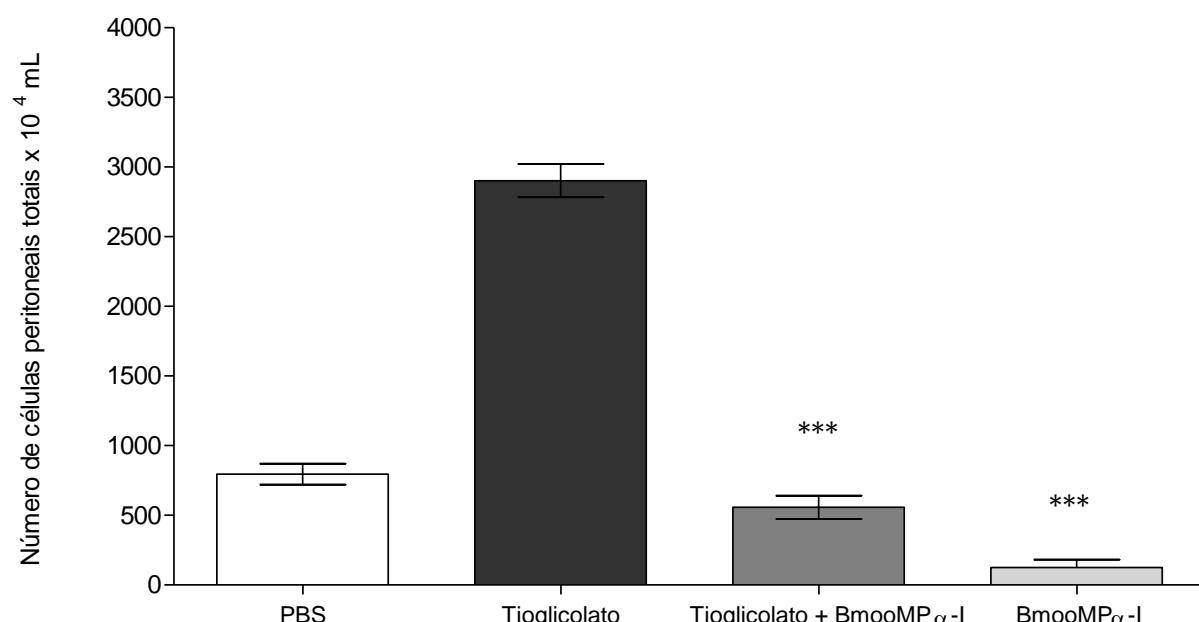


Figura 17: Influxo celular na cavidade peritoneal dos camundongos após os diferentes estímulos. Grupos de camundongos (5 animais por grupo) foram injetados com PBS estéril (controle); tioglicolato 3%; tioglicolato 3% 24 horas depois tratados com 50 µg de BmooMP α -I; e BmooMP α -I (50 µg) injetados na cavidade peritoneal dos camundongos em um volume final de 1mL. O número total de células peritoneais foi determinado pela lavagem da cavidade peritoneal 72 h após os tratamentos estabelecidos para os diferentes grupos. * indica relevância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle não tratado (teste One-Way ANOVA seguido por análise posterior pelo teste de Bonferroni).

5.6 Ensaio de degradação de TNF- α murino

Os níveis de TNF- α foram mensurados pelo ensaio ELISA para se determinar o efeito da metaloprotease BmooMP α -I na degradação de TNF- α murino, a partir dos seguintes tratamentos: enzima pura (BmooMP α -I); BmooMP α -I inibida por EDTA (BmooMP α -I (i)); e BmooMP α -I neutralizada com anticorpos policlonais (BmooMP α -I (pAb)), em comparação com amostras tratadas contendo concentração conhecida de TNF- α tratada apenas com PBS.

Como demonstrado na Figura 18, a metaloprotease BmooMP α -I e suas variáveis não causaram nenhuma alteração significativa nos níveis de TNF- α murino quando as amostras dos diferentes tratamentos foram pré-incubadas com o anticorpo de captura. No entanto, quando as amostras contendo concentração conhecida de TNF- α murino foram pré-incubadas com as amostras de BmooMP α -I resultou em uma diminuição significativa nos níveis de TNF- α em 53% em relação ao controle. BmooMP α -I inibida com EDTA praticamente não degradou TNF- α diminuindo seus níveis em apenas 17% e os anticorpos policlonais não neutralizaram o efeito de degradação da enzima BmooMP α -I sobre TNF- α .

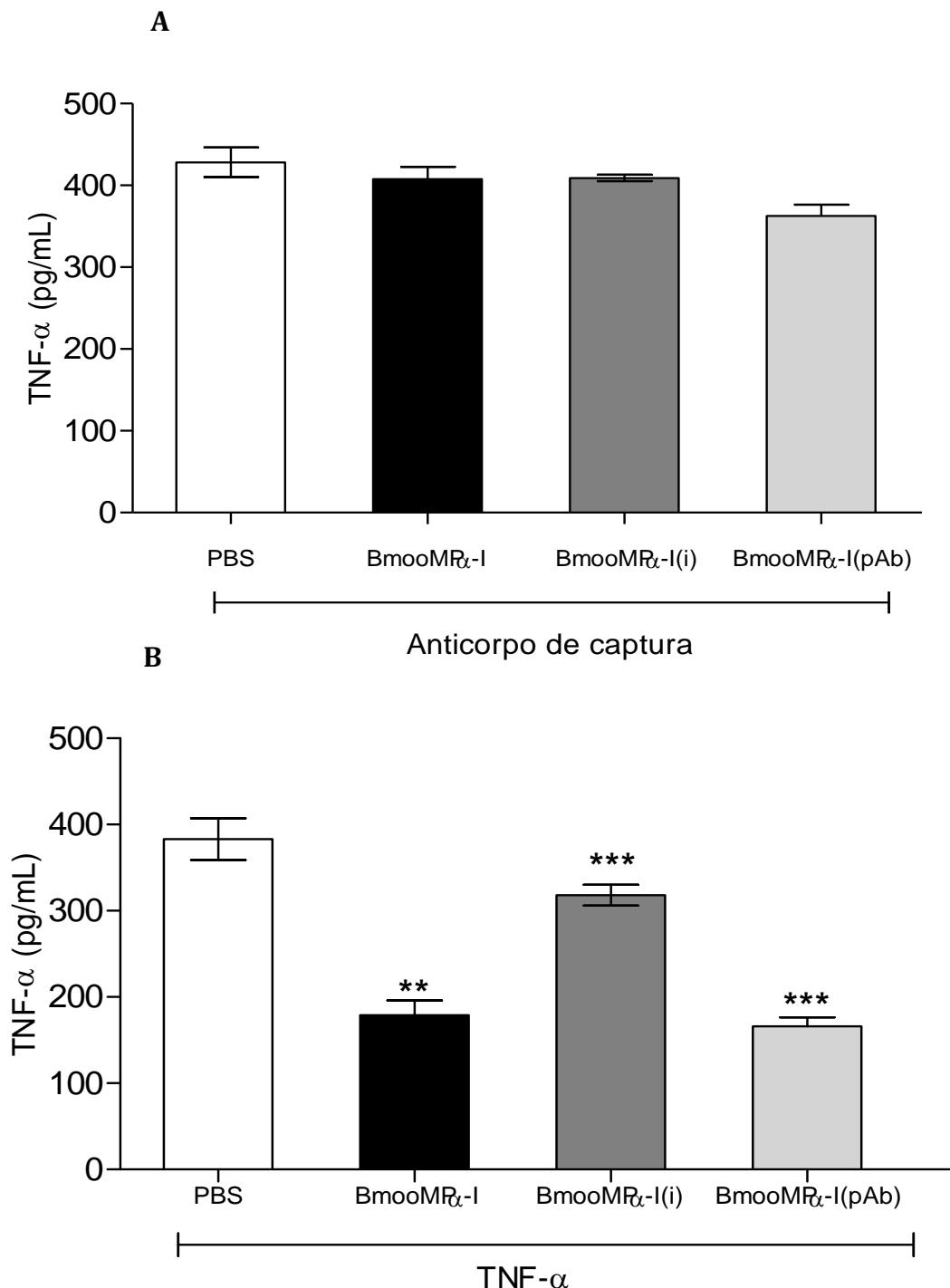


Figura 18: Degradação de TNF- α murino recombinante pela metaloprotease BmooMP α -I. **A)** Níveis de TNF- α determinados após a pré-incubação do anticorpo de captura com 12 μ g/mL de BmooMP α -I ou BmooMP α -I tratada com 10 mM EDTA (BmooMP α -I (i)) ou BmooMP α -I tratada com anticorpo policlonal na razão 1:10 m/m (BmooMP α -I(pAb)) por 45 mim a 37°C. **B)** Níveis de TNF- α determinados após a pré-incubação do TNF- α murino recombinante com 12 μ g/mL de BmooMP α -I ou BmooMP α -I tratada com 10 mM EDTA (BmooMP α -I (i)) ou BmooMP α -I tratada com anticorpo policlonal na razão 1:10 m/m (BmooMP α -I(pAb)) por 45 mim a 37°C. TNF- α murino recombinante foi quantificado por kit ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Resultados foram apresentados por média \pm SD. * indica relevância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle não tratado (teste One-Way ANOVA seguido por análise posterior pelo teste de Bonferroni. N amostral: 5.

5.7 Atividade proteolítica da enzima BmooMP α -I sobre TNF- α murino

A enzima BmooMP α -I foi capaz de hidrolisar o TNF- α murino sendo a atividade proteolítica caracterizada pelo desaparecimento da cadeia 1 (17,8 KDa) e cadeia 2 (18,9 KDa) do TNF- α murino após 45 minutos de incubação a 37 °C (Figura 19A).

A análise do SDS-PAGE 18% pelo programa Kodak demonstrou uma proteólise da enzima BmooMP α -I sobre o TNF- α murino de uma forma dose dependente. Como pode ser observado na Figura 19B, na maior na concentração de BmooMP α -I (12 μ g/mL), uma alta atividade proteolítica evidenciada pela diminuição da intensidade da banda de TNF- α em torno de 94% para cadeia 1 (17,8 KDa) e 91% para a cadeia 2 (18,9 KDa); na concentração intermediária de BmooMP α -I (6 μ g/mL), observamos que a proteólise ainda é significativa, em torno de 90% para cadeia 1 (17,8 KDa) e 70% para a cadeia 2 (18,9 KDa); e na menor concentração de BmooMP α -I (3 μ g/mL), ocorre uma redução na atividade proteolítica, resultando em uma degradação de 40% para cadeia 1 (17,8 KDa) e 37% para a cadeia 2 (18,9 KDa) e os níveis de intensidade da banda próximos ao controle (TNF- α na ausência de BmooMP α -I).

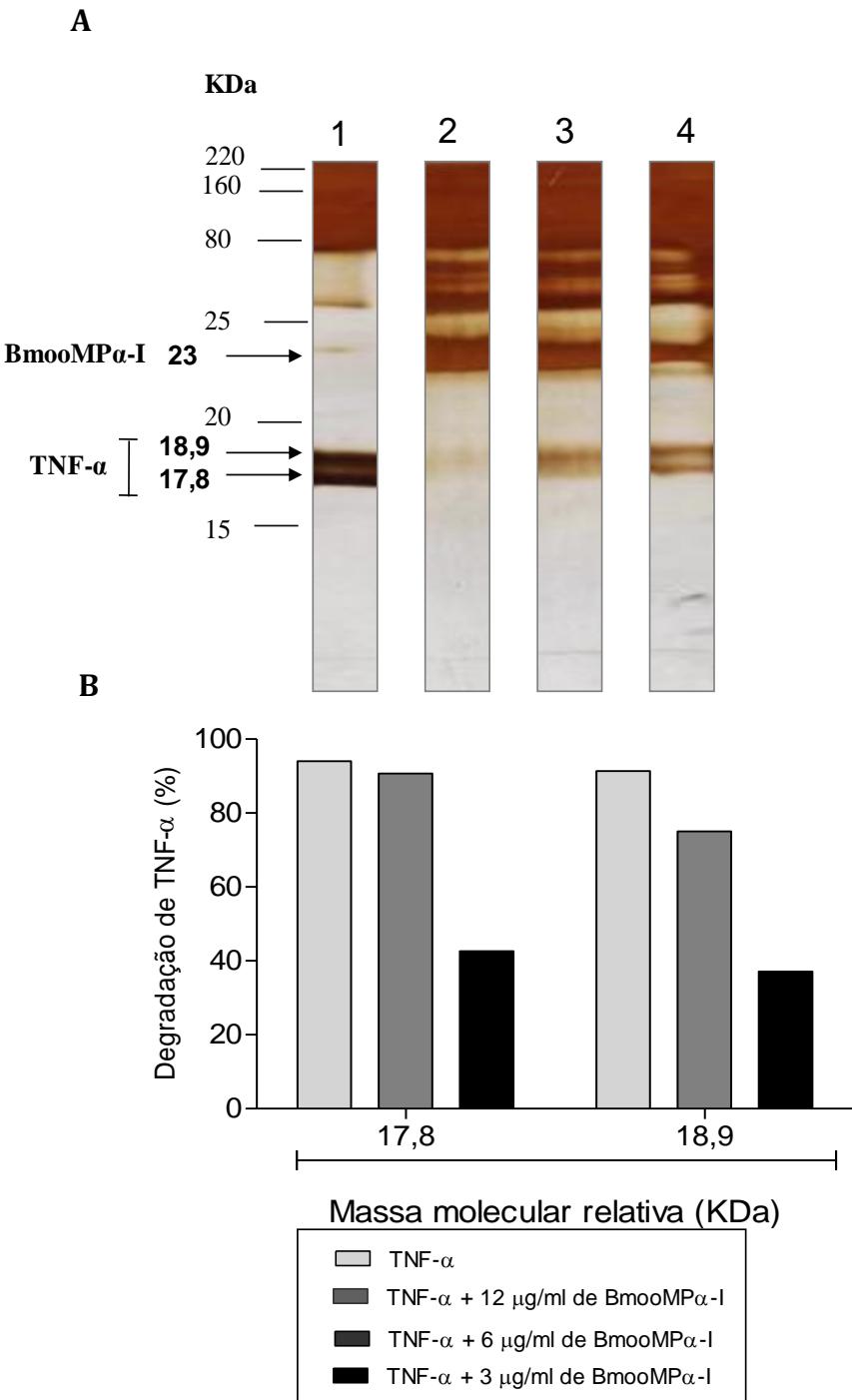


Figura 19: A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 18% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise de TNF- α (0,7 ng) resultante da ação da enzima BmooMP α -I (12, 6 e 3 μ g/mL). 1 - TNF- α controle; 2 a 4 - TNF- α incubado com 12, 6 e 3 μ g/mL de BmooMP α -I por 45 min a 37°C., respectivamente. Foram aplicados 20 μ L de cada amostra no SDS-PAGE. B) Porcentagem de degradação de TNF- α por diferentes concentrações de BmooMP α -I, determinada pela intensidade da banda das amostras tratadas em relação ao controle versus massa molecular relativa de TNF- α .

5.8 Análise da viabilidade celular dos macrófagos ativados

A análise da viabilidade celular dos macrófagos ativados com agonistas de receptores do tipo *Toll* (FSL-1 e LPS) e NOD1 (IE) tratados com a BmooMP α -I examinadas método do MTT revelou que os macrófagos apresentaram-se 100% viáveis após a ativação com os agonistas e tratamento com a enzima BmooMP α -I. Portanto, os agonistas e a enzima BmooMP α -I não exercem efeito citotóxico sobre os macrófagos (Figura 20).

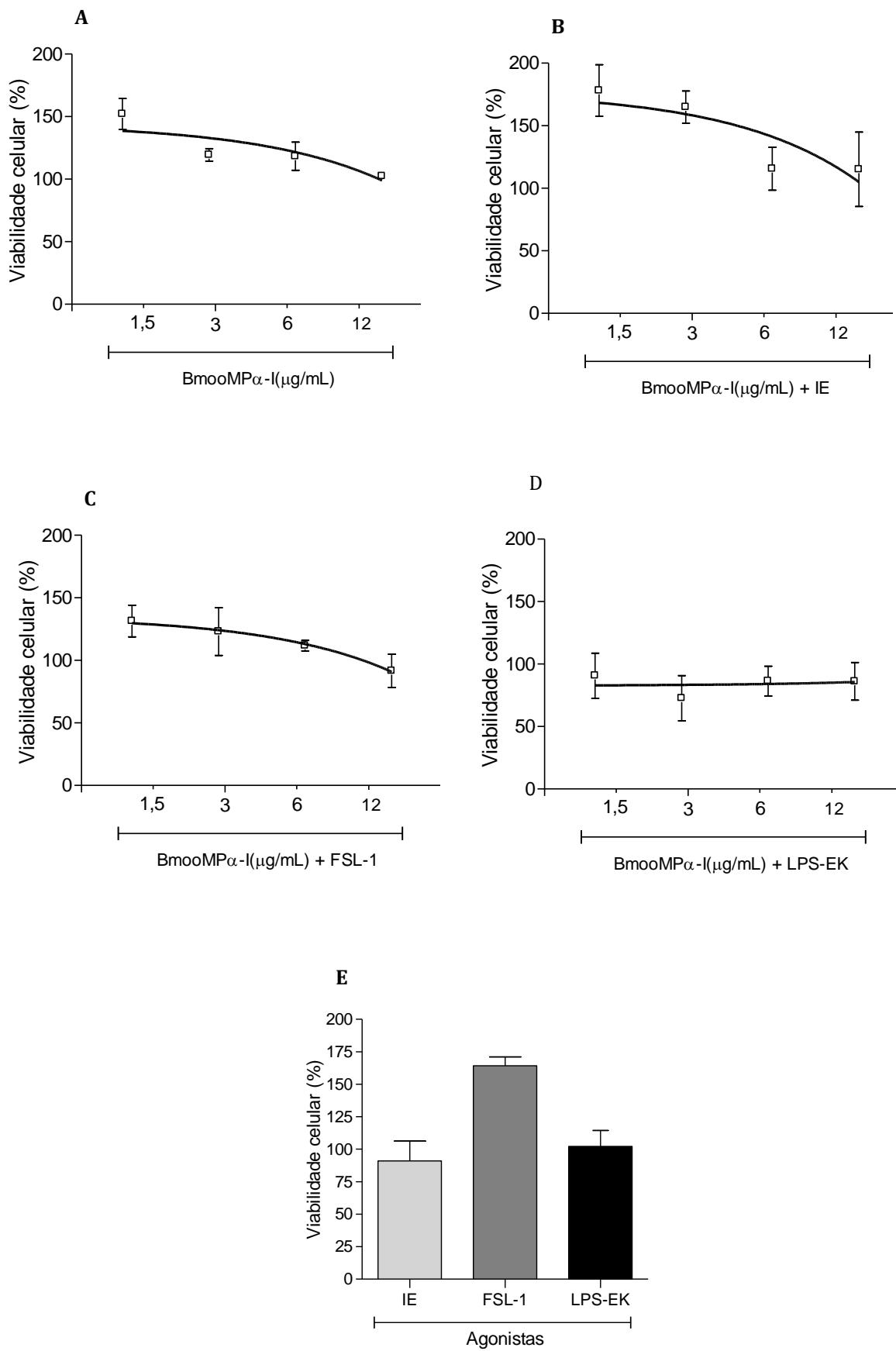


Figura 20: A análise da viabilidade celular dos macrófagos ativados com os agonistas de PRRs e tratados com enzima BmooMP α -I. **A)** Viabilidade celular dos macrófagos após a incubação com a enzima BmooMP α -I. **B)** Viabilidade celular dos macrófagos após a ativação com 10 μ g/mL de FSL-1–agonista de Toll-6/2 e incubação com a enzima BmooMP α -I (12 a 1,5 μ g/mL). **C)** Viabilidade celular dos macrófagos após a ativação com 1 μ g/mL de IE–agonista de NOD/1 e incubação com a enzima BmooMP α -I (12 a 1,5 μ g/mL). **D)** Viabilidade celular dos macrófagos após a ativação com 1 μ g/mL de LPS-EK–agonista de Toll-4 e incubação com a enzima BmooMP α -I (12 a 1,5 μ g/mL). **E)** Viabilidade celular dos macrófagos após a ativação com 1 μ g/mL de IE, 10 μ g/mL de FSL-1 e 1 μ g/mL de LPS-EK e meio de cultivo celular (RPMI). Macrófagos foram cultivados por 24 horas em placas de 96 poços (2×10^5 células/200 μ L/poço), em seguida foram ativados com PRRs ou mantidos com o meio RPMI (controle) e cultivados em condições de cultura por 3h. Após a ativação foram tratados com a protease BmooMP α -I (12 a 1,5 μ g/mL) ou mantidos com o meio RPMI (controle) por 48 horas em condições de cultura. A quantificação das células viáveis foi determinada utilizando-se o ensaio MTT após 48 horas incubação. Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da porcentagem de células viáveis em relação ao controle e estão plotados em uma regressão não linear representados por uma curva dose resposta com intervalo de 95% de confiança. N amostral: 4

5.9 Determinação dos níveis de TNF- α secretados por macrófagos ativados com agonistas de PRRs.

A análise dos níveis de TNF- α secretado por BMDMs após a ativação com agonistas de PRRs (FSL-1, IE e LPS-EK) e tratamento com diferentes concentrações da enzima BmooMP α -I (12 μ g/mL) revelou que no sobrenadante dos macrófagos ativados com FSL-1, a metaloprotease BmooMP α -I na concentração de 12 e 6 μ g/mL modula negativamente a produção de TNF- α , sendo que na concentração de 12 μ g/mL a citocina TNF- α detectada em baixíssima concentração 0,041 ng/mL e na concentração de 6 μ g/mL tem sua concentração ligeiramente aumentada 47,4 ng/mL, contudo ainda é bem menor quando comparada ao controle (FSL-1 somente com meio, na ausência da enzima) com concentração de 660 ng/ mL de TNF- α (Figura 21). Nas menores concentrações testadas (3 e 1,5 μ g/mL), a metaloprotease BmooMP α -I modula positivamente a produção de TNF- α , elevando sua concentração para 840 ng/mL e 1773 ng/mL, respectivamente.

Já no sobrenadante dos macrófagos ativados com LPS-EK, observamos que a enzima BmooMP α -I modula negativamente a produção de TNF- α em todas as concentrações testadas (12 a 1,5 μ g/mL) com uma mesma intensidade, ou seja, a diminuição dos níveis de TNF- α secretado por macrófagos ativados por LPS-EK não é um fenômeno dose resposta. Os níveis de TNF- α do grupo controle reduziu de 34,9 ng/mL para 20,4 ng/mL no grupo tratado com a enzima BmooMP α -I. O agonista IE não induziu níveis significativos de TNF- α (Figura 21).

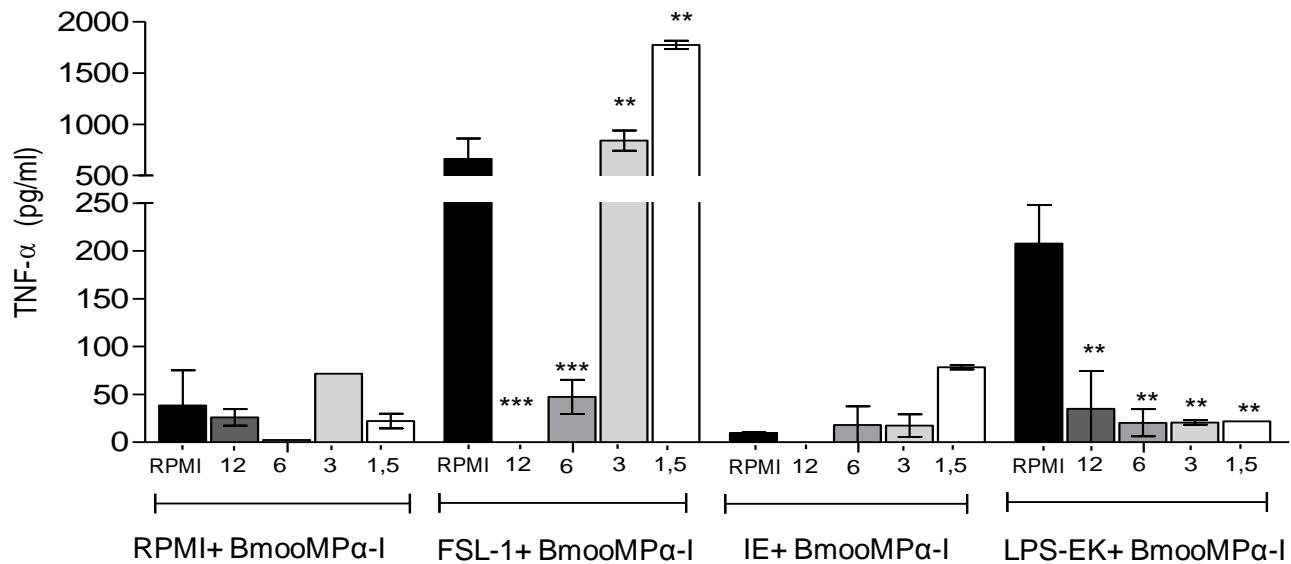


Figura 21: Efeito da enzima BmooMP α -I sobre secreção de TNF- α pelos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) ativados pelos agonistas de PRRs. Macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços (2×10^5 céls/200 μ L/poço) e após 24 horas foram ativados com 10 μ g/mL de FSL-1–agonista de Toll-6/2, 1 μ g/mL de IE–agonista de NOD/1, e 1 μ g/mL de LPS-EK– agonista de Toll-4, respectivamente ou mantidos com o meio RPMI (controle), a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida foram tratados com a protease BmooMP α -I (12 a 1,5 μ g/mL) ou mantidos com o meio RPMI (controle), a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 horas. TNF- α murino foi quantificado por kit ELISA de acordo com as instruções do fabricante. Resultados foram apresentados por média \pm SD. * indica relevância estatística ($p < 0,05$) em relação ao controle não tratado (Teste two-Way ANOVA seguido por análise posterior pelo teste de Bonferroni). N amostral: 4.

6. DISCUSSÃO

Peçonhas produzidas por serpentes constituem complexos moleculares com diferentes atividades biológicas, direcionadas para diversos alvos. Em relação à peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, particularmente, a atividade biológica mais evidente é proteolítica, sendo a principal responsável pelas manifestações clínicas dos acidentes botrópicos (FONSECA *et al.*, 2010). Desta forma, no presente estudo, o interesse foi focalizado neste grupo de moléculas.

O trabalho proposto teve por objetivo obter e analisar a enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease isolada da peçonha de *B. moojeni*, quanto a exercer algum papel na resposta inflamatória em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, considerando que até o momento não há dados na literatura sobre o papel desta enzima na inflamação.

Inicialmente, a metaloprotease BmooMP α -I, foi isolada da peçonha bruta da serpente *B. moojeni* de acordo com o procedimento descrito anteriormente. O uso combinado de resinas cromatográficas com propriedades distintas tem se mostrado muito eficiente nos processos de purificação de proteínas a partir peçonha de *B. moojeni*, como relatado em diversos estudos anteriores, nos quais foram isolados vários componentes com diferentes características bioquímicas e funções biológicas, como por exemplo, a metaloprotease Moo-4.2 de massa molecular de 27.6 KDa e atividade fibrinogenolítica (TORRES *et al.*, 2005); a miotoxina BmTx com massa molecular de 15.7 KDa (FRANÇA, 2005); a serinoprotease, BthT1, com massa molecular aparente de 36 KDa com atividade tipo "trombin-like" (OLIVEIRA, 2001); a fosfolipase A₂ ácida, denominada BmooPLA₂ de massa molecular aparente de 15.5 KDa (SANTOS FILHO, *et. al.*; 2008); a metaloprotease BthMP com massa molecular de 23.5 kDa e atividade hemorrágica (GOMES *et al.*, 2009); a metaloprotease BmooMP α -II massa molecular aparente de 25kDa atuando como um potente inibidor da agregação plaquetária (QUEIROZ, 2010); e a metaloprotease moozincina de massa molecular aparente de 30 KDa e atividade fibrinogenolítica (FONSECA, 2010).

A enzima BmooMP α -I corresponde a 8,71% da peçonha total de *B. moojeni* (BERNARDES *et al.*, 2008), constituindo-se na expressão mais significativa do total deste complexo protéico quando comparada a outras enzimas fibrinogenolíticas isoladas da mesma peçonha, como as enzimas MSP1(0,5%)/MSP2(1,1%) (SERRANO *et al.*, 1993), MOO3 (1,42 %) (OLIVEIRA *et al.*, 1999), BthMP (2,3%) (GOMES *et al.*, 2009) e BmooMP α -II (0,9%) (QUEIROZ, 2010).

No presente estudo, a análise do perfil eletroforético por eletroforese 1D e 2D permitiu evidenciar que a metaloprotease BmooMP α -I é constituída de uma proteína monomérica em condições não-redutoras, com *Mr* de ~22,36 e *pI* 6,82. Em condições redutoras, na presença de

Maraisa Cristina Silva

DTT e tiouréia, a eletroforese 2D evidenciou que a enzima BmooMP α -I pode ser dissociada em trímeros, com Mr decrescente de ~22,3 KDa, ~21,2 KDa e ~19,5 KDa, com um pI na faixa de 7,24 a 7,33. A formação do trímero proteíco ocorre devido a ação conjunta dos componentes DTT e tiouréia sobre as estrutura tridimensional da protease. O DTT atua como um agente redutor quebrando as pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas, já a tiouréia atua como um agente caotrópico, ou seja, um composto químico capaz de desenovelar a estrutura da proteína, por meio da desestabilização e desorganização das ligações ou interações mantidas entre as cadeias laterais responsáveis por manter sua estrutura tridimensional (MUSANTE *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2010).

A administração do soro antiofídico é a única forma de tratamento clínico para os acidentes ofídicos. No entanto, a literatura demonstra que pacientes submetidos à soroterapia tiveram um retorno dos níveis hemostáticos 6 horas após sua administração, ou seja, os anticorpos policlonais foram capazes de neutralizar as principais toxinas presentes na peçonha e reverter os efeitos sistêmicos no organismo, mas a lesão local causada por estes peçonhas, não é neutralizada eficientemente pelo soro (CARDOSO *et al.*, 1993). Devido ao fato de a soroterapia ser pouco eficaz no tratamento das reações locais induzidas pelas peçonhas botrópicas, atualmente há uma procura por tratamentos complementares que possibilitem a melhora desse quadro. Uma alternativa para melhorar a eficácia deste tratamento seria enriquecer o soro antiofídico, com altos títulos de anticorpos direcionados a antitoxinas específicas responsáveis pelos efeitos deletérios (RODRIGUES *et al.*, 2001).

Com a finalidade de contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de neutralização dos efeitos fisiopatológicos causado pelas enzimas presentes na peçonha botrópica, produzimos e purificamos anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I e investigamos sua reação específica com o imunógeno a partir do qual foi produzido.

A análise funcional da IgG específica para BmooMP α -I, isolada a partir de soro de coelhos imunizados com a metaloprotease, revelou que esta enzima comporta-se como um bom imunógeno, uma vez que as amostras de soro obtidas na sangria de prova apresentaram uma reação positiva determinada pelo ensaio de ELISA, com alto índice de reatividade contra este antígeno (5,4).

Os anticorpos policlonais IgG anti-BmooMP α -I foram capazes de detectar outras bandas protéicas presentes na peçonha bruta de *B. moojeni*, além daquela correspondente à metaloprotease, demonstrando, assim, que há outros epítopos na peçonha bruta de *B. moojeni* com semelhança estrutural responsável por esta reatividade cruzada, provavelmente outras

Maraisa Cristina Silva

metaloproteases de seqüências semelhantes ou até mesmo homólogas a metaloprotease BmooMP α -I. No entanto, apesar de apresentarem está reatividade cruzada, as IgG anti-BmooMP α -I foram capazes de formar imunocomplexos com o imunógeno, evidenciando sua especificidade pela marcação de uma única banda protéica referente à enzima BmooMP α -I no ensaio *immunoblotting*.

Estudos anteriores demonstraram que os anticorpos policlonais produzidos contra proteínas isoladas possuem reatividade cruzada com peçonha bruta de diferentes espécies do gênero *Bothrops*. Queiroz e colaboradores (2011), descreveram a reatividade cruzada entre os anticorpos policlonais isolados de coelhos após imunização com a miotoxina BmooMtx , presente na peçonha de *B. moojeni*, com os抗ígenos miotóxicos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops leucurus* e *B. moojeni*.

No presente estudo, a análise do ensaio de neutralização da atividade azoproteolítica induzida pela peçonha de *B. moojeni* e a metaloprotease BmooMP α -I pelos anticorpos policlonais, confirmou a reatividade cruzada entre os compostos analisados. Na presença dos anticorpos policlonais, observou-se uma neutralização da atividade azoproteolítica induzida tanto pela peçonha bruta [30%, na razão 1:15 (m/m)], como pela enzima pura [100%, na razão 1:15(m/m)], o que caracteriza ser este fenômeno dependente da massa de anticorpos. Estes resultados sugerem que provavelmente os anticorpos anti-BmooMP α -I neutralizaram diferentes isoformas de metaloproteases presentes nessa peçonha, visto que estas proteínas apresentam semelhanças em seus domínios estruturais. Tal fenômeno foi também observado por Pinto e colaboradores (2008) no estudo de anticorpos policlonais isolados a partir de amostras de soro de camundongos imunizados com a metaloprotease neuwiedase, os quais foram capazes de neutralizar totalmente a atividade hemorrágica e os distúrbios na coagulação induzidos pela peçonha de *Bothrops neuwiedi*.

A lesão tecidual provocada pela inoculação da peçonha no organismo desencadeia uma cascata de eventos celulares que culminam em uma resposta inflamatória mediada pelas toxinas presentes na peçonha e mediadores endógenos. A resposta inflamatória está associada a uma variedade de componentes da peçonha, dentre os quais se incluem as metaloproteases. A migração leucocitária é o evento chave na inflamação, como defesa do organismo contra os agentes invasores (TEIXEIRA *et al.*, 2005)

No presente estudo, observamos que a metaloprotease BmooMP α -I, quando administrada na cavidade peritoneal de camundongos previamente tratados com tioglicolato 3% ou não, demonstrou uma redução significativa no acúmulo de infiltrado celular no grupo de

Maraisa Cristina Silva

animais estimulados com tioglicolato 3% e tratados com a metaloprotease BmooMP α -I e, um baixo acúmulo de infiltrado leucocitário induzido metaloprotease BmooMP α -I comparado aos grupos controles (PBS e tioglicolato 3%). Estes resultados sugerem que metaloprotease BmooMP α -I pode ser caracterizada como uma enzima que interfere na migração celular, apresentando um potencial papel anti-inflamatório, contraponto aos diversos estudos anteriores que demonstraram a presença de ações pró-inflamatórias em metaloproteases de serpentes.

A primeira evidência experimental que as metaloproteases de serpentes (SVMP) causam inflamação foi constatada por Gutiérrez e colaboradores (1995), que demonstraram que a metaloprotease BaP1 da classe PI, isolada da peçonha de *Bothrops asper* induz edema na pata de camundongo, uma pequena hemorragia após a sua administração intramuscular, formação de bolhas e acúmulo de infiltrado leucocitário. Posteriormente, Rucavado e colaboradores (1998, 1999, 2002) sugeriram que a ação pró-inflamatória de metaloproteases de serpentes está associada com degranulação de mastócitos e recrutamento de macrófagos, que liberam as citocinas IL-1 e IL-6. Fernandes e colaboradores (2006) confirmaram esta hipótese pela detecção de altos níveis de IL-1 no exsudado peritoneal de camundongos coletados após a injeção da BaP1 na cavidade peritoneal, além do aumento da expressão de moléculas de adesão.

As citocinas realizam sinalizações celulares por meio da aproximação de seus receptores específicos presentes na membrana celular que se associam as proteínas Janus quinases (JAKs). As JAKs iniciam uma cascata de fosforilação dos receptores de citocinas, acoplando o sinal de transdução e ativando os fatores de transcrição (STATs). Após a sua ativação, os STATs formam dímeros e são translocados para o núcleo, onde irão ativar determinados genes de transcrição específicos, que são traduzidos em moléculas específicas dependendo do estímulo inicial (PALMER, RESTIFO, 2009).

A produção de citocinas pró e anti-inflamatórias é controlada por um complexo mecanismo de *feedback*. As citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α) são responsáveis por iniciar um efeito contra um patógeno exógeno ou lesão tecidual. Em contraste, as citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-10) atuam na *down-regulation* da resposta inflamatória, ou seja, para o retorno a homeostase fisiológica (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Além da BaP1, outras SVMPs são capazes de induzir eventos inflamatórios. Rodrigues e colaboradores (2001) demonstraram a presença de leucócitos em cortes histológicos de músculos após a injeção de neuwiedase, uma metaloprotease hemorrágica da classe PI, isolada

Maraisa Cristina Silva

da peçonha de *B. neuwiedi*. Em adição, jararagina, uma metaloprotease hemorrágica da classe PIII, isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, foi capaz de induzir acúmulo de leucócitos na bolsa de ar de camundongos (COSTA *et al.*, 2002). Este efeito foi caracterizado como dependente da presença de macrófagos assim como da atividade proteolítica desta SVMP. Estudos posteriores mostraram que a jararagina pode estimular diretamente a expressão de mRNA que codifica para TNF- α , IL-1 e IL-6 secretado por macrófagos, sugerindo que os macrófagos são alvos importantes para SMPV, embora o ligação celular ainda não foi caracterizada (CLISSA *et al.*, 2001).

Em estudos adicionais, foi relatado que as metaloproteases HF3 da classe P-III, isoladas da peçonha de *B. jararaca* (SILVA *et al.*, 2004), assim como a peçonha bruta de *Bothrops alternatus* (SETUBAL *et al.*, 2011) estimulam a fagocitose de macrófagos, atividade essencial para eliminação da peçonha do organismo. Mais recentemente foi isolada a metaloprotease patagonofibrase da classe P-III, da peçonha da serpente sul americana *Philodryas patagoniensis* com funções semelhantes na resposta inflamatória (PEICHOTO *et al.*, 2011)

O fator de necrose tumoral (TNF- α) é uma citocina tipicamente pró-inflamatória. Diferentes células, principalmente macrófagos, linfócitos ou monócitos ativados, produzem TNF- α , geralmente em resposta aos lipolissacarídeos (LPS), os componentes da membrana de bactérias gram-negativas (VITALE, ANDRADE, RIBEIRO, 2007).

TNF- α é reconhecido por dois receptores distintos, TNF-RI (também referido como TNF-R1, TNFRSF1A, p55, p60 ou CD120a) e, TNF-RII (TNF-R2, TNFRSF1B, p75, p80 ou CD120b). *In vivo*, TNF-RI é o mediador da maioria das atividades induzidas por TNF- α , em contrapartida TNF-RII media preferencialmente efeitos ligados ao TNF- α de membrana (VERHELST, CARPENTIER, BEYEAERT, 2011).

TNF-RI contém um domínio de morte e TNF-RII contém um domínio de ligação associado ao fator TNF-R (TRAF), o qual media a ligação com diferentes proteínas de sinalização. Ambos os receptores ativam vias de sinalização similar, quinase I κ B e proteína quinase mitógeno ativada (MAPK), que resulta na ativação de fatores de transcrição como fator nuclear- κ B (NF- κ B) e AP-1, atuando na regulação da produção de moléculas efetoras como citocinas, quimiocinas e enzimas pró-inflamatórias (VERHELST, CARPENTIER, BEYEAERT, 2011).

Além disto, sua ativação gênica, TNF-RI pode direcionar a célula à morte pelo recrutamento de caspase, levando-a à apoptose, ou alternativamente a necrose e necroptose, vias dependentes de ativação de serina treonina quinases RIP1 (receptor interagindo com

proteína 1) e RIP3 (receptor interagindo com proteína 3) (VERHELST, CARPENTIER, BEYAERT, 2011).

Tendo em vista o papel essencial de TNF- α em promover a resposta imunológica e combater infecções, foi investigado no presente estudo se a enzima BmooMP α -I apresentava ou não alguma atividade sobre o TNF- α murino em modelos moleculares e modelo celular. Os níveis de TNF- α mensurados por ELISA relevaram uma significativa redução na concentração de TNF- α na presença da metaloprotease (12 μ g/mL) em relação aos níveis observados nos controles. A inibição da enzima BmooMP α -I pela incubação previa com EDTA foi capaz de restaurar em 80% os níveis de TNF- α e, a incubação com IgG específica a metaloprotease BmooMP α -I não foi capaz de neutralizar sua proteólise sobre o TNF- α . A fim de eliminar a possibilidade de uma interferência direta da enzima sobre os anticorpos de captura utilizados no ensaio ELISA, procedeu-se a uma incubação prévia destes anticorpos com a enzima, nas mesmas condições utilizadas para a incubação com o TNF- α . Os resultados revelaram que nenhuma ação da BmooMP α -I foi verificada sobre os anticorpos de captura, uma vez que, quando a enzima foi removida da placa, os níveis de TNF- α detectados no ensaio não apresentaram nenhuma alteração em relação ao ensaio quando esta citocina não havia sido pré-incubada com a BmooMP α -I.

A partir destes resultados, foi hipotetizado que a redução na concentração de TNF- α ocorre devido à ação proteolítica da enzima BmooMP α -I, uma vez que a remoção do zinco por agentes quelantes como EDTA ou 1-10-fenantrolina elimina completamente a atividade biológica das metaloproteases de peçonha de serpente (SVMPs) (MARKLAND, 1998). Em contrapartida, foi hipotetizado também que, provavelmente, os anticorpos policlonais anti-BmooMP α -I ligam-se em domínios diferentes do domínio catalítico da enzima BmooMP α -I responsável pela hidrólise de TNF- α .

Visando confirmar se a metaloprotease BmooMP α -I apresenta uma ação direta sobre o TNF- α , foi realizado um ensaio onde o efeito de proteólise sobre esta citocina pudesse ser evidenciado. Por meio da eletroforese 1D-SDS-PAGE 18% foi possível confirmar que a degradação de TNF- α pela metaloprotease BmooMP α -I ocorre de fato, como um fenômeno dose-dependente.

No presente estudo, foi evidenciado também o efeito da metaloprotease BmooMP α -I na degradação de TNF- α em modelo celular. Observou-se que metaloprotease BmooMP α -I exerce uma hidrólise de forma dose-dependente sobre o TNF- α secretado pelos macrófagos estimulados com os agonistas FSL-1 e LPS-EK.

Maraisa Cristina Silva

O LPS-EK é um ligante sintético (agonista) derivado da bactéria *Escherichia coli* e o FSL-1 é um ligante sintético derivado da lipoproteína de *Mycoplasma salivarium*, reconhecidos por *Toll-4* (TLR-4) e *Toll-6/2* (TLR-6/2), respectivamente, ou seja, são ativadores destas vias de sinalização. O reconhecimento de estruturas moleculares conservadas nos patógenos, conhecidas como PAMPs, por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs) nas células da imunidade inata promovem a base da defesa antimicrobiana (KECK, FREUDENBERG, HUBER, 2012). Cada TLR sozinho ou como heterodímeros ligados a um PAMP específico inicia sua cascata de sinalização celular baseada no seu ligante inicial, direcionando a produção de mediadores endógenos, incluindo diversas citocinas, espécies reativas do oxigênio, MHC e moléculas coestimulatórias necessárias a uma apresentação antigênica eficiente (ROSE, MCGOWIN, PYLES, 2009)

O lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina é o principal componente estrutural das bactérias Gram-negativas, composto por três domínios distintos: lipídeo A, cadeia principal de oligossacarídeos, e antígeno O. De todos os três domínios, o antígeno O é mais importante na determinação das cepas das bactérias gram-negativas e reconhecimento pelo sistema imune. A secreção de citocinas pró-inflamatórias ocorre após a interação inicial entre LPS e TLR-4, presente nas células apresentadoras de抗ígenos, como macrófagos e células dendríticas. Após a ativação de TLR-4, ocorre uma cascata de sinalização que conduz ao fator de transcrição NF-κB, resultando na produção de citocinas inflamatórias, tais como TNF-α, IL-1B, e IL-12p70. Em conjunto, essas citocinas inflamatórias são responsáveis pela resposta inflamatória sistêmica observada durante o choque séptico (SHANMUGAM *et al.*, 2012).

Os micoplasmas são as menores bactérias de auto-replicação e geralmente são parasitas comensais em humanos. *M. salivarium* preferencialmente reside em placas dentárias e sulcos gengivais, 60 a 80% das amostras da garganta dos adultos, e freqüentemente encontrado em amígdalas inflamadas (GRISOLD *et al.*, 2008).

A diminuição nos níveis de TNF-α nestas patologias poderia trazer algum benefício no controle destas doenças pró-inflamatórias, como observado nos estudos de Croft e colaboradores (2012), que demonstraram que o bloqueio de TNF resulta na melhora do prognóstico destas doenças.

Estes achados corroboram com estudos anteriores, como aquele realizado por Wang e colaboradores (2008) que relataram que uma fibrinogenase recombinante rF II, produzida a partir do protótipo da FII, uma metaloprotease com ação fibrinolítica sobre a cadeia β da fibrina isolada da peçonha da serpente *Agkistrodon acutus*, possa ter um papel de proteção na

sepsis devido a sua ação de degradação direta de coágulos de fibrina e TNF- α . Em 2009, o mesmo grupo demonstrou que está metaloprotease recombinante FII foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α no plasma sanguíneo de coelhos estimulados previamente com LPS, sugerindo que a proteólise do TNF- α por esta enzima como um possível mecanismo de proteção a disseminação intravascular da coagulação (DIC) induzida por LPS. Recentemente, Luo e colaboradores (2010), co-autor dos trabalhos anteriores, sugeriram que metaloprotease recombinante FII pode exercer um papel de proteção na pancreatite aguda severa (SAP) induzida por taurocolato de sódio 5%, dependente da degradação de TNF- α .

Contudo, é importante destacar que a metaloprotease BmooMP α -I é uma fibrinogenase, capaz de degradar TNF- α , produzida naturalmente na glândula da peçonha de uma serpente da fauna brasileira, *B. moojeni*. A literatura relata um alta homologia entre as metaloproteases de peçonha de serpente (SVMPs) e as metaloproteases de matriz de mamíferos (MMPs) e as metaloproteases da família ADAMs (as desintegrinas e metaloproteases). Enzymas que atuam na degradação de diversos substratos. As MMPs além das proteínas de matriz extracelular também podem clivar moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, receptores e proteínas. Ito e colaboradores (1996) descreveram que existem metaloproteases de matriz como MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-2 (gelatinase A), MMP-3 (estromelisina 1), e MMP-9 (gelatinase B) que são capazes de degradar a citocina pró-inflamatória IL- β .

As metaloproteases de matriz de mamíferos MMP-1, MMP-2, MMP-13 e MMP-14, degradam a proteína quimiotática de monócitos-3 (MCP-3), essencial para o recrutamento de monócitos e leucócitos, da mesma forma, que as proteínas quimiotáticas de monócitos-1,2 e 4 (MCP-1, MCP-2, e MCP-4) são inativadas por MMP-1 e MMP-3 e MMP-9. O fator derivado de células do estroma (SDF-1 α), pode ser clivado por MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, e MMP-14. A desintegrina e metaloprotease 17 (ADAM 17), também conhecida como enzima conversa do fator de necrose tumoral (TACE), é uma protease responsável pela clivagem do TNF- α da membrana plasmática e sua secreção na forma solúvel. Coletivamente, estes estudos sugerem que há metaloproteases que podem atuar como mediadores pró-inflamatórios, enquanto outras atuam para “amortecedores” da inflamação, sendo que a regulação da atividade proteolítica destas metaloproteases é crucial para dar o sinal apropriado de “start” e “stop” durante a resposta inflamatória (MOHAMMED, SMOOKLER, KHOKHA, 2012). Por outro lado, a atividade anti-inflamatória pode ser resultante de pequenas diferenças estruturais, como tem sido demonstrado em estudos anteriores, demonstrando que existem centenas de

Maraisa Cristina Silva

proteases presentes em peçonhas de serpentes, sendo clara a dificuldade em se conseguir obtê-las por métodos bioquímicos na forma de cadeias únicas, devido ao fato de que as diferenças estruturais entre as proteases de peçonhas serem muito tênuas. No entanto, é importante destacar que estas pequenas diferenças e mudanças estruturais podem ser as responsáveis pela diversidade de atividades biológicas (Wang *et al.*, 2008). A metaloprotease BmooMP α -I exibe o sítio de ligação do zinco em coordenação octaédrica distorcida formada por átomos Nε2 de três histidinas catalíticas (His¹⁴², His¹⁴⁶ e His¹⁵²) e três moléculas de solvente (OW¹³¹, OW¹⁴³ e OW¹⁴⁴). Esta configuração do sítio de ligação do zinco da enzima BmooMP α -I é bem peculiar, uma vez que a maioria das SVMPs, como H2-protease e adamalisina-II, apresenta sítio de ligação do zinco em coordenação tetraédrica com três histidinas e uma molécula solvante, que são estruturalmente relacionadas ao resíduo Glu¹⁴³, que polariza a molécula para o ataque nucleofílico na cadeia do polipeptídica do substrato. A molécula solvante OW¹⁴³ na enzima BmooMP α -I é coordenada por uma pequena alça, com distância de 2,79 Å, quando comparada com outras “metzincinas” descritas, cujas distâncias estão em torno de 3,52 a 4,3 Å (AKAO *et al.*, 2010).

Apesar de TNF- α ser crucial para promover a resposta imunológica e combater as infecções, no entanto, sua sinalização desregulada pode resultar em várias patologias, principalmente nas doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, doença de Crohn e osteoporose. Por outro lado, a ausência completa de TNF- α no organismo pode acarretar em malefícios ao mesmo, considerando que estudos com camundongos com deleção gênica (*knockout*) para o gene TNF ou seus receptores apresentam defeito no desenvolvimento dos tecidos linfóides secundários e arquitetura esplênica, são susceptíveis a agentes infecciosos (AGGARWAL, GUPTA, KIM, 2012).

Atualmente, as únicas drogas disponíveis no mercado visando evitar os efeitos deletérios de uma produção exacerbada de TNF- α são os anticorpos monoclonais que atuam na inibição de TNF (TNFIs), bloqueando o sítio de ligação com os seus receptores (WALCZAK, 2011). Neste contexto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a metaloprotease BmooMP α -I reúne os pré-requisitos necessários para sua investigação em aplicação clínica, já que, possuindo uma alta atividade de catálise sobre TNF- α , esta enzima poderia ter efeitos similares ao inibidores de TNF (TNFIs) utilizados atualmente em terapias que visam o controle de processos inflamatórios não modulados. Tendo vista que há possibilidade de existirem efeitos adversos, quando se considera a existência dos diversos domínios na molécula de BmooMP α -I como um todo, apresentando funções biológicas diferentes, estudos adicionais são

Maraisa Cristina Silva

necessários para se assegurar o sucesso de um futuro uso clínico. Uma estratégia pertinente para diminuir estes prováveis efeitos adversos, será clonar a cadeia específica do gene codificador do sítio catalítico sobre a molécula de TNF para se produzir uma protease recombinante, com alta especificidade para este substrato de interesse.

7. CONCLUSÕES

- Este estudo relata, pela primeira vez, uma atividade anti-inflamatória de uma metaloprotease nativa BmooMP α -I, isolada da peçonha da serpente *B. moojeni*;
- Os anticorpos policlonais específicos para a metaloprotease BmooMP α -I apresentam uma reatividade cruzada com outras proteínas da peçonha bruta de *B. moojeni*, provavelmente pela presença de domínios homólogos entre as proteínas da peçonha bruta e a enzima BmooMP α -I;
- Os anticorpos policlonais específicos para a metaloprotease BmooMP α -I foram capazes de neutralizar sua atividade proteolítica sobre o substrato azocaseína, porém não exercem nenhum efeito sobre a proteólise de TNF- α , sugerindo sítios catalíticos diferentes para ação enzimática da mesma;
- A atividade anti-inflamatória da metaloprotease BmooMP α -I pode ser evidenciada por uma inibição da migração de células inflamatórias recrutadas para cavidade peritoneal;
- A atividade anti-inflamatória da metaloprotease BmooMP α -I envolve a degradação da citocina pró-inflamatória TNF- α , sendo esta ação proteolítica um fenômeno dose-dependente.
- No seu conjunto, os resultados obtidos sugerem a hipótese do uso desta biomolécula como protótipo para o desenvolvimento de drogas com efeito terapêutico sobre as desordens pró-inflamatórias.
- Pesquisas futuras, no sentido de caracterizar as regiões ou domínios metaloprotease BmooMP α -I responsáveis pela hidrólise de TNF- α são essenciais no sentido de uma possível aplicação clínica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1 As referências bibliográficas foram citadas de acordo com a ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR 6023/2002; NBR 10520/2002 e NBR 14724/2002.

ABBAS, K. A; LICHTMAN, H. A. Anticorpos e Antígenos. In: **Imunologia Celular e Molecular**. Brasil, 2003, 4. ed., p. 56-57.

ABBAS, K. A; LICHTMAN, H. A. Citocinas. In: **Imunologia Celular e Molecular**. Brasil, 2003, 4. ed., p. 243-274.

ADESSI, C.; MIEGE, C.; RABILLOUD, T. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: A current challenge for immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 18, p. 127-135, 2005.

AGGARWAL, B. B.; MOFFAT, B.; HARKINS, R. N. Human lymphotoxin: production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 686-691, 1984.

AGGARWAL, B. B.; GUPTA, S. G.; KIM, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. **BLOOD**, v. 119, p. 651-665, 2012.

ALARCO, A.M.; MARCIL, A.; CHEN, J.; SUTER, B.; THOMAS, D.; & WHITEWAY, M. Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 5622-5628, 2004.

AKAO, P. K.; TONOLI, C. C. C.; NAVARRO, M. S; CINTRA, A. C. O.; NETO, J. R.; ARNI, R. K.; MURAKAMI, M. T. Structural studies of BmooMP α -I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, v. 55, p. 361-368, 2010.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, p. 949-957, 2009.

ARCOLINI, T. **Guia de animais brasileiros: Répteis e Peixes de água doce**. São Paulo, 2006, 2. ed., p. 22- 30.

ARENDS, W. P.; GABAY, C. Cytokines in the rheumatic diseases. **Rheumatic Diseases Clinics North America**, v. 30, p. 41-47, 2004.

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. **Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas**. Simpósio: Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas: Medicina, Ribeirão Preto, v. 36, p. 480-489, 2003.

BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L. N.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (White-Tailed Jararaca) snake venom, **Biochimie**, v. 88, p. 189-200, 2006.

BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; COSTA, T. R.; GOMES, M. S. R.; TORRES, F. S.; COSTA, J. O.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A. M. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin (ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 574-584, 2008.

BÉRNILS, R. S. (org.). **Brazilian reptiles: List of species**. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 18 de março de 2010.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal Leukocyte Biology**, v. 81, p. 1-5, 2007.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins form snake venoms. **Journal of Toxicology**, v. 7, p. 121-209, 1989.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **Fefs Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.

BLUMM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins in Triton X-114 solution. **Journal Biological Chemistry**, v. 256, p. 93-99, 1981.

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

BROGGINI, N.; MCMANUS, L. M.; HERMANN, J. S.; MEDINA, R.; SCHENK, R. K.; BUSER, D.; COCHRAN, D. L. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. **Journal of dental Research**, v. 85, p. 473-478, 2006.

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

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. ; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M., HADDAD, J. R. **Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**, São Paulo: Sarvier-FAPESP, 2003, 1. ed ,459 p.

CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANCA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, R. P.; NISHIOKA, S. A.; ÁVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L. Randomized Comparative Trial Of Three Antivenoms In The Treatment Of Envenoming By Lance-Headed Vipers (*Bothrops Jararaca*) In São Paulo, Brazil. **QJM (An International Journal of Medicine)**, v. 86, p. 315-325, 1993.

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

CISCOTTO, P. H. C. Purificação e caracterização biológica e estrutural (antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de dois componentes protéicos do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. 2005, 102 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia)- Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2005.

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

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

CROFT, M.; DUAN, W.; CHOI, H.; EUN, SO-Y.; MADIREDDI, S.; MEHTA, A. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. **Trends in Immunology**, v. 33, p. 144-152, 2012.

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

FONSECA, K. C. Purificação e caracterização bioquímica da moozincina, uma metaloprotease dependente de zinco presente na peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (caíçaca). 2010, 52 p. (Dissertação de Mestrado). Mestrado em Genética e Bioquímica. 2010.

FOX, J. W.; MA, L.; NELSON, K.; SHERMA, N. E.; SERRANO S. M. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon**, v. 47, p. 700-714, 2006.

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

FRANÇA, L. F. Fracionamento da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (caíçaca): caracterização parcial de frações proteolíticas e purificação de uma miotoxina (Bmtx). **Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia**, 2005.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. **Ministério da Saúde**. Brasil, 2001, 112p.

GOMES, M. S. R.; MENDES, M. M.; OLIVEIRA, F.; ANDRADE, R. M; BERNARDES, C. P.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 24-32, 2009.

GOMIS-RU, T. H.; KRESS, F. X.; KELLERMAN, L. F.; MAYR, J.; LEE, I.; HUBER, X.; R. Refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the snake venom zincendopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. **Journal of Molecular Biology**, v. 239, p. 513–544, 1994.

GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*., v. 283, p. 657–668, 1998.

GRISOLD, A. J.; HOENIGL, M.; LEITNER, E.; JAKSE, K.; FEIERL, G.; RAGGAM, R.; MARTH, B. E. Submasseteric Abscess Caused by *Mycoplasma salivarium* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 3860–3862, 2008.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NUNEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Experimental and Molecular Pathology**, v. 62, p. 28-41, 1995.

HOGE, A. R. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 32, p. 109-184, 1965.

HOGE, A. R.; ROMANO, S. A. R. W. D. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Serpentes, Elapidae e Viperidae. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 36, p.109-207, 1972.

ITO, A.; MUKAIYAMA, A.; ITOH, Y.; NAGASE, H.; THØGERSEN, I. B.; ENGHILDI, J. J.; SASAGURI, Y.; MORI, Y. Degradation of Interleukin 1 β by Matrix Metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 14657–14660, 1996.

KADAL, A.; LEITINGER, N. The roles of the endothelial cells in the resolution of acute inflammation. **Antioxidants Redox Signal**, v. 7, p. 1744-1754, 2005.

KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. South american snake venoms affecting haemostasis. **Journal Toxicologic Review**, v. 14, p. 359-374, 1995.

KECK, S.; FREUDENBERG, M.; HUBER, M. Activation of Murine Macrophages via TLR2 and TLR4 Is Negatively Regulated by a Lyn/PI3K Module and Promoted by SHIP1. **Journal Immunology**, v. 184, p. 5809-5818, 2010.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochemical Journal**, v. 420, p. 1–16, 2009.

KUMASAKA, T.; YAMAMOTO, M.; MORIYAMA, H.; TANAKA, N.; SATO, M.; KATSUBE, Y.; YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATO, T.; IWANAGA, S.; UEKI, T. Crystal structure of H2-proteinase from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **The Journal of Biochemistry**, v. 119, p. 49–57. 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, p. 680-689, 1970.

LALLO, D. G., THEAKSTON, R. D. G. Snake Antivenoms. **Journal of Toxicology**, v. 41, p. 277-290, 2003.

LALOO, D. Venomous bites and stings. **The Medicine Publishing Company Ltd**, v. 33, p. 74-76, 2005.

LEE, C. C.; AVALOS, A. M.; PLOEGH, H. L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. **Nature**, v. 12, p. 168-179, 2012.

LUO, S.; WANG, R.; JIANG, W.; LIN, X.; QIU, P.; YAN, G. A novel recombinant snake venom metalloproteinase from *Akistrodon acutus* protects against taurocholate-induced severe acute pancreatitis in rats. **Biochimie**, v. 92, p. 1354-1361, 2010.

MARIM, F. M.; SILVEIRA, T. N; S. LIMA, D. S.; ZAMBONI, D. S. A Method for Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages from Cryopreserved Mouse Bone Marrow Cells. **PLoS ONE**, v. 5, p. 1-8, 2010.

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

MATRISIAN, L. M. Metalloproteinases and the inhibitors in matrix remodeling. **Trends in Genetics**, v. 6, p. 121-125, 1990.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MINEO, J. R.; SILVA D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1. ed. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273 p.

Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos: aspectos epidemiológicos. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 22 de maio de 2012.

MOHAMMED, F. F; SMOOKLER, D. S.; KHOKHA, R. Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, p. 43-47, 2003.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia Processos gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999, 320 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**, v. 37, p. 653-659, 2003.

OIE, S.; KAMIYA, A.; SETO, T.; SUGA, A.; NAITO, K. Microbial contamination of in-use lubricants for non-touch urethral catheters in intermittent self-catheterization. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 781-783, 2000.

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

OLIVEIRA, F. **Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bth α s) e caracterização bioquímica da BthTl.** 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A. GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Purification and parcial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (Caiçaca). **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, p.1069-1077, 1999.

PALMER, D. C.; RESTIFO, N. P. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. **Trends in Immunology**, v. 30, p. 592-602, 2009.

PEICHOTO, M. E; ZYCHAR, B.C; TAVARES, F. L; GONÇALVES, L. R. C; OFELIA, A.; COSTA, O; SANTORO. M. L. Inflammatory effects of patagonfibrase, a metalloproteinase from *Philodryas patagoniensis* (Patagonia Green Racer; Dipsadidae) venom. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, p. 1166-1172, 2011.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 24-29, 2001.

PINTO, J. S.; MENDES, M. M; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. ; RODRIGUES, V. M. Neutralização das alterações sistêmicas e locais induzidas por peçonhas de serpentes botrópicas por anticorpos policlonais. **Revista horizonte científico**, p.1-16, 2008.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; MCFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 798 p.

QUEIROZ, M. R. **Purificação e caracterização de uma nova metaloprotease da serpente *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae) com ação na agregação plaquetária.** 2010, 75 p. (Dissertação de Mestrado). Mestrado profissionalizante em Inovação Biofarmacêutica, 2010.

QUEIROZ, M.R.; MAMEDE, C.C.; FONSECA, K.C; CANABRAVA, L. C. M.N; FRANÇA, L. V.; SILVA, M. C.; STANZIOLA, L. BELETTI, M. E; CANABRAVA, H. A. N; OLIVEIRA, F Biological characterization of a myotoxin phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 49-58, 2011.

RA, H. J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology**, v. 26, p. 587-596, 2007.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R., Pathological alterations induced by neuwiedase, a

metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471-479, 2001.

ROSE, W. A.; MCGOWIN, C.L.; PYLES, R. B. FSL-1, a bacterial-derived toll-like receptor 2/6 agonist, enhances resistance to experimental HSV-2 infection. **Virology Journal**, v. 6, p. 1743-1755, 2009.

ROEDER, A.; KIRSCHNING, C. J.; RUPEC, R.A.; SCHALLER, M.; and KORTING, H.C. Toll-like receptors and innate antifungal responses **Trends in Microbiology**, v.12, p.44-49, 2004.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; TEIXEIRA, C. F; FERNANDES, C. M; DIAZ, 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 Inflammation**, v. 11, p. 121-128, 2002.

RUCAVADO, A.; NUNEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 79, p. 245-254, 1998.

RUCAVADO, A; FLORES-SANCHÉZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHÃES, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, p. 1297-1312, 1999.

RUSSELL, F. E. Venomous animal injuries. **Current Problems in Pediatrics**, v. 3, p. 3-47, 1973.

SANTOS FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P ; MENALDO, D. L.; Fuly, A. L.; Arantes, E. C.; Sampaio, S. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A New Acidic Myotoxic, Anti-Platelet and Prostaglandin I₂ Inductor Phospholipase A₂ Isolated from *Bothrops moojeni* Snake Venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

SAWAYA, R. J.; MARQUES, O. A. V.; MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 8, p. 127-149, 2008.

SCHMIDT, M. E.; ABDELKBAKI, Y. Z.; TU, A. T. Nephrotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: electron-microscopic study. **The Journal Pathology**, v. 118, p. 49, 1976.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1191-1197, 2005.

SETUBAL, S. S.; PONTES, A. S.; FURTADO, J. L.; KAYANO, A. M.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Effect of *Bothrops alternatus* snake venom on macrophage phagocytosis and superoxide production: participation of protein kinase C. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 430-441, 2011.

SHANMUGAM, A.; RAJORIA, S.; GEORGE, L. A; MITTELMAN, A.; SURIANO, R. Synthetic Toll Like Receptor-4 (TLR-4) Agonist Peptides as a Novel Class of Adjuvants. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-10, 2012.

SILVA, C. A; ZULIANI, J. P; ASSAKURA, M. T.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; TEIXEIRA, C. F.; Serrano, S. M. Activation of alpha(m) beta (2)-mediated phagocytosis by HF3, a p-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops Jararaca*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, p. 950-956, 2004.

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

SIMSEK, I. TNF Inhibitors for Rheumatoid Arthritis A Year in Review. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 69, p. 2011; 220-224, 2011.

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

TAVASSI, C. A. M.; JARED, C.; REIS, C. V.; TAMBOURGI, D. V.; OLIVEIRA, J. S.; PALMA, M.; RANGEL, M.; SIMONS, S. M.; SERRANO, S. **Serpentes**. Disponível em: <<http://catcepid.tempsite.ws>>. Acesso em: 7 de junho de 2008.

TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 181-184, 2005.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 67-76, 2009.

THALAYASINGAM, N.; ISAACS, J. D. Anti-TNF therapy. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, p. 549-567, 2011.

TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, p. 55-68, 2006.

TORRES. F. S. Caracterização bioquímica de proteases presentes na peçonha de serpente *Bothrops moojeni*. **Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas)**. Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

VERHELST, K.; CARPENTIER, I.; BEYAERT, R. Regulation of TNF-induced NF- κ B activation by different cytoplasmic ubiquitination events. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 2, p. 277-286, 2011.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases Structure, Function, and Biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, p. 827-839, 2003.

VITALE, R. F.; ANDRADE, F.; RIBEIRO, Q. The role of Tumor Necrosis Factor -Alpha (TNF- α) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, p. 123-127, 2007.

WALCZAK., H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. **Immunological Reviews**, v. 244, p. 9–28, 2011.

WANG, R.; CAI, J.; HUANG, Y.; XU, D.; SANG, H.; YAN, G. Novel recombinant fibrinogenase of *Agkistrodon acutus* venom protects against LPS-induced DIC. **Thrombosis Research**, v. 123, p. 919–924, 2009.

WANG, W. J.; SHIH, C.; HUANG, T. Primary structure and antiplatelet mechanism of a snake venom metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochimie**, v. 87, p. 1065-1077, 2005.

WANGA, R.; QIU, P.; JIANG, W.; CAI, X.; OU, Y.; SU, X.; CAI, J.; CHEN, J.; YIN, W.; YAN, G. Recombinant fibrinogenase from *Agkistrodon acutus* venom protects against sepsis via direct degradation of fibrin and TNF- α . **Biochemical pharmacology**, v. 76, p. 620-630, 2008.

WARSHAWSKY, H.; HADDAD, A.; GONCALVES, R. P.; VALERI, V. E.; DE LUCCA, F. L. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. **American Journal Anatomy**, v. 138, p. 79–119, 1973.

WIJEYEWICKREMA, L. C; BERNDT, M. C; ANDREWS, R. K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 45, p. 1051-1061, 2005.

