

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo das Alterações Sistêmicas e Locais Induzidas
pela neuwiedase: Uma Metaloprotease Isolada da
Peçonha de *Bothrops pauloensis***

Daiana Silva Lopes

**Monografia apresentada à coordenação do curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

**Uberlândia-MG
Setembro- 2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudo das Alterações Sistêmicas e Locais Induzidas
pela neuwiedase: Uma Metaloprotease Isolada da
Peçonha de *Bothrops pauloensis***

Autor: Daiana Silva Lopes

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**Monografia apresentada à coordenação do curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

**Uberlândia-MG
Setembro- 2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Estudo das Alterações Sistêmicas e Locais Induzidas
pela neuwiedase: Uma Metaloprotease Isolada da
Peçonha de *Bothrops pauloensis***

Autor: Daiana Silva Lopes

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Àvila

**Homologado pela coordenação
do Curso de Ciências Biológicas
em / /**

**Coordenador(a) do Curso
Cecília Lômonoco**

Uberlândia-MG

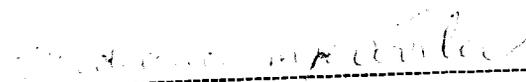
Setembro- 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Estudo das Alterações Sistêmicas e Locais Induzidas
pela neuwiedase: Uma Metaloprotease Isolada da
Peçonha de *Bothrops pauloensis***

Autor: Daiana Silva Lopes

Aprovado pela Banca Examinadora em: 18 / 09 / 2006 Nota: 100,00



Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila



Mestre: Luiz Fernando Moreira Izidoro



Mestre: Cristiani Baldo

Uberlândia-MG
Setembro- 2006

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu eterno Amor.

À minha família, Mamãe, Papai e Raffael, pelo Amor e apoio incondicional. Amo vocês.

Ao meu Amor Marcelo, pelo incentivo, apoio e carinho em todos os momentos. Sem o seu computador!!!! Amo você.

À Dra Veridiana de Melo Rodrigues Àvila, minha querida orientadora, meu exemplo, por me ensinar a crescer, pelo carinho e apoio. Gosto muito de você.

À Dra Maria Inês Homs Brandeburgo, sempre disposta a me ajudar.

À Dra Amélia Hamaguchi, pela oportunidade de trabalho e pela orientação e pela confiança depositada em mim.

À Dra Patricia Bianca Clissa, pela oportunidade e pela confiança depositada em mim. Aprendi muito com você. Obrigada por tudo.

À amiga Hérica, pela convivência agradável e pela contribuição profissional.

À Cristiani Baldo, por ter contribuído muito para o meu crescimento. À minha amiga Cris, obrigada pela paciência e pelo carinho.

Ao amigo Luiz Fernando Izidoro, pela convivência, pelos ensinamentos preciosos, e pelas contribuições cruciais para a realização deste trabalho.

À minha melhor amiga Carol, pelo carinho, pela companhia (sempre juntas!!!), pela contribuição total para a realização deste trabalho e é claro, pelas broncas!!!

Aos amigos Carla Menezes Luis Carlos Gebrim, pelos conselhos que me ajudaram a crescer.

À minha amiga Mirian, por ter conquistado a minha amizade e por estar sempre disposta a me ajudar. Obrigada por tudo.

Às amigas Renata e Johara, pela ajuda profissional, pelo companherismo e pelas risadas.

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Luís Henrique, Fábio Lucas, Leonardo, Débora, Malson, Samela, Jordano, pela convivência e pela assistência em todos os momentos.

À minha amiga Janaína, pelo carinho e apoio.

Aos funcionários Dona Nenzinha, Tianinha, Marlene e Sr. Vilmar, pelas contribuições.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

As peçonhas de serpentes da família Viperidae contém uma grande variedade de proteínas que podem causar diversas seqüelas em suas vítimas. As metaloproteases constituem uma importante classe de proteínas da peçonha de serpente capazes de causar alterações sistêmicas e outros efeitos como, edema, necrose, hemorragia e inflamação, que caracterizam a lesão tecidual que ocorre após o envenenamento. Neste trabalho estudamos as alterações sistêmicas, o dano tecidual e a inflamação induzidas pela neuwiedase, uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. A neuwiedase foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de fibrinogênio e de degradar in vitro as cadeias A α e B β da molécula de fibrinogênio. Além disso, diminuiu os níveis de hemácias, % hematócrito e de plaquetas no sangue. A lesão tecidual induzida pela neuwiedase foi caracterizada pela formação de edema, pela liberação de creatina quinase e pela mionecrose. Estas alterações foram acompanhadas da indução de resposta inflamatória detectada pela presença de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e IL-8. Esses dados confirmam os distúrbios sistêmicos e locais induzidos por essa toxina.

Palavras-chaves: *Bothrops*, neuwiedase, lesão tecidual, inflamação, alterações sistêmicas

LISTA DE ABREVIATURAS

Asp: Aspartato

BSA: Soroalbumina bovina

AMBIC: Bicarbonato de amônio

CK: Creatina quinase

CM: Carboximetil

DL50: Dose mínima letal

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico

ELISA: “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

Lys: Lisina

PB: Peçonha bruta

PBS: Tampão fosfato de sódio

PLA₂: Fosfolipase A₂

PM: Peso molecular

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

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

SVMPs: “Snake venom metalloproteinases”

Tris : Tris (hidroximetil) aminoetano

v/v: volume por volume

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	1
2-OBJETIVOS.....	8
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. Obtenção da peçonha.....	9
3.2. Animais.....	9
3.3. Cromatografia de troca-iônica em gel de CM-Sepharose.....	9
3.4. Obtenção da metaloprotease neuwiedase.....	9
3.5. Dosagem de Proteínas.....	10
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com agente desnaturante.....	10
3.7. Ensaio Enzimáticos e Biológicos.....	11
3.7.1. Atividade Fosfolipásica	11
3.7.2. Atividade Coagulante.....	11
3.7.3. Atividade Fibrinogenolítica.....	11
3.7.4. Quantificação do fibrinogênio.....	12
3.7.5. Alterações hematológicas.....	12
3.7.6. Atividade edematogênica	12
3.8. Análise morfológica da lesão tecidual induzida pela peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> e pela neuwiedase sobre o músculo gastrocnêmio de camundongos.....	13
3.8.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina quinase no plasma.....	13
3.8.2. Análise Morfológica por microscopia de luz.....	13
3.9. Dosagem de citocinas inflamatórias no sobrenadante das patas de camundongos inoculados com neuwiedase por ELISA.....	14
3.10. Análise Estatística	15
4-RESULTADOS.....	16
4.1. Cromatografia da peçonha bruta em resina de troca-iônica CM-Sepharose.....	16
4.2. Cromatografia da fração CM2 em resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B.....	17
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das frações resultantes do processo e purificação da neuwiedase.....	18
4.4. Recuperação protéica	19

4.5. Atividade fibrinogenolítica	20
4.6. Quantificação do fibrinogênio	22
4.7. Alterações hematológicas	22
4.8. Atividade edematogênica	25
4.9. Atividade miotóxica avaliada por dosagem de creatina quinase.....	26
4.10. Análise histopatológica da evolução da lesão tecidual induzida pela peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> e pela neuwiedase	27
4.11. Dosagem de citocinas.....	32
5-DISSCUSSÃO.....	34
6-CONCLUSÃO.....	40
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1-Introdução

As serpentes sempre foram temidas e rejeitadas pelo homem. Fato que pode ser atribuído ao desconhecimento real sobre a biologia, o papel na cadeia alimentar e a importância ecológica desses animais.

Na fauna Brasileira existem 9 famílias de serpentes, constituindo um total de 73 gêneros e 265 espécies. Contudo, apenas 2 famílias, Elapidae e Viperidae, são consideradas peçonhentas, produzindo toxinas e tendo aparelhos apropriados para inoculá-las (Cardoso, J.L.C, et al, 2003). A família Viperidae compreende os gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotralus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus), (Barravieira, B, 1999).

Aproximadamente 76% dos acidentes ofídicos ocorridos e notificados na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, entre 1993 e 1995, foram atribuídos ao gênero *Bothrops* (Silva,C.J, et al, 2003).

A espécie *Bothrops neuwiedi*, conhecida como jararaca pintada ou boca de sapo, descrita por Amaral (1925), era dividida em 12 subespécies, de acordo com padrões de coloração e área de ocorrência. Diante da grande incidência dos acidentes ofídicos e da necessidade de uma melhor identificação dessas serpentes, Silva, X.V, (2000), realizou uma revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* onde as 12 subespécies passaram a ser consideradas 7 espécies distintas. Nessa reclassificação *Bothrops neuwiedi pauloensis* passou a ser denominada *Bothrops pauloensis*, classificação aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia SBH (2005). As serpentes dessa espécie são encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Sul de Goiás e Triângulo Mineiro (Campbell,J.A, et al, 1989).

A composição da peçonha de serpente varia entre as diferentes espécies, sendo na sua maioria composta de proteínas e de uma pequena fração não protéica, como, íons metálicos e aminas biogênicas. As proteínas da peçonha são farmacologicamente e bioquimicamente ativas e, portanto, as responsáveis pela toxicidade da peçonha (Barravieira, B, 1999).

As diversas toxinas presentes na peçonha botrópica podem causar alterações sistêmicas capazes de provocar variações dos parâmetros hematológicos e distúrbios da hemostasia, como alterações na função plaquetária, na coagulação sanguínea e no sistema fibrin(geno)lítico (Markland, F. S, 1998). Efeitos locais também são bastante frequentes como, edema, hemorragia, inflamação e necrose (Voronov, E, et al, 1999; Gutiérrez, J.M, et al, 1995 a)

As proteínas que provocam tais efeitos são metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, lectinas tipo C, miotoxinas, fosfolipases A₂ (PLA₂), L-amino oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterases, arginina esterases, hialuronidases, 5'- nucleotidases e NAD-nucleosidases (Russel,F.E, 1980; Tu, A.T,1988; Meier,J, 1990; Stocker, K, 1990; Braud, S,et al, 2000).

As alterações sistêmicas após o envenenamento botrópico podem ser induzidas principalmente por fosfolipases A₂, por enzimas proteolíticas (que geralmente são classificadas por suas estruturas em serinoproteases e metaloproteases) ou ainda, peptídeos desintegrina.

As fosfolipasesA₂ da peçonha de serpentes são responsáveis por várias alterações sistêmicas principalmente no sistema hemostático. O desequilíbrio da hemostasia induzido por essas enzimas se deve principalmente a sua ação anticoagulante, por degradar os fosfolipídeos da membrana plaquetária, responsáveis por formarem uma superfície catalítica onde ocorrem os processos de ativação, adesão, agregação plaquetária e ativação da coagulação sanguínea (Gutiérrez, J.M, et al, 1995a; Markland, S. F, 1998; Andrião-Escarso,S.H, et al, 2002).

PLA₂ são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação 2 acil éster de 3 sn-fosfolipídeos, liberando ácidos graxos e lisofosfatídeos (Mollier,P. et al, 1990). Estas enzimas, amplamente distribuídas na natureza, são encontradas tanto no interior como no exterior da célula (Dennis,E.A, 1997). As PLA₂ intracelulares estão frequentemente associadas a membranas e envolvidas com o metabolismo de fosfolipídeos e outras funções celulares (Mukherjee,A.B, et al., 1994). As extracelulares são amplamente distribuídas em secreções pancreáticas, exudatos inflamatórios e nas peçonhas de serpentes e artrópodes.

As fosfolipases A₂ além de interferirem na hemostasia provocam outros efeitos tóxicos e farmacológicos tais como neurotoxicidade, hemorragia, edema e também podem causar mionecrose devido a sua ação direta nas membranas plasmáticas das células musculares (Gutiérrez, J.M, et al, 1997; Soares, A.M, 2004).

As peçonhas de serpentes são ricas em enzimas proteolíticas, as quais são designadas de acordo com suas estruturas em serinoproteases e metaloproteases (SVMPs), ambas podem afetar o sistema hemostático através de vários mecanismos (Yong-Hong, J,I,A, et al., 2003; White,J, 2005). As serinoproteases contribuem para o efeito tóxico do envenenamento por afetarem muitos passos da cascata de coagulação sanguínea, por interferirem na função plaquetária ou no sistema fibrinolítico (White,J, 2005; Kamiguti,A.S, 2005; Swenson, S, et al, 2005). Algumas

dessas enzimas são denominadas “thrombin-like” por clivarem o fibrinogênio, mas apesar de possuírem uma ação semelhante à trombina, permitem apenas a formação de um coágulo frouxo, por não serem capazes de ativar o fator XIII, responsável pela estabilização do coágulo de fibrina (Braud, S, et al, 2000).

As metaloproteases constituem uma importante classe de proteínas diretamente relacionadas com o quadro clínico característico do envenenamento botrópico. São enzimas extremamente versáteis, exibindo grande diversidade estrutural e funcional (Gutierrez, J.M, et al, 2000). Estas enzimas são sintetizadas como proteínas multimodulares (Figura 1). De acordo com a organização de seus múltiplos domínios as metaloproteases são classificadas em 4 classes; PI a PIV (Bjarnason, J.B, et al, 1994). As proteínas da classe PI, possuem baixa massa molecular, 20-30 kDa, pouca ou nenhuma atividade hemorrágica e 3 domínios estruturais: peptídeo sinal, pró-domínio e domínio metaloprotease; na classe PII se encontram as toxinas de massa molecular de 30-60 kDa, que possuem além dos outros 3 domínios, um domínio desintegrina na região C-Terminal; a classe PIII compreende metaloproteases com alta atividade hemorrágica e massa molecular de 60-80 kDa e que possuem além do domínio semelhante a desintegrina, um domínio rico em resíduos de cisteína; a classe PIV é formada por toxinas de alto massa molecular 80-100 kDa e possuem um domínio adicional semelhante a lectina tipo C .

Recentemente, Fox, J.W, et al, (2005) adaptaram o esquema de classificação originalmente proposto para as SVMPs, incluindo as seguintes sub-classes precursoras de metaloproteases: PIIa-PII, precursores de metaloproteases que não sofrem processamento proteolítico e não liberam o domínio desintegrina; precursores PIIb-PII, que se encontram na forma dimérica; precursores D-I que não contêm o domínio metaloprotease; precursores PIIIa-PIII que liberam seus domínios semelhante a desintegrina e rico em cisteína; precursores PIIIb-PIII que também formam dímeros (Figura 1).

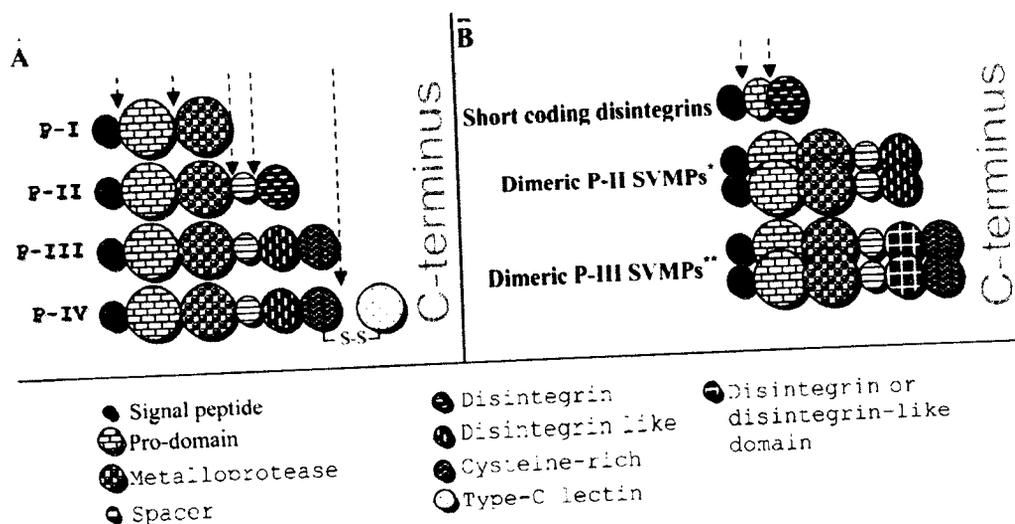


Figura 1-Classificação das SVMPs de acordo com seus domínios estruturais (A) e precursores desintegrinas (B). As setas indicam pontos de processamento proteolítico. (A)-Classificação que propõe uma origem comum de metaloproteases e peptídeos desintegrinas a partir de um precursor (Bjarnason, et al, 1994). (B)-Precursores alternativos de moléculas diméricas sugeridos por recentes descobertas (Okuda, D, et al, 2002; Francischetti, I.M.B, et al, 2004). Dímeros PIIB (*Nikai,T et al, 2000) e PIII SVPMs (**Cominetti, et al, 2003; Masuda,S, et al, 1998,2001).

As metaloproteases de serpentes (SVMPs) são zinco-dependentes, tendo a sequência de aminoácidos HEBXHXBGBXH (H: histidina, E: ácido glutâmico, G: glicina, B: resíduo hidrofóbico e X: qualquer aminoácido) comum ao sítio ligante de todas as metaloproteases. Por isso, essas toxinas podem ser inibidas pelos agentes quelantes, EDTA ou 1,10 fenantrolina (Matsui, et al, 2000). Um outro grupo de proteínas também zinco-dependentes são as ADAMs (proteínas de mamíferos contendo domínio desintegrina e um domínio metaloprotease) que estão envolvidas em importantes eventos fisiológicos e juntamente com as SVMPs formam a subfamília das Reprolisinas, que faz parte da super família das Metzincinas. Todas as Metzincinas são zinco-dependentes e possuem um resíduo de metionina na porção carboxi terminal na volta a baixo do sítio ligante de zinco (met-turn). Esta família compreende 6 subfamílias, as Astacinas, Serralisinas, Matrixinas, Snapalisinas, Reprolisinas e Leishmanolisinas (Hooper,N.M, 1994; Gomis-Ruth,F.X, et al, 2003; Ramos, O.H.P, et al, 2006).

As metaloproteases são sintetizadas *in vivo* na forma inativa, zimogênio. A ativação ocorre por um mecanismo chamado cysteine-switch ou “velcro”. De acordo com esse mecanismo, o grupo tiol presente na sequência conservada do pró-domínio PKMGGVT, interage com o zinco presente no sítio ativo, bloqueando a ligação do substrato. Dessa forma é necessária a remoção do grupo tiol do sítio ativo para ativar a enzima. A ativação da enzima pode ocorrer ou por atividade catalítica residual ou por ação de outras proteases da peçonha (Grams, F, et al, 1993; Shimokawa, K, et al, 1996; Ramos and Araújo, 2006).

Estudos estruturais de metaloproteases sugerem o seguinte mecanismo de catálise. A presença de uma molécula de água localizada entre o grupo carboxílico do Glu335 catalítico e o íon zinco provoca um aumento da polarização na região, isto possibilita a transferência de um próton da molécula de água para o Glu335, o qual se torna um nucleófilo e ataca o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato levando o íon zinco a um estado de transição pentacoordenado. Com a transferência do próton do Glu para o nitrogênio da ligação peptídica do substrato, o mesmo é clivado liberando os subprodutos da reação, a enzima é regenerada com a incorporação de uma nova molécula de água (Stocker, W, et al, 1995; Ramos, O.H.P, et al, 2006).

Os principais efeitos biológicos das SVMPs incluem alterações no sistema hemostático e outros efeitos como, edema, necrose, apoptose e inflamação, que caracterizam a lesão tecidual que ocorre após o envenenamento (Gutiérrez, J. M, et al, 2000; Matsui, T, et al, 2000, Laing, G.D, et al, 2003).

De acordo com suas ações no sistema hemostático as SVMPs podem ser classificadas em enzimas coagulantes ou anticoagulantes. As enzimas coagulantes podem levar a ativação da protrombina e do fator X. As anticoagulantes compreendem enzimas que podem agir sobre o fibrinogênio e plaquetas (Matsui, T, et al, 2000; Ramos, O.H.P, et al, 2006).

As enzimas que apresentam ação fibrinogenolítica encontradas nas peçonhas de serpentes podem ser classificadas em três grupos de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. O primeiro grupo das fibrinogenases presentes nas peçonhas são aquelas com especificidade pela cadeia A α do fibrinogênio, apresentam pontes dissulfeto que são importantes para sua estrutura e função e aparentemente, degradam primeiro a cadeia A α do fibrinogênio e depois a B β , elas são representadas pelas metaloprotease de peçonha de serpente. O segundo grupo das fibrinogenases de peçonhas são aquelas com especificidade pela cadeia B β do

fibrinogênio. Essas enzimas são serino proteases, possuem atividade arginina esterásica e são inibidas por diisopropilfluorfosfato (DFP) ou fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), mas não por EDTA. O terceiro grupo das fibrinogenases de peçonhas são aquelas com especificidade pela cadeia γ do fibrinogênio. Esse tipo de fibrinogenase é bastante rara, tendo sido purificada a partir da peçonha de *Crotalus atrox* (toxina hemorrágica) com massa molecular de 64.000 (Nikai, T, et al., 1984; Markland Jr.F.S, 1991).

A lesão local após o envenenamento por serpentes da família Viperidae pode ocorrer por degradação da matrix extracelular ou de proteínas do plasma e da superfície da célula. Dessa forma, a hemorragia que se sucede pode acontecer por dois mecanismos distintos: per rhexis, ocorre a perda de hemácias através da lise ou rompimento de áreas endoteliais ou per diapedesis, ocorre a perda de hemácias através das junções endoteliais mantendo a integridade da célula (Kamiguti, A.S, et al, 1996; Hati, R, et al, 1999). A mionecrose que ocorre após o envenenamento pode ser devido à ação indireta de metaloproteases hemorrágicas que rompem os vasos sanguíneos levando a isquemia (Gutiérrez, J.M, et al, 1995b ; Gutiérrez, J.M, et al, 2000).

A lesão tecidual após envenenamento desencadeia uma cascata de eventos inflamatórios caracterizados por formação de edema, recrutamento de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios no local da picada. Entre esses mediadores estão diversas citocinas (proteínas de baixa massa molecular que mediam todas as fases da resposta inflamatória) tais como TNF α e IL-1 β , que amplificam a resposta inflamatória contribuindo com o processo de necrose (Voronov, E, et al. 1999). Gutiérrez, J.M, et al, (1995b), realizaram os primeiros experimentos que evidenciaram a resposta inflamatória induzida pelas SVMs, observando a formação de edema em camundongos tratados com metaloprotease da classe PI, BaPI de *Bothrops asper*. Mais tarde, Rucavado, A, et al, (2002) identificaram a liberação de IL-1 e IL-6 por essa mesma metaloprotease. Assim diversos estudos tem sido realizados na tentativa de entender melhor o papel da resposta inflamatória induzida pelas SVMs (Teixeira, C.F.P, et al, 2005).

As metaloproteases da classe PI, apesar de seu pouco efeito hemorrágico, demonstram uma variedade de efeitos biológicos que podem estar associados à suas estruturas primárias e terciárias, bem como com o modelo de pontes de dissulfeto apresentado por elas (Fox, J.W, et al, 2005). Rodrigues,V.M. et al, (2000) isolaram uma metaloprotease da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, fibrinogenolítica e não hemorrágica denominada neuwiedase. Essa proteína pertence à classe PI das metaloproteases e apesar de seu pouco efeito hemorrágico, contribui

para o dano tecidual local, causa edema, e possui baixa toxicidade, além de ser capaz de degradar os componentes da matriz extracelular (Rodrigues, V.M, et al, 2001).

Durante os últimos anos, foi crescente o interesse no estudo dos componentes responsáveis pelo mecanismo de ação local e sistêmico de toxinas presentes na peçonha de serpentes. Como resultados, várias miotoxinas e metaloprotease foram isoladas e caracterizadas, e alguns progressos têm sido feitos para compreender o mecanismo de ação e a patogênese destas toxinas.

Diante da diversidade de ações das proteínas da peçonha de serpente, o estudo dos distúrbios locais e sistêmicos induzidos pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e pela metaloprotease neuwiedase é de extrema importância, permitindo conhecer melhor o mecanismo de ação dessa toxina, além de possibilitar novos métodos terapêuticos para o envenenamento botrópico e também possíveis utilizações dessa enzima como ferramenta para diagnósticos.

2-Objetivos

O presente trabalho teve como objetivos:

1- Purificar a metaloprotease neuwiedase da peçonha de *Bothrops pauloensis* e realizar testes enzimáticos para caracterizar a enzima, como atividade coagulante, atividade PLA₂ e atividade fibrinogenolítica.

2- Estudar os distúrbios sistêmicos induzidos pela peçonha bruta e pela metaloprotease neuwiedase, através da dosagem de fibrinogênio e análises hematológicas.

3- Estudar a lesão tecidual local e a resposta inflamatória induzidas pela metaloprotease neuwiedase, por meio da dosagem do nível de creatina quinase, de análises histopatológicas e dosagem de citocinas.

3-Metodologia

3.1. Obtenção da peçonha

A peçonha de serpentes *Bothrops pauloensis* foi cedida pela Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação Ltda. Após a coleta, a peçonha foi dessecada a vácuo em temperatura ambiente e conservada a -20°C.

3.2. Animais

Nos experimentos foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica BALBc (18-22g) que são mantidos “Ad libitum” no laboratório de experimentação animal (LEA), da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram sacrificados por inalação com éter etílico.

3.3. Cromatografia de troca-iônica em gel de CM-Sepharose

Aproximadamente 225 mg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foram ressuspensos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8. Em seguida a mistura foi centrifugada a 10.000 g por 10 min a 4° C (Centrifuge 5402-Eppendorf) e o sobrenadante aplicado a uma coluna contendo a resina de troca-iônica CM Sepharose Fast Flow (2,0 x 20,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída em temperatura ambiente pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração usando o tampão bicarbonato de amônio nas concentrações de 0,05 a 0,5 M. Frações de 3 mL/tubo foram coletadas num fluxo de 20mL/hora e foram obtidas cinco frações denominadas de CM1 a CM5. A cromatografia foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm (Ultrospec 1000-Amersham pharmacia biotech), e as frações visualizadas em SDS-PAGE, segundo Laemmli, U.K, (1970).

3.4. Obtenção da metaloprotease neuwiedase

A metaloprotease neuwiedase foi isolada de acordo com metodologia descrita por Rodrigues, et al (2000), com algumas modificações. A fração referente à neuwiedase, CM2, foi ressuspensa em 2,0 mL de tampão Tris-HCl 10mM pH 8.5 + NaCl 4M e submetida a uma nova cromatografia em uma coluna contendo a resina de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose.

A coluna foi inicialmente equilibrada com 10ml do tampão inicial (Tris-HCl 10mM pH 8.5 + NaCl 4M) e posteriormente eluída em temperatura ambiente utilizando soluções decrescentes em concentração molar de NaCl (4M à 0M) e o processo de eluição foi finalizado com água. A cromatografia foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm (Ultrospec 1000-Amersham pharmacia biotech) e o grau de pureza avaliado em SDS-PAGE, segundo Laemmli, U.K, (1970).

3.5. 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).

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com agente desnaturante

As eletroforeses com agente desnaturante (SDS) foram realizadas segundo a técnica descrita por Laemmli, U.K, (1970). Foi utilizado um gel de concentração a 3%, contendo Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) e SDS a 1 % e um gel de separação a 13,5% contendo Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e SDS 1%, mantendo a relação de bisacrilamida/acrilamida 0,8:30. Amostras contendo de 5 a 10 µg de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8; glicerol a 10% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); 2 % de SDS e 0,001 % de azul de bromofenol como corante. As soluções foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e aplicados nos poços do gel. Foram aplicados no gel aproximadamente 20 µL de amostra, sendo também aplicados padrões de pesos moleculares dissolvidos no mesmo tampão. Os padrões de peso molecular utilizados foram: fosforilase (97.000), albumina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina do feijão e da soja (20,100), α lactalbumina (14,400) da LMW (Amersham

Biosciences). O tampão do eletrodo foi constituído por Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M e SDS a 0,1 %, pH 8,3.

A eletroforese foi realizada com uma corrente de 20 mA até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. As proteínas foram fixadas com metanol 50% e ácido acético 10% durante 15 a 20 minutos e corados por 1 hora numa solução de 0,2 % (m/v) de Coomassie Blue R-250 em água e metanol na proporção de 1:1 (v/v). O gel foi descorado numa solução de etanol 30% + ácido acético a 10% em água destilada.

3.7. Ensaio Enzimáticos e Biológicos

3.7.1. Atividade Fosfolipásica

Foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por De Haas, et al. (1968). Como substrato foi utilizado uma emulsão de gema de ovo em presença de deoxicolato de sódio 0,03 M e CaCl₂ 0,6 M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,0935N em pH 8,0 à temperatura ambiente. A atividade fosfolipásica foi realizada utilizando-se diferentes concentrações da enzima e da peçonha bruta, calculadas pela quantidade de micro equivalente de base consumida por minuto, por mg de proteína.

3.7.2. Atividade Coagulante

A atividade coagulante foi realizada segundo Assakura, M.T, et al. (1992), utilizando 5µg da enzima ou da peçonha bruta diluídas em 20µL de salina. Como substrato foi utilizado plasma bovino citratado (100µL).

Este experimento foi realizado com o aparelho coagulômetro Quick-Timer (DRAKE LTDA). Ele determina o tempo de coagulação de uma amostra de plasma bovino, até um tempo máximo de 120 segundos, utilizando um sistema óptico que detecta a variação brusca da densidade óptica da amostra no instante da coagulação (devido à formação do coágulo de fibrina). Assim que a amostra era adicionada ao plasma bovino, o cronômetro do aparelho era acionado registrando o tempo (em segundos) necessário para a formação da rede de fibrina. Os tempos obtidos foram

comparados ao controle positivo (peçonha bruta) para verificar se houve ou não diminuição do tempo de coagulação.

3.7.3. Atividade Fibrinogenolítica

Este teste foi realizado segundo Edgar, W, et al, (1973), com algumas modificações. Soluções de 50 μ L de fibrinogênio bovino (1,5mg/mL em PBS) foram incubadas com diferentes doses da metaloprotease neuwiedase (0.5, 1.0, 2.0, 5.0 e 10 μ g) a 37°C por 2 horas. A reação foi interrompida utilizando-se 25 μ L de tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), β -mercaptoetanol a 5% (v/v), SDS a 2% e azul de bromofenol 0,001%. Em seguida as amostras foram analisadas em SDS-PAGE a 13,5%.

O mesmo procedimento foi realizado incubando 1 μ g da enzima com 50 μ g de fibrinogênio a diferentes intervalos de tempo (15 e 30 minutos, 1, 2, e 24 horas). A ação de inibidores na atividade fibrinogenolítica foi realizada pré-incubando 1 μ g de enzima com 10 μ l de EDTA (10mM) ou 1,10 fenantrolina(10mM), seguindo-se o primeiro procedimento descrito acima.

3.7.4. Quantificação do fibrinogênio

Foi realizada a inoculação intravenosa de 0.6 DL50(0,47 μ g/g) da peçonha bruta ou 0.6 DL50(5 μ g/g) da toxina neuwiedase (Rodrigues, V.M, et al, 2001) na cauda de camundongos (n=4). Animais inoculados com PBS foram utilizados como controle. Após 3 horas da inoculação os camundongos foram sacrificados e o sangue coletado por punção cardíaca usando como anticoagulante citrato de sódio (50 μ L/mL). O sangue coletado foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C (Centrifuge 5402-Eppendorf) e o plasma obtido foi usado para quantificar o fibrinogênio de acordo com as recomendações do fabricante do Kit (Laboratório Wiener). Esse ensaio baseia-se no método de Clauss, A, (1957), no qual 0,1mL de trombina (100 U NIH) são adicionados à amostra, o tempo de coagulação medido é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio plasmático. O tempo de coagulação foi obtido pelo aparelho coagulômetro Quick-Timer (DRAKE LTDA) e posteriormente comparado com uma preparação de fibrinogênio padronizada.

3.7.5. Alterações hematológicas

Para esta atividade foi realizada a inoculação intravenosa de 0.6 DL50(0,47 μ g/g) da peçonha bruta ou 0.6 DL50(5 μ g/g) da toxina neuwiedase (Rodrigues, V.M, et al, 2001) na cauda de camundongos (n=4). Animais inoculados com PBS foram utilizados como controle. Após 6 horas da inoculação os camundongos foram sacrificados e o sangue coletado por punção cardíaca usando como anticoagulante EDTA (50 μ L/mL). O sangue coletado foi utilizado para contagem de hemácias, hematócrito e plaquetas no contador automático (Sysmex SE 9500).

3.7.6. Atividade edematogênica

Para a realização dessa atividade foram inoculados 10 μ g da toxina ou da peçonha bruta na pata dos camundongos (n=4) e avaliada a porcentagem de edema formado após diferentes intervalos de tempo. Animais controles foram inoculados com PBS. O edema produzido foi medido (mm) utilizando-se um paquímetro (CALIPER).

3.8. Análise da lesão tecidual induzida pela peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* e pela neuwiedase sobre o músculo gastrocnêmio de camundongos

3.8.1. Atividade miotóxica analisada por dosagem de creatina quinase no plasma

Aproximadamente 25 μ g da peçonha bruta ou 50 μ g da toxina neuwiedase foram inoculados no músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos (n=4). Animais inoculados com PBS foram utilizados como controle. Após alguns intervalos de tempo o sangue dos animais tratados foi coletado por punção cardíaca utilizando-se anticoagulante EDTA (50 μ L/mL) e centrifugado a 2500 rpm por 10 min (Centrifuge 5402-Eppendorf) para a obtenção do plasma. A atividade da enzima creatina quinase foi determinada utilizando-se 10 μ L de plasma pelo kit CK-UV cinético da Biotécnica - Biotecnologia avançada. de acordo com as normas do fabricante. A atividade creatina quinase foi expressa em unidades/litro, constituindo uma unidade o resultado da fosforilação de um nanomol de creatina quinase por minuto a 37°C.

3.8.2. Análise Morfológica por microscopia de luz

As análises morfológicas foram realizadas no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia com a colaboração da professora Dra. Tânia Alcântara Machado.

Aproximadamente 25µg da peçonha bruta ou 50µg da toxina neuwiedase foram inoculados no músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos (n=3). Animais inoculados com PBS foram utilizados como controle. Após 1, 3, 6, 24, 72 horas, 1 e 2 semanas os animais foram sacrificados e um pequeno fragmento da porção central do músculo retirado e fixado em solução de formalina a 10%.

Posteriormente, os músculos foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), diafanizados em xilol e, em seguida, incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram seccionados em micrótomo. Cortes com 6 µm (micra) de espessura foram aderidos a lâminas histológicas e então, corados com hematoxilina-eosina (HE) e/ou Masson, montados com lamínula utilizando-se como meio de montagem goma de Damar, examinados ao microscópio óptico e fotografados.

3.9. Dosagem de citocinas inflamatórias no sobrenadante das patas de camundongos inoculados com neuwiedase por ELISA

As dosagens de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8) foram realizadas no laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan - São Paulo, com a colaboração da professora Dra. Patricia Bianca Clissa. Após 1, 3, 6 e 24 horas da inoculação de 10µg de neuwiedase na pata de camundongos (n=3), os animais foram sacrificados e a pata retirada foi colocada em 200µL de tampão PBS, picotada e macerada. Posteriormente acrescentou-se 300µL de PBS e centrifugou a amostra a 10.000 rpm por 5 minutos (Laborzentrifugen 2K 15-Sigma). Os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C e reservados para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

Para este ensaio foram utilizados anticorpos monoclonais específicos anti-citocinas (Sigma, Chemical, Co.) para a captura de antígenos no sobrenadante das patas. Os anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS foram incubados durante a noite em placas próprias para o ELISA, à temperatura ambiente. No dia seguinte estas placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05% por 3 vezes e bloqueadas por duas horas com uma solução a 1% de BSA e

Para este ensaio foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongos específicos anti-citocinas (RDI) para a captura de antígenos no sobrenadante das patas. Os anticorpos monoclonais anti-citocinas diluídos em PBS foram incubados durante a noite em placas próprias para o ELISA, à temperatura ambiente. No dia seguinte estas placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05% por 3 vezes e bloqueadas por duas horas com uma solução a 1% de BSA e 5% de sacarose em PBS. Após este período de bloqueio as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween e as amostras (ou a curva padrão de citocinas) foram colocadas para incubação por mais 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem foi adicionado o segundo anticorpo (anticorpo policlonal de camundongo biotilado anti-citocinas-RDI) incubado durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas novamente e incubadas com uma solução de Horseradish Peroxidase conjugada à avidina (Sigma, Chemical, Co) diluída em 1%BSA/PBS, durante 20 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS/Tween, foram adicionados 100 µL do reagente Tetrametilbenzidina (TMB® - Sigma) para revelar a reação. Após cerca de 30 minutos a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 30% e a absorbância lida em um comprimento de onda de 450 nm. A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão feita com as respectivas citocinas recombinantes, utilizadas em uma diluição seriada a partir de 2.000 até 15,62 pg/mL. Os resultados da absorbância foram analisados por regressão linear em um programa de análise de curvas GraphPad Software Versão 2.01.

3.10. Análise Estatística

A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizadas com auxílio do software Excel.

4- Resultados

4.1. Cromatografia da peçonha bruta em resina de troca-iônica CM-Sepharose

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em gel de CM-Sepharose utilizando-se um gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 mol/L a 0,5 mol/L pH 7,8 resultou em cinco frações denominadas de CM1 a CM5 conforme evidenciado na figura 2.

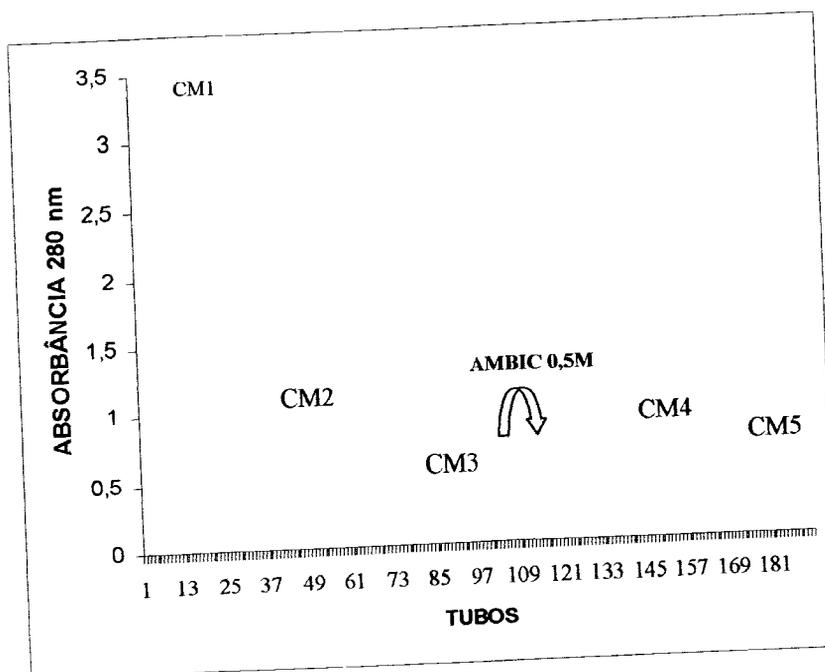


Figura 2- Perfil cromatográfico do fracionamento de 225mg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em coluna (2,0 x 20,0 cm), contendo a resina de troca iônica CM-Sepharose Fast Flow equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05mol/L pH 7.8. Estabelecendo-se um gradiente convexo de concentração 0,05 mol/L a 0,5 mol/L. Frações de 3ml foram coletadas em cada tubo num fluxo de 20mL/hora à temperatura ambiente e as absorvâncias lidas a 280 nm.

4.2. Cromatografia da fração CM2 em resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B

A metaloprotease neuwiedase foi eluída da resina Phenyl-Sepharose CL-4B, quando se utilizou 4M de NaCl em TrisHCl-10mM conforme visualizado na figura 3.

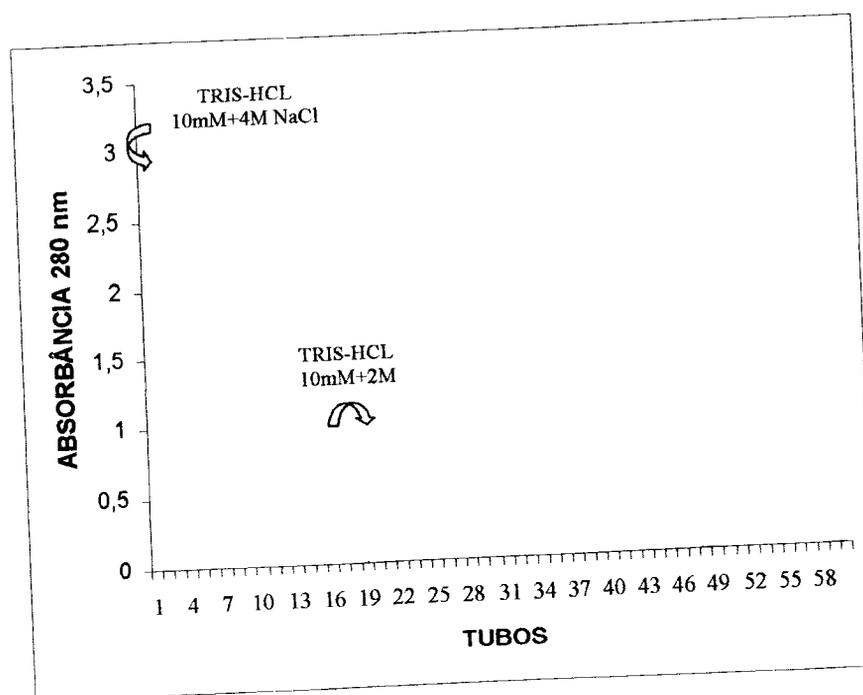


Figura 3-Perfil cromatográfico do fracionamento de 10 mg da fração CM2 em resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose (20 x 1,2 cm), equilibrada em tampão Tris-HCl 10mM pH 8.5 + NaCl 4M, eluída em gradiente de 4M a 0M de NaCl. Frações de 3 ml/tubo foram coletadas à temperatura ambiente num fluxo de 15mL/hora e as absorvâncias lidas a 280 nm.

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das frações resultantes do processo e purificação da neuwiedase

A fração correspondente ao primeiro pico (4M NaCl) foi lavada para se retirar o sal em sistema de ultrafiltração (AMICON YM 10) e posteriormente visualizada em gel de poliacrilamida. A metaloprotease neuwiedase apresentou-se com massa molecular de aproximadamente 22kDa (Figura 4).

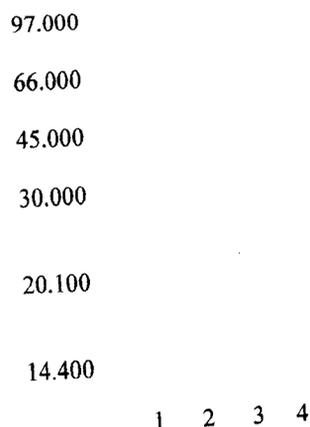


Figura 4-Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Gel à 13,5%, tampão Tris-HCl 0,025M, pH 8,3, 600 V, tempo de corrida de 130 minutos. 1-Marcador de peso molecular LMW (Amersham Biosciences): fosforilase (97.000), albumina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina do feijão e da soja (20,100), α lactalbumina (14,400). 2- Peçonha bruta. 3- fração CM2. 4-Neuwiedase.

4.4. Recuperação protéica

Na Tabela I estão expressas as porcentagens de recuperação em termos de concentração (mg) por dosagem pelo método de Bradford, M, (1976), das frações obtidas da peçonha de *Bothrops pauloensis* cromatografadas em CM-Sepharose e em Phenyl-Sepharose. Como pode ser observado, a recuperação total de proteínas foi de aproximadamente 62% em relação à peçonha bruta total, sendo que a fração CM2, corresponde a aproximadamente 2,3 % desta peçonha. Após o fracionamento em Phenyl -Sepharose obteve-se aproximadamente 30% de recuperação da neuwiedase em relação à fração CM2.

Tabela 1-Rendimento protéico das frações obtidas do fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em CM-Sepharose e da fração CM2 em Phenyl-Sepharose CL-4B.

Fração	Proteína (mg)	Proteína (%)
Passo 1: CM-Sepharose		
PB	225	100
CM1	110,8	49,2
CM2	5,2	2,3
CM3	8,4	3,7
CM4	9,1	4,0
CM5	6,3	2,8
Total	139,9	62
Passo 2: Phenyl-Sepharose CL-4B		
CM2	10	100
4M NaCl-Neuwiedase	3	30
2M NaCl	0,2	2
Total	3,2	32

4.5. Atividade fibrinogenolítica

Como pode ser observado na figura 5, a degradação do fibrinogênio pela neuwiedase foi dose dependente, com 1ug da toxina as cadeias A α e B β já se apresentavam totalmente degradadas, enquanto que a γ permaneceu inalterada nas condições experimentais utilizadas. A neuwiedase também apresentou um modelo de degradação proteolítica tempo dependente. Como pode ser observado na figura 6, a partir dos 15 primeiros minutos a cadeia A α já estava parcialmente degradada, sendo totalmente consumida em 30 min. de incubação. A cadeia B β foi completamente degradada a partir de 2 horas de incubação, com 24 h observou-se a degradação também da cadeia γ .

A influência de alguns agentes inibidores da atividade proteolítica, EDTA (10mM) e 1, 10 fenantrolina (10mM) pode ser observada na figura 7. O EDTA e a 1,10 fenantrolina inibiram completamente a atividade proteolítica da neuwiedase sobre o fibrinogênio.

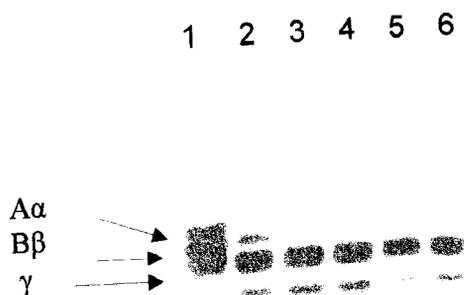


Figura 5-Atividade Fibrinogenolítica em gel de poliacrilamida a 13,5 % com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino pela neuwiedase. 1-Fibrinogênio controle (75 μ g). 2-Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (0,5 μ g). 3- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1,0 μ g). 4- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (2,0 μ g). 5- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (5,0 μ g). 6- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (10,0 μ g).

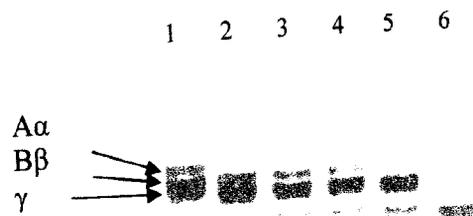


Figura 6-Atividade Fibrinogenolítica em gel de poliacrilamida a 13,5 % com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino pela neuwiedase. 1-Fibrinogênio controle (75 μ g). 2-Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g)-15 min. 3- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g)-30 min. 4- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g)-1 hora. 5- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g)-2 horas. 6- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g)-24 horas.

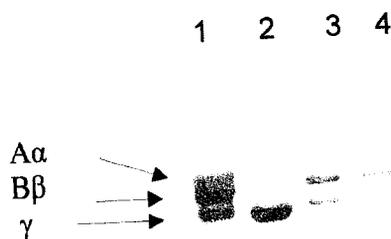


Figura 7-Atividade Fibrinogenolítica em gel de poliacrilamida a 13,5 % com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, provocado pela neuwiedase. 1- Fibrinogênio controle (75 μ g). 2-Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g). 3- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g) + EDTA (10mM). 4- Fibrinogênio (75 μ g) + neuwiedase (1 μ g) + 1,10 fenantrolina (10mM).

4.6. Quantificação do fibrinogênio

A concentração de fibrinogênio no plasma de camundongos foi quantificada 3 horas após a inoculação intravenosa de 0.6 DL₅₀ de peçonha bruta ou neuwiedase. A quantidade de fibrinogênio encontrada no plasma dos camundongos inoculados com a peçonha bruta ou a neuwiedase foi de aproximadamente (67,8 mg/dL) e 14 mg/dL respectivamente.

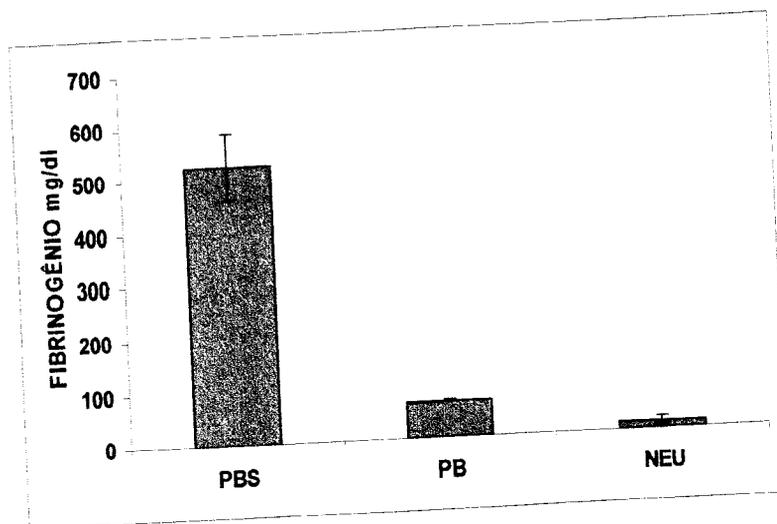


Figura 8-Valores de fibrinogênio (mg/dL) no plasma de camundongos após 3 horas da inoculação intravenosa de 0.6 DL₅₀ de peçonha bruta ou neuwiedase. Animais controles foram inoculados com PBS. Os resultados representam a média + ou- desvio padrão (n=4).

4.7. Alterações hematológicas

Para avaliar o efeito sistêmico induzido pela toxina, foi quantificado o número de plaquetas, o número de hemácias e a % de hematócrito 6 horas após a inoculação intravenosa de 0.6 DL₅₀ de peçonha bruta ou neuwiedase. Observou-se uma redução significativa do número de plaquetas, e uma pequena redução do número de hemácias e % de hematócrito nos animais inoculados com a peçonha bruta ou neuwiedase quando comparado com o PBS (Figuras 9,10,11).

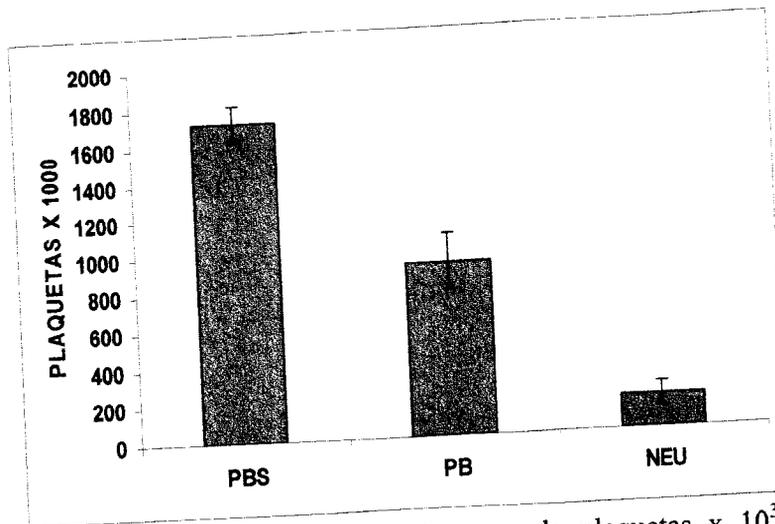


Figura 9-Valores do número de plaquetas (número de plaquetas $\times 10^3 \mu\text{L}$) no sangue de camundongos após 6 horas da inoculação intravenosa de 0.6 DL_{50} de peçonha bruta ou neuwiedase. Animais controles foram inoculados com PBS. Os resultados representam a média \pm ou- desvio padrão (n=4).

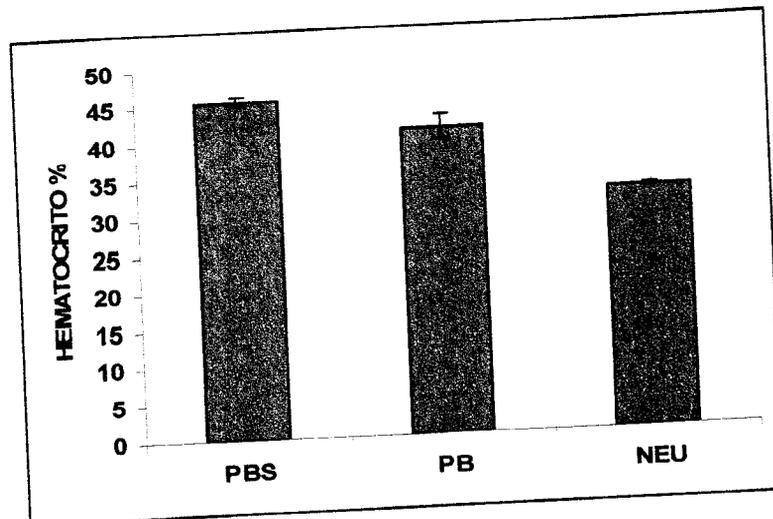


Figura 10-Valores da porcentagem de hematócrito (%) no sangue de camundongos após 6 horas da inoculação intravenosa de 0.6 DL_{50} de peçonha bruta ou neuwiedase. Animais controles foram inoculados com PBS. Os resultados representam a média \pm ou- desvio padrão (n=4).

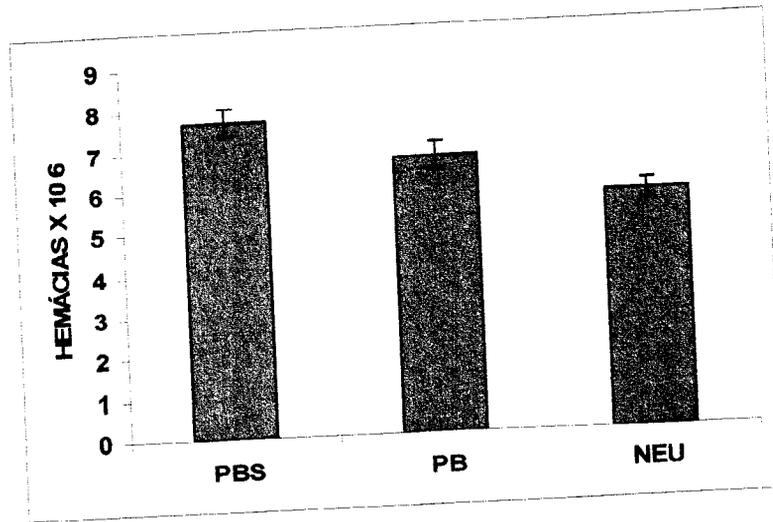


Figura 11-Valores do número de hemácias (número de hemácias x 10⁶μL) no sangue de camundongos após 6 horas da inoculação intravenosa de 0.6 DL₅₀ de peçonha bruta ou newiedase. Animais controles foram inoculados com PBS. Os resultados representam a média + ou- desvio padrão (n=4).

4.8. Atividade edematogênica

A atividade edematogênica da metaloprotease neuwiedase foi avaliada pela porcentagem de edema induzido na pata de camundongos inoculados com 10 μ g de neuwiedase ou peçonha bruta como mostrado na figura 12. Observou-se um significativo aumento na porcentagem de edema quando comparado com o controle positivo (peçonha bruta) e negativo (PBS). A maior porcentagem de edema foi observada 30 minutos após a inoculação da metaloprotease neuwiedase. Também foi avaliada a porcentagem de edema induzida pela neuwiedase inativada com EDTA, onde se observa uma diminuição na porcentagem de edema quando comparado com o edema induzido pela neuwiedase ativa.

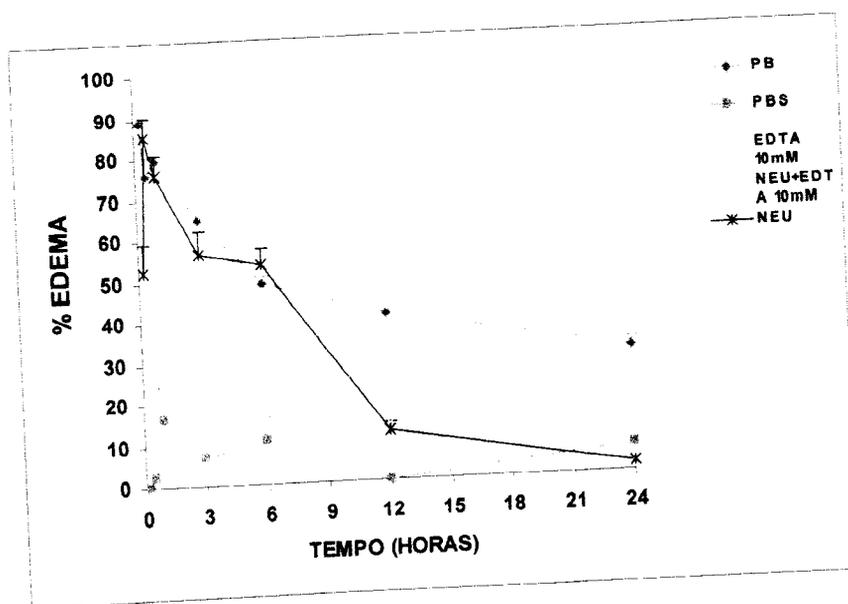


Figura 12- Porcentagem de edema induzido na pata de camundongos inoculados com 10 μ g de peçonha bruta, neuwiedase ou neuwiedase inativada com EDTA e sacrificados após 0,25, 0,5, 1, 3, 6, 12, 24 horas. Animais controles foram inoculados com 10 μ L de PBS ou EDTA (10mM). A porcentagem máxima de edema foi observada 30 minutos após a inoculação da toxina. O edema produzido foi medido (mm) utilizando-se um paquímetro (CALIPER). Os resultados representam a média + ou- desvio padrão (n=4).

4.9. Atividade miotóxica avaliada por dosagem de creatina quinase

A atividade miotóxica da neuwiedase foi analisada pela dosagem plasmática da enzima creatina quinase em camundongos inoculados com 50 μg da neuwiedase, como mostrado na figura 13. Nota-se um significativo aumento na liberação de creatina quinase, quando comparada ao controle PBS. Níveis máximos de CK foram observados 3 horas após a inoculação da metaloprotease neuwiedase correspondendo aproximadamente 1431 U/L

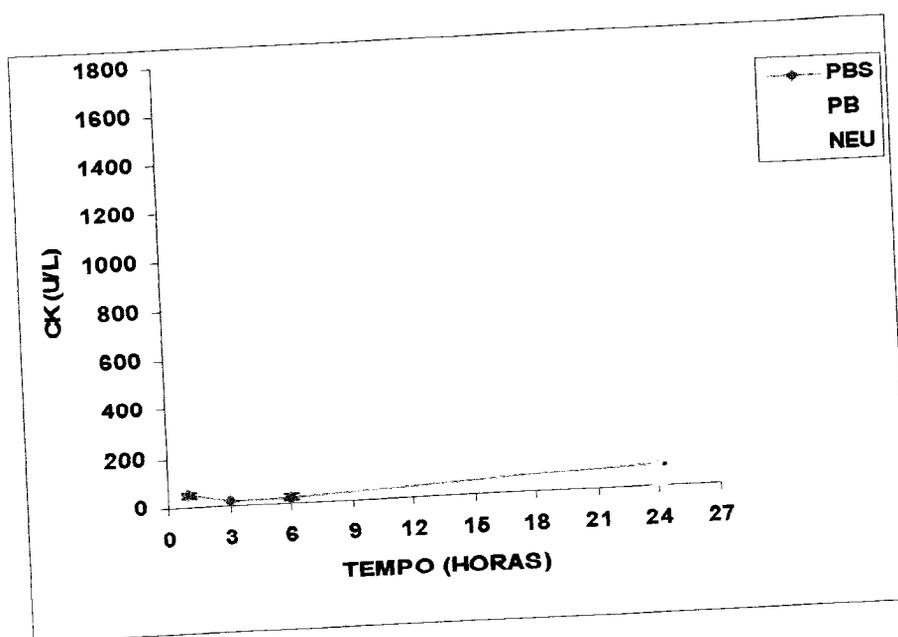


Figura 13-Níveis plasmáticos de creatina quinase (CK) obtido após 1, 3, 6, 24 horas da inoculação de 50 μg da neuwiedase ou 25 μg de peçonha bruta no músculo gastrocnêmico de camundongos. Animais inoculados com 20 μL de PBS foram utilizados como controle negativo. A atividade foi expressa em U/L. Os resultados representam a média + ou- desvio padrão (n=4).

4.10. Análise histopatológica da evolução da lesão tecidual induzida pela peçonha de *Bothrops pauloensis* e pela neuwiedase

A evolução do dano tecidual local foi analisada por microscopia de luz após 1, 3, 6, 24, 72 horas, 1 e 2 semanas da inoculação de 50µg da peçonha bruta ou da neuwiedase no músculo gastrocnêmio esquerdo de camundongos. Os grupos controles que receberam 50µL de PBS não apresentaram nenhuma alteração morfológica (Figura 14A).

Entre 1 e 6 horas após a inoculação da peçonha bruta observa-se um grande número de hemácias, caracterizando o quadro hemorrágico (Figuras 14B, 14C e 14D), observa-se também a presença de edema. Após 6, 24 e 72 horas nota-se a necrose das fibras musculares (Figuras 14D, 14E, 14F). A partir de uma semana houve um aumento significativo do infiltrado inflamatório, principalmente macrófagos, dando início ao quadro de regeneração das fibras musculares, com diminuição do edema, hemorragia, necrose. As células musculares em regeneração mostravam-se diminuídas de tamanho e com núcleos grandes, vesiculosos, por vezes, com nucléolo proeminente. O processo de reparação das fibras musculares, com a presença de tecido conjuntivo se confirmou nas lâminas coradas pelo Masson, coloração que cora em azul o tecido conjuntivo (Figura 14I).

A figura 15 mostra a lesão tecidual induzida pela neuwiedase. Quando comparados com o controle negativo (PBS), as fibras de músculo gastrocnêmio de camundongos inoculados com 50µg de neuwiedase mostraram, após as primeiras horas, um acentuado edema, evidenciado pelo espaçamento entre as células musculares. Além disso, notou-se importante infiltrado inflamatório constituído, predominantemente, por neutrófilos (1h e 3hs após a inoculação da toxina) (Figura 15B e 15C). Entre 3 e 24 horas, observou-se necrose das células musculares, caracterizada por citoplasma fracamente corado, pálido, com perda dos detalhes citoplasmáticos e, por vezes, sinais de fagocitose representados pela presença de macrófagos no interior do miócito (Figuras 15C, 15D, 15E). Após 24 horas, verificou-se um aumento na intensidade do exsudato inflamatório. Passadas 72 horas, as principais células encontradas no infiltrado inflamatório foram macrófagos (Figura F). Não foram observados sinais de regeneração após 1 e 2 semanas da inoculação de neuwiedase (dados não mostrados). Os músculos tratados com neuwiedase não apresentaram hemorragia.

Figura 14-Histopatologia do músculo gastrocnêmico esquerdo de camundongos inoculados com 25µg da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*. **A** – músculo controle inoculado com 50µL de PBS: observar a integridade das fibras musculares; **B, C, D**-1, 3 e 6 horas respectivamente, após a inoculação da peçonha bruta: observar a hemorragia (**H**) e o edema formados (**E**); **E, F**- 24, 72 horas: observar a necrose das fibras musculares e o infiltrado inflamatório, principalmente neutrófilos (**I**); **G**, 1 semana e **H, I**- 2 semanas: observar a regeneração das fibras musculares (**R**) e o tecido conjuntivo nas fibras em regeneração (**C**). Coloração: figuras **A, B, C, D, E, F, G, H**: lâminas coradas em HE; figura **I**: Masson. Aumento: figuras, **B, C, D, E, F, H, I**: 400x; figuras, **A e G**: 200x.

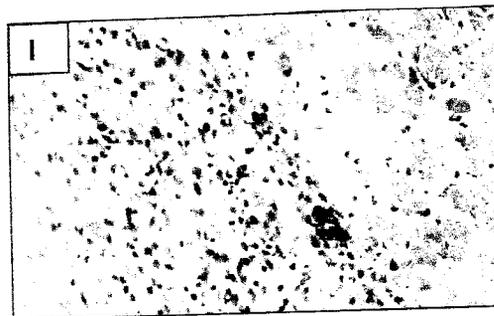
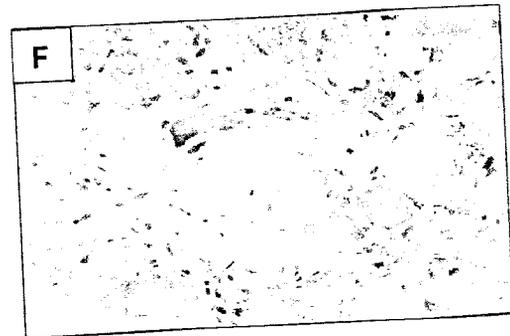
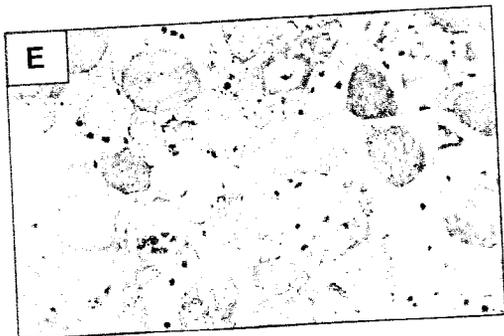
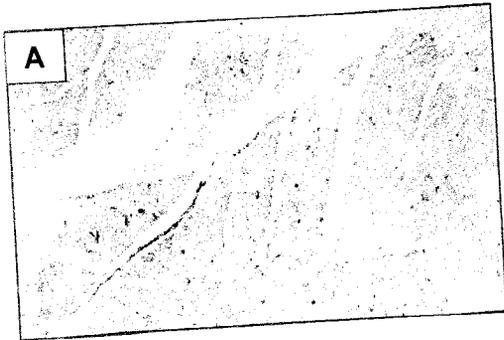
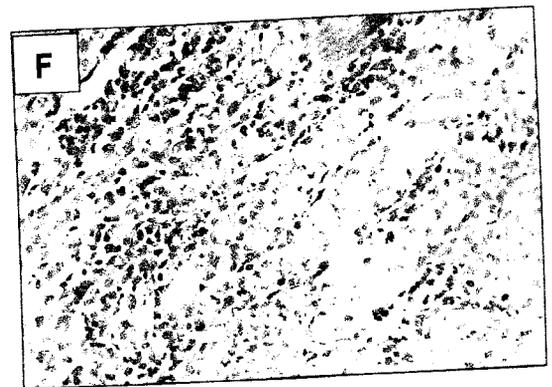
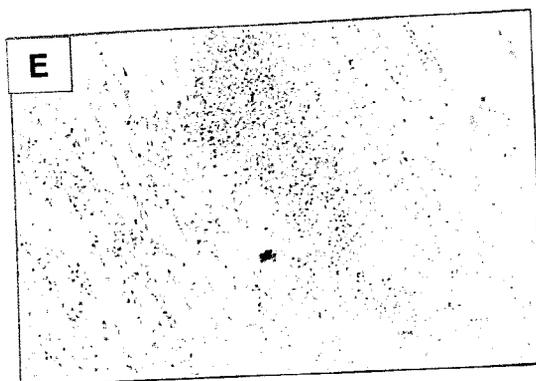
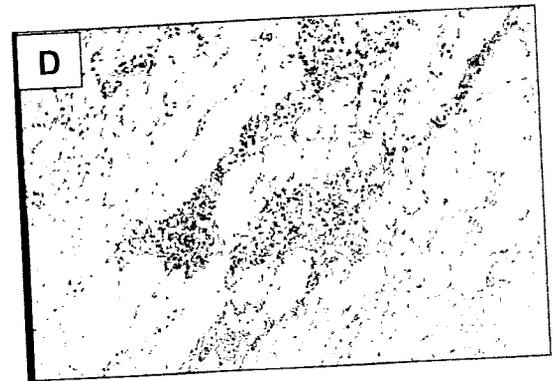
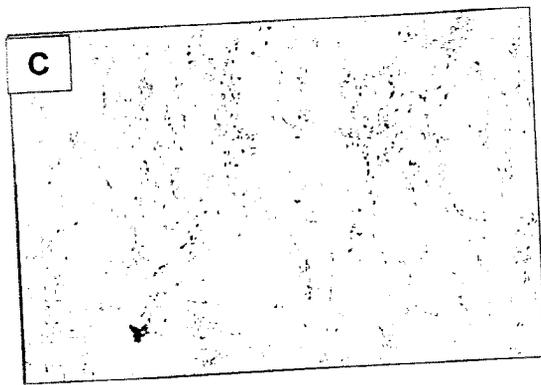
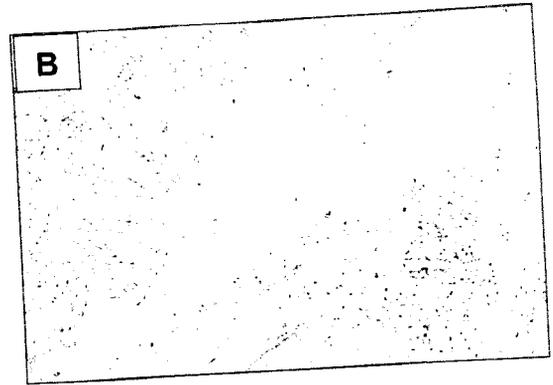
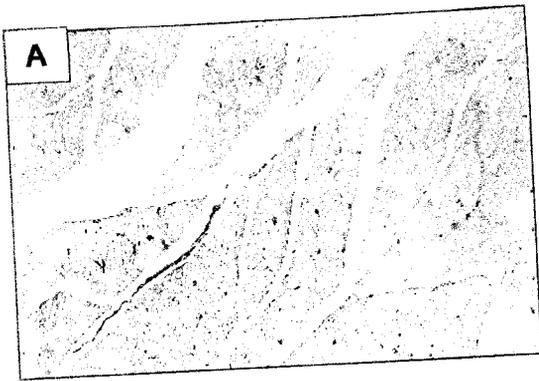


Figura 15- Histopatologia do músculo gastrocnêmico esquerdo de camundongos inoculados com 50µg da neuwiedase. **A** – músculo controle inoculado com 50µL de PBS: observar a integridade das fibras musculares; **B, C**-1 e 3 horas após a inoculação da neuwiedase respectivamente: observar edema (**E**) e o intenso infiltrado inflamatório (**I**); **D**- 6 horas: observar a necrose das fibras musculares (**N**); **E, F**- 24 e 72 horas: observar o grande número de macrófagos (**M**). Coloração: figuras **A, B, C, D, E** e **F** foram coradas com HE . Aumentos: figuras **B, C, D, E**, 200x; figura **A**, 100x; figura **F**: 400x.



4.11. Dosagem de citocinas

Para avaliar a resposta inflamatória induzida pela neuwiedase foram feitas as dosagens das citocinas IL-8, IL-6, IL-1 β , no sobrenadante da pata de camundongos, 1, 3, 6 e 24 horas após a inoculação de 10 μ g de neuwiedase. Animais que receberam PBS foram usados como controle. Elevados níveis de IL-8 e IL-6 foram encontrados 3 horas após a inoculação de neuwiedase quando comparados com o PBS (figuras 16 e 17). Altos níveis de IL-1 β foram encontrados entre 3 e 6 horas após a inoculação da toxina (figura 18).

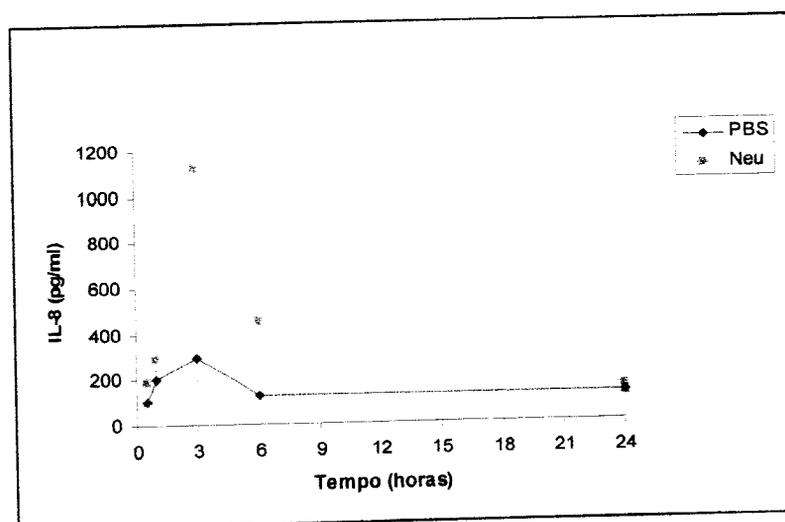


Figura 16-Dosagem de IL-8 no sobrenadante resultante do masserado das patas de camundongos inoculados com 10 μ g de neuwiedase. Animais que receberam PBS foram usados como controle. Níveis máximos de citocina foram encontrados 3 horas após a inoculação da toxina correspondendo aproximadamente 1127 pg/mL. Os resultados representam a média + ou- desvio padrão (n=3).

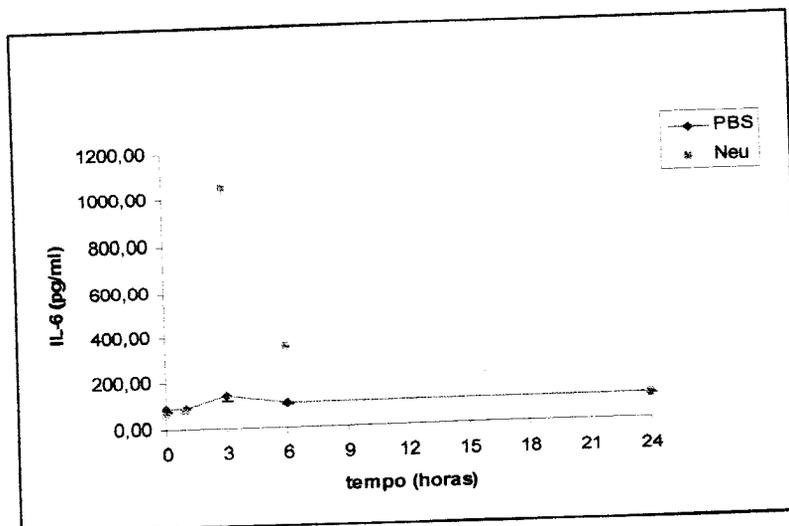


Figura 17-Dosagem de IL-6 no sobrenadante resultante do masserado de patas de camundongos inoculados com 10 µg de neuwiedase. Animais que receberam PBS foram usados como controle. Níveis máximos da citocina foram encontrados 3 horas após a inoculação da toxina correspondendo aproximadamente 1047 pg/mL. Os resultados representam a média + ou- desvio padrão (n=3).

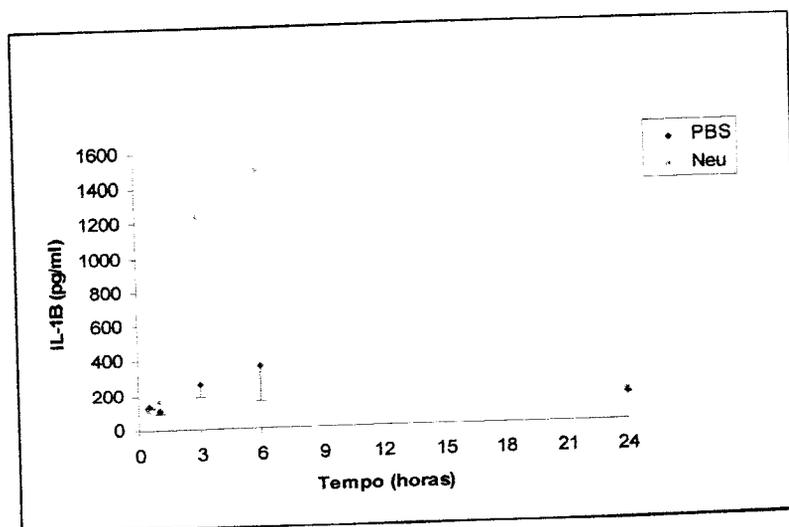


Figura 18-Dosagem de IL-1 β no sobrenadante resultante do masserado de patas de camundongos inoculados com 10 µg de neuwiedase. Animais que receberam PBS foram usados como controle. Níveis máximos da citocina foram encontrados 6 horas após a inoculação da toxina correspondendo aproximadamente 1484 pg/mL. Os resultados representam a média + ou- desvio padrão (n=3).

5-Discussão

A maioria dos acidentes botrópicos não resultam na morte das vítimas, mas apresentam como conseqüências graves efeitos locais podendo levar a perda do membro afetado. As SVMs possuem papel chave nesse quadro, podendo causar danos teciduais locais como edema, necrose, hemorragia, inflamação e também alterações no sistema hemostático (Gutiérrez, J. M, et al, 2000; Matsui, T, et al, 2000). Diante desse fato, estudamos algumas alterações sistêmicas e locais induzidas pela metaloprotease neuwiedase isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

Neste trabalho, a neuwiedase foi purificada utilizando-se a metodologia previamente descrita por Rodrigues, V.M, et al. (2000) com algumas modificações. Para a purificação desta toxina foi utilizada uma cromatografia de troca-iônica em gel de CM-Sepharose, que resultou em cinco frações protéicas, denominadas de CM1 a CM5 (Figura 2). Da peçonha *Bothrops neuwiedi pauloensis* seguindo os mesmos processos de purificação, foram isoladas duas miotoxinas Lys 49 (Rodrigues, V.M, et al, 1998), duas fosfolipases Asp49 (Rodrigues, V.M, et al., 2004) e uma fosfolipase A₂ ácida (Rodrigues, R.S, 2006). Algumas atividades enzimáticas e biológicas presentes em peçonhas ofídicas também foram avaliadas por estes autores, como a atividade fosfolipásica A₂, a qual foi encontrada nas frações CM1 e CM5. A atividade hemorrágica, bastante pronunciada nos envenenamentos botrópicos, foi detectada também na fração CM1. Iniciando com essa mesma metodologia de purificação, também estão em processo final de purificação em nosso laboratório uma serinoprotease e uma L-aminoácido-oxidase presentes nas frações CM4 e CM1, respectivamente (comunicação pessoal).

A fração CM2, que representou 2,3 % da peçonha total de *Bothrops pauloensis* (Tabela 1), apresentou várias bandas em PAGE-SDS (Figura 4), assim fez-se necessário a padronização de outros métodos cromatográficos que permitissem obter essa enzima com melhor grau de pureza. Com a utilização da resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B, a qual tem a capacidade de se ligar a proteínas de caráter hidrofóbico que são eluídas quando se utiliza um gradiente decrescente de força iônica, obteve-se a metaloprotease neuwiedase com um melhor grau de pureza (Figura 4) e um bom rendimento protéico (Tabela I). Dessa forma pôde-se proceder com os testes de caracterização enzimática e biológica.

A metaloprotease neuwiedase não demonstrou nenhuma atividade coagulante ou fosfolipásica A₂ (dados não mostrados) como também foi demonstrado por Rodrigues, V.M, et al, (2000).

As SVMs são capazes de atuar sobre uma ampla variedade de substratos, incluindo o fibrinogênio (Bjarnason, J.B, et al, 1994). A molécula de fibrinogênio é composta de 3 pares de cadeias ligadas entre si por pontes dissulfeto, estas são denominadas A α , B β e γ (Doolittle et al, 1984). As enzimas fibrinogenolíticas podem ser classificadas em α , β , ou γ fibrinogenases de acordo com a cadeia do fibrinogênio preferencialmente degradada (Markland, F.S, et al, 1998). A neuwiedase foi capaz de clivar as cadeias A α e B β do fibrinogênio, mostrando um padrão de hidrólise dose e tempo dependentes (Figuras 5 e 6). Essa enzima é classificada como α fibrinogenase por clivar preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio (Rodrigues, V.M, et al, 2000; Swenson, S, et al, 2005). Sendo as metaloprotease zinco-dependentes elas podem ser inibidas por agentes quelantes como EDTA ou 1,10 fenantrolina (Rodrigues, V.M, et al., 2000; Matsui, T, et al, 2000), esta inibição foi confirmada para a atividade fibrinogenolítica da neuwiedase isolada neste trabalho (Figura 7).

A atividade proteolítica da neuwiedase sobre o fibrinogênio também foi evidenciada in vivo, com diminuição dos níveis plasmáticos do fibrinogênio após inoculação desta enzima por via intravenosa em camundongos (Figura 8). A capacidade da neuwiedase em clivar o fibrinogênio e impedir a formação do coágulo de fibrina, a caracteriza como uma provável enzima anticoagulante podendo afetar o sistema hemostático. O estudo mais detalhado da relação estrutura-função dessa enzima permitirá futuras aplicações da mesma no controle de distúrbios sistêmicos, podendo ser utilizada como agente desfibrinogenante, como as enzimas Ancrod e Batroxobina, as quais têm sido utilizadas em pacientes vítimas de trombose, infarto do miocárdio, doenças vasculares periféricas, isquemia aguda e rejeição de transplantes renal (Bell, W.R, 1988; Stocker, K, et al, 1988).

Os componentes das peçonhas de serpentes são responsáveis pelas várias alterações sistêmicas apresentadas pelas vítimas de acidentes ofídicos, podendo interferir com as proteínas da cascata de coagulação e outros fatores que garantem a hemostasia, além de causarem alterações hematológicas (Markland, F. S, 1998; Matsui, T, et al, 2000; Sano-Martins, I.S, et. al, 1995). Alterações hematológicas são frequentemente observadas após o envenenamento

botrópico, tais como leucocitose caracterizada por (neutrofilia e monocitose), as quais podem ser atribuídas ao processo inflamatório no local da inoculação da peçonha (Cardoso, J.L.C, et al., 1993). Eritrocitopenia, também ocorre após o envenenamento botrópico, e esta pode ser resultante de um processo multifatorial, como resultado de alterações nos mecanismos hemodinâmicos, celulares e bioquímicos, os quais podem ser induzidos por diferentes toxinas presentes nessas peçonhas de serpentes (Sano-Martins, I.S, et al., 1995).

No presente trabalho foi observado uma redução nos níveis plasmáticos de hemácias, da % de hematócrito e de plaquetas após a inoculação da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (Figuras 8, 9 e 10). Izidoro, L.F.M, et al (2003) observaram uma diminuição do número de hemácias, da % hematócrito e plaquetas em camundongos tratados com peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, sugerindo a ocorrência de hemorragia e também hemólise intravascular devido à atividade hemolítica da peçonha.

Esses distúrbios hematológicos também foram verificados experimentalmente após a administração intravenosa da peçonha de *Bothrops jararaca* em cães, onde se observou redução no número de plaquetas entre 1 e 6 horas (Sano-Martins, I.S, et al 1995). Baixos níveis de hematócrito em camundongos tratados com peçonha de *Bothrops jararaca* também foram encontrados por Teixeira, F.P.C, et al (2005). A depleção na quantidade de fibrinogênio e de outros fatores da cascata de coagulação e a redução do número de plaquetas foi observada em pacientes envenenados por *Pseudechis papuanus* (David Laloo, et al 1994) e Tunisian saw-scaled (Adrian, G, et al, 1994).

A neuwiedase também provocou queda no número de plaquetas, hemácias e consequentemente do hematócrito (Figura 8, 9 e 10). Apesar dessa enzima não apresentar atividade hemorrágica quando administrada intradermicamente (Rodrigues, V.M, et al., 2001), provoca hemorragia pulmonar disseminada quando injetada em altas doses por via endovenosa (Rodrigues, V.M, et al., 2001), esta hemorragia pulmonar pode ser responsável pela diminuição do número de hemácias e de plaquetas induzida pela neuwiedase. As plaquetas sofrem depleção, após envenenamento ofídico, principalmente devido à formação disseminada de coágulos no espaço intravascular. Esta plaquetopenia pode ser induzida por um grupo de enzimas que interferem na função plaquetária tais como serinoproteases e fosfolipases A₂ (Mounier, B.B, et al., 1994) ou pela ação de metaloproteases hemorrágicas sobre os vasos sanguíneos, danificando-os e expondo seus componentes principais como o colágeno. Com o rompimento da parede

vascular, e exposição de componentes do subendotélio, as plaquetas migram para o sítio da lesão e se ligam a proteínas da camada subendotelial para formarem um tampão plaquetário, este mecanismo conseqüentemente levará uma diminuição dos níveis plasmáticos de plaquetas. Ainda com relação à análise das alterações hematológicas é relevante ressaltar que a metaloprotease neuwiedase foi capaz de provocar uma maior alteração desses parâmetros do que a peçonha bruta, esta diferença provavelmente se deve a algum erro experimental durante a inoculação da peçonha bruta. Assim, torna-se necessário a confirmação destes resultados.

Além das alterações sistêmicas induzidas pela peçonha bruta e pela neuwiedase, estudamos também o papel desses componentes na lesão tecidual local e na resposta inflamatória. A peçonha bruta e a neuwiedase induziram uma maior ação edematogênica na pata de camundongos 30 minutos após a inoculação (Figura 12). Sendo a neuwiedase uma metaloprotease zinco-dependente houve a inibição da formação de edema quando a toxina foi pré-incubada com o agente quelante EDTA (Figura 12). O edema induzido pela neuwiedase pode ser devido a degradação proteolítica dos componentes da membrana basal, com exudação do plasma sem causar colapso da estrutura dos microvasos, ou ainda, a liberação de mediadores farmacologicamente ativos de precursores protéicos devido a ação enzimática da neuwiedase (Rodrigues, V.M, et al, 2001).

Um elevado nível de creatina quinase no plasma dos camundongos foi observado após 3 horas da inoculação das amostras (Figura 13) sugerindo uma lesão das células musculares que foi confirmada através de análises histopatológicas do músculo gastrocnêmio de camundongos entre uma hora e duas semanas (Figuras 14 e 15). Observa-se a ocorrência de hemorragia (somente na presença de peçonha bruta), formação de edema, necrose das fibras musculares e um elevado infiltrado inflamatório caracterizado inicialmente por acúmulo de neutrófilos e posteriormente macrófagos.

Vários componentes da peçonha bruta podem estar associados aos efeitos locais observados neste trabalho. Diversas fosfolipases A₂ e metaloproteases hemorrágicas têm sido descritas por atuarem na patologia local após o envenenamento (Rucavado, A, et al 1999 e Gutiérrez, J.M, et al 1995a). A mionecrose pode ser devido a uma ação direta de PLA₂s miotóxicas nas membranas plasmáticas das células musculares (Gutiérrez, J.M, et al, 1997 e Soares, A.M, 2004), ou provocada pela ação indireta de metaloproteases hemorrágicas que causam danos nas células musculares pela isquemia, que ocorre como conseqüência da hemorragia (Gutiérrez, J.M, et al,

1995b). A lesão tecidual local induzida por metaloproteases não hemorrágicas ou fracamente hemorrágicas, como a neuwiedase, pode ser devido a uma ação citotóxica direta nas células musculares, degradação da matrix extracelular, proteínas da superfície celular ou outros mecanismos indiretos ainda não identificados (Rucavado, A, et al, 1999 e Gutiérrez, J.M, et al, 2000; Ramos, O. H. P., et al, 2006).

Estudos preliminares da resposta inflamatória local induzida pela neuwiedase após 3 e 6 horas de sua inoculação em patas de camundongos demonstraram altos níveis de IL-1 β , IL-6 e IL-8. Os componentes das peçonhas de serpentes são importantes ativadores de agentes proinflamatórios (Laing, D.G, et al, 2005). As citocinas e quimiocinas são importantes mediadores das interações celulares e de vários eventos imunológicos e inflamatórios, atuando também na reparação de tecido e na fibrose (Voronov, E, et al, 1999). Nos estágios iniciais da resposta inflamatória há o acúmulo predominante de neutrófilos que são mediados por citocinas. A interleucina IL-8 é secretada por leucócitos e está envolvida na mediação da resposta inflamatória ativando neutrófilos (Sandra, P.F, et al, 1995). IL-1 é subdividida em IL-1 α e IL-1 β e são produzidas principalmente por macrófagos e monócitos, já as citocinas IL-6 são conhecidas por ativarem as células T e B.

Assim como a neuwiedase, diversas toxinas isoladas têm sido relatadas por induzirem a liberação de citocinas. Fernandes, C.M, et al, (2006) descreveram a reação inflamatória induzida por BaP1, uma metaloprotease da classe PI isolada de *Bothrops asper*, esta induziu um acúmulo de leucócitos e liberação de IL-1 e TNF α sendo o domínio catalítico dessa proteína essencial para esses efeitos. Gallagher, P, et al, (2005) relatou o aumento na expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e das quimiocinas IL-8, CXCL-1 e CXCL-2, 1 ou 3 horas após a injeção de jararagina no músculo gastrocnêmio. Esses fatores proinflamatórios oferecem uma significativa contribuição para a destruição do tecido local devido ao subsequente influxo de neutrófilos e macrófagos para o local afetado (Gallagher, P, et al, 2005).

Os efeitos de metaloproteases da peçonha botrópica sobre os componentes do sangue foram primeiramente elucidados com a toxina jararagina isolada do veneno de *Bothrops jararaca* (Paine, M, et al., 1992). A jararagina é uma metaloprotease da classe PIII fortemente hemorrágica, capaz de causar distúrbios na hemostasia e também contribuir para o dano tecidual local estabelecido após a picada. Contribuindo com a patogênese local após o envenenamento a jararagina induz resposta inflamatória com o acúmulo de leucócitos e a liberação de citocinas

(Clissa, PB, et al, 2001). Além disso, estudos recentes têm relatado a interferência da jararagina com células cancerígenas, mostrando assim a versatilidade dessa enzima (Laing, G.D, et al, 2005).

Neste trabalho também foi estudado o processo de regeneração tecidual após inoculação intramuscular da peçonha bruta ou da neuwiedase em músculo gastrocnêmio de camundongos. Os músculos tratados com peçonha bruta mostraram indícios de regeneração 1 e 2 semanas após a inoculação da peçonha, evidenciados pela presença de núcleos centrais e fibras fracamente coradas, essa regeneração foi apenas parcial, havendo presença de tecido conjuntivo fibroso em algumas áreas, onde o músculo provavelmente deixou de ser funcional. Embora, a peçonha bruta (na dose e tempos avaliados) tenha causado um quadro hemorrágico intenso, é provável que uma regeneração dos vasos sanguíneos tenha ocorrido, uma vez que uma eficiente circulação é essencial para uma completa regeneração das fibras musculares lesadas, provendo a área afetada com macrófagos responsáveis pela limpeza do local e com o suprimento necessário de O₂ (Harris, J.B, 2003). Ao mesmo tempo, a regeneração do músculo depende da ativação de células satélites (células precursoras das células musculares localizadas na lâmina basal) e de outros fatores miogênicos secretados por macrófagos (Neto, H.S, et al, 2005), assim os neutrófilos possuem um papel relevante nesse processo, uma vez que recrutam e ativam macrófagos (Teixeira, C.F.T, et al, 2003).

Necrose muscular e a regeneração tecidual nos músculos tratados com a neuwiedase após 72 horas não foram observadas, o que também foi confirmado por Baldo, C, (2004). No entanto, esta condição seria esperada uma vez que nenhuma hemorragia foi observada nos músculos tratados com neuwiedase, ocorrendo suprimento de sangue necessário para que ocorra a regeneração do músculo. Assim o processo de regeneração neste tecido pode ter ocorrido entre os tempos de 72 horas e 1 semana (intervalos de tempo não estudados) ocorrendo um rápido restabelecimento das fibras musculares. Diante disso, novos estudos deverão ser realizados para entender melhor esse fato.

As SVMP possuem papel chave no dano tecidual local induzido pelas peçonhas de serpente. Essa lesão tecidual se desenvolve rapidamente e na maioria das vezes deixa seqüelas permanentes, fato que torna os antivenenos relativamente ineficientes para combater esses efeitos, assim as SVMPs constituem-se alvos do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Gutiérrez, J.M, et al, 1998 ; Gutiérrez, J.M, et al, 2000).

6-Conclusão

Em nossas investigações a metaloprotease neuwiedase isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* mostrou ter um papel relevante nas alterações sistêmicas e locais induzidas pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. Ela diminui os níveis de fibrinogênio e o número de plaquetas e causa alterações hematológicas como diminuição do número de hemácia e da % de hematócrito. Além disso, provocou dano tecidual local com a formação de edema, mionecrose e inflamação evidenciada pela liberação de IL-1 β , IL-6 e IL-8. Dessa forma novos estudos para se compreender melhor a relação estrutura-função dessa proteína poderão abrir caminhos que permitirão a sua aplicação como agente terapêutico na área clínica, no tratamento de distúrbios da hemostasia bem como em outras patologias.

7-Referências Bibliográficas

- ADRIAN, G; DAVID, THEAKSTON, R.G.D; BARTH, J; MAY, B; KRIEG, M; DAVID, A.W. Neurotoxicity, haemostatic disturbances and haemolytic anaemia after a bite by a Tunisian Saw-Sailed or carpet viper (*Echis pyramidium*- complex): failure of antivenom treatment. *Toxicon*, v. 32, n. 8, p 937-944, 1994.
- AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pit-vipers. *Contr. Harvard Inst. Trop. Biol. Med.* v.2 , p1-64, 1925.
- ANDRIÃO –ESCARSO, S. H; SOARES, A.M; FONTES, M.R.M; FULY, A.L; CORRÊA, F.M.A; ROSA, J.C; GEENE, L.J. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochemical Pharmacology*, v.64, p 723-732, 2002.
- ASSAKURA, M. T; FURTADO, M. F.; MANDELBAU, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). *Compendium Biochemistry and Physiology*, n.102, p 727-732, 1992.
- BALDO, C. *Lesão Tecidual e Inflamação Induzidas pela Neuwiedase: Uma Metaloprotease isolada da peçonha da Serpente Bothrops neuwiedi pauloensis*. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal de Uberlândia, 2004.
- BARRAVIERA, B. *Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos*. São Paulo. EPUC, 1999.p 205.
- BELL,W.R. Clinical trials with ancrod. In: *Hemostasis and animal venoms*, p 541, 1988.

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

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

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

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

CARDOSO,J.L.C; FAN, H.W; FRANÇA, F.O.S;JORGE, M.T; LEITE,R.P;NISHIOKA, S.A; AVILA, A; SANO MARTINS, I.S; TOMY, S.C; SANTORO, M.L;CHUDZINSKI, A.M; CASTRO, S.C.B; KAMIGUTI,A.S; KELEN. E.M.A; HIRATA, M.H; MIRANDOLA, R.M.S; THEAKSTON, R.D.G; WARREL, D.A. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenomation by lace-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Quarterly J. Med.* v.86, p 315–325, 1993.

CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.DE S; WEN,F.H; MALÁQUE, C.M.S; HADDAD JÚNIOR, V. *Animais Peçonhentos do Brasil, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. São Paulo: Savier, 2003. p 44-45.

CLAUSS, A. *Acta haematol.* v. 17, p 237, 1957.

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

COMINETTI, M.R; RIBEIRO, J.U; FOX, L.W; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. BaG, a new dimeric metalloproteinase disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha 5\beta 2$ integrin. *Arch. Biochem. Biophys.* v.416, p 171-179, 2003.

DAVID, L; ANDREW, T; JULIE, B; JAMES, M; SIRUS, N; DALES, O; RON, H; THEAKSTON R.G.D; DAVID, A.W. Neurotoxicity and haemostatic disturbances in patients envenomed by the Papuan black snake (*Pseudechis papuanus*). *Toxicon*, v 32, n.8, p 927- 936, 1994.

DE HAAS, G. H., POSTEMA, N. M. Purification and properties of phospholipase A₂ from porcine pancreas. *Biochemistry and Biophysics Acta*, v.159, p 103-117, 1968.

DENNIS, E.A. The growing phospholipase A₂ superfamilie of signal transduction enzymes. *Trends Biochem.Sci*, v.22, p 1-2, 1997.

DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and Fibrin. *Annual Review of Biochemistry*, v.53, p 195-229, 1984.

EDGAR, W; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thromb. Res.* v.2, p 85-95, 1973.

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

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

- FRANCISCHETTI, I.M.B; MY-PHAM, V; HARRISON, J; GARFIELD, M.K; RIBEIRO, J.M.C. *Bitis gabonica* (Gabbon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene*. v. 337, p 55-69, 2004.
- GALLAGHER, P; BAO,Y; SERRANO, S.M.T; LAING, G.D; THEAKSTON, R.D.G; MAUCH,C; MOSKALUK, C; FOX, J.W. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.45, p 1-15, 2005.
- GOMIS-RUTH, F.X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. *Mol. Biotechnol.* v.24, p 157-202, 2003.
- GRAMS, F; HUBER, R; KRESS, L.F; MORODER, F; MODE,W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism. *Febs lett* , v. 335, p 76-80, 1993.
- GUTIÉRREZ, J. M; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochemie*, v.82, p 841-850, 2000.
- GUTIÉRREZ, J. M; LÉON, G; ROJAS, G; LOMONTE, B; RUCAVADO, A; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, v. 36, p 1529-1538, 1998.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini Rm, editor. *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Chichester: Wiley & Sons, p. 321-52, 1997.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venom, *Mem. Inst. Butantan*, v.33. p1405-1474, 1995a.
- 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, 1995b.

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

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.29(1), p 19-23, 1999.

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

IZIDORO, L.F.M.;RODRIGUES, V.M, FERRO, E.V;HAMAGUCHI,A;GIGLIO,J.R;
HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of some hematological and hemostatic
Alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia mariquitensis* (Flacourtiaceae). *Biochimie*, v. 85, p 669-675, 2003.

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

KAMIGUTI, A.S. HAY, C.R.M., THEAKSTON, R.D.G. et al. Review article. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v.34, p.327-642, 1996.

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

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

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

MARKLAND JR, F.S. Inventory of alpha-and beta-fibrinogenases from snake venom. For the subcommittee on nomenclature of exogenous hemostatic factors of the scientific and standardization committee of the international society on thrombosis and hemostasis. *Thromb. Haemost.* v.65, p 438-443, 1991.

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

MASUDA, S; HAYASHI, H; ARAKI, S. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease disintegrin family. *Eur. J.Biochem.* v. 253, p 36-41, 1998.

MASUDA, S; HAYASHI, H; ARAKI, S; ATODA, H; MORITA, H. Purification cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis- inducing protein HVI, from *Trimesurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem*, v. 26, p 3339-3345, 2001.

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

MEIER, J. Venoms snakes. In: *Medical use of snake proteins*, p1-32, 1990.

MOLLIER, P; CHWETZOFF, S; MÉNEZ, A.A. A monoclonal antibody recognizing a conserved epitope in a group of phospholipase A₂. *Mol. Immunology*, v. 27, p 7-15, 1990.

MOUNIER, B.B. VARGAFTIG, P.A. FFRANKEN, H.M. VERHEIJ, C. BON,L. Touqui, Platelet secretory phospholipase A₂ fails to induce rabbit platelet activation and to release arachidonic acid in contrast with venom phospholipase A₂, *Biochim. Biophys. Acta.* v.1214, p 88-96, 1994.

MUKHERJEE, A.B; MIELE, L; PATTABIRAMAN, N. Phospholipases A₂ enzymes regulation and physiological role. *Biochem. Pharmac*, v.48, p 1-10, 1994.

NETO.H.S; MARIA JULIA, M. Microvessel damage by *B. jararacussu* snake venom: pathogenesis and influence on muscle regeneration. *Toxicon*, v.46, p 814-819, 2005.

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

NIKAI, T; TANIGUCHI, K; KOMORI, Y; MASUDA, K; FOX, J.W; SUGIHARA, H. Primary structure and functional characterization of bilitoxin-1, a novel dimeric P-II snake venom metalloproteinase from *Agkistrodon bilineatus* venom. *Arch. Biochem. Biophys*, v. 378, p 6-15, 2000.

OKUDA, D; KOIKE, H; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. *Biochemistry*. v. 41, p 14248-14254, 2002.

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

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

RODRIGUES, R.S. *Purificação e caracterização de uma PLA₂ de Bothrops pauloensis*. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, v. 44, p 305-314, 2004.

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. *Biochemie*, v.83, p 471-479, 2001.

RODRIGUES, V. M., SOARES, A. M., GUERRA-SÁ, R., RODRIGUES, V., FONTES, M. R. M. and GIGLIO, J. R. Structural and Functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 381(2), p 213-224, 2000.

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

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

RUCAVADO, A; FLORES-SANCHEZ, E; FRANCESCHI, A; MAGALHAES, 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.

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

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

SANO-MARTINS, I.S; SANTORO, L.M; MORENA,P; SOUSA, M.C.C ; SILVA,S.C; TOMY, L.C; ANTONIO, A K; NISHIKAWA, I.L.C. GONÇALVES,M.H.A; LARSON, M.K. HAGIWARA, A.S. KAMIGUTI. Hematological changes induced by *Bothrops jararaca* venom in dogs, *Brazilian J.Biol. Res.* v.28, p 303–312, 1995.

SBH. 2005. Lista de espécie de répteis do Brasil. Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH). Disponível em: [http://www2.Sbherpetologia.org.br/check list/répteis.htm](http://www2.Sbherpetologia.org.br/check_list/répteis.htm), acessado em 30/05/2006.

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

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

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

SOARES, A.M; FONTES, M.R.M; GIGLIO, J.R. Phospholipases A2 myotoxins from Bothrops snake venoms: structure-function relationship. *Curr. Org Chem.* v.8, p1677-1690, 2004.

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

STOCKER, K.; MEIER, J. Thrombin-like snake venom enzyme. In: *Hemostasis and animal venoms* 7, 1998.

STOCKER, W; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 5, p 382-390, 1995.

SWENSON, S; MARKLAND JR, F.S. Snake Venom Fibrinolytic enzymes. *Toxicon*, v.45, p 1021-1039, 2005.

TEIXEIRA, F.P.C; CHAVES, F; ZAMUNÉR, R.S; FERNANDES, C.M; ZULIANI, J.P; CRUZ-HOFLING, M.A; FERNANDES, I; GUTIÉRREZ, J.M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *International Journal of Experimental Pathology*, v.86, p 107-115, 2005.

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

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

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

YONG-HONG, J. I. A., YANG, J. I. N., QIU-MIN, L., SHENG, d. L. I., WAN-YU, W, YU-LIANG, X. Jerdonase, a novel serine proteinase with kunitz-releasing and fibrinolytic activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Acta Biochim Biophys. Sinica*, v.35, p 689-694, 2005.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*, v.45, p951-967, 2005.