

PATRICIA BIANCA CLISSA

*Caracterização do efeito da jararagina
sobre a produção e liberação de citocinas
pró-inflamatórias em modelo murino*

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Imunologia

São Paulo
2002

PATRICIA BIANCA CLISSA

*Caracterização do efeito da jararagina
sobre a produção e liberação de citocinas
pró-inflamatórias em modelo murino*

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Imunologia

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Ivan Mota

Co-Orientadora: Dra. Ana Maria Moura da Silva

São Paulo

2002

Dedicatória

A realização deste trabalho
foi movida acima de tudo
pelo desejo de minimizar o
sofrimento daqueles 18.000
pacientes que sofrem
acidentes por *Bothrops*
anualmente no Brasil.

Eu dedico este trabalho à eles.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Moura, pela orientação, confiança, paciência, amizade, e principalmente pelas preciosas oportunidades de desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Ivan Mota, pela orientação e eterna disposição em compartilhar suas experiências profissionais e de vida, as quais foram, e sempre serão, de grande importância para a conquista das minhas.

Ao prof. Dr. David Theakston, Dr. Gavin Laing e Dr. Mark Taylor e Dr^a Aura Kamiguti (Escola de Medicina Tropical de Liverpool) pelas valiosas participações, contribuições e sugestões desde o desenvolvimento inicial deste trabalho até o presente momento.

À Dra. Renata Giorgi, Dra. Catarina Teixeira e Dra. Nanci Starobinas pela composição da banca de qualificação e contribuições na “inflamada” revisão deste trabalho.

À Dra. Harumi Ando Takehara, pela oportunidade de realização deste trabalho no Laboratório de Imunopatologia, pelo imprescindível apoio ao desenvolvimento da pesquisa e pela leitura crítica deste.

À amiga e “vizinha de bancada” Mônica Colombini, pela transparência, sinceridade e por ter me ensinado o valor de uma amizade, onde sempre existiu o respeito e a confiança mútua e também por ter estado presente nos momentos mais críticos e mais felizes destes últimos anos.

Aos amigos Diego, Isabelle, Maisa, Ana Amélia e André David pelas agradáveis e importantes experiências compartilhadas no convívio de laboratório e também pelo apoio experimental. À Isabelle também pela revisão final deste trabalho.

À Dra. Fernanda Macedo Soares pela leitura crítica da qualificação e pela ampliação da rede de Internet no Laboratório (com apoio da Fapesp).

Às Dra. Kátia C. Bárbaro, Dra. Irene Fernandes, Dra. Ivana Loureiro e Dra. Mônica Lopes pela amizade e apoio fundamentais durante a realização deste trabalho. À Dra. Kátia em especial pela revisão final da tese.

Às amigas Nanci Fumie, Elaine, Andréia, Edna, Telma, Denise, Cris, Adriana, Ana Flávia, Luciana, Paula e Karen pelas felizes experiências compartilhadas no convívio do dia a dia do laboratório.

À grande equipe de apoio do laboratório de Imunopatologia, Cleusa, Tereza, Jô, Jussara, Iranilde, Gerson, e Francisco pelo apoio técnico.

À Viviana Beatriz Lencina, do Instituto de Matemática e Estatística/USP pela análise estatística dos resultados.

Ao Sabri, meu marido, por ter estado sempre ao meu lado, por ser um exemplo de persistência e paciência, e por ter me compreendido e apoiado em todos os sentidos, desde o início deste trabalho até o presente momento.

Aos meus pais, Ângelo e Vicenzina, pelo amor, pelo exemplo de dignidade que eles sempre me passaram e por terem me dado a oportunidade de perseguir meus sonhos e seguir o meu caminho.

À Dona Antônia Zara, minha avó, por ser um exemplo de vida.

Aos meus irmãos, Michelangelo e Giancarlo por completarem (tão bem) a minha família.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo n° 97/06016-1).

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO NO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA DO
INSTITUTO BUTANTAN**



DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Clissa, Patricia Bianca.

Caracterização do efeito da jararagina sobre a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo murino / Patricia Bianca Clissa. – São Paulo, 2002.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Imunologia.

Área de concentração: imunologia.

Linha de pesquisa: Atividades pró-inflamatórias dos venenos Botrópicos.

Orientador: Mota, Ivan.

Versão do título para o inglês: Effect of jararhagin on the production and release of pro-inflammatory cytokies in a murine model.

Descritores: 1. Inflamação 2. Jararagina 3. Metaloproteinase 4. Citocinas
5. Venenos de serpentes

ICB/SBIB024/2002

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
I - INTRODUÇÃO	
I. 1 - Os ACIDENTES BOTRÓPICOS	01
I. 2 - COMPONENTES DO VENENO DE <i>BOTHROPS JARARACA</i>	03
I. 3 - EFEITOS LOCAIS DO ENVENENAMENTO	09
I. 4 - RESPOSTA INFLAMATÓRIA NO ENVENENAMENTO	12
I. 5 - AS CITOCINAS E O SEU PAPEL NA INFLAMAÇÃO AGUDA	15
I. 6 - CITOCINAS ENVOLVIDAS NO ENVENENAMENTO	18
I. 7 - PARTICIPAÇÃO DA JARARAGINA NO PROCESSAMENTO DO TNF-α	19
II - OBJETIVOS	22
III - MATERIAIS E MÉTODOS	
III. 1 - ANIMAIS	23
III. 2 - VENENO	23
III. 3 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	
III. 3.1 - Jararagina	24
III. 3.2 - Jararagina-C	25
III. 3.3 - Jararagina Inativa	25
III. 4 - ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA	25
III. 5 - SDS-PAGE	26

III. 6 – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	
III. 6.1 – Atividade Proteolítica sobre a Caseína	27
III. 6.2 – Atividade Proteolítica sobre Citocinas Recombinantes	28
III. 7 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS	
III. 7.1 – Atividade Hemorrágica	29
III. 7.2 – Atividade de Inibição da Agregação Plaquetária	29
III. 7.3 – Atividade Edematogênica	30
III. 7.4 – Atividade Citotóxica	31
III. 8 – MODELOS DE ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDA PELA JARARAGINA	
III. 8.1 – Modelo <i>In Vitro</i>	
<i>a. Células Peritoneais Aderentes de Camundongos</i>	31
<i>b. Linhagem Celular Macrofágica Murina (J774.A1)</i>	32
III. 8.2 – Modelo <i>In Vivo</i>	
<i>a. Homogenato proveniente do coxim plantar</i>	33
III. 8.3 – Detecção da Produção de Citocinas	
<i>a. Dosagem de Citocinas por ELISA</i>	34
<i>b. Detecção de mRNA para Citocinas por RT-PCR</i>	35
III.9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
IV – RESULTADOS	
IV. 1 – OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	
IV. 1.1 – Isolamento da Jararagina, Jararagina-C e Obtenção de Jararagina Inativa	38

IV. 1.2 – Análise de Pureza	39
IV. 1.3 – Atividade Proteolítica sobre a Caseína	39
IV. 1.4 – Atividades Biológicas	
<i>a. Atividade Hemorrágica</i>	39
<i>b. Atividade de Inibição da Agregação Plaquetária</i>	40
IV. 2 – AÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA DA JARARAGINA	
IV. 2.1 – Produção de Citocinas <i>In Vitro</i>	
<i>a. Células Peritoneais Aderentes Murinas (MPAC)</i>	40
<i>b. Linhagem Celular Macrofágica Murina (J774.A1)</i>	43
<i>c. Atividade Proteolítica sobre Liberação de Citocinas</i>	44
<i>d. Atividade Proteolítica sobre Citocinas Recombinantes</i>	45
<i>e. Transcrição de mRNA em MPACs Induzida por Jararagina</i>	45
IV. 2.2 – Modelo <i>In Vivo</i>	
<i>a. Atividade Edematogênica</i>	47
<i>b. Produção Sérica das Citocinas</i>	48
<i>c. Produção Local das Citocinas</i>	48
<i>d. Transcrição de mRNA Induzida por Jararagina no Local</i>	49
IV. 2.3 – Efeito dos Domínios da Jararagina na Ação Inflamatória	
<i>a. Papel dos Domínios na Atividade Edematogênica</i>	51
<i>b. Papel dos Domínios na Liberação Local de Citocinas</i>	51
IV. 3 – TABELAS	54
IV. 4 – FIGURAS	57

V. DISCUSSÃO	76
VI. CONCLUSÃO	93
VII. REFERÊNCIAS	95
VIII. ANEXO	110

RESUMO

O efeito inflamatório da jararagina, toxina hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*, foi avaliado através de um sistema *in vitro* (células peritoneais murinas-MPACs) e *in vivo* (coxim plantar de camundongos), onde foi avaliada a produção de mRNA que codifica as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 por RT-PCR e a liberação destas no sobrenadante de cultura e no local de injeção (ELISA). Além disso, o domínio da jararagina responsável pela liberação local das citocinas foi estudado. Nossos resultados mostram que a jararagina induziu a expressão de mRNA que codifica para o TNF- α , IL-1 β e IL-6 em MPACs, 4 horas após o estímulo, entretanto a ação enzimática da jararagina interferiu com a detecção destas citocinas no sobrenadante da cultura. A jararagina inibida com EDTA induziu a liberação destas citocinas no modelo *in vitro* (MPACs). No modelo *in vivo* foi verificada a liberação local de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no sobrenadante do homogenato do tecido, sendo a IL-6 a citocina liberada em maior quantidade. Tanto o domínio disintegrina/rico em cisteína, como o metaloproteinase, da jararagina, participam desta liberação. Este estudo mostrou o envolvimento direto de citocinas em um modelo inflamatório, liberadas pela metaloproteinase de veneno botrópico, em cultura de células e também no local da injeção.

ABSTRACT

The inflammatory effect of jararhagin, a haemorrhagic toxin from *Bothrops jararaca* venom, was evaluated in an *in vitro* (Murine Peritoneal Adherent Cells-MPACs) and *in vivo* system (mouse footpad), through the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA (RT-PCR) and the release of these cytokines in the culture supernatant and locally at the site of injection (ELISA). In addition the domain of jararhagin responsible for the local release of cytokines was studied. Our results showed that the jararhagin can induce the mRNA expression for TNF- α , IL-1 β and IL-6 in MPACs at 4 hours after treatment, however the enzymatic activity of jararhagin was found to affect the detection of the cytokines in the culture supernatant. The jararhagin inhibited with EDTA was found to induce the release of these cytokines by MPACs. Concerning the *in vivo* model, the local release of TNF- α , IL-1 β and IL-6 was detected in the footpad homogenate. Both of the jararhagin domains, the metalloproteinase and the disintegrin/cystein rich domains play a role in this release. This study showed the direct involvement of cytokines in an inflammatory model, released by snake venom metalloproteinases in the cell culture and also locally at the site of injection.

I. INTRODUÇÃO

I. 1 - OS ACIDENTES BOTRÓPICOS

O ofidismo consiste em um importante problema de saúde pública no Brasil em virtude de sua grande frequência e gravidade. Dos acidentes ofídicos notificados ao Ministério da Saúde durante os anos de 1990 a 1993, onde o gênero da serpente foi identificado, 90,5% foram causados pelo gênero *Bothrops*, 7,7% por *Crotalus*, 1,4% por *Lachesis* e 0,4% pelo gênero *Micrurus*. Os acidentes causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* não apresentam uma alta letalidade (0,31%), porém devido à alta incidência, são considerados de grande importância epidemiológica no país (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1999).

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 19 espécies, distribuídas por todo o território nacional. A espécie *Bothrops jararaca* é predominante no Brasil, sendo encontrada no sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Campbell e Lamar, 1989).

O quadro clínico observado no envenenamento botrópico pode ser didaticamente dividido em sistêmico e local (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1999). As manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por distúrbios na hemostasia, caracterizados por deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (Hati e col. 1999). A seqüência destes eventos culmina em sangramentos de ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância, como por

exemplo a gengivorragia. Ainda em nível sistêmico é observado sudorese, hipotensão arterial e hipotermia (Cardoso, 1997). As manifestações locais são caracterizadas por dor e edema persistentes no local da picada, de intensidade variável e, em geral, de instalação precoce e caráter progressivo. Equimoses e hemorragias no ponto da picada são freqüentes e bolhas podem aparecer na evolução do quadro clínico, acompanhado ou não de necrose (Cardoso, 1997). Nos casos mais graves, o dano tecidual pode resultar em sérias seqüelas, tais como a perda funcional ou permanente do tecido ou do membro afetado. A magnitude dos efeitos locais em envenenamentos botrópicos depende basicamente da quantidade de veneno inoculada, do tempo entre a picada e o início da soroterapia, do peso e idade do paciente, da região anatômica onde ocorreu a picada e do eventual uso de torniquete (França, 1997).

O tratamento utilizado atualmente no caso dos acidentes por *B. jararaca* é a soroterapia com antiveneno botrópico poliespecífico (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, 1999). Com base nas manifestações clínicas e visando a terapêutica, os acidentes botrópicos são classificados em leve, moderado e grave. A quantidade de antiveneno administrada ao paciente varia conforme a gravidade do caso (Cardoso e col. 1993). Este tratamento mostra-se eficiente em neutralizar os efeitos sistêmicos observados, porém pouca neutralização é observada sobre os efeitos locais (Gutierrez e col. 1981). Dado o rápido desenvolvimento da lesão local, é extremamente difícil a sua completa neutralização por antivenenos, pois freqüentemente ocorre uma demora no início da aplicação da soroterapia. Como na maioria dos acidentes ofídicos no Brasil o início do tratamento ocorre em um tempo médio de quatro horas após a picada, este quadro inflamatório local já se instalou e a soroterapia pouco contribui para revertê-lo. Em modelos

experimentais, observa-se que a administração do antiveneno botrópico 15 ou 30 minutos após a inoculação de veneno de *Bothrops asper* em camundongos também não se mostra eficiente na neutralização dos efeitos locais (hemorragia, edema e mionecrose), sendo parcialmente eficiente apenas quando o antiveneno é administrado imediatamente após a inoculação do veneno (Gutiérrez e col. 1981). Entretanto, não se observa uma completa neutralização dos efeitos locais, mesmo quando o veneno botrópico é inoculado em animais experimentais logo após a administração do antiveneno homólogo, ainda que este apresente alto título de anticorpos capazes de neutralizar as principais atividades do veneno botrópico *in vitro* (Otero e col. 1997).

I. 2 - COMPONENTES DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACA*

Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* são misturas bastante complexas de toxinas com diferentes propriedades tóxicas ou enzimáticas. As proteases presentes no veneno parecem agir sobre a presa de 2 maneiras distintas: (1) degradando as proteínas teciduais da vítima, de maneira não específica e (2) clivando proteínas plasmáticas de maneira relativamente específica, gerando compostos de potentes efeitos na hemostasia do indivíduo (Matsui e col. 2000). Os principais componentes encontrados no veneno de *B. jararaca* são **lectinas, metaloproteínases, serinoproteínases, disintegrinas, fosfolipases e os peptídeos que agem sobre a bradicinina e o sistema angiotensina.**

As **lectinas** encontradas no veneno de *B. jararaca* são pertencentes à família das lectinas tipo-C, que interagem com proteínas plasmáticas, componentes da cascata de coagulação ou com as

plaquetas (Brinkhous e col. 1981, Sekiya e col. 1993, Ozeki e col. 1994, Fujimura e col. 1995, Kawasaki e col. 1996, Matsushita e col. 2000, Monteiro e Zingali, 2000). Uma das primeiras lectinas tipo-C encontradas no veneno de *B. jararaca* foi a **Botrocetina**, uma proteína de 31 kDa que promove aglutinação de plaquetas por formar um complexo solúvel com o fator de von Willebrand (vWF) ativando o seu domínio A1, favorecendo assim a sua interação com o receptor do vWF, a glicoproteína de plaquetas (GP)Ib (Brinkhous e col. 1981, Matsushita e col. 2000). Uma outra Lectina tipo-C identificada no veneno de *B. jararaca*, a **Jararaca (GP)Ib-BP** (30 kDa), não induz agregação plaquetária. Esta toxina se liga ao (GP)Ib, bloqueando a sua interação com o vWF (Fujimura e col. 1995, Kawasaki e col. 1996). A **Botrojaracina**, uma lectina tipo-C de 27 kDa, também presente no veneno de *B. jararaca*, estudada por Monteiro e Zingali (2000), possui um efeito anticoagulante resultante de dois mecanismos sinérgicos e distintos. Esta toxina forma um complexo com a trombina, inibindo a capacidade desta enzima agir sobre substratos naturais como o fibrinogênio, o receptor de plaquetas, a proteína C e o fator V, atuando como um potente e seletivo inibidor da agregação plaquetária induzida pela trombina (Fenton e col. 1998). Esta toxina também age como um eficiente anticoagulante após ativação das vias intrínsecas de coagulação sanguínea, interagindo com a protrombina e reduzindo a formação da α -trombina. Uma outra lectina tipo-C presente neste veneno, ainda não nomeada, foi caracterizada como uma **lectina homodimérica**, que causa hemaglutinação cálcio-dependente e não possui efeito sobre a aglutinação de plaquetas (Ozeki e col. 1994). A **Jararaca IX/X-bp**, também presente no veneno de *B. jararaca*, é uma lectina tipo-C, com estrutura similar à Botrocetina, porém com diferente atividade biológica (Sekyia e col. 1993). Esta lectina é composta por um

heterodímero ligado por pontes dissulfeto, com uma subunidade de 15 kDa e outra de 16 kDa, com a propriedade de se ligar aos fatores IX e X e à proteína S de uma maneira Ca^{+2} dependente, interferindo com a coagulação (Sekiya e col. 1993).

As **serinoproteinases** presentes no veneno botrópico são caracterizadas principalmente como serinoproteinases com atividade tipo trombina (Kamiguti e Sano-Martins, 1995). De maneira resumida, a trombina converte o fibrinogênio em coágulos de fibrina, os quais são ligados ao fator XIII ativado, liberando os fibrinopeptídeos A e B. A trombina também age como fator ativador de componentes da cascata de coagulação (V, VII e XIII) (Colman e col. 1993). Entre as principais serinoproteinases presentes no veneno de *B. jararaca*, encontram-se: a **Botrombina** (33 kDa), com atividade tipo trombina que coagula o fibrinogênio e não possui nenhum efeito direto sobre plaquetas a menos que o fibrinogênio exógeno esteja presente (Nishida e col. 1994); a **PA-BJ**, com peso molecular de 30 kDa, a qual possui atividade amidolítica e induz agregação plaquetária (Serrano e col. 1995) por interagir com o receptor de plaquetas PAR1 (*protease activated receptor 1*) (Santos e col. 2000); a **KN-BJ 1** e a **KN-BJ 2** (38 e 39 kDa respectivamente), com atividade amidolítica, atividade sobre a liberação de cininas e atividade coagulante (Serrano e col. 1998).

Fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas lipolíticas que clivam especificamente a ligação sn-2-acyl dos fosfolipídeos de membrana para produzir quantidades equimolares de lisofosfatídeos e ácidos graxos livres, principalmente o ácido araquidônico. Estes produtos então se tornam disponíveis para a conversão em potentes mediadores pró-inflamatórios, como o fator ativador de plaquetas e os eicosanóides (Dennis, 1978; Chang e col. 1987). O veneno de *B. jararaca* apresenta uma baixa atividade fosfolipásica quando comparado ao veneno de *B.*

moojeni, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* (Moura-da-Silva, 1991), porém uma fração com atividade fosfolipásica, que inibe a agregação plaquetária, foi descrita por Zingali e col. (1990). Serrano e col. (1999), purificaram e caracterizaram esta fração, denominada de **BJ-PLA₂**, como um fator de inibição da agregação plaquetária, com 124 aa e pertencente à classe II de PLA₂, a qual é geralmente encontrada em venenos viperídeos e crotalídeos, enquanto à classe I pertencem as PLA₂ similares à PLA₂ pancreática, encontradas principalmente em venenos elapídios. Moura-da-Silva e col. (1991) isolaram 4 frações com peso molecular de aproximadamente 15 kDa, com diferentes atividades fosfolipásica e miotóxica, sendo estas frações denominadas **JAR 10, 11, 12 e 13**. As frações JAR 11 e 13 apresentaram maior atividade fosfolipásica, enquanto a Jar 12 e 13 apresentaram maior atividade miotóxica.

Um outro importante grupo de componentes do veneno botrópico é formado pelos **BPPs** (Peptídeos Potenciadores da Bradicinina). Os BPPs são uma classe de inibidores naturais da enzima conversora da angiotensina (ACE), que apresentam efeito anti-hipertensivo. A ACE é uma peptidase presente na membrana citoplasmática de células endoteliais responsável pela conversão da angiotensina I em angiotensina II e pela degradação da bradicinina. Um dos primeiros BPPs identificados no veneno botrópico foi o **BPF** (Fator Potenciador da Bradicinina), por Ferreira e Rocha e Silva (1965). Esta descoberta deu origem ao **Captopril**, um agente anti-hipertensivo utilizado comercialmente, com ação de inibir a enzima conversora da angiotensina (Orning e col. 1991). Treze BPPs do veneno de *B. jararaca*, contendo de 5 a 13 aminoácidos já foram descritos na literatura (Cintra e col. 1990). Murayama e col. (1997) demonstraram a existência de um precursor dos peptídeos potenciadores de bradicinina na glândula do

veneno de *B. jararaca*. Esse precursor contém 7 cópias de BPPs arranjados numa seqüência em rosário, possuindo ainda na seqüência C-terminal um peptídeo de 22 aa, homólogo ao peptídeo natriurético tipo -C (CNP).

Um grupo importante de enzimas proteolíticas encontradas nos venenos botrópicos é formado pelas **metaloproteinases**. As metaloproteinases compreendem uma série de enzimas dependentes de zinco com variada massa molecular que são responsáveis pelo efeito hemorrágico característico destes envenenamentos (Bjarnason e Fox, 1994). As metaloproteinases de veneno (SVMP) também são classicamente conhecidas como toxinas hemorrágicas, embora existam exceções com relação à sua atividade hemorrágica. A estrutura das metaloproteinases contém, além do domínio catalítico, um domínio disintegrina e um domínio rico em cisteína. A atividade hemorrágica das diferentes metaloproteinases é variável, dependendo de sua estrutura. Com base em seus domínios estruturais, as metaloproteinases de veneno podem ser classificadas em 4 classes distintas (Hite e col. 1994):

- **PI**: Metaloproteinases que possuem somente o domínio catalítico.
- **PII**: Metaloproteinases que possuem o domínio catalítico seguido por um domínio disintegrina
- **PIII**: Metaloproteinases formadas pelo domínio catalítico, domínio disintegrina e o domínio rico em cisteína.
- **PIV**: Compreende um grupo de enzimas que possuem, além dos três domínios descritos na classe das PIII, um polipeptídeo tipo lectina, ligado por uma ponte disulfeto à cadeia polipeptídica da metaloproteinase.

As principais metaloproteinases já identificadas no veneno de *B. jararaca* são: **Fatores hemorrágicos HF2 e HF3**, com massa molecular de 49,1 kDa (HF2) e 62 kDa (HF3) (Assakura e col. 1986); **Jararafibrase I** (47kDa), **Jararafibrase II** (21,4kDa), **Jararafibrase III** (20,4kDa) e **Jararafibrase IV** (21,2 kDa), todas apresentam atividade hemorrágica e fibrinolítica (Maruyama e col. 1992; Maruyama e col. 1993); **Botropasina**, uma metaloproteinase de 48 kDa, que apresenta uma fraca atividade hemorrágica (Mandelbaun e Assakura, 1988); **Jararagina**, uma metaloproteinase/disintegrina com massa molecular de 52 kDa, possui ação hemorrágica (Paine e col. 1992) e também a capacidade de inibir a agregação plaquetária por bloquear a ligação do colágeno à integrina $\alpha_2\beta_1$ presente na membrana das plaquetas. A jararagina se liga ao domínio I da cadeia α_2 e/ou cliva a cadeia β_1 dessa integrina (Kamiguti e col. 1996). A **Proteinase J** também está incluída no veneno botrópico, e é um exemplo de metaloproteinase dependente de zinco que não apresenta atividade hemorrágica (Tanizaki e col. 1989).

As **Disintegrinas** são proteínas de veneno de baixo peso molecular, ricas em pontes dissulfeto, que contêm uma seqüência característica RGD (Arg-Gly-Asp) em seu sítio ativo. As disintegrinas clássicas se ligam através desta seqüência RGD às integrinas (receptores da superfície celular) (Gould e col. 1990). Entre as principais toxinas tipo-disintegrinas já identificadas no veneno de *B. jararaca*, encontra-se a **Jararagina-C**, uma proteína de 28kDa que corresponde aos domínios disintegrina e rico em cisteína da metaloproteinase jararagina. Esta disintegrina possui a capacidade de inibir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno e por adenosina difosfato (ADP) (Usami e col. 1994) e apresenta uma seqüência de ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ composta pelos aminoácidos ECD (Glu-Cys-Asp) e não pelo RGD presente nas disintegrinas clássicas. A **Jaracetina**, um dímero de 60 kDa, que

representa uma diferente forma processada da jararagina, interage com o domínio A do vWF e também bloqueia a adesão das plaquetas ao colágeno dependente de $\alpha_2\beta_1$ (Luca e col. 1995). Outra disintegrina purificada do veneno botrópico, a **Jaracina**, uma disintegrina contendo a seqüência RGD de 73 aa com atividade inibitória sobre a agregação plaquetária foi descrita por Scarborough e col. (1993). Uma nova disintegrina do veneno de *B. jararaca*, a **Jarastatina**, foi identificada e caracterizada biologicamente por Coelho e col. (1999). Esta disintegrina contém o peptídeo RGD e se liga a receptores de neutrófilos, promovendo ativação celular e alterações dinâmicas dos filamentos de actina, um dos primeiros eventos na sinalização mediada por integrinas.

I.3 – EFEITOS LOCAIS DO ENVENENAMENTO

Segundo o Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, publicado pelo Ministério da Saúde (1999), nos acidentes botrópicos classificados como *leves* os pacientes apresentam dor e edema local pouco intenso ou ausentes e manifestações hemorrágicas discretas ou ausentes. Nos acidentes classificados como *moderados*, observa-se dor e edema evidente que ultrapassa o segmento anatômico picado e são acompanhados ou não de alterações hemorrágicas locais. Os acidentes *graves*, por sua vez, são caracterizados por edema local de longa duração, intenso e extenso, podendo atingir todo o membro picado, geralmente acompanhado de dor intensa e, eventualmente com a presença de bolhas. Em decorrência do edema podem aparecer sinais de isquemia local devido à compressão dos feixes vaso-nervosos.

O mecanismo pelo qual a hemorragia é desencadeada no local da picada, ainda não está totalmente elucidado. Porém, dois eventos independentes parecem estar intimamente relacionados: a degradação enzimática da membrana basal causada por toxinas hemorrágicas e também o efeito direto destas toxinas sobre as células endoteliais dos capilares (Hati e col. 1999; Gutiérrez e Rucavado, 2000).

No que se refere à degradação enzimática da membrana basal, sabe-se que as toxinas hemorrágicas em geral, representadas pelas metaloproteinases, possuem uma afinidade específica por proteínas presentes na matriz extracelular, como por exemplo, o colágeno tipo IV e a laminina, degradando-os (Rucavado e col. 1995, Baramova e col. 1989) . A destruição da membrana basal e da matriz extracelular leva a um conseqüente descolamento e lise das células endoteliais dos capilares, resultando na morte destas células e no extravasamento de plasma e de células sangüíneas para o tecido conectivo, que caracteriza um tipo de hemorragia *per rhexis* (Gutiérrez e Rucavado, 2000). No entanto o potencial hemorrágico das metaloproteinases varia conforme a estrutura destas toxinas (Fox and Long, 1998).

Outras toxinas presentes no veneno botrópico, que não as metaloproteinases, também estão envolvidas na atividade hemorrágica por agirem sobre fatores da coagulação e induzirem a transformação direta (componentes tipo-trombina) ou indireta (componentes pró-coagulantes) do fibrinogênio plasmático em fibrina (Kamiguti e Sano-Martins, 1995). Há ainda no veneno componentes com ação fibrinolítica/fibrinogenolítica direta (Maruyama e col. 1992) e proteínas que podem alterar a função plaquetária, inibindo-a ou ativando-a, contribuindo desta forma para que o quadro hemorrágico se agrave (Kamiguti e Sano-Martins, 1995).

A mionecrose também é uma consequência comum nos envenenamentos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops*. A mionecrose ocorre principalmente devido à ação direta de miotoxinas ou fosfolipases (PLA₂). Após a injeção intramuscular experimental de miotoxinas em camundongos, são observadas rápidas mudanças degenerativas no músculo levando à necrose. Porém de maneira interessante, após a remoção dos *debris* necróticos pelos fagócitos, ocorre um processo de regeneração muscular normal, com a formação de miotúbulos e fibras musculares regenerativas. Este fato já não é observado quando são injetadas no músculo toxinas hemorrágicas e PLA₂ ao mesmo tempo, ou mesmo o veneno total (Gutiérrez e Lomonte, 1989). Para que a regeneração do tecido ocorra, são necessários que 3 componentes do tecido se encontrem preservados: a inervação, a lâmina basal e os vasos sanguíneos (Collins, 1999). Uma vez que as toxinas hemorrágicas agem diretamente sobre a lâmina basal e os vasos sanguíneos, a recuperação do tecido afetado é prejudicada na presença destas toxinas.

A inflamação também possui um papel fundamental na lesão local induzida pelo envenenamento botrópico e é caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular, edema e infiltração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Rosenfeld, 1971; Trebien e Calixto, 1989; Lomonte e col. 1993, Farsky e col. 1997). O edema parece ser induzido por diferentes componentes dos venenos tais como aminas, pequenos peptídeos e proteínas, assim como fatores tissulares liberados pelo veneno. A histamina, entre outros mediadores, está envolvida no edema causado pelo veneno de *B. jararaca* (Trebien e Calixto, 1989). Faria e col. (2001) também verificaram que o edema causado pelo veneno de *Bothrops lanceolatus* envolve a desgranulação de mastócitos causando uma liberação local de histamina e serotonina, sendo um

fenômeno mediado principalmente por cininas e metabólitos da lipoxigenase. Outra característica inflamatória do veneno botrópico que está bem descrita em literatura é a dor. Teixeira e col. (1994) observaram que o veneno de *B. jararaca* causa uma hiperalgesia mediada, em parte, por mediadores lipídicos como as prostaglandinas, o leucotrieno e o PAF. Chacur e col. (2001) estudando os efeitos de hiperalgesia e de indução de edema causada pelo veneno de *B. asper* em ratos, verificaram que estes são mediados por mecanismos distintos, sendo que na indução da hiperalgesia estão envolvidos componentes como a bradicinina, fosfolipases A2 e leucotrienos.

I.4 - Resposta Inflamatória no Envenenamento

Os sinais da resposta inflamatória induzida pelo veneno botrópico são característicos de um quadro de **Inflamação Aguda**. A inflamação aguda se caracteriza por 3 eventos principais: (1) Alterações no calibre vascular, que levam a um aumento no fluxo sanguíneo, (2) mudanças estruturais na microvasculatura, permitindo que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação e (3), emigração de leucócitos da microcirculação e sua acumulação no foco da injúria (Collins, 1999). Durante o processo agudo, assim como no processo crônico da resposta inflamatória, uma variedade de fatores solúveis está envolvida no recrutamento de leucócitos, através do aumento da expressão de moléculas de adesão celular e de fatores quimiotáticos. Muitos destes fatores regulam a ativação das células residentes (tais como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos) e também das células inflamatórias recém recrutadas (monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos), além de alguns destes

mediadores induzirem uma resposta sistêmica do processo inflamatório (febre, hipotensão, síntese de proteínas da fase aguda, leucocitose e caquexia) (Feghali e Wright, 1997). Estes mediadores encontram-se divididos em 6 categorias distintas, segundo Collins, 1999:

- Derivados do ácido aracdônico;
- As três cascatas solúveis de proteases/substratos (cascata da coagulação, das cininas e do complemento);
- Óxido nítrico, como um potente agente vasodilatador;
- Citocinas, como um grupo de polipeptídeos de origem com ação reguladora;
- Aminas vasoativas, como a Histamina e Serotonina;
- Neuropeptídeos, com ação similar às aminas vasoativas e os eicosanóides;

O complexo quadro do desenvolvimento da lesão local observada no envenenamento botrópico sugere que componentes endógenos com capacidade de induzir uma resposta inflamatória local ou sistêmica sejam ativados por toxinas do veneno botrópico rapidamente após o contato do mesmo com os tecidos. A favor desta hipótese, encontram-se os resultados de Farsky e col. (1997), que observaram que o acúmulo de leucócitos no local da injeção experimental do veneno de *Bothrops jararaca* é dependente de mediadores inflamatórios endógenos (Leucotrieno B₄ e Tromboxana A₂), liberados por macrófagos e neutrófilos ativados, juntamente com fatores quimiotáticos liberados durante a ativação do sistema complemento (C5a e C5a Des Arg), e não da ação direta do veneno sobre estas células. Em um trabalho realizado posteriormente por Farsky e col. (1999), foi verificado que a seqüência de eventos celulares induzidos pelo contato direto do mesmo veneno na microcirculação apresentou acentuados distúrbios nas vênulas capilares

e pós-capilares, caracterizados por vasodilatação, formação de coágulo de fibrina, lesões hemorrágicas e alterações nas interações leucócito-endotélio. Cury e col. (1997) verificaram que o veneno botrópico estimula a liberação de componentes endógenos com ação pró-inflamatória, sem alterar a produção de agentes endógenos antiinflamatórios, como os corticosteróides. Gonçalves e Mariano (2000) verificaram ainda a participação da serotonina e de mediadores neurohumorais na hemorragia local induzida pelo veneno de *B. jararaca* em animais experimentais.

Apesar dos recentes estudos realizados para se compreender melhor os efeitos locais desencadeados após a picada por acidentes botrópicos, as toxinas envolvidas no processo de ativação dos componentes pró-inflamatórios endógenos e o mecanismo desencadeado imediatamente após o contato destas com os tecidos ainda não estão bem esclarecidos.

As citocinas, por possuírem um papel de grande relevância na regulação de mecanismos inflamatórios, têm se mostrado como fortes candidatas a serem os possíveis agentes endógenos pró-inflamatórios liberados em resposta ao envenenamento. A produção de citocinas tem sido descrita em modelos experimentais e em vítimas de acidentes botrópicos e crotálicos (Lomonte e col. 1993; Barravieira e col. 1995; Barros e col. 1998 e Petricevich e col. 2000). Porém, poucas evidências sobre o envolvimento direto das citocinas na inflamação ocasionada por envenenamentos ofídicos estão disponíveis na literatura.

I. 5 - AS CITOCINAS E O SEU PAPEL NA INFLAMAÇÃO AGUDA

As principais características das citocinas (proteínas reguladoras, secretadas pelas células brancas do sangue e por uma variedade de outras células do corpo, cujas ações pleiotrópicas incluem numerosos efeitos nas células do sistema imune e a modulação da resposta inflamatória) foram revistas por Vilcek, 1998 e podem ser resumidas em: (1) A maioria das citocinas é formada por polipeptídeos simples ou glicoproteínas com peso molecular de 30 kDa ou menos; (2) A produção constitutiva das citocinas é normalmente baixa ou ausente. A produção é regulada por vários estímulos indutores em nível de transcrição ou tradução; (3) A produção de citocinas é temporária e o raio de ação geralmente é pequeno (ação autócrina ou parácrina, não endócrina); (4) As citocinas produzem as suas ações por se ligarem a receptores específicos na superfície celular com alta afinidade ($K_D = 10^{-9} - 10^{-12} \text{ M}$); (5) Muitas ações das citocinas podem ser atribuídas a uma alteração no padrão da expressão gênica na célula alvo. Fenotipicamente a ação das citocinas leva a um aumento (ou diminuição) na taxa da proliferação celular, uma mudança no estado de diferenciação celular e ou uma mudança na expressão de algumas funções diferenciadas; (6) Embora o espectro de ação apresentado pelas citocinas individuais possa ser amplo e diverso, pelo menos algumas ações são direcionadas às células hematopoiéticas.

As citocinas que desempenham um papel importante mediando a inflamação aguda, conforme Feghali e Wright (1997), são a Interleucina- 1β (IL- 1β), o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), a Interleucina-6 (IL-6), a Interleucina-8 (IL-8), a Interleucina-11 (IL-11), o Fator Estimulante de Colônia de Macrófago/Granulócito (GM-CSF) e o Fator Estimulante de Colônia de Granulócito (G-CSF). Dentre estas, o TNF- α e a IL- 1β são

moléculas extremamente potentes na inflamação, que mediam a inflamação aguda induzida em animais por injeções intradérmicas de lipopolissacarídeo de bactérias (Feghali e Wright, 1997).

Existem duas formas de IL-1, a IL-1 α e a IL-1 β , com atividades biológicas bastante semelhantes, localizadas em genes distintos. Existe ainda um terceiro membro na família de genes da IL-1, o IL-1Ra (antagonista específico do receptor da IL-1), que age inibindo as ações pró-inflamatórias da IL-1 (revisto por Dinarello, 1998). A IL-1 α é sintetizada em associação com proteínas do citoesqueleto, é ativa como precursor e permanece intracelular (Mosley e col. 1987). Quando as células morrem a pró-IL-1 α é liberada e clivada por uma protease intracelular específica (Kobayashi e col. 1991). A IL-1 β por sua vez também é sintetizada como um precursor que precisa ser clivado por uma enzima conversora da IL-1 (ICE) e transportado para fora da célula. (Cerreti e col. 1992; Thornberry e col. 1992). As principais fontes celulares da IL-1 são os fagócitos mononucleares, fibroblastos, queratinócitos, e linfócitos T e B (Feghali e Wright, 1997). Tanto a IL-1 α como a IL-1 β podem induzir febre por um aumento na síntese da prostaglandina E₂ pelo endotélio vascular do hipotálamo (Warren, 1990). A IL-1 induz a liberação de histamina por mastócitos no foco inflamatório. A histamina por sua vez induz uma imediata vasodilatação e aumenta a permeabilidade vascular (Feghali e Wright, 1997).

O TNF- α é inicialmente sintetizado como uma proteína não-glicosilada transmembranar (proteína precursora), que deve ser processada para uma forma madura com massa molecular de 17 kDa. A enzima responsável pelo processamento do TNF é uma metaloproteinase específica, também chamada de enzima conversora do TNF- α (TACE ou ADAM 17) (Black e col. 1997; Moss e col. 1997). A síntese inicial de TNF- α por macrófagos e monócitos é estimulada por substâncias exógenas,

como o LPS e as β -glicanas, ou por mediadores endógenos, como a IL-1. O TNF- α também pode ser produzido por fibroblastos, mastócitos, linfócitos T e células NK (Beutler e Cerami, 1988). Após ser sintetizado, liberado e processado, o TNF- α se liga aos receptores nas células alvo e possui a capacidade de mediar diferentes efeitos em diferentes órgãos e tecidos. Com base na revisão realizada por Warren (1990), os principais efeitos pró-inflamatórios do TNF- α são os seguintes: Nas células endoteliais esta citocina induz a expressão de moléculas de adesão, de outras citocinas, de fatores de coagulação e da enzima iNOS (responsável pela síntese de óxido nítrico). Através da expressão dos fatores de coagulação ocorre uma supressão da atividade anticoagulante das células endoteliais, culminando em um bloqueio do suprimento sanguíneo e necrose do tecido adjacente. O TNF- α também ativa leucócitos inflamatórios (macrófagos, neutrófilos, monócitos e linfócitos), aumentando a atividade microbicida; e induz os fagócitos mononucleares e outros tipos de células a produzirem citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e o próprio TNF). Estas ações contribuem para o acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório.

A IL-6 é uma glicorproteína com peso molecular variando de 21 a 28 kDa, dependendo do grau de modificações pós-traducionais (Van Snick, 1990). A IL-6 é produzida por uma variedade de células, incluindo fagócitos mononucleares, células T e fibroblastos (Hirano, 1992). A IL-6, assim como a IL-1 e o TNF- α induzem a produção de proteínas da fase aguda pelo fígado. Estas proteínas fornecem um aumento na proteção contra microorganismos e modificam a resposta inflamatória por agirem sobre o tráfego celular e a liberação de mediadores (Suffredini e col. 1999). A IL-6 também apresenta um efeito regulatório, envolvendo a inibição da produção do TNF- α , agindo como

um *feedback* negativo que limita a resposta inflamatória aguda (Gadient e Patterson, 1999).

A IL-8 é uma quimiocina com capacidade de estimular e direcionar os movimentos dos leucócitos, sendo mais eficiente para os neutrófilos. De acordo com a revisão de Wuyts e col. (1994), a IL-8 promove adesão leucocitária às células endoteliais através da indução de expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) na membrana das células endoteliais. Esta interleucina pode ser produzida por todos os leucócitos, plaquetas e células endoteliais humanas, em resposta à um estímulo externo como o LPS ou outras citocinas (IL-1- β e TNF- α).

I. 6 - CITOCINAS ENVOLVIDAS NO ENVENENAMENTO

As citocinas pró-inflamatórias possuem um papel fundamental na regulação da inflamação. Assim, conhecer o perfil das citocinas liberadas durante o envenenamento botrópico pode nos levar a uma modulação desta resposta no sentido de minimizar os efeitos locais causados pelo envenenamento. Esta modulação da resposta inflamatória poderia então ser utilizada visando o tratamento do envenenamento, uma vez que o soro antiofídico não se mostra totalmente eficiente na neutralização destes efeitos.

Dados da literatura sobre a detecção de citocinas em soro de pacientes acidentados por *Bothrops* são bastante escassos, entretanto Barravieira e col. (1995), analisando 8 pacientes acidentados, detectou a presença de IL-6 em 6 pacientes (com níveis variando de 7 a 116 pg/ml de soro) e de IL-8 em um único paciente (2088 pg/ml). O soro foi avaliado também para a presença do TNF- α e IL-1 β , porém estas duas citocinas não foram encontradas. Estes autores sugerem que as reações

de fase aguda provocadas pelo aumento de IL-6 na corrente sanguínea de pacientes envenenados por *Bothrops* sejam responsáveis pela patogênese da síndrome da resposta inflamatória sistêmica observada nos envenenamentos. O aumento de IL-6 sérico também foi observado em camundongos experimentalmente inoculados com o veneno total de *B. asper* ou com uma fosfolipase miotóxica isolada do mesmo veneno (Lomonte e col. 1993). Estes autores sugerem que linfócitos e macrófagos não sejam os responsáveis pela indução do aumento nos níveis séricos de IL-6 após o envenenamento de camundongos com o veneno de *B. asper* e sim as células endoteliais, uma vez que o veneno possui efeitos drásticos na integridade dos vasos sanguíneos, sendo o dano causado nas células endoteliais e a mionecrose consideradas como um estímulo para esta liberação. Os autores atribuíram este efeito à fosfolipase miotóxica deste veneno.

Apesar da importância da IL-1 e do TNF- α no processo inflamatório, não foi detectado qualquer aumento destas citocinas no soro de animais experimentalmente inoculados com o veneno de *B. asper* (Lomonte e col. 1993) e pouco se sabe sobre a liberação local destes mediadores provocada pela ação dos venenos botrópicos.

I. 7 - Participação da Jararagina no Processamento do TNF- α

A jararagina é uma metaloproteinase hemorrágica presente no veneno de *B. jararaca* (Paine e col. 1992) que pertence à subfamília das metaloproteinases de venenos de serpentes (*Snake Venom Metalloproteinases* - SVMs). Junto com as ADAMs (*A Disintegrin and Metalloproteinase*), as SVMs pertencem à família das reprotinas (Fox e Long, 1998). As ADAMs compreendem atualmente um grupo de

aproximadamente 20 proteínas diferentes, expressas por uma ampla variedade de células e estão envolvidas em diferentes funções biológicas, tais como a ligação do espermatozóide ao óvulo (Bigler e col. 1997; Cho e col. 1998), a fusão de mioblastos (Yagami-Hiromassa e col. 1995), a neurogênese (Pan e Rubin, 1997) e o processamento (*shedding*) de ectodomínios de proteínas presentes na superfície celular (Peschon e col. 1998; Lunn e col. 1999). As SVMs e as ADAMs apresentam uma significativa similaridade estrutural. Ambas as subfamílias contém o **pró-domínio**, o qual confere a inativação do domínio catalítico, até que o pró-domínio seja proteoliticamente removido; um **domínio metaloproteinase** dependente de zinco, e um **domínio disintegrina**, que bloqueia as funções específicas das integrinas (Killar e col. 1999). A principal diferença entre as duas subfamílias é que as SVMs não possuem um domínio citoplasmático e um transmembrânico, enquanto as ADAMs estão geralmente ligadas à membrana. Esta característica das SVMs pode ser um importante instrumento para uma melhor compreensão do papel biológico de algumas reprotinas.

A ADAM 17, ou TACE (TNF- α *convertase enzyme*) é uma proteína ligada à membrana responsável pelo processamento do TNF- α , liberando a sua forma ativa da membrana da célula (Black e col. 1997; Moss e col. 1997). O domínio enzimático da TACE cliva o pró-TNF- α , entre a Ala76-Val77 (Milla e col. 1999). Em estudos anteriores realizados por Mourada-Silva e col. (1996), foi demonstrado que a jararagina também é capaz de processar a forma precursora do pró-TNF- α recombinante, na mesma posição que a TACE, liberando a sua forma ativa.

O presente estudo se baseia na possibilidade das SVMs estarem ativando mecanismos pró-inflamatórios endógenos através da liberação do TNF- α , contribuindo para o grave dano local induzido pelo veneno de

B. jararaca. Assim, foram realizados experimentos na tentativa de clarificar o mecanismo e também de investigar o papel das SVMPs solúveis na produção e liberação de pró-TNF- α em um sistema completo de células e também em um modelo experimental *in vivo*.

II. OBJETIVOS

- Caracterizar o efeito da **jararagina**, metaloproteinase hemorrágica do veneno de *B. jararaca*, na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias por células murinas em cultura (modelo *in vitro*).
- Caracterizar o perfil inflamatório local, causado pela jararagina injetada na pata de camundongos, através do estudo de edema de pata, do perfil de liberação local de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) e da análise da transcrição do mRNA que traduz as citocinas pró-inflamatórias.
- Verificar a participação dos domínios disintegrina/rico em cisteína e metaloproteinase da jararagina, na liberação local de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em pata de camundongos injetados com jararagina.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. 1 - ANIMAIS

Os experimentos envolvendo animais foram realizados com camundongos machos BALB/c, pesando entre 22 e 25 gramas, criados e mantidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os experimentos foram realizados no Biotério de Experimentação do Laboratório de Imunopatologia. Todos os animais foram mantidos em dieta de ração e água *ad libitum*. O protocolo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética para a Utilização de Animais do Instituto Butantan (protocolo número 003/2001) e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

III. 2 - VENENO

O veneno de *Bothrops jararaca*, na forma liofilizada foi obtido a partir de um *pool* de vários exemplares mantidos no laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan e. O veneno liofilizado foi mantido a -20°C até o uso.

III. 3 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

III. 3.1 - Jararagina

A jararagina foi isolada a partir do veneno de *B. jararaca* conforme procedimento descrito originalmente por Paine e col. 1992. Para tanto, 20 mg deste foram ressuspendidas em 2 mL de uma solução de sulfato de amônia 1,2 M tamponada com 20 mM de Tris/HCL, pH 7,4, centrifugadas a 12.000 x g durante 5 minutos e submetidas a uma coluna de interação hidrofóbica (Phenyl Superose® HR 5/5 - Pharmacia), no mesmo tampão, acoplada a um sistema FPLC - Pharmacia. Após remoção das proteínas não retidas com 13 mL do tampão de equilíbrio, foi efetuado o processo de eluição. A fase eluente utilizada foi um gradiente de concentração de 100 a 0% de sulfato de amônia 1,2 M em Tris/HCl 20 mM pH 7,4. A cromatografia foi realizada a um fluxo constante de 0,5 mL/minuto e foram coletadas frações de 1 mL. A fração obtida da coluna de Phenyl Superose referente à jararagina foi dialisada durante 18 horas a 4°C contra Tris/HCl 20 mM, pH 6,8 na presença de cloreto de cálcio 1 mM e aplicado em uma coluna de troca iônica Mono-Q® (HR 5/5 - Pharmacia), equilibrada com o mesmo tampão da diálise. A fase eluente da cromatografia de troca iônica foi um gradiente de concentração de 0 a 100% de NaCl 1M no tampão de equilíbrio. A cromatografia foi realizada a um fluxo constante de 1 mL/minuto e foram coletadas frações de 1 mL. As cromatografias foram monitoradas pela leitura da absorbância a 280 nm. Toda a coleta das frações foi efetuada a baixa temperatura. A fração obtida foi analisada quanto ao seu grau de pureza por SDS-PAGE e a preservação de sua atividade biológica, através do ensaio de atividade proteolítica e hemorrágica.

III. 3.2 - Jararagina-C

A jararagina-C, correspondente ao domínio disintegrina e rico em cisteína da jararagina, foi isolada utilizando-se protocolo semelhante ao descrito para a jararagina (item anterior). Para a obtenção desta fração, o primeiro pico do fracionamento na coluna de Mono-Q, eluído com uma concentração de aproximadamente 300 mM de NaCl, foi recolhido, dialisado contra tampão Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, contendo 1mM de CaCl₂, e recromatografado em coluna Mono-Q equilibrada com o mesmo tampão. A jararagina-C foi eluída em um gradiente linear crescente de 0 a 200 mM de NaCl, com um fluxo de 1mL por minuto, em um volume total de 30 mL, e testada quanto a sua pureza e preservação de sua atividade biológica (ensaio de inibição da agregação plaquetária).

III. 3.3 - Jararagina Inativa

A atividade proteolítica da jararagina foi inativada pelo ácido etilenodiamino tetracético (EDTA - AMRESCO). Para tanto, foi preparada uma solução mãe 1 M de EDTA diluído em água destilada cujo pH foi mantido constante em 8,0 com NaOH durante o preparo da solução. A jararagina diluída em PBS foi incubada durante 30 minutos a 37°C com diferentes concentrações de EDTA. A inibição da atividade enzimática foi testada frente à atividade proteolítica da toxina sobre a caseína.

III. 4 - ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A concentração protéica das amostras provenientes da cromatografia foi estimada através do método descrito inicialmente por Bradford (1976). Para este ensaio foi utilizado um reagente Bradford adquirido comercialmente (AMRESCO) e uma curva padrão com soro

albumina bovina (BSA) (Sigma), nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 0 µg/mL. Foram transferidos 150 µL do reagente Bradford em cada poço de uma placa de 96 poços, em duplicata, e adicionados 50µL dos pontos da curva padrão ou das amostras a serem dosadas. A reação foi agitada e após 5 minutos submetida à leitura da absorbância a 595 nm, em um leitor de placas Multiskan. A concentração das amostras foi estimada através da comparação com a curva padrão de BSA, plotada e analisada por regressão linear em um programa de análise de curva GraphPad Software Versão 2.01 (Gentilmente cedido pelo Dr. Cipolla-Netto, USP)

III.5 - SDS-PAGE

As proteínas purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS conforme descrito por Laemmli (1970). As frações correspondentes às proteínas purificadas (5,0 µg) foram diluídas em um mesmo volume de tampão de amostra (Tris/HCL 125 mM, pH 6,8, 4% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 20% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol), reduzidas com 2% de 2-mercaptoetanol (2-ME), e fervidas por 5 minutos. O material foi então aplicado em um gel de empilhamento de 5% e gel de resolução de 12% de poliacrilamida e submetido a eletroforese com corrente elétrica estabelecida em 25 mA e voltagem de até 240 V, durante 1 hora. Os géis foram corados uma solução corante (0,5% de Azul de Coomassie R-250 dissolvidos em 45% metanol e 10% ácido acético, diluídos em água destilada e filtrados em papel Whatman Nº1) e descorados com uma solução 7% de ácido acético e 25% de metanol. Os padrões de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (94 kDa), soro albumina bovina-BSA (67 kDa),

ovoalbumina-OVA (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

III. 6 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

III. 6.1 - Atividade Proteolítica sobre a Caseína

Os ensaios realizados para verificar a atividade proteolítica da jararagina e da jararagina inativada, seguiram os procedimentos descritos por Lomonte e Gutiérrez (1983). Inicialmente, foram adicionados 500 μ L de uma solução de caseína 1% em 200 μ L de tampão Tris/HCL 10 mM, pH 8,8 e 100 μ L de cloreto de cálcio 4 mM. À esta solução foram adicionados 60 μ g das amostras nativas ou inativadas com EDTA, diluídas em um volume final de 200 μ L de PBS. A mistura foi incubada a 37°C por 2 horas e a reação interrompida pela adição de 1mL de ácido tricloroacético 5% seguida de incubações em banho de gelo por 30 minutos. Após este período as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos. Aliquotas de 2mL dos sobrenadantes foram retiradas e a absorbância foi determinada a 280 nm em espectrofotômetro. Esta medida determina a quantidade de peptídeos liberados no sobrenadante sob a ação proteolítica da jararagina. Os valores são expressos em U/mg, onde 1 U corresponde à atividade proteolítica que produz um aumento na absorbância de 1,0 unidade de densidade ótica, por minuto, por miligrama de proteína. Os resultados são expressos como média \pm o desvio padrão de 3 experimentos independentes.

III. 6.2 - Atividade Proteolítica sobre Citocinas Recombinantes

A atividade enzimática da jararagina foi analisada sobre o TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, TGF- β e IL-10. Este ensaio foi realizado com as citocinas recombinantes de camundongo, sendo o TNF- α , IFN- γ e IL-1 β provenientes do fabricante Genzyme Diagnostics, a IL-6 e o IL-10 provenientes da ReD Systems. Foi utilizado também o TGF- β purificado de plaquetas humanas (ReD Systems), o qual apresenta homologia de aminoácidos de 99% com o TGF- β de camundongos. As citocinas recombinantes e a purificada foram diluídas em meio RPMI 1640. Estas condições foram utilizadas com o objetivo de reproduzirmos as mesmas condições da cultura de células. A concentração final foi de 2,00 ng/mL (TNF- α); 1,00 ng/mL (IL-6, TGF- β e IL-10) e 0,25 ng/mL (IFN- γ e IL-1 β). As amostras de citocinas foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (200 μ L/poço) sendo realizados os experimentos em triplicata. Após a distribuição das citocinas em placa, foi adicionada a jararagina a uma concentração final de 50 μ g/mL ou o PBS, como controle. As amostras foram incubadas a 37°C e um volume de 200 μ L foi colhido em 5 diferentes intervalos de tempo: 0, 2, 6, 12 e 24 hs e congeladas imediatamente à -20°C. Para a detecção da ação enzimática da jararagina, 50 μ L do volume total coletado das placas de cultura foram analisados por ELISA para detecção de citocinas (conforme descrito no item III.8.3).

III. 7 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS

III. 7.1 - Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica foi realizada como descrito previamente por Kondo e col. (1960), com algumas modificações. Camundongos BALB/c foram anestesiados, uma porção de seu dorso foi depilada, e diferentes amostras de jararagina foram injetadas intradermicamente, em um volume final de 100 µL. Os animais foram sacrificados após 3 horas e a pele do dorso retirada para a medida da área hemorrágica. Foi considerada como atividade hemorrágica o produto do maior diâmetro da área da hemorragia pelo diâmetro perpendicular a este. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão dos dados obtidos de 9 animais analisados em 3 experimentos independentes.

III. 7.2 - Atividade de Inibição da Agregação Plaquetária

Sangue humano, obtido de doadores saudáveis e voluntários, colhido em solução de citrato de sódio 3,8% e centrifugado por 20 minutos a temperatura ambiente a 1250 x g, foi utilizado para a obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP). As plaquetas foram isoladas do PRP através de gel filtração em coluna de Sepharose 2B® (Pharmacia), imediatamente após o PRP ter sido submetido a um gradiente descontínuo de 25/34% de BSA e centrifugado por 20 minutos a 720 x g. As plaquetas isoladas foram então ressuspendidas para uma concentração final de 3×10^8 /mL em tampão Tyrodes/Hepes (138 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM Glicose, 0,5 mM NaH₂PO₄, 20 mM Hepes, pH 7,4) contendo 0,35% de soro albumina bovina. Os efeitos das proteínas sobre a inibição da agregação plaquetária, foram estudados através da

incubação com plaquetas por 10 minutos a 37°C antes da adição de 1 µg/mL de colágeno (Horm Chemie). A extensão da agregação foi estimada como o aumento da transmissão de luz avaliada em um agregômetro Chrono-Log de duplo canal (modelo 440 VS)[P1]. A inibição da agregação foi estimada em porcentagem, tomado-se como 100% o valor obtido com a incubação das plaquetas apenas com as soluções diluentes, apropriadamente usadas como controles e como 0% estas mesmas suspensões desafiadas com colágeno (1 µg/mL). O dados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

III. 7.3 – Atividade Edematogênica

Para o ensaio da atividade edematogênica, foram utilizados grupos de 4 camundongos para cada amostra avaliada. As amostras foram diluídas em PBS em diferentes concentrações, e um volume final de 30 µL foi injetado sub-cutaneamente no coxim plantar da pata direita dos camundongos, enquanto a pata esquerda recebeu apenas PBS como controle. As soluções foram preparadas no momento do uso e filtradas em membrana Millipore de 0,22 µ para esterilização. A espessura da pata foi medida com um paquímetro ao longo de 24 horas. O edema foi calculado como a diferença entre a pata controle e a pata experimental, em cada tempo. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão dos dados obtidos de 12 animais analisados em 3 experimentos independentes.

III. 7.4 – Atividade Citotóxica

A viabilidade celular após tratamento das células peritoneais murinas (MPACs) com a jararagina foi quantificada pela atividade da succinil desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas. O substrato utilizado para esta enzima foi o 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Após 24 horas de cultura das MPACs tratadas com diferentes doses de jararagina ou LPS, o sobrenadante foi removido e o MTT foi adicionado à placa de cultura na concentração de 5mg/mL em PBS e incubado por 90 minutos a 37°C. As placas foram então lavadas com PBS e foram adicionados 200 µL/poço de DMSO. Uma hora após a incubação com DMSO, a densidade ótica foi determinada em um comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade foi calculada segundo a absorbância obtida, usando-se células não tratadas como equivalente a células 100% viáveis. As culturas foram feitas em triplicatas e o experimento repetido 3 vezes. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão dos dados obtidos de um experimento representativo.

III. 8 – MODELOS DE ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS INDUZIDA PELA JARARAGINA

III. 8.1 – Modelo *In Vitro*

a. Células Peritoneais Aderentes de Camundongos

Grupos de 10 camundongos receberam intra-peritonealmente 1mL de tioglicolato fermentado (Difco Laboratories) e após 5 dias o exsudato peritoneal formado foi coletado, em condições estéreis, com 5mL de meio

RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco), 100 UI/mL de penicilina (Bio-Whittaker), 100 µg/mL de estreptomicina (Bio-Whittaker), 100 µM de amino-ácidos não essenciais (Sigma), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco), 10 µg/mL de gentamicina (Gibco), 50 µM de 2-mercaptoethanol (Sigma) e 2 IU/mL de heparina (Roche). As células inflamatórias foram contadas em hemocitômetro, com uma solução corante de azul de Trypan 10%, e sua concentração ajustada para 10⁶ células/mL de meio RPMI 1640 suplementado. As células foram então semeadas, em placas de cultura celular de 96 (200 µL/poço) ou 24 poços(1mL/poço). Após 2 horas em estufa de CO₂ a 37°C, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS, restando somente as células aderentes (aqui denominadas de MPACs, *Murine Peritoneal Adherent Cells*). Foi adicionado então meio RPMI suplementado, contendo 5% de soro fetal bovino (SFB). As culturas, em triplicata, foram estimuladas com diferentes amostras durante um período de 24 horas. Após este período, o sobrenadante das culturas foi coletado e reservado para posterior dosagem de citocinas por ELISA. As células remanescentes na placa de cultura de 96 poços foram submetidas ao ensaio de atividade citotóxica ou coletadas com 500 µL/poço (placas de 96 poços) ou 1 mL de TRI Reagent® (Sigma) (placas de 24 poços), para posterior extração de RNA.

b. Linhagem Celular Macrofágica Murina (J774.A1)

A linhagem celular J774.A1 (macrófagos de camundongos), foi gentilmente cedida pelo Dr. Mark J. Taylor do Laboratório de Imunologia Celular da Escola de Medicina Tropical de Liverpool, R.U.

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado, contendo 5% de SFB, em condições estéreis, em estufa de CO₂ a 37°C. As células foram tratadas com uma solução de tripsina/EDTA durante 3

minutos para o descolamento e posterior coleta. As células foram lavadas 2 x com PBS e a concentração celular ajustada para 10^6 células por mL de meio RPMI 1640 completo. As células foram então semeadas, em triplicatas, em placa de cultura de 96 poços (200 μ L/poço), e imediatamente estimuladas com as diferentes amostras. O sobrenadante da cultura celular após diferentes tempos de estímulo foi coletado e reservado para posterior dosagem de citocinas por ELISA.

III. 8.2 - Modelo *In Vivo*

a. *Homogenato proveniente do coxim plantar*

No experimento realizado para se avaliar o a produção de citocinas *in vivo* foram utilizados grupos de 5 camundongos para cada amostra avaliada. As soluções de jararagina foram preparadas no momento do uso e filtradas em membrana Millipore de 0,22 μ para esterilização. As diferentes concentrações de amostra utilizadas foram injetadas em um volume de 30 μ L no coxim plantar da pata direita (pata experimental), enquanto a pata esquerda não recebeu nenhum estímulo (pata controle). Um grupo independente recebeu PBS nas mesmas condições. Diferentes períodos de tempo após a injeção da amostra, o animal foi anestesiado com éter, o sangue foi coletado pelo plexo oftálmico com uma pipeta *Pasteur*, e então o animal foi sacrificado por meio de deslocamento cervical. A pata foi cortada na altura da tíbia e transferida para um tubo *eppendorf* contendo 200 μ L de PBS, para dosagem de citocinas por ELISA, ou 1mL de Reagente Tri[®] (Sigma), para extração de mRNA. O tecido foi picotado com uma tesoura e posteriormente homogeneizado com uma haste de vidro no próprio tubo *eppendorf*. Após este procedimento a amostra foi

centrifugada a 12.000 x g durante 6 minutos e o sobrenadante foi processado para dosagem de citocinas ou isolamento de RNA.

III. 8.3 – Detecção da Produção de Citocinas

a. Dosagem de Citocinas por ELISA

Foi feito um *pool* contendo os sobrenadantes das culturas celulares, ou dos soros dos animais tratados ou ainda do homogenato celular de cada grupo. Posteriormente, o pool das amostras foi submetido a uma dosagem de citocinas pela técnica de ELISA, para cada uma das citocinas avaliadas (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β - R e D System) e IFN- γ (Genzyme Diagnostics), conforme protocolo especificado pelo fabricante.

Foram utilizados para a captura de antígenos 100 μ l de anticorpos monoclonais específicos para as citocinas de camundongos: anti-TNF- α (0,8 μ g/mL); anti-IL-6 (1 μ g/mL); anti-IL-1 β (2 μ g/mL); anti-IL-10 (1,5 μ g/mL), anti-TGF- β (2 μ g/mL) e anti-IFN- γ (4 μ g/mL) e incubadas durante a noite a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05% 3 vezes e bloqueadas por duas horas com 200 μ L uma solução a 1% de BSA e 5% de sacarose em PBS (TNF- α , IL-1 β , IL-6 IL-10 e TGF- β), ou 1% de BSA em PBS (IFN- γ). Após este período as placas foram lavadas novamente, e 50 μ L de amostras ou da curva padrão de citocinas, em duplicata, foram colocadas para incubação por mais 2 horas a temperatura ambiente. Após nova lavagem foram adicionados 100 μ l de um segundo anticorpo policlonal biotilado anti-TNF- α (0,3 μ g/mL); anti-IL-6 (0,05 μ g/mL); anti-IL-1 β (0,1 μ g/mL); anti-IL-10 (0,1 μ g/mL); anti-TGF- β (0,1 μ g/mL) e anti-IFN- γ (1 μ g/mL) e incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. As placas foram

então lavadas novamente e incubadas com uma solução de *Horseradish Peroxidase* conjugada à avidina (Genzyme Diagnostics) 1,25 ng/mL diluída em 1%BSA/PBS, durante 20 minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS, foram adicionados 100 µL de 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 foi 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 murinas 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 (gentilmente cedido pelo Dr. Cipolla-Netto, USP). A concentração de citocinas das amostras do homogenato foi obtida em pg/mL, entretanto os valores foram corrigidos para pg/pata após divisão da concentração obtida em pg/mL pelo volume coletado para cada animal. Desta maneira o volume adicional de líquido na pata do camundongo resultante do edema pôde ser descontado da pata controle. No soro e nas amostras de sobrenadante de cultura a concentração é referida em pg/mL. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo 3 vezes, sendo apresentado apenas o resultado de um experimento representativo.

b. Detecção de mRNA para Citocinas por RT-PCR

A extração do RNA foi feita isoladamente para cada amostra, a partir do material colhido de 3 camundongos utilizados por amostra. Os homogenatos das patas ou o sobrenadante de cultura diluídos em Reagente Tri® foram centrifugados a 12.000 x g durante 10 minutos em uma centrífuga *Eppendorf* 5415C. Foram adicionados 200 µL de

clorofórmio para cada mL de Reagente Tri® utilizado inicialmente, e estes foram agitados vigorosamente por 15 segundos. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas novamente a 12.000 x g durante 10 minutos. A fase aquosa (superior) resultante foi transferida para um tubo eppendorf e a este foram adicionados 250 µL de isopropanol. Após 10 minutos as amostras foram centrifugadas (12.000 x g /10min) e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (RNA) foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado novamente (7.500 x g /10min). O sobrenadante foi descartado novamente e o precipitado ressuspenso em 30 µL de água livre de RNase (Promega). A concentração de RNA foi quantificada conforme procedimento descrito por Sambrook e col. (1989). Todo o material utilizado foi manipulado em um ambiente livre de RNase.

Para a reação de transcrição reversa (RT) do mRNA para cDNA foi utilizado o sistema A3500 Promega. Para cada uma das amostras analisadas, 1µg de RNA obtido foi adicionado a 20 µL de uma solução contendo Tampão de Transcrição Reversa (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 0,1% de Triton X-100), 5 mM de MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 20 U do Inibidor de Ribonuclease (Recombinant RNasin®), 15 U da Transcriptase Reversa AMV (High Conc.) e 0,5 µg Primer Oligo (dT)₁₅. Esta mistura foi incubada durante 1 hora a 42° C e após este período as amostras foram fervidas durante 5 minutos e em seguida resfriadas a 4°C durante 5 minutos.

Após a reação de transcrição reversa, o cDNA obtido foi submetido à reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Para tanto, 1 µL do cDNA obtido acima foi incubado com 2,5 UI de DNA Polimerase Ampli Taq Gold (Perkin Elmer), 50 µM dos *primers* 3' e 5', e 200 µM de dNTP. Estes reagentes foram diluídos em um tampão contendo 200 mM de Tris-HCl, pH8,4, 500 mM de KCl e 1,0 a 4,0 mM de MgCl₂ (dependendo do *primer*

utilizado). Foi adicionado um volume de água livre de RNase em quantidades suficientes para 50 μ L/reacção. A reacção de PCR foi realizada com 1 ciclo inicial de denaturação de 94°C durante 9 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto (temperatura de denaturação), 58°C por 1 minuto (temperatura de anelamento) e 72°C por 1,5 minutos (temperatura de extensão). Os produtos do PCR foram detectados em um sistema de eletroforese com gel a 2% de agarose, utilizando-se como marcadores do tamanho e da concentração de nucleotídeos, o DNA Low Mass Ladder (Gibco).

Para a amplificação do cDNA foram utilizados os pares de *primers* da β -actina (controle positivo do PCR) e das citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β previamente descritos por Wesseling e col. (1994) e Seguin e col. (1994) (Tabela 1).

III.9 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizada neste trabalho foi realizada pelo Centro de Estatística Aplicada, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo. Foram utilizados o teste *t* de comparação de médias, o teste de *Friedman* modificado, o teste *Anova com Modelo Misto* e também o *Modelo de Comparações Múltiplas de Bonferroni*, na análise dos resultados (Conover 1971; Neter e col. 1985).

IV. RESULTADOS

IV. 1 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

IV. 1.1 - Isolamento da Jararagina, Jararagina-C e Obtenção da Jararagina Inativa

O fracionamento inicial do veneno de *B. jararaca* em uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl Superose® resultou em um perfil cromatográfico de acordo com o esperado pela literatura (Paine e col. 1992), no qual 6 picos foram observados (Figura 1). O pico VI foi submetido à diálise e recromatografado em coluna de troca-iônica Mono-Q®, resultando em 2 picos (Figura 2).

O pico I foi submetido a uma recromatografia na mesma coluna Mono-Q®, em tampão pH 7,4, resultando em um único pico (Figura 3), livre de contaminantes, referente à jararagina-C.

O pico II da primeira cromatografia de troca-iônica Mono-Q® (Figura 2), foi referente à jararagina purificada. As frações obtidas através das cromatografias foram avaliadas quanto à pureza, atividade de inibição da agregação plaquetária, atividade proteolítica e hemorrágica. O rendimento deste processo foi de aproximadamente 3 mg de jararagina e 500 µg de jararagina-C a partir de 100 mg de veneno total de *B. jararaca*.

A atividade proteolítica da jararagina foi inativada pela incubação com 1 mM de EDTA. Os ensaios que avaliam a atividade proteolítica da jararagina sobre a caseína e também a atividade hemorrágica foram utilizados para se verificar a ação inibitória destes compostos.

IV. 1.2 – Análise de Pureza

A análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE de 5 µg de jararagina e jararagina-C em condições redutoras demonstra que a jararagina apresentou uma única banda de 52 kDa e a jararagina-C também apresentou uma única banda de aproximadamente 30 kDa (Figura 4). Assim, foi possível verificar que as amostras foram obtidas com elevado grau de pureza, satisfatório para a realização de nossos experimentos.

IV. 1.3 – Atividade Proteolítica Sobre a Caseína

Como podemos verificar na tabela 2, a jararagina apresenta alta atividade caseinolítica, atividade esta totalmente ausente na jararagina-C, desprovida do domínio catalítico. A atividade catalítica da jararagina foi inibida com a dose de 1 mM de EDTA. Conforme pode ser verificado na tabela, esta dose foi eficiente em inibir completamente a atividade proteolítica da jararagina sobre a caseína.

IV. 1.4 - Atividades Biológicas

a. Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica da jararagina, da jararagina-C e da jararagina inibida com EDTA foi avaliada através da injeção de 4 doses mínimas hemorrágicas da jararagina (5 µg/animal) via intradérmica, no dorso de camundongos previamente depilados. Os resultados podem ser vistos na tabela 2. A jararagina induziu uma lesão hemorrágica de aproximadamente 260 mm². A jararagina-C, por sua vez não apresentou

qualquer sinal de atividade hemorrágica com a injeção da mesma dose. Após inibição da atividade catalítica da jararagina, 93% de sua atividade hemorrágica foi inibida, resultando em uma lesão de 16,6 mm².

b. Atividade de Inibição da Agregação Plaquetária

Os efeitos das proteínas sobre a inibição da agregação plaquetária foram avaliados através da incubação de 10, 20, 30 e 50 µg de jararagina e 35 µg de jararagina-C com plaquetas humanas por 10 minutos a 37°C antes da adição de 1 µg/mL de colágeno. A jararagina e a jararagina-C preservaram a sua atividade de inibição da agregação plaquetária, porém a atividade de inibição da jararagina-C foi levemente inferior à atividade de inibição induzida pela jararagina nativa, onde cerca de 35 µg de jararagina-C inibiram aproximadamente 86% da agregação plaquetária, enquanto 30 µg de jararagina foram suficientes para inibir em 100% a agregação plaquetária (Tabela 3).

IV. 2 – AÇÃO PRÓ-INFLAMATÓRIA DA JARARAGINA

IV. 2.1 – Produção de Citocinas *In Vitro*

a. Células Peritoneais Aderentes Murinas (MPACS)

Células peritoneais aderentes de camundongos foram estimuladas durante 24 horas com 10, 25 e 50 µg de jararagina por mL de cultura, ou 1 µg/mL de LPS ou ainda 1 µg/mL de LPS adicionada a 10, 25 e 50 µg/mL de jararagina. Após este período, o sobrenadante foi coletado e submetido a um ELISA para dosagem de TNF- α , enquanto as células

remanescentes na placa de cultura foram submetidas a um ensaio de viabilidade celular.

Descritivamente pode-se observar na figura 5 que a jararagina não apresentou qualquer atividade tóxica sobre as MPACs, apresentando pelo contrário uma atividade levemente protetora dos efeitos citotóxicos induzidos pelo LPS, quando as duas toxinas (jararagina + LPS) foram incubadas ao mesmo tempo, principalmente na dose de 25 e 50 µg/mL. Usando uma modificação do teste de *Friedman* (Canover, 1971) para a análise estatística, não foram detectadas mudanças significativas na viabilidade celular quando comparados o tratamento com jararagina nas diferentes doses ao tratamento com PBS ($p= 0,161$). O tratamento com o LPS por sua vez, induziu uma diminuição significativa da viabilidade com relação ao PBS ($p < 0,001$). Já a jararagina, nas doses de 25 e 50 µg/ml, quando adicionada junto ao LPS, apresentou uma ação protetora estatisticamente significativa sobre os efeitos tóxicos do LPS ($p= 0,005$).

No experimento de liberação de TNF- α , conforme pode ser visto na figura 6, descritivamente pode-se observar que após 24 horas de tratamento, nenhuma dose de jararagina induz a liberação desta citocina em doses superiores à liberada em nível basal. A jararagina, além disso, possui uma atividade sobre o TNF- α induzido pelo LPS (ou sobre as células), diminuindo a sua liberação. A quantidade de TNF- α produzida pelo estímulo por LPS mostrou uma redução quando em presença de jararagina, dependente da dose de toxina utilizada. A análise estatística destes resultados revela que a dose de 50µg/mL de jararagina causou uma diminuição significativa na produção de TNF- α , quando comparada ao controle com PBS ($p < 0,001$). Ao mesmo tempo, o tratamento das MPACs com a jararagina nas doses de 25 e 50 µg/mL adicionada concomitantemente ao LPS, causou uma diminuição na

liberação do TNF- α induzido por LPS devido a adição de jararagina a cultura ($p < 0,001$)

A dose de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de jararagina (jar 50), foi escolhida para ser utilizada em estudos subsequentes, onde foi analisado o efeito direto da jararagina sobre as células, ou seu efeito sobre as citocinas induzidas pelo LPS. Foi utilizada a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS e o co-estímulo com Jararagina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante períodos de 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 36 horas. O sobrenadante destas culturas foi coletado após estes períodos de tempo e submetido ao teste de ELISA para quantificação de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-10 e TGF- β .

Descritivamente, observa-se na figura 7 que o estímulo com a jararagina não levou à produção de nenhuma das citocinas analisadas. Por outro lado, interferiu na produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β induzidos pelo LPS e não alterou a produção de IFN- γ também induzido por LPS. A análise estatística realizada nestes experimentos (teste de *Friedman*) mostrou uma diferença significativa no efeito de inibição da produção de **IL-10** induzida por LPS causada pela jararagina com 18, 24 e 36 horas ($p = 0,01$, 0,049 e 0,048 respectivamente). Com relação à **IL-1b**, a jararagina inibiu significativamente a sua produção induzida por LPS somente após 36 horas de tratamento ($p = 0,01$). Analisando-se o **TGF-b**, o LPS não causou um aumento estatisticamente significativo na produção desta citocina com relação ao controle, entretanto a jararagina diminuiu a liberação de seus níveis basais. Com relação à produção de **IFN-g**, a jararagina não apresentou nenhum efeito estatisticamente significativo sobre a sua produção induzida por LPS. Quanto à liberação do **TNF-a** e da **IL-6**, a grande variabilidade dos resultados obtidos nos experimentos independentes não permitiu o tratamento estatístico destas amostras devido a um problema de

interação entre as coletas. Foi observado para estas 2 citocinas que o perfil de liberação foi o mesmo, porém a ordem de grandeza foi diferente.

b. Linhagem Celular Macrofágica Murina (J774.A1)

As células da linhagem J774.A1 foram estimuladas nas mesmas condições que as células MPACs citadas anteriormente (50 µg/mL de jararagina ou 1 µg/mL de LPS, ou ainda um co-estímulo de jararagina 50 µg/mL + LPS 1 µg/mL) durante um período de 4, 8, 10, 22, 24, 30 e 40 horas. Foram analisadas as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ .

Na figura 8 pode-se observar que as células J774.A1 estimuladas com LPS produziram altos níveis de TNF- α , atingindo um valor máximo com 10 horas de estímulo. Entre 10 e 22 horas de tratamento a quantidade de TNF- α permaneceu estável, diminuindo ligeiramente ao longo de 40 horas de estímulo. A adição de jararagina concomitante ao LPS reduziu significativamente a quantidade de TNF- α induzido por LPS, caindo para níveis basais após 40 horas de estímulo. Esta redução foi estatisticamente significativa a partir de 10 horas de tratamento ($p < 0.05$ para todos os tempos). Mais uma vez, a jararagina adicionada isoladamente às culturas não induziu a produção/liberação de TNF- α . A linhagem J774.A1 também respondeu positivamente ao LPS induzindo a liberação de IL-6 a partir de 8 horas de estímulo, porém a adição de jararagina e LPS sobre as células inibiu completamente a liberação desta interleucina. Esta inibição foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A jararagina adicionada isoladamente não induziu a produção de IL-6 (Figura 8).

O sobrenadante destas células, obtidos após os tratamentos descritos acima, também foram analisados quanto à presença de IL-1 β e

IFN- γ , porém estas citocinas não foram encontradas em nenhum grupo que recebeu os diferentes tratamentos (dados não mostrados).

c. Atividade Proteolítica sobre Liberação de Citocinas

No sentido de verificar-se o papel da atividade proteolítica da jararagina sobre a liberação de citocinas, a jararagina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inibida com 1mM de EDTA (Jar/EDTA) foi utilizada como estímulo para células MPACs. Foram utilizados ainda a jararagina nativa (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + jararagina nativa (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Jar + LPS) e o LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + jararagina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inativada por 1mM de EDTA (LPS + Jar/EDTA).

Na figura 9 pode-se observar que a jararagina induz uma liberação significativa de TNF- α após 4 horas. Níveis significantes de IL-1 β e de IL-6 não foram detectados após o estímulo com a jararagina. A estimulação de MPACs com a jararagina tratada por EDTA resultou na produção significativa de TNF- α com 12 e 24 horas, de IL-1 β com 24 horas e na liberação de IL-6 em todos os tempos analisados.

Na figura 10 observa-se a ação da jararagina na produção de citocinas induzidas por LPS. Os níveis de TNF- α e IL-6 foram significativamente menores quando as células foram co-incubadas com LPS e jararagina, reduzindo praticamente a níveis basais a produção destas citocinas. Por outro lado, os níveis de IL-1 β mantiveram-se praticamente semelhantes frente aos estímulos de LPS ou LPS com jararagina nativa. Após a co-estimulação com LPS e Jar/EDTA, níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 apresentaram-se estatisticamente semelhantes aos obtidos com LPS, exceto com relação à produção de TNF- α , 24 horas após o estímulo, onde foi observada uma redução parcial (*Teste 'student'*)

(Figura 10). Analisados de maneira conjunta, estes resultados sugerem que a redução das citocinas induzidas pelo LPS seja dependente da atividade proteolítica da jararagina.

d. Atividade Proteolítica sobre Citocinas Recombinantes

Considerando-se a importância da atividade proteolítica na redução dos níveis de citocinas induzidas pelo LPS, uma hipótese que nos ocorreu seria que a jararagina poderia estar atuando diretamente nas citocinas neo-formadas, impedindo assim sua reatividade com os anticorpos envolvidos no teste. Deste modo, a jararagina foi incubada com as citocinas recombinantes sob as mesmas condições utilizadas nos experimentos de cultura celular. Estes resultados estão representados na figura 11, onde podemos observar que esta toxina apresentou uma marcante ação enzimática sobre as citocinas recombinantes IL-6, TNF- α e IL-10, de modo que estas citocinas não foram detectadas pelo ensaio imunoenzimático. A ação proteolítica sobre o TGF- β , IFN- γ e a IL-1 β foi menos acentuada, sugerindo que estas citocinas possuam algumas propriedades que as tornem resistentes à ação enzimática da jararagina.

e. Transcrição de mRNA em MPACs Induzida por Jararagina

Um eventual estímulo direto das MPACs pela jararagina foi avaliado por RT-PCR. O RNA total foi extraído de MPACs em cultura, estimuladas com jararagina nativa (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + jararagina nativa (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Jar + LPS) e LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + jararagina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inativada por 1mM de EDTA (LPS + Jar/EDTA) e submetidos a uma reação de Transcrição Reversa (RT), onde o RNA foi transcrito para o seu DNA complementar (cDNA). Devido ao *primer* oligo

(dT) utilizado em nossos experimentos, somente o RNA mensageiro foi transcrito para cDNA, deste modo foi analisado por PCR a expressão do mRNA que codifica as citocinas pró-inflamatórias durante os estímulos estudados, através da presença do cDNA. Para a reação de PCR foi utilizado um *primer* para a proteína β -actina (expressa constitutivamente pelas células) como nosso controle positivo da reação, em conjunto com os *primers* para o TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Conforme pode ser visto na figura 12, 4 horas após o estímulo tanto com a jararagina, quanto com a jararagina inibida pelo EDTA, a presença de cDNA que codifica o TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi detectada pela reação de RT-PCR como uma banda marcada de maneira mais intensa quando comparada ao controle. Embora este teste não seja quantitativo, a intensidade das bandas resultantes de ambos os tratamentos foi similar. No sentido de se eliminar a possibilidade de que a regulação negativa das citocinas induzidas por LPS mais a jararagina estivesse ocorrendo devido a inibição da síntese, o RT-PCR também foi realizado após estímulo com LPS ou LPS + jararagina nativa ou tratada com EDTA. A produção do mRNA para TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi detectada 4, 12 e 24 horas após o estímulo com LPS. A intensidade das bandas de cDNA induzido pela estimulação com o LPS não foi alterada pela co-estimulação tanto com a jararagina nativa como com a toxina inativada, mostrando que uma regulação negativa das citocinas induzidas pelo LPS devido a jararagina não está relacionada com a inibição dos primeiros passos de ativação das MPACs, levando à síntese de mRNA.

IV. 2.2 - Modelo *In Vivo*

No ensaio de atividade inflamatória *in vivo* causada pela jararagina, foi utilizado um modelo de inflamação local na pata de camundongos, onde observamos hemorragia, edema e liberação local de citocinas. Foi preparado um homogenato com as patas tratadas e este foi submetido a um ELISA ou à extração de RNA para o ensaio de RT-PCR.

a. Atividade Edematogênica

No ensaio de atividade edematogênica, foram utilizadas as doses de 0,25, 1, 2, 5, e 10 μg de jararagina, injetadas em um volume de 30 μL , por coxim plantar de camundongo (pata experimental), enquanto a pata contralateral recebeu somente PBS como controle. Foram medidas as espessuras tanto da pata controle como da pata experimental, e a diferença entre ambas (mm) foi expressa como o valor do edema. Descritivamente, observa-se na figura 13 que a jararagina possui uma atividade edematogênica, e quanto maior é a dose injetada, maior a espessura média da pata. Nas primeiras quatro horas ocorre um aumento marcante do edema e após este período uma diminuição progressiva.

O modelo de comparações múltiplas de *Bonferroni* foi utilizado na análise estatística deste experimento, confirmando que a partir da dose de 1 μg /pata há um aumento significativo na sua espessura. Usando um modelo linear generalizado com medidas repetidas, supondo distribuição normal da intensidade do edema, encontramos que a espessura média da pata muda significativamente segundo a dose aplicada ($p < 0,001$), confirmando que o efeito edematogênico da jararagina é dose-dependente.

b. Produção Sérica das Citocinas

Duas horas após a injeção de 0,25, 1 e 5 μg de jararagina por coxim plantar de camundongos ($\mu\text{g}/\text{pata}$), uma amostra do sangue dos animais foi coletada, o soro foi separado por centrifugação, e reunido em *pool* para cada grupo. Este *pool* de soro foi submetido a um ELISA para detecção de citocinas. Foi detectado um aumento dose-dependente somente nos níveis séricos da IL-6, a partir da dose de 1 $\mu\text{g}/\text{pata}$, conforme pode ser visto na figura 14. No tempo analisado e com as doses de jararagina utilizadas, as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10, IFN- γ e TGF- β não foram detectadas no soro destes animais, pelos métodos empregados.

c. Produção Local das Citocinas

Duas horas após a injeção de 0,25, 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{pata}$ de jararagina no coxim plantar de camundongos, o homogenato da pata foi obtido conforme descrito em Materiais e Métodos. A presença de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TGF- β foi avaliada neste homogenato. Os resultados podem ser vistos na figura 15. Foi observado um aumento significativo de IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TGF- β após a injeção de jararagina. A produção de TNF- α apresentou uma significativa diminuição para a dose de 5 $\mu\text{g}/\text{pata}$, e o não apresentou nenhum aumento 2 horas após a injeção de 5 $\mu\text{g}/\text{pata}$.

No sentido de se verificar a cinética da produção local das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ) em camundongos tratados com jararagina ao longo do tempo, foi escolhida a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{pata}$. O homogenato do local foi colhido com os tempos de 2, 4, 8, 24 e 48 horas após a injeção da jararagina no coxim plantar de camundongos e

processado conforme descrito na metodologia para a dosagem das citocinas.

Descritivamente, podemos observar na figura 16 que as citocinas que apresentaram um aumento marcante nas primeiras horas após a injeção com a jararagina foram principalmente a IL-6, a IL-1 β e o TNF- α , sendo o aumento de TNF- α observado após 2 horas, enquanto o aumento de IL-1 β e IL-6, observado somente a partir de 4 horas após a injeção. Todas estas citocinas também foram quantificadas em animais controle injetados com PBS, onde não foi observada a produção de níveis significativos de nenhuma das citocinas analisadas. Pode-se observar ainda na figura 16 que a jararagina não induziu qualquer aumento na produção de IFN- γ , permanecendo em níveis basais até as 24 horas.

A análise estatística (*teste de Friedman*) confirma as observações descritivas. Com relação ao TNF- α , com exceção dos tempos 0, 4 e 48 horas, foram detectadas diferenças significativas na sua liberação após o estímulo com jararagina, quando comparado ao PBS, sendo o pico de produção observado com 2 horas. A IL-6 apresentou aumentos significativos com 2, 4, e 8 horas, com um pico em 4 horas, e a IL-1 β apresentou diferenças estatisticamente significantes com 2, 4, 8 e 24 horas, sendo o pico máximo de liberação também em 4 horas.

d. Transcrição de mRNA Induzida por Jararagina no Local.

A produção de mRNA para as citocinas, induzida no local da injeção da jararagina (1 μ g/pata) ao longo de 8 horas, foi avaliada pela técnica de RT-PCR e comparada a um grupo que recebeu a injeção de PBS, ou ainda um grupo controle que não recebeu qualquer tratamento. O homogenato da pata foi coletado em 1 mL de reagente Tri para

extração do RNA total. Para a transcrição do mRNA para cDNA, 1 µg de RNA total foi submetido a uma reação de transcrição reversa. A expressão de mRNA para as citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α foi analisada através de reações de PCR do cDNA obtido.

Na figura 17 observam-se os produtos do RT-PCR em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo. Foram detectadas bandas marcadas com alta intensidade para a IL-1β em todos os tempos analisados, após o tratamento com a jararagina. Após o tratamento com PBS também foram observadas bandas para a IL-1β, porém de intensidade inferior às observadas após o tratamento com a jararagina. O grupo que não recebeu nenhum tratamento não apresentou nenhum produto para a IL-1β. Com relação à IL-6 e o TNF-α, também foram detectadas bandas marcadas com alta intensidade, preferencialmente nos tempos de 2 e 4 horas. O tratamento com PBS também estimulou a transcrição de mRNA para o TNF-α com 2 horas. Não foram detectados produtos de PCR para a IL-6 ou o TNF-α nos grupos que não receberam qualquer tratamento (grupo controle).

IV. 2.3 - Efeito dos Domínios da Jararagina na Ação Inflamatória

O efeito dos domínios da jararagina na atividade inflamatória foi estudada através da ação da jararagina-C, que corresponde somente ao domínio disintegrina e rico em cisteína, comparada à jararagina nativa (domínio metaloproteinase, domínio disintegrina e domínio rico em cisteína). A ação local foi avaliada através da atividade edematogênica das amostras ao longo de 24 horas após a injeção, e também pela

liberação das citocinas detectadas no local, a IL-6 e a IL-1 β , no tempo de 4 horas e o TNF- α no tempo de 2 horas.

a. Papel dos Domínios na Atividade Edematogênica

A participação dos domínios da jararagina na atividade edematogênica foi avaliada através da injeção das amostras de jararagina (1 μ g/pata) e jararagina-C (1 μ g/pata), diluídas em um volume de 30 μ L de PBS, no coxim plantar (pata experimental) de grupos de 12 camundongos por amostra, e comparados a um grupo injetado somente com PBS. A pata contralateral (pata controle) não foi injetada e a espessura de ambas as pata foi medida com 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas após a injeção, com o auxílio de um paquímetro. A diferença entre os valores da pata experimental e da pata controle expressam o aumento da espessura da pata.

A jararagina-C não induziu edema na pata do camundongo ao longo do tempo analisado, ficando o aumento da espessura da pata injetada com esta amostra, muito próximo aos valores obtidos com o PBS. A jararagina nativa apresentou uma forte atividade edematogênica 2 horas após a injeção, voltando aos níveis basais após 24 horas (Figura 18).

b. Papel dos Domínios na Liberação Local de Citocinas

A participação dos domínios da jararagina na liberação local das citocinas foi avaliada através da injeção das amostras nas mesmas concentrações utilizadas para a atividade edematogênica, no coxim plantar (pata experimental) de grupos de 4 camundongos por dose. A pata contralateral (pata controle) de todos os grupos não recebeu

nenhum estímulo. Dois grupos independentes de camundongos foram utilizados como controle, um que recebeu apenas PBS como estímulo e outro que não recebeu nenhum estímulo (Nada). O homogenato do local foi preparado após 2 e 4 horas e processado para posterior dosagem das citocinas por ELISA. Estes experimentos foram repetidos 4 vezes, onde o perfil de liberação encontrado para todos os experimentos foi semelhante. Foi escolhido um experimento representativo das 4 coletas independentes, onde as barras representam a média + o desvio padrão encontrado na dosagem de ELISA (Figura 19)

Na análise estatística foi utilizada uma tabela de Anova com Modelos Mistos (fator fixo o tratamento e aleatório a coleta). Comparando-se a liberação de TNF- α causada pelas 2 amostras estudadas, podemos observar na figura 19 que a jararagina e a jararagina-C induziram a liberação de níveis de TNF- α significativamente superiores ($P < 0.001$) quando comparados ao PBS ou ao grupo que não recebeu nenhum estímulo. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre a liberação desta citocina induzida por jararagina ou jararagina-C. Com relação à IL-1 β e à IL-6, a jararagina-C, assim como a jararagina induziram a liberação de níveis estatisticamente significantes ($P < 0,05$) destas citocinas, quando comparado ao PBS ou ao controle. Porém houve uma diminuição significativa da liberação causada pela jararagina-C, quando comparada à jararagina ($p = 0,048$ para a IL-1 β e $p = 0,036$ para a IL-6).

Estes resultados sugerem inicialmente que o domínio disintegrina da jararagina (jararagina-C) seja importante na liberação de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , embora a sua participação na liberação de IL-6 e IL-1 β seja menor que na liberação do TNF- α , onde ele provavelmente desempenha um papel fundamental.

Pode-se observar que o domínio disintegrina é extremamente importante na liberação do TNF- α , mas para que a IL-6 e o IL-1 β sejam liberados é preciso que, além do domínio disintegrina, também o domínio catalítico esteja presente. O domínio catalítico também mostrou ser fundamental para que ocorra o edema induzido pela jararagina, uma vez que a jararagina-C ou a jararagina inibida não induzem edema no local de sua injeção.

TABELA 1

Seqüência de *primers* utilizados nas reações de PCR para detecção de cDNA que codifica as citocinas IL-1b, IL-6 e TNF-a

Primers	Oligonucleotídeo 3'	Oligonucleotídeo 5'	Tamanho do produto (pares de bases)
IL-6	GTACTCCAGAAGACCAGAGG	TGCTGGTGACAACCACGGCC	308
IL-1 β	GAGATTGAGCTGTCTGCTCA	AAGGAGAACCAAGCAACGAC	381
TNF- α	CCTGTAGCCCACGTCGTAGC	TTGACCTCAGCGCTGAGTTG	306
β -actina	CGGAGGAAGAGGATGCGGCAGTGG	CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAGGG	605

TABELA 2

Atividade hemorrágica e proteolítica da jararagina, jararagina-C e jararagina inativada enzimaticamente por EDTA

Amostras	Atividade hemorrágica (5mg/animal)		Atividade Proteolítica (60 mg/mL)	
	Área da lesão hemorrágica *	Inibição da lesão hemorrágica (%)	Peptídeos liberados	Inibição da ativ. Proteolítica (%)
Jararagina Nativa	260 ± 48,5	ND	53,27 ± 9,2	ND
Jararagina-C	0	ND	ND	ND
Jararagina/EDTA 1 mM	16,6 ± 5,3	93	Zero	100

ND: Não determinada

* : Área da lesão hemorrágica, em mm² ± desvio padrão.

Camundongos BALB/c foram injetados intradermicamente com 4 doses mínimas hemorrágicas (5 µg) da jararagina nativa ou tratada com 1mM de EDTA, ou 5 µg de jararagina-C. Os animais foram sacrificados após 3 horas e a pele do dorso foi retirada para a medição da área hemorrágica. A atividade hemorrágica foi determinada como a área resultante do produto dos diâmetros da lesão hemorrágica. Para a atividade proteolítica, 60 µg de jararagina inativada com o-fenantrolina ou EDTA foram incubadas com a caseína à 1% e a absorbância da solução contendo os peptídeos liberados determinada a 595 nm. Os valores da lesão hemorrágica representam a média ± desvio padrão de 9 animais, e da atividade proteolítica representam média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

TABELA 3**Inibição da agregação plaquetária induzida
pela jararagina e jararagina-C**

Amostras	Concentração (mg)	% inibição
Colágeno/PBS	1	Zero
Jararagina	10	10%
	20	10%
	30	100%
	50	100%
Jararagina-C	35	86%

Suspensões de plaquetas humanas lavadas foram incubadas com diferentes concentrações de jararagina nativa ou jararagina-C por 10 minutos a 37°C. Colágeno (1 µg/mL) foi adicionado e a agregação foi registrada durante 5 minutos. Os percentuais de inibição das amostras em estudo foram estimados tomando-se como referência os valores da agregação plaquetária induzida pelo colágeno na presença dos diluentes das amostras.

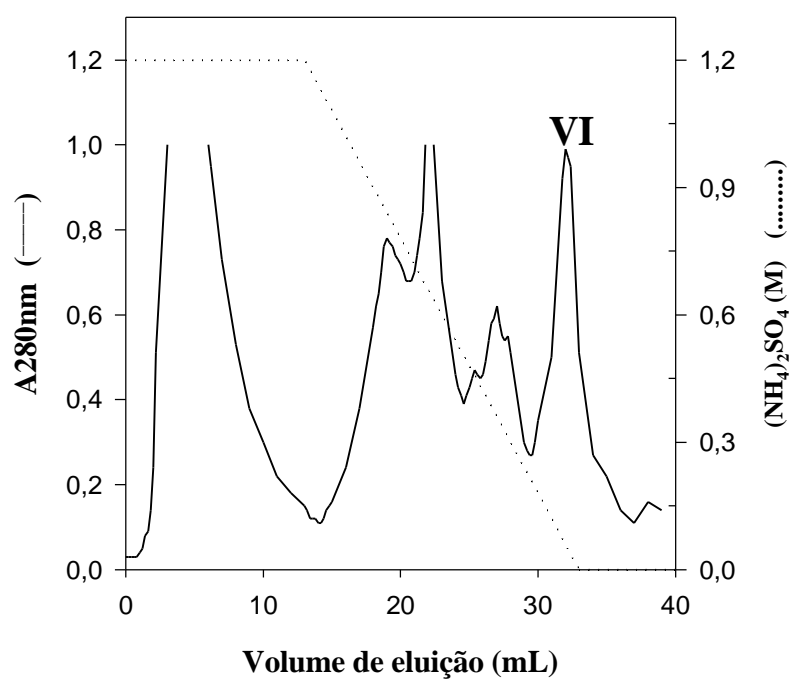


Figura 1: Isolamento da jararagina. Cromatografia do veneno de *B. jararaca* em coluna de interação hidrofóbica, Phenyl Superose, como descrito em materiais e métodos. O pico VI, referente à jararagina, foi submetido a uma nova cromatografia em coluna de troca iônica Mono-Q.

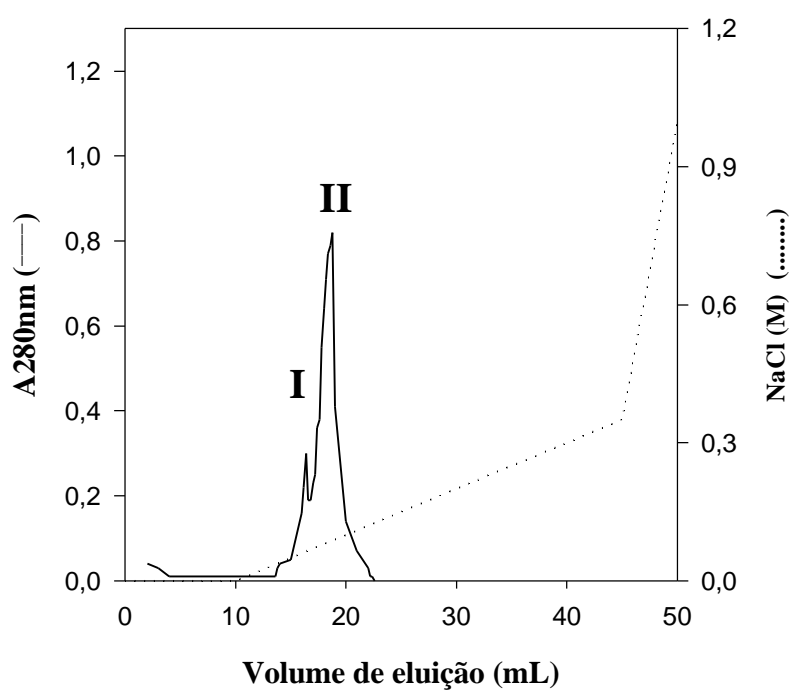


Figura 2: Isolamento da jararagina. Cromatografia do pico VI proveniente da Phenyl Superose, em coluna Mono-Q, como descrito em materiais e métodos. O pico II, referente à jararagina purificada, foi submetido à análise por SDS-PAGE e atividade biológica. O pico I, referente a jararagina-C, foi submetido à recromatografia em coluna Mono-Q.

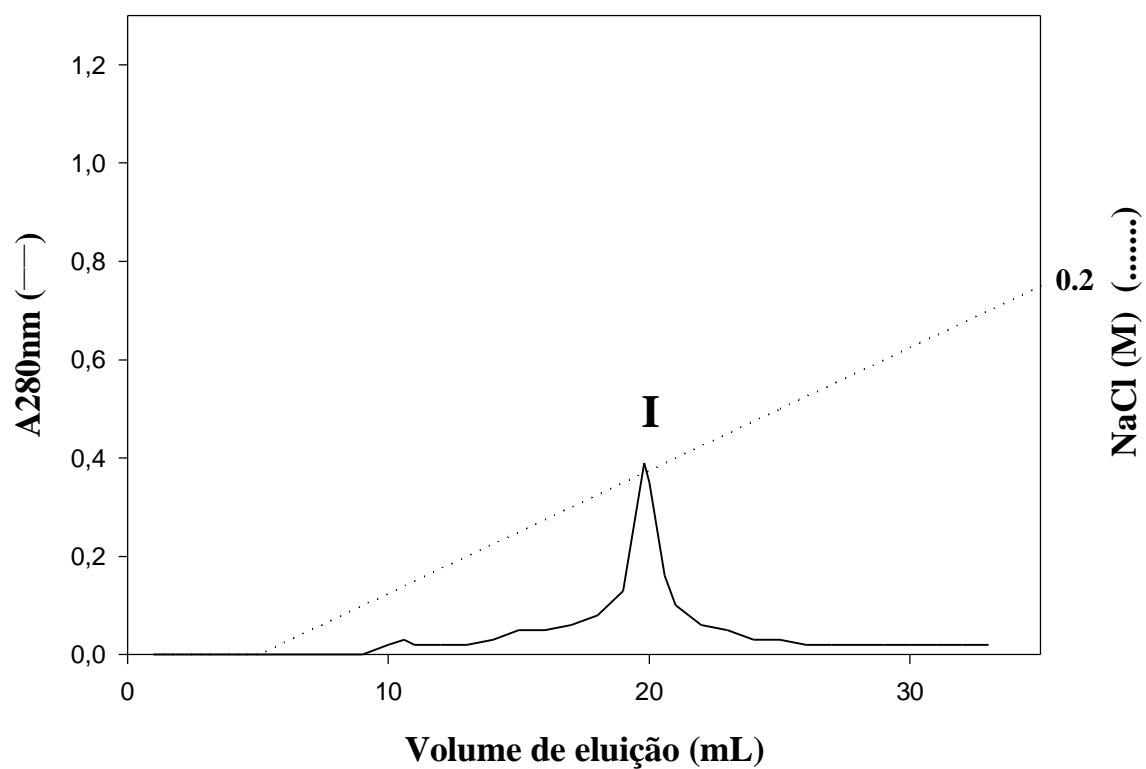


Figura 3: Isolamento da jararagina-C. Cromatografia em coluna Mono-Q do pico 1 proveniente do processo de purificação da jararagina em coluna Mono-Q, como descrito em materiais e métodos.

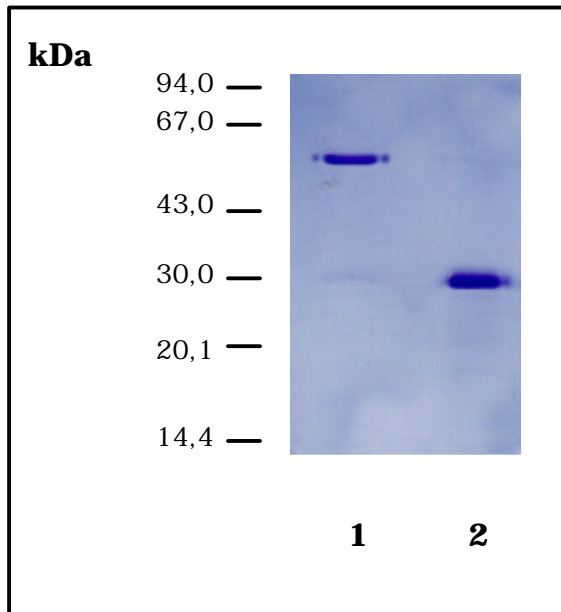


Figura 4: SDS-PAGE da jararagina e jararagina-C. Amostras de 5 μg de proteína foram analisadas por SDS-PAGE, em um gel de acrilamida 12%, sob condições redutoras. Após eletroforese as bandas foram coradas por azul de Coomassie. Os números da esquerda indicam a posição de migração dos marcadores de massa molecular. A jararagina migrou na linha 1 e a jararagina-C na linha 2.

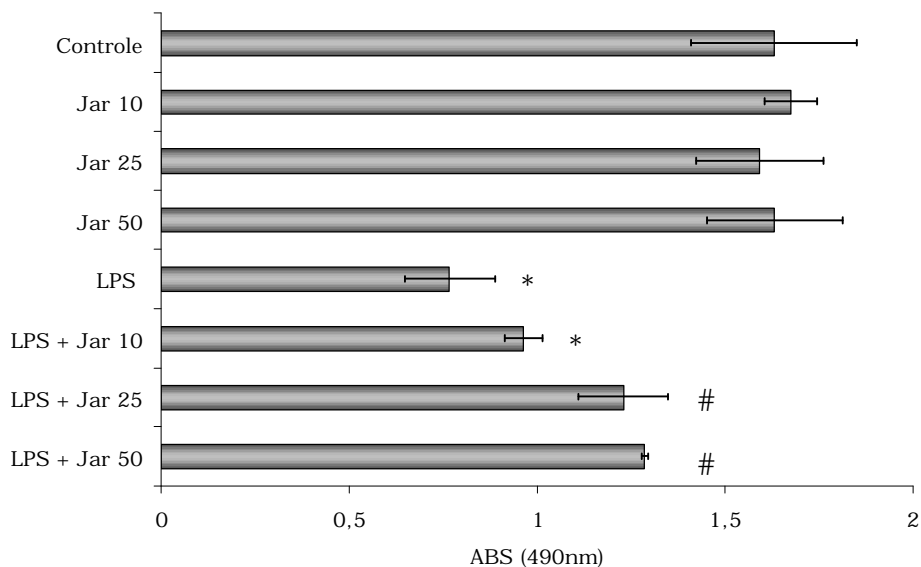


Figura 5: Ensaio de viabilidade celular em MPACs (células aderentes peritoneais murinas). As células foram tratadas durante 24 horas com jararagina, nas concentrações de 10, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Jar 10; Jar 25; Jar 50, respectivamente) ou com 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS, ou ainda 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS adicionado às amostras de jararagina nas diferentes concentrações (LPS + Jar 10; LPS + Jar 25 e LPS + Jar 50) e o ensaio de viabilidade foi realizado pelo método do MTT. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata. As barras representam a média \pm o desvio padrão da triplicata de 1 experimento representativo. O símbolo * representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) dos tratamentos comparados ao controle de PBS, e # representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) comparando-se os tratamentos com LPS e LPS + Jar (Teste de *Friedman*).

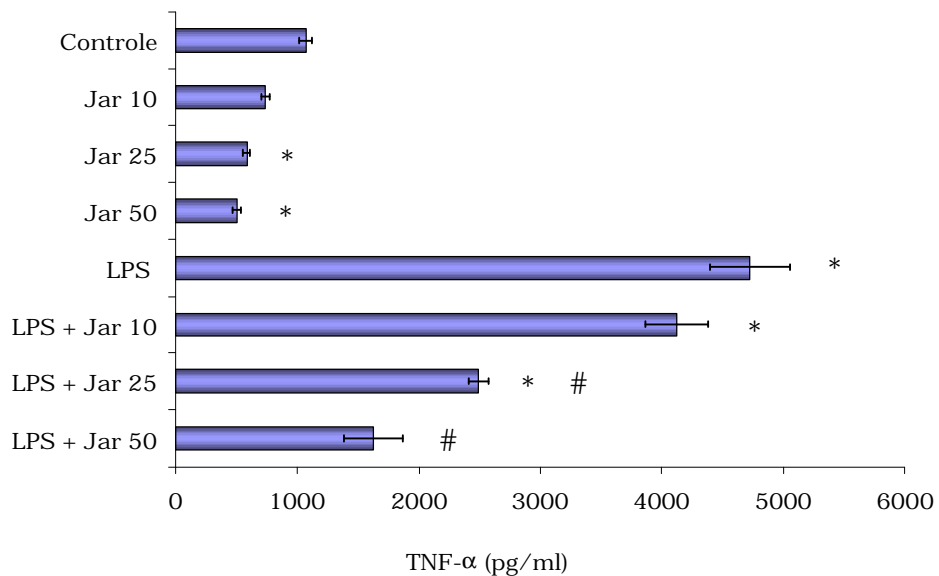


Figura 6: Produção de TNF- α por MPACs (células aderentes peritoneais murinas). 10^6 células/ml foram tratadas com jararagina nas concentrações de 10, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jar 10; Jar 25; Jar 50, respectivamente) ou com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (LPS), ou ainda 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS adicionado às amostras de jararagina nas diferentes concentrações (LPS + Jar 10; LPS + Jar 25 e LPS + Jar 50) e o sobrenadante foi submetido a dosagem de TNF- α murino por ELISA após 24 horas de estímulo. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata. As barras representam a média \pm o desvio padrão da triplicata de 1 experimento representativo. O símbolo * representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) dos tratamentos comparados ao controle de PBS, e # representa uma diferença significativa ($p < 0,05$) comparando-se os tratamentos com LPS e LPS + Jar (Teste de *Friedman*).

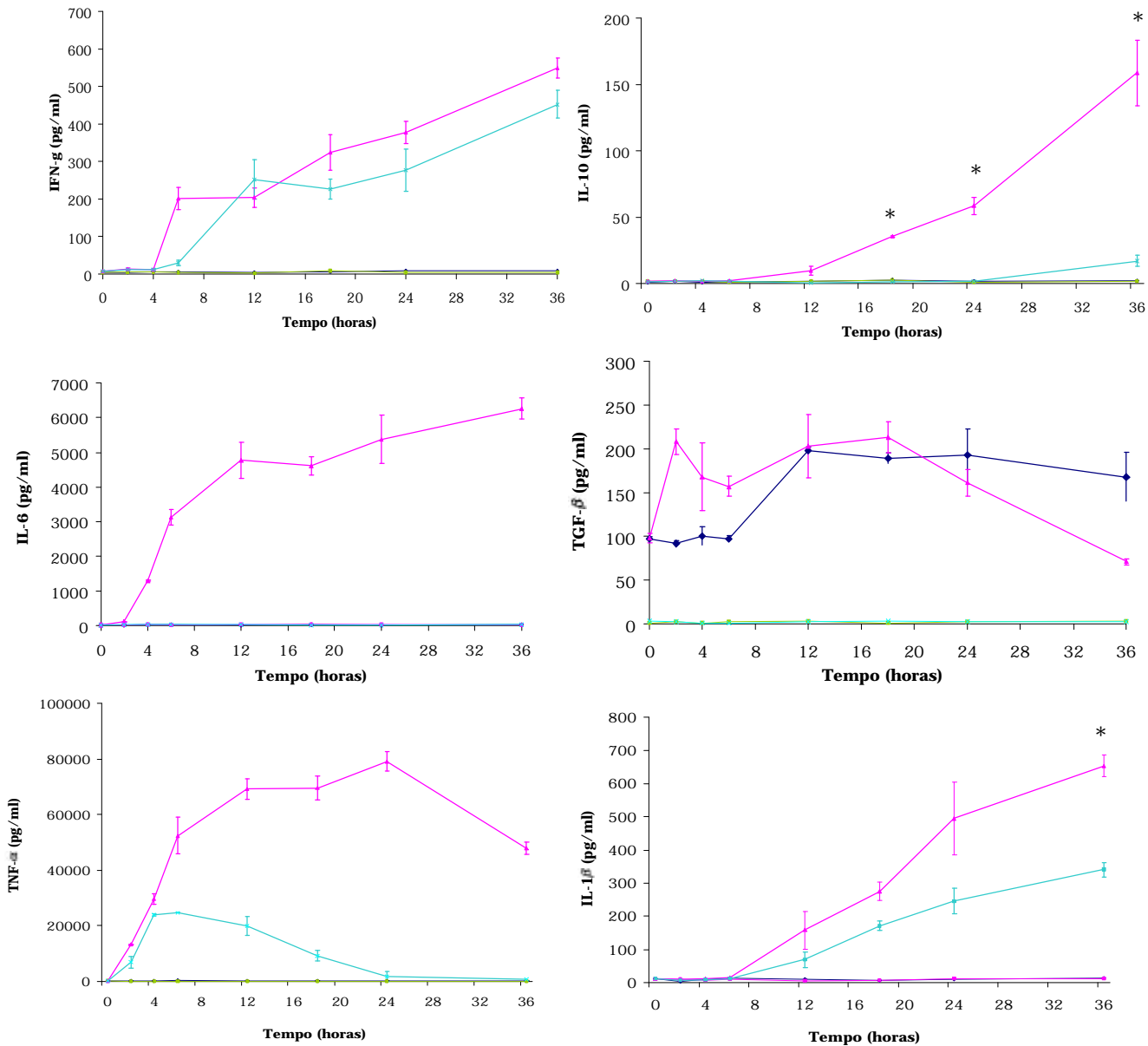


Figura 7: Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células MPACs (células aderentes peritoneais murinas). 10^6 células/ml foram estimuladas com $1\mu\text{g/ml}$ de LPS (—), $50\mu\text{g/ml}$ de jararagina (—) ou $1\mu\text{g/ml}$ de LPS + $50\mu\text{g/ml}$ de jararagina (—), durante um período de 36 horas. O controle negativo foi realizado somente com a adição de meio RPMI suplementado (—). Após 0, 2, 4, 6, 12, 18, 24 e 36 horas o sobrenadante foi colhido e reservado para dosagem de citocinas pela técnica de ELISA. Os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes. Os resultados apresentados são de 1 experimento representativo de 3 experimentos independentes, onde a cultura foi realizada em triplicata. As barras representam o desvio padrão da triplicata e * representa os pontos onde a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) comparando-se os tratamentos com LPS e jararagina + LPS (Teste de *Friedman*).

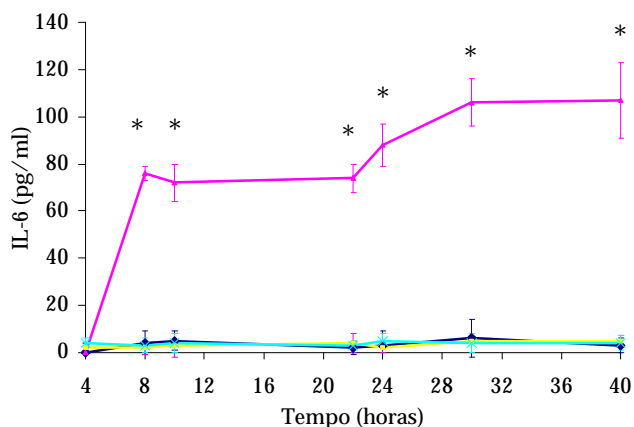
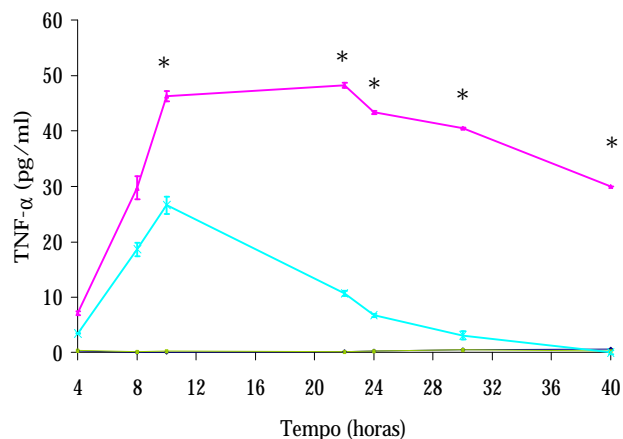


Figura 8: Quantificação de TNF- α e IL-6 no sobrenadante de cultura de células J774.A1 (macrofágos murinos). 10^6 células/ml foram estimuladas com $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS (—), $50 \mu\text{g/ml}$ de jararagina (—) ou $1 \mu\text{g/ml}$ de LPS + $50 \mu\text{g/ml}$ de jararagina (—), durante um período de 40 horas. O controle negativo foi realizado somente com a adição de meio RPMI suplementado (—). Após 4, 8, 10, 22, 24, 30 e 40 horas o sobrenadante foi colhido e reservado para dosagem de citocinas pela técnica de ELISA. Os experimentos foram repetidos pelo menos 3 vezes. Os resultados são de 1 experimento representativo de 3 experimentos independentes, onde a cultura foi realizada em triplicata. As barras representam o desvio padrão da triplicata e * representa os pontos onde a diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) comparando-se os tratamentos com LPS e jararagina + LPS (Teste de *Friedman*)

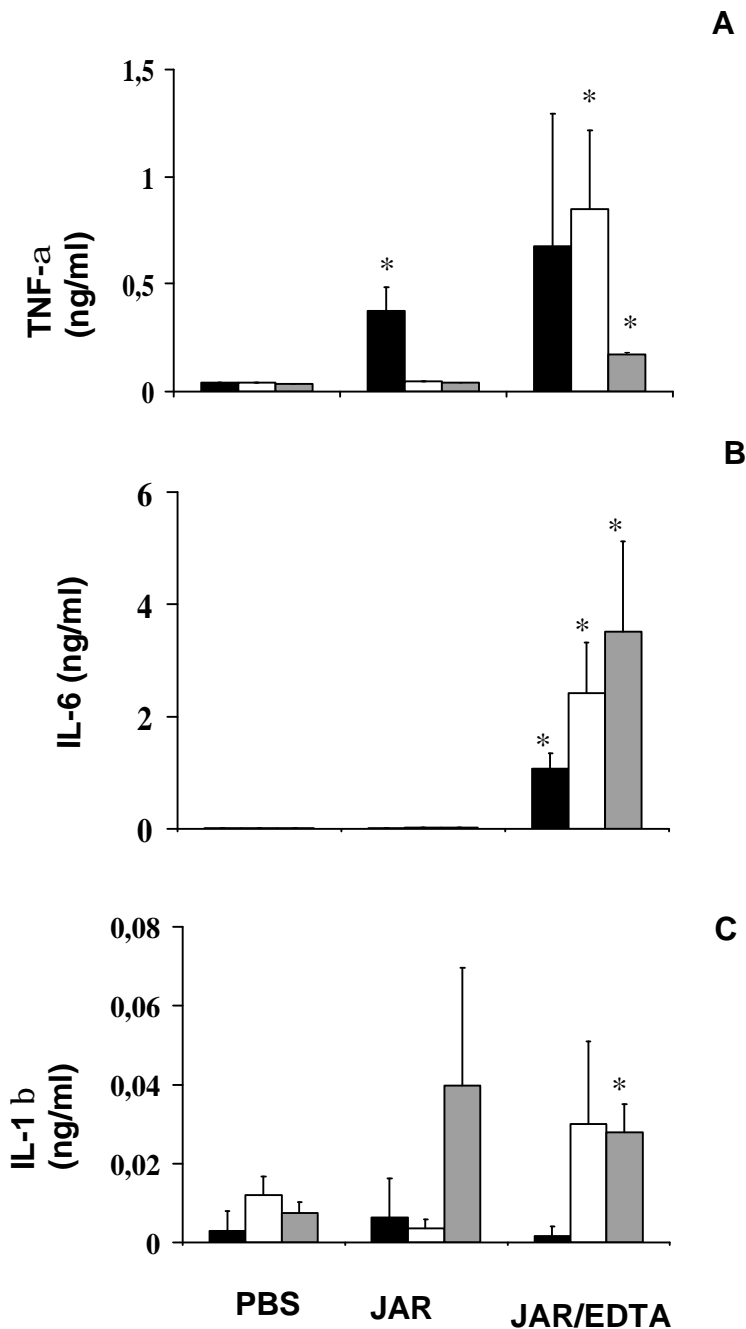


Figura 9: Produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β por MPACs. 10^6 células/ml foram estimuladas com jararagina nativa, ou tratadas por EDTA. A presença de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) foi avaliada por ELISA a partir do sobrenadante das MPACs estimuladas com 50 μ g/ml de jararagina nativa (JAR) ou jararagina inativada com 1mM de EDTA (JAR/EDTA), coletados 4 (■), 12 (□) e 24 (▨) horas após o estímulo. O experimento foi repetido pelo menos 3 vezes. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento representativo de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por um teste *t* student, p < 0,05 em relação ao PBS.

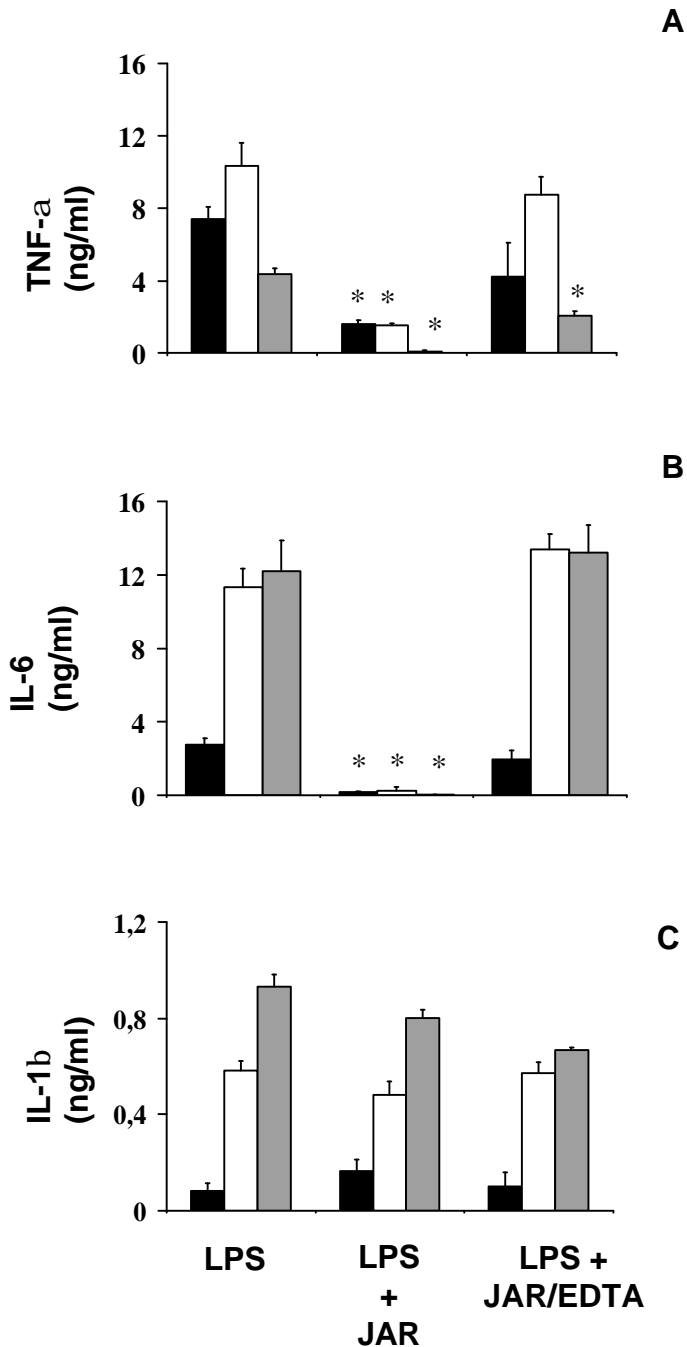


Figura 10: Produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β por MPACs. 10^6 células/ml foram estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ou LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Jararagina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ou LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + Jararagina/EDTA (50 $\mu\text{g}/\text{mL}/1\text{mM}$). A presença de TNF- α (A), IL-6 (B) e IL-1 β (C) foi avaliada por ELISA a partir do sobrenadante das MPACs estimuladas. Os sobrenadantes foram coletados 4 (■), 12 (□) e 24 (▨) horas após o estímulo. O experimento foi repetido pelo menos 3 vezes. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão de um experimento representativo. A análise estatística foi realizada por um teste *t* student, onde * representa $p < 0,05$ com relação ao LPS.

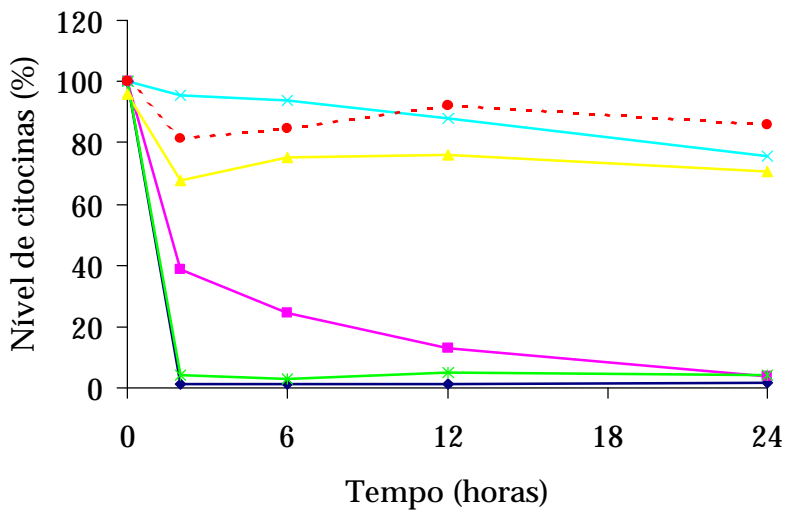


Figura 11: Efeito da jararagina sobre citocinas recombinantes solúveis *in vitro*: IL-6 recombinante (—), IL-1 β (—), TNF- α (—), IFN- γ (—), IL-10 (—) e TGF- β (- - -) foram incubadas com PBS ou jararagina (50 μ g/ml) por 2, 6, 12 e 24 horas, e avaliadas quanto à presença da respectiva citocina por ELISA. Os valores de 100% foram obtidos para cada tempo de incubação usando PBS como controle.

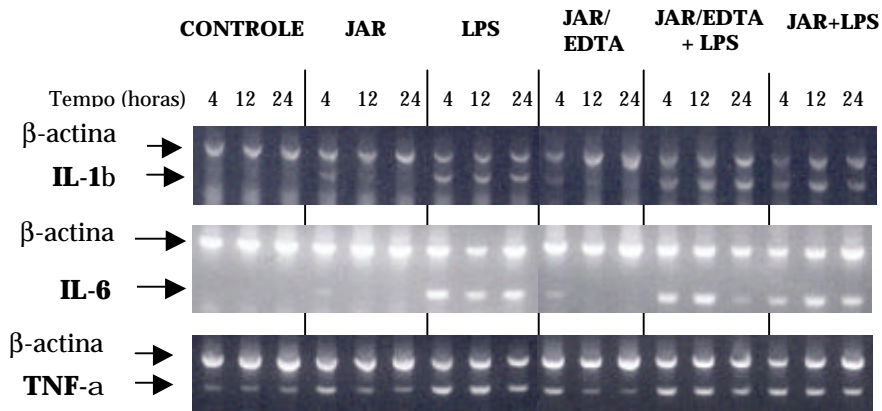


Figura 12: Produção de RNAm que codifica para TNF-a, IL-6 e IL-1b. 10^6 MPACs foram tratadas com JAR (50 μ g/ml); LPS (1 μ g/ml); JAR (50 μ g/ml) inativada por EDTA; JAR (50 μ g/ml) inativada por EDTA mais LPS (1 μ g/ml) ou JAR (50 μ g/ml) + LPS (1 μ g/ml). As células foram coletadas em Tri Reagent® com 4, 12 e 24 após os estímulos. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

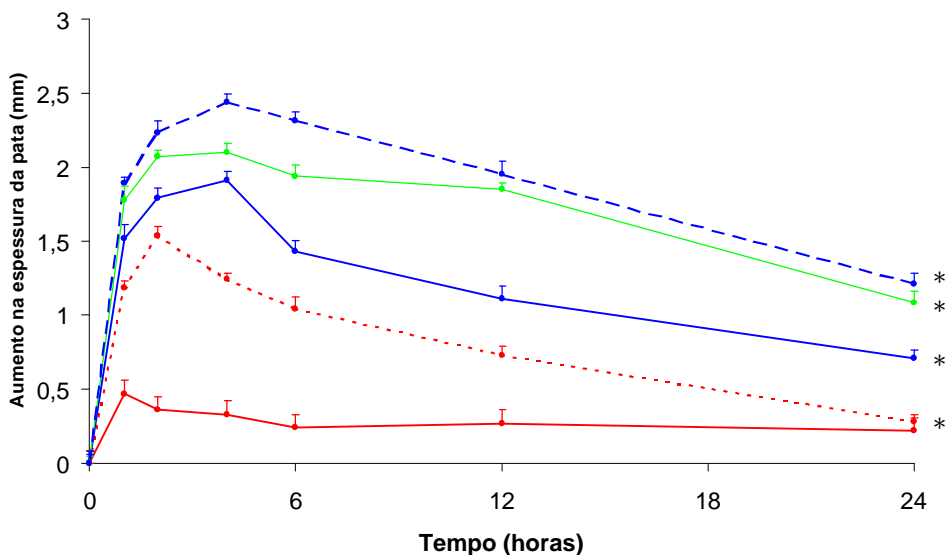


Figura 13: Atividade edematogênica da Jararagina. A jararagina foi injetada no coxim plantar de camundongos em diferentes doses, sendo: (—) 0,25 µg/pata; (---) 1 µg/pata; (—) 2 µg/pata; (—) 5 µg/pata e (---) 10µg/pata. A pata contralateral recebeu somente PBS. A atividade edematogênica representa a diferença entre a pata que recebeu jararagina e a pata controlateral. A espessura da pata foi avaliada com um paquímetro em 12 animais independentes por cada dose testada e analisada estatisticamente pelo método de comparações múltiplas de *Bonferroni*. O aumento da espessura da pata foi considerado significativo quando igual ou superior a 0,5mm. O símbolo * representa um aumento significativo ($p < 0.05$) para a curva como um todo. Os resultados são expressos como a média + o erro padrão.

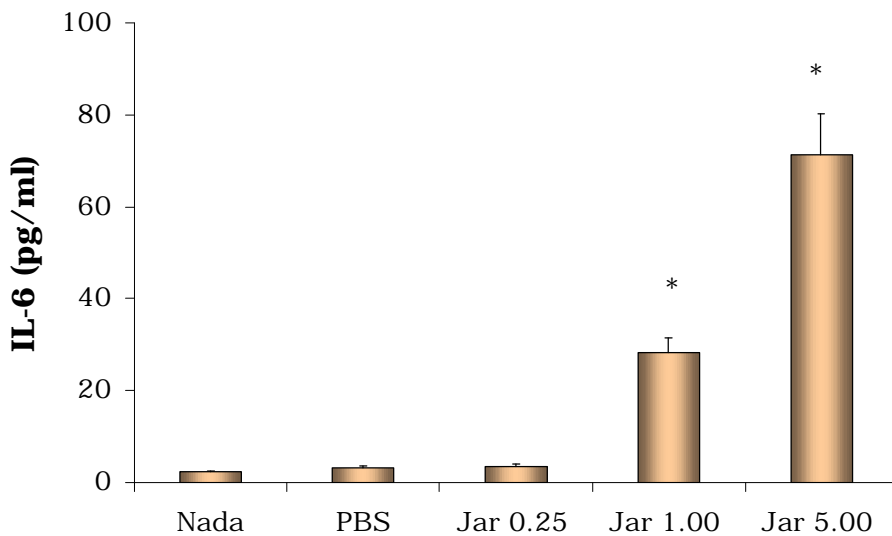


Figura 14: Produção sérica de IL-6 induzida por diferentes doses de jararagina. Diferentes doses de jararagina ou PBS foram injetados no coxim plantar de camundongos e 2 horas após uma amostra de sangue foi obtida e o soro foi separado. A dosagem de citocinas no soro feita por ELISA. Os experimentos foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por teste *t*'student, onde * representa $p < 0,05$ com relação ao PBS. Os resultados são expressos como a média da triplicata \pm o desvio padrão.

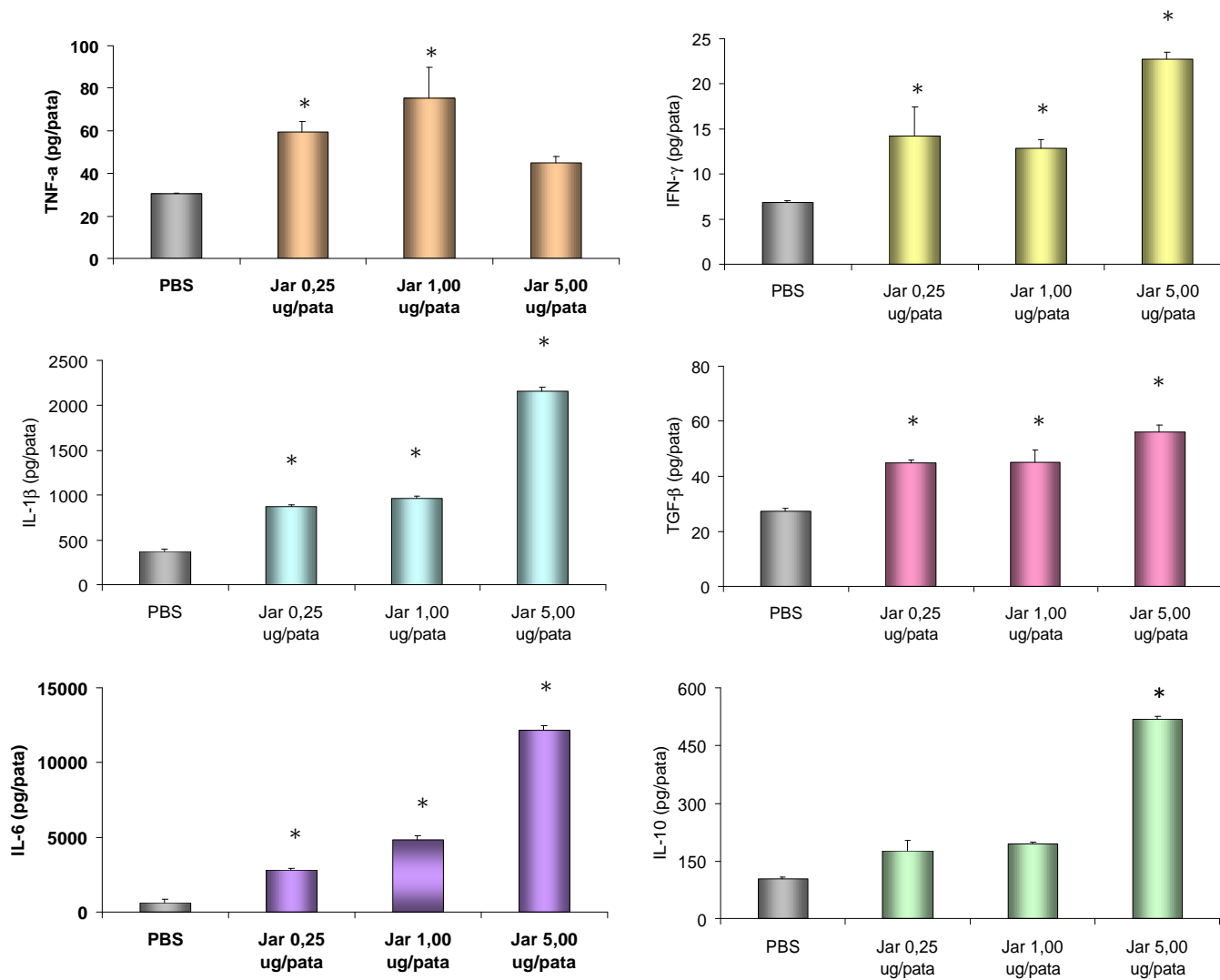


Figura 15: Produção local de citocinas induzida por diferentes doses de jararagina. Diferentes doses de jararagina ou PBS foram injetados no coxim plantar de camundongos e 2 horas após o homogenato da pata foi obtido. A dosagem de citocinas no sobrenadante do homogenato feita por ELISA. Os experimentos foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente por teste *t*'student, onde * representa $p < 0,05$ com relação ao PBS. Os resultados são expressos como a média da triplicata + o desvio padrão.

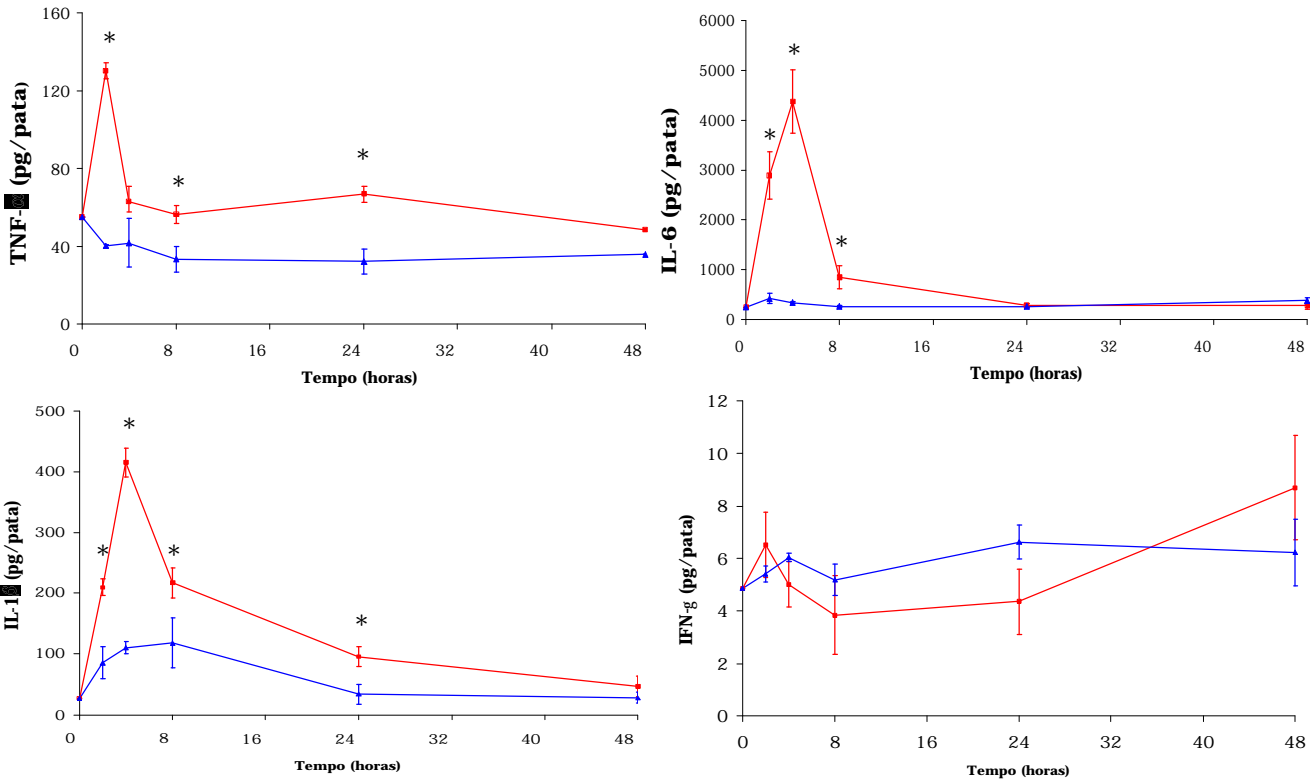


Figura 16: Cinética da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no coxim plantar de camundongos. Um volume de 30 μ L de uma solução contendo 1 μ g de jararagina (—) ou PBS (—) foi injetado na pata de camundongos. Após 2, 4, 8, 24 e 48 horas o homogenato da pata foi preparado e a concentração de citocinas dosada por ELISA no seu sobrenadante. Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicata. Os gráficos representam um experimento representativo, no qual * representa um nível de significância de $p < 0,05$ com relação ao tratamento com PBS (*Teste de Friedman*). Os resultados são expressos como a média da duplicata \pm o desvio padrão.

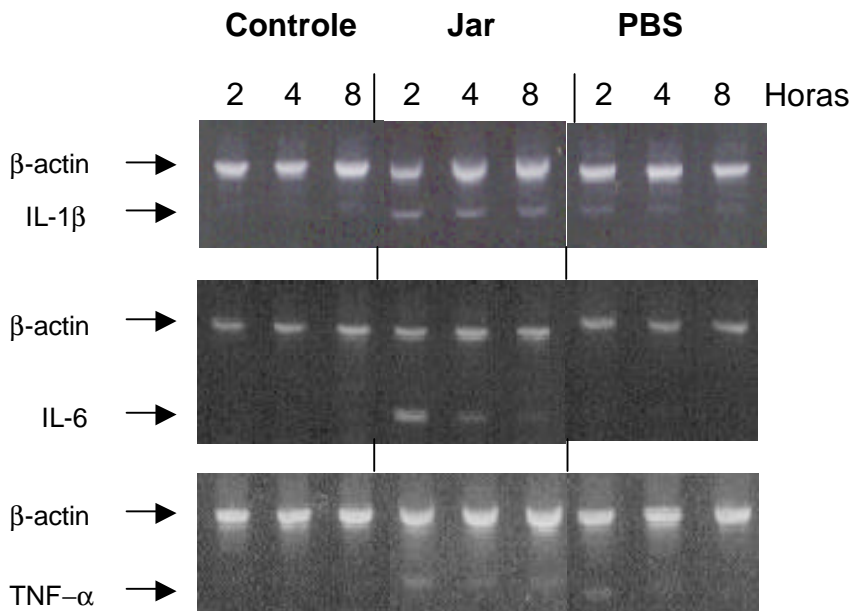


Figura 17: Análise por RT-PCR da transcrição do mRNA para citocinas no local da injeção de jararagina. Transcrição do mRNA que traduz as citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β pelas células do tecido da pata de camundongos injetados com jararagina ou PBS. O controle representa um grupo que não recebeu nenhum estímulo, enquanto JAR representa um grupo que recebeu a injeção de jararagina no coxim plantar e PBS representa um grupo injetado com PBS. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

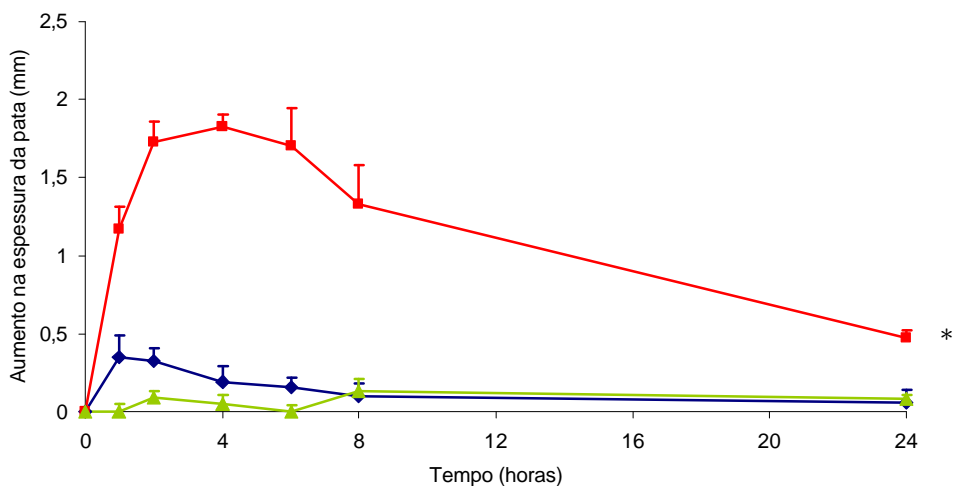


Figura 18: Atividade edematogênica da Jararagina e Jararagina-C.

A jararagina (—) ou jararagina-C (—) foram injetadas no coxim plantar experimental de camundongos na dose de 1 $\mu\text{g}/\text{pata}$. Um grupo controle recebeu PBS (—) no coxim plantar experimental. O coxim plantar contralateral não recebeu nenhum estímulo. A atividade edematogênica foi avaliada com base na diferença de espessura entre a pata que recebeu as amostras e a pata contralateral. A espessura da pata foi avaliada em 12 animais independentes para cada amostra testada e analisada estatisticamente pelo método de comparações múltiplas de *Bonferroni*. O símbolo * representa um aumento significativo da espessura da pata causada pela amostra comparada ao PBS ($p < 0.05$). Os resultados são expressos como a média + o erro padrão.

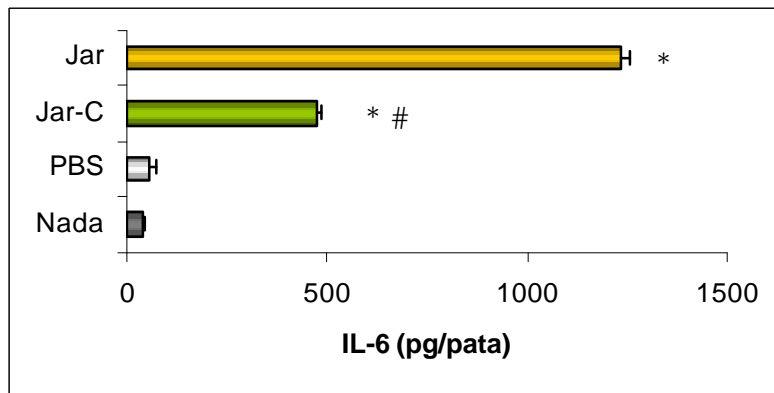
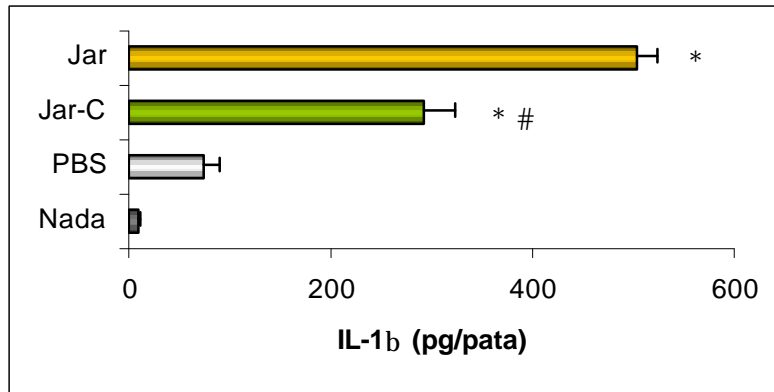
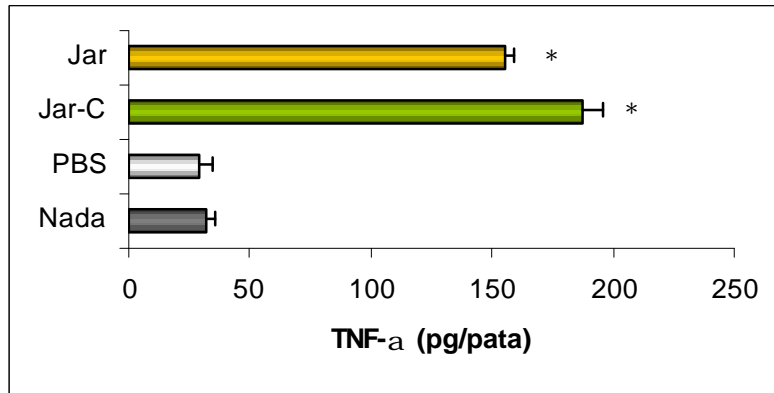


Figura 19: Papel dos domínios da jararagina na produção local de citocinas. Produção local de TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzida por jararagina (Jar), jararagina-C (Jar-C) e PBS injetados na pata experimental de camundongos. Nada representa um grupo que não recebeu qualquer amostra na pata (nível basal). A produção de TNF- α foi observada 2 horas após a injeção das amostras, enquanto a produção de IL-6 e IL-1 β foi observada 4 horas após. Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicata. Os gráficos representam um experimento representativo, no qual * representa um nível de significância de $p < 0,05$ com relação ao tratamento com PBS e o # com relação ao tratamento com jararagina. Os resultados são expressos como a média da duplicata + o desvio padrão.

V. DISCUSSÃO

“A Inflamação é uma resposta fisiológica a agentes agressivos de origem mecânica, química ou biológica (infecções). Sempre começando com uma reação local, ela pode ser seguida por um fenômeno sistêmico, com o objetivo de controlar e eliminar o agente agressor” (Fridman e Tartour, 1997).

Quando o agente agressor responsável pela reação inflamatória é um complexo de enzimas e proteínas tóxicas, como no caso do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, o quadro inflamatório nem sempre resulta em um processo de regeneração, observando-se freqüentemente uma cronificação da resposta.

Sendo o veneno botrópico uma mistura complexa de enzimas (metaloproteinases, serino-proteinases e fosfolipases), disintegrinas, lectinas e peptídeos que agem sobre o sistema das cininas, e como cada um destes componentes possui diferentes alvos no sistema fisiológico, o estudo destas toxinas isoladas faz-se necessário para compreendermos melhor o seu papel no desenvolvimento da reação local. As metaloproteinases têm se mostrado importantes na ação local deste veneno (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Hati e col. 1999). Assim sendo, a jararagina, toxina hemorrágica classificada como uma metalopro-teinase tipo PIII, presente no veneno de *B. jararaca*, foi utilizada como modelo em nossos estudos sobre a inflamação local causada pelo veneno de *B. jararaca*.

O nosso trabalho consistiu basicamente em verificar a resposta inflamatória, mais especificamente a liberação e produção de citocinas, desencadeada pela jararagina e o mecanismo pelo qual esta liberação é induzida. Foram utilizados dois modelos de estudo, um modelo *in vitro*, onde foi analisada a liberação/produção destes mediadores por células

em cultura e um modelo *in vivo*, enfocando a produção local de citocinas após a injeção da jararagina, em animais de experimentação. Uma vez verificado o envolvimento das citocinas na resposta inflamatória causada pela jararagina, nós procuramos determinar o domínio desta toxina hemorrágica responsável pela liberação das citocinas.

No modelo de estudo *in vitro* foram utilizadas células peritoneais murinas e também células de uma linhagem macrófágica murina, denominada J774.A1. As células predominantes na cavidade peritoneal de camundongos previamente injetados com uma solução de tioglicolato são células mononucleares (Kaw e Beck, 1982). Em nossos experimentos foram utilizadas somente as células aderentes, sendo os macrófagos as principais células que apresentam a capacidade de aderência em substrato sólido. Estas células foram escolhidas para nossos experimentos *in vitro* uma vez que elas são a principal fonte das citocinas pró-inflamatórias consideradas em nosso estudo (TNF- α , IL-1 β e IL-6), todavia, estas citocinas também podem ser produzidas por outras fontes celulares, como queratinócitos, células endoteliais, linfócitos, entre outras (Vassali, 1992; Dinarello, 1998; Zhang e Tracey, 1998). Já o IFN- γ , é uma citocina produzida principalmente por células T e células Natural Killer (Maeyer e Maeyer-Guignard, 1998), entretanto a sua produção também pode ser detectada por macrófagos murinos após a estimulação combinada com IL-12 e IL-18 (Munder e col. 1998).

Em nossos experimentos iniciais com cultura de células estimuladas por LPS (Figuras 6 e 7) foram detectadas a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ . Como a principal fonte celular do IFN- γ são os linfócitos, este resultado nos sugeriu que estas células também estivessem presentes na cultura de células peritoneais de camundongos. Barker e col. (1981) verificaram que na ausência de soro de

camundongo ou de cavalo no meio de cultura, cerca de 10-12% de linfócitos T do fígado e 22% de células do timo, ambas de origem murina, aderem a um substrato sólido. Desta maneira, como nosso protocolo não utiliza soro durante o período de aderência, foi sugerido que estas células estivessem presentes e fossem as responsáveis pela produção do IFN- γ após estímulo com LPS. Assim, o nome de *Murine Peritoneal Adherent Cells* (MPAC), foi utilizado como sendo referente a macrófagos e linfócitos presentes na cultura. Na tentativa de identificarmos se os macrófagos seriam as possíveis células produtoras de citocinas, nós utilizamos também as células de linhagem macrofágica de origem murina, J774.A1.

O tratamento das MPACs com a jararagina não apresentou nenhuma citotoxicidade sobre estas células, desde a dose de 10 até 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 5). A ausência de citotoxicidade direta das metaloproteinases sobre células em cultura, também foi observada por outros autores. Rucavado e col. (1995), estudando o efeito de uma metaloproteinase fracamente hemorrágica de 24kDa do veneno de *B. asper*, a BaP1, sobre células endoteliais, e Lomonte e col. (1994), estudando a BaH1, uma toxina hemorrágica de 64 kDa presente no mesmo veneno, também observaram ausência de citotoxicidade destas toxinas sobre células endoteliais em cultura. Em nossos experimentos, a dose de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS mostrou-se tóxica para as MPACs em cultura, e a jararagina, quando administrada conjuntamente com o LPS, na dose acima de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, apresentou um efeito relativamente protetor sobre esta toxicidade induzida pelo LPS. Provavelmente, esta atividade esteja relacionada com a diminuição da produção de TNF- α pelas mesmas células, induzida pela jararagina, uma vez que o TNF- α pode apresentar efeitos tóxicos sobre células de cultura, assim como em células tumorais (Warren, 1990).

Analisando-se a ação da jararagina sobre a produção de citocinas, tanto das MPACs quanto da J774.A1 (Figuras 6, 7 e 8), inicialmente ficou bastante evidente um efeito de regulação negativa das citocinas induzidas pelo LPS. Este efeito foi bastante drástico para as citocinas IL-6 e tempo-dependente para o TNF- α , resultando em uma diminuição total dos níveis desta citocina detectados após 24 horas. As MPACs tratadas com os mesmos agentes (jararagina + LPS) resultaram em um efeito parcial de diminuição para a IL-1 β , e não foi observado nenhuma diminuição sobre o IFN- γ .

No sentido de verificarmos o possível papel da jararagina na aparente regulação negativa do TNF- α e IL-6 induzidos pelo LPS, foram analisados os níveis das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β em cultura de MPACs, uma vez que a IL-10 é conhecida como um fator desativador de macrófagos (Bogdan e col., 1991) e o TGF- β , por sua vez, induz uma supressão funcional destas células (Derynk e Choy, 1998). Entretanto não foi observado um aumento significativo na produção destas citocinas regulatórias após o tratamento com a jararagina, sugerindo que estas citocinas não possuem um papel relevante na inibição ou diminuição observada e outro mecanismo poderia estar envolvido neste efeito. Por outro lado, foi observado que a jararagina apresentou o mesmo efeito de diminuição das citocinas (IL-10 e TGF- β) induzidas por LPS.

Com o objetivo de verificarmos se esta regulação negativa estava ocorrendo no nível de transcrição gênica, a tradução de mRNA que codifica para as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi analisada através de experimentos de RT-PCR (Figura 12). Estes experimentos detectam a presença de mRNA através da transcrição de mRNA para cDNA induzida pela enzima transcriptase reversa. Estes experimentos foram realizados inicialmente com as MPACs em cultura, tratadas com jararagina, LPS

ou jararagina + LPS. A jararagina induziu a expressão de mRNA que codifica a IL-6, IL-1 β e TNF- α durante as 4 primeiras horas de tratamento em cultura, sugerindo uma estimulação das MPACs pela jararagina durante este período. Note-se que, entretanto, esta estimulação não se manteve ao longo das 24 horas analisadas. De maneira interessante, não foi observada qualquer inibição na produção do mRNA para estas citocinas após o tratamento com a jararagina + LPS, descartando a hipótese de que a jararagina estivesse causando uma regulação negativa na transcrição dos genes destas citocinas induzidas pelo LPS.

Uma vez que a jararagina apresenta atividade proteolítica e as citocinas são compostos de origem protéica, foi verificada a possibilidade da jararagina estar agindo proteoliticamente sobre as citocinas estimuladas pelo LPS, ou pela própria jararagina (Figura 9 e 10). Para verificarmos tal hipótese, as MPACs foram estimuladas com jararagina inibida pelo EDTA, ou a jararagina/EDTA + LPS. Após o tratamento das MPACs com a jararagina inibida, foi observada a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β , em níveis significativos, porém mais baixos quando comparados à produção induzida pelo LPS. Já a jararagina/EDTA + LPS induziu a produção destas citocinas em níveis semelhantes aos induzidos somente pelo LPS, sugerindo assim que a atividade proteolítica da jararagina possui um papel relevante na diminuição dos níveis de citocinas induzidas pelo LPS observada inicialmente.

O EDTA se mostrou eficiente em inativar a atividade proteolítica da jararagina com a vantagem de não alterar significativamente a viabilidade das MPACs em cultura. Este composto age como quelante de metal, causando a remoção do íon zinco do domínio enzimático, algumas vezes seguido por uma perturbação estrutural da conformação

da proteína, seguido por uma inibição irreversível (Bjarnason e Tu, 1978; Bjarnason e Fox, 1983).

Foram realizados experimentos para verificar a atividade proteolítica da jararagina diretamente sobre as citocinas, nos quais as citocinas recombinantes foram incubadas com a jararagina, nas mesmas condições dos experimentos em cultura (Figura 11). A jararagina apresentou uma atividade proteolítica sobre o TNF- α e a IL-6, alterando o seu reconhecimento no ensaio imunoenzimático, de modo que este não ocorreu da mesma forma que a citocina recombinante não tratada. Por outro lado, a jararagina não degradou o IFN- γ e a IL-1 β . Estes resultados corroboram os observados anteriormente, onde não foi verificada uma significativa diminuição dependente da jararagina nos níveis de IFN- γ e IL-1 β induzidos pelo LPS. A clivagem de citocinas, tais como o TNF- α , a IL-1 β e o TGF- β , entre outras, por metaloproteinases endógenas é bem descrita em literatura (Gearing e col., 1994; Schonbeck e col. 1998). Estes resultados apóiam os nossos resultados referentes à ação proteolítica da jararagina sobre as citocinas.

Estudos recentes sobre a análise funcional da estrutura da enzima conversora do TNF- α , a TACE, sugerem que o ancoramento desta enzima, através do seu domínio transmembranar, na membrana da mesma célula que expressa o pró-TNF- α , seja essencial para o processamento desta citocina (Reddy e col. 2000). No mesmo trabalho, os autores verificaram ainda que a expressão de TACE secretada não induz um processamento do TNF- α da membrana celular. No entanto, quando analisados de maneira conjunta, os nossos resultados confrontam esta hipótese, pois a jararagina (apesar de apresentar uma estrutura semelhante à TACE secretada), além de ter apresentado a propriedade de estimular as MPACs quanto à produção de mRNA que

codifica para o TNF- α , IL-1 β e IL-6, também liberou as citocinas das células quando a sua atividade proteolítica foi inibida.

O processamento do TNF- α da membrana celular é um evento fundamental na indução da resposta inflamatória, uma vez que esta citocina, quando liberada da superfície celular, possui a característica de regular positivamente a sua própria síntese, induzindo ainda a síntese e liberação de IL-1 β e IL-6 (Jirik e col. 1989). Entretanto este mecanismo de retroalimentação positiva induzida pelo TNF- α , aparentemente não está envolvido em nosso modelo experimental, uma vez que ele dependeria da atividade catalítica conservada da jararagina e também porque a proteólise induzida pela jararagina estaria agindo sobre o TNF- α liberado, justificando assim a ausência de resposta observada quando as células foram estimuladas com a jararagina nativa. Desta forma, devido ao efeito proteolítico da jararagina sobre algumas citocinas, o nosso modelo experimental *in vitro* dificultou uma exploração mais profunda dos mecanismos envolvidos nesta resposta.

Estudos anteriores, realizados por nosso grupo em modelo experimental *in vivo*, enfocando a resposta inflamatória local, demonstraram que esta toxina possui a capacidade de induzir um infiltrado leucocitário em modelo de bolsas de ar induzidas no dorso de camundongos, provavelmente dependente de macrófagos e seus mediadores (Costa e col. 2002). Os nossos resultados observados nos experimentos *in vivo* reforçam a hipótese de que a jararagina possui a capacidade de ativar as células residentes no tecido do coxim plantar de camundongos, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que poderiam estar atuando no início (ou no decorrer) da resposta inflamatória observada após a injeção desta toxina em modelo murino. Outros eventos pró-inflamatórios marcantes, observados em nossos

experimentos *in vivo*, foram um significativo edema dose-dependente, acompanhado de hemorragia.

Foram observados poucos efeitos sistêmicos induzidos pela injeção de jararagina no coxim plantar de camundongos até a dose máxima utilizada (5 µg/animal). Foram avaliadas as presenças das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ na circulação após 2 horas, porém somente foi detectada a presença de níveis significantes de IL-6, 2 horas após a injeção de 1 e 5 µg de jararagina por animal (Figura 14). Alguns trabalhos relatam a presença de citocinas na circulação após a injeção do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. Petricevich e col. (2000), estudando os venenos de *B. jararaca* e *B. asper* injetados experimentalmente em camundongos com as doses de 40 e 74 µg/animal (1 DL₅₀) respectivamente, via intraperitoneal, verificaram a liberação na circulação de TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 e IFN-γ nas primeiras 18 horas após a injeção. Barros e col. (1998), também observaram a liberação sistêmica de IL-6, TNF-α, IL-10 e IFN-γ após a administração i.p. de 50 µg/animal do veneno de *B. atrox*. Lomonte e col. (1993), estudando a resposta inflamatória do veneno de *B. asper* (50 µg) injetado no coxim plantar de camundongos também verificaram um rápido aumento nas concentrações séricas de IL-6, mas não detectaram qualquer aumento de TNF-α e IL-1α no soro. A alta dose de venenos utilizada por estes autores e também a via de administração, provavelmente favoreceram a detecção de significativos níveis das citocinas encontradas na circulação sangüínea. Em nossos experimentos, a presença da IL-6 no soro 2 horas após a injeção da jararagina, pode estar refletindo a alta liberação no local da administração da jararagina, uma vez que esta foi a única citocina detectada em níveis de liberação da ordem de ng.

Ainda com relação à produção local de citocinas, o aumento na liberação destas, observado 2 horas após a injeção de diferentes doses (0,25 a 5,0 μ g/animal) de jararagina no coxim plantar de camundongos, demonstra que esta metaloproteinase induz a produção local de IL-6, IL-1 β e IFN- γ de maneira dose dependente, enquanto o TNF- α parece sofrer uma regulação negativa apenas com altas doses de jararagina (Figura 15). Esta regulação pode ser causada pelo aumento da IL-6, uma vez que com a dose de 5 μ g/animal ocorreu uma liberação de níveis bastante elevados de IL-6, e dados da literatura revelam que esta citocina age regulando negativamente a liberação de TNF- α (Schindler e col, 1990). Embora nossos experimentos *in vivo*, aparentemente, não demonstrem uma diminuição no nível de citocinas decorrente de proteólise (como observado nos experimentos *in vivo*), não foram utilizadas doses maiores da jararagina nos experimentos subseqüentes, tendo sido escolhida a dose de 1 μ g/animal como uma dose capaz de causar uma significativa reação inflamatória caracterizada por edema, hemorragia e liberação local de citocinas.

O perfil de produção de TNF- α na pata de camundongos injetados com jararagina (1 μ g/animal) ao longo de 48 horas, demonstrou que ocorre uma significativa liberação local desta citocina desde o início do tratamento (2hs) (Figura 16). Estes níveis caem rapidamente e já com 4 horas é observada a volta a níveis basais de liberação do TNF- α . Esta queda pode ser explicada pela ausência de um mecanismo de retroalimentação positivo causado pelo TNF- α para induzir a liberação de mais TNF- α . Como pode ser observado na análise por RT-PCR do mRNA que traduz o TNF- α , aparentemente não foram detectadas diferenças na transcrição deste gene, comparando-se o grupo tratado com PBS e o grupo tratado com jararagina (Figura 17). Estes resultados

sugerem que apesar do aumento de TNF- α observado no local não houve um aumento correspondente na transcrição do mRNA. Podemos aventar que a elevada produção de IL-6 observada à partir de 2 horas após a injeção de jararagina poderia estar causando uma inibição na transcrição do TNF- α devido ao seu efeito de regulação negativa sobre esta citocina (Schindler e col. 1990). Analisando-se o papel dos domínios da jararagina na liberação de TNF- α , observamos que tanto a jararagina nativa quanto a jararagina-C induziram uma liberação de níveis comparáveis de TNF- α sugerindo que o domínio disintegrina tenha um papel importante na liberação local do TNF. Com base nos resultados do TNF- α liberado no local, podemos concluir que a jararagina induz uma significativa liberação de TNF- α logo no início do tratamento e que esta não se sustenta por longos períodos de tempo, provavelmente devido a uma inibição de mecanismos de transcrição deste gene, e o domínio disintegrina possui um papel tão importante quanto o domínio metaloproteinase.

Com relação à cinética de liberação local de IL-1 β e IL-6, os nossos resultados demonstram que ambas as citocinas são produzidas localmente, após a produção inicial de TNF- α , atingindo um pico máximo 4 horas após o estímulo, caindo com 8 horas e voltando aos níveis basais dentro de 24 horas (Figura 16). Quando analisamos os níveis de transcrição de mRNA que traduz a IL-6 e a IL-1 β , os nossos experimentos demonstram que houve uma ativação na transcrição destas citocinas após a injeção da jararagina (Figura 17). Esta ativação corrobora os resultados obtidos anteriormente no estudo *in vitro*, onde o tratamento de MPACs com a jararagina também induziu uma transcrição dos genes para estas citocinas, durante o tempo inicial de 4 horas. Analisando o papel dos domínios da jararagina na liberação de IL-1 β e IL-6, podemos observar que a jararagina nativa mostra-se mais

eficiente em induzir a liberação de ambas as citocinas quando comparada à jararagina-C, sugerindo um papel importante do domínio metaloproteinase neste efeito. Nota-se, porém que o domínio disintegrina também se mostra capaz de induzir a liberação de IL-1 β e IL-6.

No que se refere à atividade edematogênica observada no envenenamento causado experimentalmente pela jararagina, podemos observar um efeito dose e tempo-dependente, onde, a partir de 1 hora foi observado um aumento progressivo até as 4 horas, com uma queda parcial em 4 horas até 24 horas (Figura 13). A cinética do edema induzido pela jararagina compara-se com a cinética induzida pelo veneno total de *B. jararaca*, onde se observa uma atividade edematogênica atingindo um pico máximo com 1 hora após a injeção do veneno de *B. jararaca*, uma redução parcial com 6 horas e o desaparecimento por completo com 24 horas (Trebien e Calixto, 1989). No quadro do envenenamento humano, o edema apresenta-se como um dos efeitos mais marcantes, estando presente na maioria dos pacientes (Jorge e Ribeiro, 2000) e apresentando um caráter de longa duração. O mecanismo envolvido nesta atividade ainda não está totalmente elucidado, apresentando um quadro extremamente complexo. A ação do veneno botrópico sobre os mastócitos induzindo uma liberação local de histamina e serotonina, em conjunto com a liberação das prostaglandinas (Trebien e Calixto, 1989; Faria e cols. 2001), provavelmente agem no desencadeamento do edema. O edema induzido por estes mediadores é causado por um mecanismo de formação de *gaps* endoteliais nas vênulas, o qual é usualmente reversível e de meia vida curta (Collins, 1999). No entanto uma vez que o edema observado no envenenamento botrópico se apresenta de longa duração, outros mecanismos podem estar envolvidos. As citocinas

liberadas localmente durante o envenenamento podem induzir uma reorganização do citoesqueleto da célula endotelial, resultando em retração endotelial e abertura dos gaps. Este mecanismo foi descrito inicialmente por Brett e col. (1989), sobre um sistema de cultura de células endoteliais. De acordo com Collins, 1999 este mecanismo de extravasamento de plasma, denominado de “reorganização do citoesqueleto”, apresenta um caráter de meia vida longa.

Com relação aos domínios da jararagina envolvidos no edema, os nossos resultados revelam a importância do domínio metaloproteinase nesta atividade, uma vez que a jararagina-C não apresentou qualquer atividade edematogênica (Figura 19). Por outro lado, Petretski e col. (2000) sugerem a existência de um mecanismo não enzimático relacionado com o aumento na permeabilidade vascular, uma vez que um domínio disintegrina isolado do veneno de *Bothrops atrox* induziu uma atividade edematogênica em camundongos. Podemos observar que o quadro edematogênico desencadeado pelo envenenamento humano ainda não está totalmente elucidado, e parece apresentar um mecanismo extremamente complexo.

Com relação especificamente à magnitude de liberação das citocinas induzidas pela jararagina, podemos observar que a IL-6 foi liberada em quantidades extremamente elevadas no local da injeção, atingindo níveis de aproximadamente 4.000 pg/pata, comparadas à 400 pg/pata liberadas pela IL-1 β e 150 pg/pata liberadas pelo TNF- α . Esta alta liberação local de IL-6 nos leva a aventar o papel biológico desta citocina no quadro inflamatório.

A IL-6 faz parte de um grupo de citocinas conhecidas como citocinas neuropoiéticas, que compreendem, por exemplo, a IL-11 e a LIF (Fator Inibidor de Leucemia), com ações semelhantes por

compartilharem receptores com a mesma estrutura, como a proteína transmembranar transdutora de sinais gp130 (Gadient e Patterson, 1999). As citocinas neuropoiéticas podem ativar a expressão das reações de fase aguda, induzindo o fígado a secretar rapidamente na circulação as proteínas da fase aguda (APP), que controlam a homeostasia do organismo e regulam as reações inflamatórias. A IL-6 é a principal indutora de APP *in vivo* (Kaibara e col. 1998) e também está associada com algumas graves doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, pancreatite aguda e doença de Alzheimer. A IL-6 pode atuar nestas doenças como uma citocina pró-inflamatória, onde o aumento de sua expressão resulta em uma grave reação inflamatória associada com infiltrado de células mononucleares. Entretanto, a IL-6 pode agir regulando negativamente a reação infamatória causada por vários estímulos, suprimindo as citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 (Schindler e col. 1990).

Na inflamação induzida pela jararagina, a IL-6 não parece estar relacionada com o edema observado. Embora alguns autores sugerem que exista uma relação entre o edema de pata e o aumento de IL-6 no soro de ratos que desenvolvem um modelo experimental de artrite (Leisten e col. 1990), este mecanismo não parece estar ocorrendo no edema induzido pela jararagina, haja visto que a jararagina-C também libera altos níveis de IL-6 e os animais não desenvolvem edema de pata.

Analisados em conjunto os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* e *in vitro*, revelam o envolvimento da jararagina na ativação celular, levando a uma transcrição gênica de IL-1 β e IL-6, e causando uma liberação do TNF- α . Os mecanismos envolvidos na liberação das citocinas e ativação da transcrição ainda não estão claros. Porém alguns dados disponíveis na literatura possibilitam aventar algumas hipóteses

para explicar tal mecanismo. Por exemplo, a liberação do TNF- α induzida pela jararagina pode estar relacionada com o processamento do pró-TNF- α presente na membrana da célula, o qual poderia estar ocorrendo não pela ação direta da jararagina, mas pela ação desta na ativação da TACE, uma metaloproteinase endógena, através de um mecanismo ainda não conhecido. Sabe-se que as metaloproteinases endógenas como, por exemplo, as metaloproteinases de matriz (MMP), assim como as metaloproteinases de veneno, apresentam um pró-domínio, o qual mantém estas enzimas em uma forma latente por impedir a interação do zinco com o substrato (Van Wart e Birkedal-Hansen, 1990). O rompimento da interação entre o pró-domínio e o sítio ativo da enzima por um mecanismo tipo *cysteine switch* é necessário para ativar as MMPs e reprotolisinas. Dados da literatura sobre a ativação da TACE sugerem que sua ativação pode ser efetuada por ação da proteína processadora denominada furina, expressa na membrana celular, uma vez que a TACE apresenta um sítio de clivagem pela furina (Schlondorff e col. 2000). Entretanto este mecanismo de ativação da TACE ainda não foi completamente caracterizado na literatura, e um outro mecanismo semelhante ao que ocorre com a ativação da MMP-7 (Matrilisina) também poderia estar ocorrendo com a TACE. Este mecanismo foi descrito por Fu e col. (2001), os quais observaram que o ácido hipocloroso (HOCl) oxigena os resíduos thiol da região de *cysteine switch* desta enzima. Este ácido, um potente agente oxidante citotóxico, é produzido pela ação da mieloperoxidase, uma heme proteína secretada por células fagocíticas (Rajagopalan e col. 1996; Heinecke, 1998), sobre o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Provavelmente, um mecanismo envolvendo a ativação da TACE via mecanismo proposto por Fu e col. (2001) estaria mais relacionado com o mecanismo de processamento do TNF- α da membrana celular observado em nossos experimentos, dado

que um aumento na produção de H₂O₂ em leucócitos peritoneais de camundongos estimulados com o veneno total de *B. jararaca* foi observado por Zamuner e col. (2001), e a produção de mieloperoxidase está relacionada com o acúmulo de neutrófilos nos tecidos (Kuebler e col. 1996). O acúmulo do neutrófilos no tecido após a injeção de jararagina foi descrito por Costa e col. (2002).

Uma outra hipótese aventada para se explicar este aumento de citocinas *in vivo*, refere-se à capacidade das integrinas serem estimuladas pelos próprios componentes da matriz, que sob a ação proteolítica da jararagina seriam expostos e degradados. As metaloproteinases presentes em veneno possuem a propriedade de hidrolisar o colágeno, a laminina e a fibronectina (Rucavado e col. 1995; Rucavado e col. 1999). Sabe-se que proteínas da matriz extracelular, em particular a fibronectina, quando em contato com macrófagos, via integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$, regulam a expressão do gene da IL-6 (KremLev e col. 1998). Assim, as proteínas da matriz extracelular, após sofrerem a ação proteolítica da jararagina, poderiam expor sítios de ligação às integrinas, antes não expostos devido à integridade do tecido, e estimular as células mononucleares fagocíticas via integrinas, a secretarem citocinas pró-inflamatórias. Embora esta hipótese não explique a ativação observada em nosso modelo *in vitro*, onde a jararagina foi adicionada diretamente sobre as MPACs, não havendo a interferência de nenhum componente de matriz extracelular neste ambiente, ela parece plausível no que se refere à ação local da jararagina sobre a liberação de citocinas. Entretanto, nós não poderíamos explicar o mecanismo de ação da jararagina-C, aplicando-se somente à jararagina nativa.

Um outro mecanismo, que se aplicaria tanto à ativação causada pela jararagina nativa como a jararagina-C, envolve a ligação destas

diretamente à membrana celular via receptores ainda desconhecidos, desencadeando uma ativação celular. Sabe-se que o domínio disintegrina da jararagina possui a propriedade de se ligar a um complexo da membrana formado pelas integrinas $\alpha_2\beta_1$ presente em plaquetas (Kamiguti e col. 1996 e Moura-da-Silva e col. 2001), não sendo encontrada nenhuma afinidade da jararagina por outras integrinas de membrana, como a $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_M\beta_2$ presentes em linhagens celulares ricas em integrinas ou em células transfectadas (Moura-da-Silva e col. 2001). Dados da literatura revelam que a integrina $\alpha_2\beta_1$ é pouco expressa em macrófagos e células dendríticas derivados de linhagem monocítica (Ammon e col. 2000), principais células presentes no tecido responsáveis pela produção das citocinas pró-inflamatórias. Porém estes dados não descartam a possibilidade da jararagina estar se ligando via outros receptores, ainda não identificados, presentes em outras células encontradas no tecido. Um bom exemplo disto é a jarastatina, uma disintegrina de 6kDa que se liga a receptores de neutrófilos e promove ativação celular desencadeando mecanismos de sinalização (Coelho e col. 1999).

Existem ainda em macrófagos alguns receptores conhecidos como receptores *scavenger* que são glicoproteínas de membrana, amplamente expressas por macrófagos, as quais possuem a propriedade de se ligar a uma ampla variedade de moléculas oxidadas e acetiladas, ou ainda à moléculas estranhas e endógenas, como por exemplo LDL, HDL, BSA, células apoptóticas, bactérias gram-negativas e gram-positivas, colágeno e trombospondina, (Peiser e Gordon, 2001) ou ainda à crotoxina (toxina presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus*) irradiada por ^{60}Co (Cardi et al, 1998). A ativação destes receptores resulta em regulação positiva das citocinas pró-inflamatórias e a ativação de um *burst* respiratório em monócitos humanos (Janciauskiene e col. 2001).

Entretanto, alguns dados da literatura sugerem um papel destes receptores na modulação negativa de certos mediadores da inflamação como o óxido nítrico (Matsuno e col. 1997). Assim, de maneira meramente especulativa podemos sugerir que a jararagina estaria se ligando aos receptores *scavenger* e desta forma ativando a síntese das citocinas pró-inflamatórias.

Uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos com o quadro inflamatório local desencadeado durante o envenenamento botrópico possibilita a descoberta de novas estratégias de terapia, que, administradas paralelamente aos antivenenos, contribuiriam em muito para eliminar as graves seqüelas resultantes destes acidentes. Neste sentido, e como conclusão geral, o nosso estudo caracterizou o efeito das metaloproteinases de venenos botrópicos na reação inflamatória local, identificando a expressão, produção e secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 como sendo os mediadores presentes nos momentos iniciais da instalação deste quadro e também como os possíveis alvos de estudos futuros, visando modular a resposta inflamatória para um processo de atenuação dos graves sintomas locais observado.

VI. CONCLUSÕES

Analisados em conjunto, nossos resultados permitem concluir especificamente que:

- A jararagina induz diminuição de TNF- α , IL-6 e IL-10 liberados por células peritoneais aderentes murinas estimuladas por LPS, apresentando um efeito menos acentuado sobre a IL-1 β e não apresentando efeito de diminuição sobre o IFN- γ . Esta diminuição foi atribuída à ação proteolítica da jararagina.

- A jararagina nativa apresentou uma ação direta sobre as células aderentes peritoneais murinas, agindo em nível transcricional sobre o mRNA que codifica para as citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

- A jararagina apresentou uma atividade edematogênica intensa no coxim plantar de camundongos e a ação proteolítica desta toxina se mostrou essencial neste efeito.

- A injeção de jararagina no coxim plantar de camundongos causa uma liberação local de TNF- α , IL-1 β e IL-6, sendo a IL-6 a citocina presente em maior quantidade no local e também no soro destes animais.

- A liberação de TNF- α no local da injeção de jararagina ocorre independentemente da atividade enzimática desta toxina, sendo o domínio disintegrina (jararagina-C) capaz de estimular a liberação de níveis desta citocina comparáveis aos estimulados pela jararagina nativa.

- A liberação de IL-1 β e IL-6 no local da injeção de jararagina nativa também ocorre independentemente da atividade enzimática desta toxina, porém a liberação é maior com a jararagina nativa do que com a jararagina-C.

VII. REFERÊNCIAS

AMMON, C.; MEYER, S.P.; SCHWARZFISCHER, L.; KRAUSE, S.W.; ANDREESSEN, R.; KREUTZ, M. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. **Immunology**, v. 100, p. 364-369, 2000.

ASSAKURA, M.T; REICHL AP; MANDELBAUM FR. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three haemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon** v. 24, p. 943-946; 1986.

BARAMOVA, E.M.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 275, p. 63-71, 1989.

BARRAVIEIRA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MEIRA, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 1, p. 1-11, 1995.

BARKER, R.H.; O'SHEA, P.F.; STRAUS, P.R. Adherence of murine T cells to solid substrata in the absence of serum. **J. Cell. Physiol.**, v. 109, p. 243-251, 1981.

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

BEUTLER, B.; CERAMI, A. The common mediator of shock, cachexia and tumor necrosis. **Adv. Immunol.**, v. 42, p. 213-231, 1988.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.

NBR 6023: Informação e Documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2000. 22p

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index Medicus. 2001.

Available from:

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi

www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

- BIGLER, D.; CHEN, M.; WATERS, S.; WHITE, J.M. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. **Trends. Cell Biol.**, v. 7, p. 220-225, 1997.
- BJARNASON, J.B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterisation of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. **Biochemistry**, v. 17, p. 3395-3404, 1978.
- BJARNASON, J.B.; FOX, W. Proteolytic specificity and cobalt exchange of hemorrhagic toxin e, a zincprotease from *Crotalus atrox*. **Biochemistry**, v. 222, p. 3770-3778, 1983.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 352-372, 1994.
- BLACK, R.A.; RAUCH, T.C.; KOZLOSKY, C.J.; PESCHON, J.J.; SLACK, J.L.; WOLFSON, M.F. *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. **Nature**, v. 385, p. 729-732, 1997.
- BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1549-1555, 1991.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRETT, J.; GERLACH, H.; NAWROTH, P.; STEINBERG, S.; GODMAN, G.; STERN, D. Tumor necrosis factor/cachetin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 1977-1991, 1989.
- BRINKHOUS, K.M.; BARNES, D.S.; POTTER, J.Y.; READ, M.S. Von Willebrand syndrome induced by a *Bothrops* venom factor: bioassay for venom coagglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 78, p. 3230-3234, 7 1981.
- CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. 1.ed. New York: Cornell University Press, 1989.
- CARDI, B.A.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE, JR.H.F. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ^{60}Co γ -rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. **Int. J. Radiat. Biol.**, v. 73, p. 557-564, 1998.

- CARDOSO, J.L.C.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.S.; JORGE, M.T.; LEITE, R.P.; NISHIOKA, S.A. *et al.* Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Quat. J. Med.**, v. 86, p. 315-325, 1993.
- CARDOSO, J.L.C. Ofídios – *Bothrops* (jararaca, cruzeira). In: Nicolela A; Barros E; Torres JB *et al.* eds. **Acidentes com Animais Peçonhentos** - Consulta Rápida - Porto Alegre - Ministério da Saúde 1997.
- CERRETTI, D.P.; KOZLOSKY, C.J.; MOSLEY, B.; NELSON, N.; VAN NESS, K.; GREENSTREET, T.A. *et al.* Molecular cloning of the IL-1 β processing enzyme. **Science**, v. 256, p. 97-100, 1992.
- CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, I. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v.39, p. 1173-1181, 2001.
- CHANG, J.; MUSSER, J.H.; MC. GREGOS, H. Phospholipase A₂ function and pharmacological regulation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 2429-2436, 1987.
- CHO, C.; O'DELL, B.D.; FAURE, J.E.; GOULDING, E.H.; EDDY, E.M.; PRIMAKOFF, P. *et al.* Fertilization defects in sperm from mice lacking Fertilin- β . **Science**, v. 281, p., 1857-1859, 1998.
- CINTRA, A.C.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **J. Protein. Chem.**, v. 9, p. 221-227, 1990.
- COELHO, A.L.J.; FREITAS, M.S.; CARVALHO, A.L.O.; MOURA-NETO, V.; ZINGALI, R.B.; BARJA-FIDALGO, C. Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Exp. Cell. Res.**, v. 251, p. 378-387, 1999.
- COLLINS, T. Acute and Chronic Inflammation. In: COTRAN RS; KUMAR V; COLLINS T; eds. **Robbins – Pathologic Basis of Disease**. 6.ed Philadelphia: Saunders, 1999. p.50-87.
- COLMAN, R.W.; MARDER, V.J.; SALZMAN, E.W. *et al.* **Hemostasis and Trombosis**. 3.ed. Philadelphia:JB Lippencott Company, 1993.
- CONOVER, W.J. **Practical Nonparametric statistics**. New Orleans:John Wiley & Sons INC, 1971. 273p.

- COSTA, E.P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C.F.P.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper venoms-induced local inflammation. **Inflammation**, v. 26, p. 13-17, 2002.
- CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F.; FARSKY, S.H. Lack of effect of endogenous corticosteroids on the acute inflammatory reaction (edema) induced by *Bothrops jararaca* venom (BjV) in rats. **Toxicon**, v. 35, p. 773-780, 1997.
- DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ mechanism inhibition and role in arachidonic acid release. **Drug. Dev. Res.**, v.10, p. 205-220, 1978.
- DERYNK, R.; CHOY, L. Transforming Growth Factor- β and its Receptors. In: Thomson A. **The Cytokine Handbook**. California: Academic Press, 1998
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1. In: Thomson A. **The Cytokine Handbook**. California: Academic Press, 1998
- FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; LÔBO DE ARAÚJO, A. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops Lanceolatus* (Fer de Lance) venom. **Toxicon**, v. 39, p. 825-830, 2001.
- FARSKY, S.H.P.; COSTA-CRUZ, J.W.M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, v. 35, p. 185-193, 1997.
- FARSKY, S.H.P.; GONALVES, L.R.C.; CURY, Y. Characterisation of local tissue damage evoked by *Bothrops jararaca* venom in the rat connective tissue microcirculation: an intravital microscope study. **Toxicon**, v. 37, p. 1079-1083, 1999.
- FEGHALI, C.A.; WRIGHT, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Front. Biosc.**, v. 2, p. d12-26, 1997.
- FENTON, J.W.; OFOSU, F.A.; BREZNIAK, D.V.; HASSOUNA, H.I. Thrombin and antithrombotics. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 24, p. 87-91, 1998.
- FERREIRA, S.H.; ROCHA E SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia**, v. 21, p. 347-349, 1965.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**, v. 31, p. 1551-1559, 1993.

FOX, J.W.; LONG, C. The ADAMs/MDC family of proteins and their relationships to the Snake Venom Metalloproteinases. In: Bailey GS ed. **Enzymes From Snake Venom**, USA: Alaken, 1998.

FRANÇA, F.O.S. **Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantan/SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais**. São Paulo, 1997. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]

FRIDMAN, W.H.; TARTOUR, E. Cytokines and cell regulation. **Molec. Aspects. Med.**, v. 18, p. 1-90, 1997.

FU, X.; KASSIM, S.Y.; PARKS, W.C.; HEINECKE, J.W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 41279-41287, 2001.

FUJIMURA, Y.; IKEDA, Y.; MIURA, S.; YOSHIDA, E.; SHIMA, H.; NISHIDA, S.; *et al.* Isolation and characterisation of jararaca GPIb-Bp, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. **Thromb. Haemost.**, v.74, p. 743-750, 1995.

GADIENT, R.A.; PATTERSON, P.H. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. **Stem Cells**, v. 17, p. 127-137, 1999.

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

GOULD, R.J.; POLOKOFF, M.A.; FRIEDMAN, P.A.; HUANG, T.F.; HOLT, J.C.; COOK, J.J. *et al.* Disintegrins: A family of integrin inhibitory proteins from viper venom. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 195, p. 168-171, 1990.

- GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, O. *et al.* Neutralizacion de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, v. 19, p. 493-500, 1981.
- GUTIÉRREZ, J.M.; CRAVES, F.; MATA, E.; CERDAS, L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (Terciopelo) venom. **Toxicon**, v. 24, p. 223-231, 1986.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Mem. Inst. But.**, v. 51, p. 211-233, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.
- HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K.K. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 29, p. 1-19, 1999.
- HEINECKE, J.W. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. **Atherosclerosis**, v. 141, p. 1-15, 1998.
- HIRANO, T. The biology of interleukin-6. **Chem. Immunol.**, v. 51, p. 153-182, 1992.
- HIRANO, T. Interleukin-6. In: Thomson A. **The Cytokine Handbook**. California: Academic Press, 1998.
- HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B; FOX, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 182-191, 1994.
- JANCIAUSKIENE, S.; MORAGA, F.; LINDGREN, S. C-terminal fragment of alpha1-antitrypsin activates human monocytes to a pro-inflammatory state through interactions with the CD36 scavenger receptor and LDL receptor. **Atherosclerosis**, v. 158, p. 41-51, 2001.
- JIRIK, F.R.; PODOR, T.J.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; LOSKUTOFF, D.J.; CARSON, D.A.; *et al.* Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. **J. Immunol.**, v. 42, p. 144-147, 1989.

- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Envenoming by the South American pit viper *Bothrops neuwiedi* Wagler. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 94, p. 721-734, 2000.
- KAIBARA, A.; ESPAT, N.J.; AUFFENBERG, T.; ABOUHAMZE, A.S.; MARTIN, D.; KAIARA, S.; MOLDAWER, L.L. Interleukin-6 but not ciliary neurotrophic factor or leukemia inhibitory factor, is responsible for the acute fase response to tupertine-induced myositis. **Cytokine**, v.10, p. 452-456, 1998.
- KAMIGUTI, A.S.; SANO-MARTINS, I.S. South American Snake venoms affecting haemostasis. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v. 14, p. 359-374, 1995.
- KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha_2\beta_1$ -integrin by the snake venom metalloproteinase Jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996.
- KAW, J.L.; BECK, E.G. Cellular response to various chemical stimulants in the peritoneal cavity of mouse. **Jpn. J. Exp. Med.**, v. 52, p. 261-266, 1982.
- KAWASAKI, T.; FUJIMURA, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MIURA, S.; SAKURAI, Y. *et al.* Complete aminoacid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ib-binding site of jararaca GPIb-Bp, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 10635-10639, 1996.
- KREMLEV, S.G.; CHAPOVAL, A.I.; EVANS, R. CSF-1 (M-CSF) enhances the inflammatory response of fibronectin-primed macrophages: pathway involved in activation of the cytokine network. **Nat. Immun.**, v. 16, p. 228-246, 1998.
- KILLAR, L.; WHITE, J.; BLACK, R.; PESCHON, J. Adamalysins: A Family of Metzincins including TNF- α converting enzyme (TACE). **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 878, p. 442-452, 1999.
- KOBAYASHI, Y.; OPPENHEIM, J.J.; MATSUSHIMA, K. Human pre-interleukin 1 α and β : structural features revealed by limited proteolysis. **Chem. Phar. Bull.**, v. 39, p. 1513-1517, 1991.
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. Studies on the quantitative method of determination of hemorrhagic activity of Habu Snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 13, p. 43-51, 1960.

- KUEBLER, W.M.; ABELS, C.; SCHUERER, L.; GOETZ, A.E. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. **Int. J. Microcirc. Clin. Exp.**, v. 16, p. 89-97, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEISTEN, J.C.; GAARDE, W.A.; ASCHOLZ, W. Interleukin-6 serum levels correlates with swelling in adjuvant-induced arthritic Lewis rats treated with cyclosporin A or Indometacin. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 108-115, 1990.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Proteolytic activity of snake venoms of Costa Rica on casein. **Rev. Biol. Trop.**, v. 31, p. 37-40, 1983.
- LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, p. 93-105, 1993.
- LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Activity of haemorrhagic metalloproteinase BaH1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 32, p. 505-510, 1994.
- LUCA, M.; WARD, C.M.; OHMORI, K.; ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor alpha 2 beta 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 206, p. 570-576, 1995.
- LUNN, L.; WONG, B.R.; JOSIEN, R.; BECHERER, J.D.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; SCHLÖNDORFF, J. *et al.* Evidence for a Role of a Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)-Converting Enzyme-like Protease in Shedding of TRANCE, a TNF Family Member Involved in Osteoclastogenesis and Dendritic Cell Survival. **J. Biol. Chem.**, v. 19, p. 13613-13618, 1999.
- MAEYER, E.; MAEYER-GUIGNARD, J. Interferons. In: Thomson A. **The Cytokine Handbook**. California: Academic Press, 1998.
- Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde (1999).

- MANDELBAUN, F.R.; ASSAKURA, M.T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 26, p. 379-385, 1988.
- MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, v. 30, p. 853-864, 1992.
- MARUYAMA, M.; TANIGAWA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H. Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. **Enzyme Protein**, v. 47, p. 124-135, 1993.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1477, p. 146-156, 2000.
- MATSUSHITA, T.; MEYER, D.; SADLER, J.E. Localisation of von Willebrand Factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and Botrocetin by charged-to-alanine scanning Mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 11044-11049, 2000.
- MATSUNO, R.; ARAMAKI, Y.; ARIMA, H.; TSUCHIYA, S. Scavenger receptors may regulate nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 237, p. 601-605, 1997.
- MILLA, M.E.; LEESNITZER, M.A.; MOSS, M.L.; CLAY, W.C.; CARTER H.L.; MILLER, A.B. *et al.* Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). **J. Bio. Chem.**, v. 274, 30563-30570, 1999.
- MONTEIRO, R.O.; ZINGALI, R.B. Inhibition of protrombin activation by Bothrojaracin, a C-Type Lectin from *Bothrops jararaca* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 382, p. 123-128, 2000.
- MOSLEY, B.; URDAL, D.L.; PROCKETT, K.S.; LARSEN, A.; COSMAN, D.; CONLON, P.J. *et al.* The Interleukin 1 receptor binds the human Interleukin 1 α precursor but not the Interleukin 1 β precursor. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 2941-2944, 1987.
- MOSS, M.L.; JIN, S.L.C.; MILLA, M.E.; BURKHART, W.; CARTER, H.L.; CHEN, W.J. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor Tumor-Necrosis Factor- α . **Nature**, v. 385, p. 733-736, 1997.

- MOURA-DA-SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G.; THEAKSTON, R.D. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, p. 713-723, 1991.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; LAING, G.L.; PAINE, M.J.I.; DENNISON, J.M.T.; POLITI, V.; CRAMPTON, J.M.; THEAKSTON, R.D.G. Processing of pro-tumor necrosis factor by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 2000-2005, 1996.
- MOURA-DA-SILVA, A.M.; MARCINKIWICZ, C.; MARCINKIWICZ, M.; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of $\alpha_2\beta_1$ integrin by Jararhagin, a metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb. Res.**, v. 102, p. 153-159, 2001.
- MUNDER, M.; MALLO, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Murine macrophages secrete Interferon γ upon combined stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 2103-2108, 1998.
- MURAYAMA, N.; HAYASHI, M.A.; OHI, H.; FERREIRA, L.A.; HERMANN, V.V.; SAITO, H.; FUJITA, Y. *et al.* Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, p. 1189-1193, 1997.
- NETER, J.; WASSERMAN, W.; KUTNER, M.H. **Applied Linear Statistical Models**. Philadelphia: Richard D. Irwin, INC, 1985, 782p.
- NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M. *et al.* Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p. 1843-1849, 1994.
- ORNING, L.; KRIVI, G.; BILD, G.; GIERSE, J.; AYKENT, S.; FITZPATRICK, F.A. Inhibition of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase by captopril. **J. Biochem. Chem.**, v. 266, p. 16507-16511, 1991.
- OTERO, R.; NUNEZ, V.; GUTIERREZ, J.M.; ROBLES, A.; ESTRADA, R.; OSORIO, R.G. *et al.* Neutralising capacity of a new monovalent anti-*Bothrops atrox* antivenom: comparison with two commercial antivenoms. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 375-379, 1997.

- OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, E. *et al.* C-Type galactoside binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 306-310, 1994.
- PAINE, M.J.I.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.G.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning and molecular characterisation of a high molecular weight haemorrhagic metalloproteinase, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869-22879, 1992.
- PAN, D.; RUBIN, G.M. Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediated lateral inhibition during *Drosophila* and Vertebrate neurogenesis. **Cell**, v. 90, p. 271-280, 1997.
- PEISER, L.; GORDON, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 149-159, 2001.
- PESCHON, J.J.; SLACK, J.L.; REDDY, P.; STOCKING, K.L.; SUNNARBORG, S.W.; LEE, D.C.; An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**, v. 282, p. 1281-1284, 1998.
- PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.T.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ, J.M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1253-1266, 2000.
- PETRETSKI, J.H.; KANASHIRO, M.M.; RODRIGUES, F.R.; ALVES, E.W.; MACHADO, O.L.T.; KIPNIS, T. Edema induction by the disintegrin-like/cystein-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 276, p. 29-34, 2000.
- RAJAGOPALAN, S.; MENG, X.P.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D.G.; GALIS, Z.S. 1996 Reactive oxygen species produced by macrophage-derived from cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 2572-2579, 1996.
- REDDY, P.; SLACK, J.L.; DAVIS, R.; CERRETI, D.P.; KOZLOSKY, C.J.; BLANTON, R.A. *et al.* Functional analysis of the domain structure of Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 14608-14614, 2000.

- ROSENFELD, G. Symptomatology, Pathology and Treatment of Snake Bites in South America. In Bucherl W, Buckley EE eds. **Venomous Animal and Their Venoms**. Vol II. New York: Academic Press, p.346-81, 1971.
- RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Local tissue damage induced by BaP1, a Metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 63, p. 186-199, 1995.
- RUCAVADO, A.; FLORES-SANCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHÃES, A.; GUTIERREZ, J.M. Characterisation 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.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning Laboratory Manual** 2.ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, B.F.; SERRANO, S.M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS Lett.**, v. 477, p. 199-202, 2000.
- SCARBOROUGH, R.M.; NAUGHTON, M.A.; TENG, W.; ROSE, J.W.; PHILLIPS, D.R.; NANNIZZI, L. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 1066-1073, 1993.
- SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S.C.; DINARELLO, C.A. Correlations and interactions in the production of Interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood**, v. 75, p. 40-47, 1990.
- SCHLONDORFF, J.; BECHERER, J.D.; BLOBEL, C.P. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). **Biochem. J.**, v. 347(Pt 1), p. 131-138, 2000.
- SEGUIN, M.C.; KLOTZ, F.W.; SCHEIDER, I.; WEIR, J.P.; GOODBARY, M.; SLAYTER, M. *et al.* Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: Involvement of Interferon gamma and CD8+ T cells. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 353-358, 1994.

- SEKIYA, F.; ATODA, H.; MORITA, T. Isolation and characterisation of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 32, p. 6892-6897, 1993.
- SERRANO, S.M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.; FLINK, E. Purification, characterisation, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, p. 7186-7193, 1995.
- SERRANO, S.M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A. *et al.* Purification and characterisation of a kinin-releasing and fibrinogen clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p. 845-853, 1998.
- SERRANO, M.T.S.; REICHL, A.P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E.A.; SANTORO, M.L.; SAMPAIO, C.A.M. *et al.* A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: Purification, primary structure analysis, and its characterisation as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 367, p. 26-32, 1999.
- SCHONBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3340-3346, 1998.
- SUFFREDINI, A.F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J.J.; O'GRADY, N.P. New insights into the biology of the acute phase response. **J. Clin. Immunol.**, v. 19, p. 203-214, 1999.
- TANIZAKI, M.M.; ZINGALI, R.B.; KAWAZAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S.; SUZUKI, K. Purification and some characteristics of a zinc metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 27, p. 747-755, 1989.
- TEIXEIRA, C.F.P.; CURY, I.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, v. 32, p. 419-428, 1994.
- THEAKSTON, R.D.; REID, H.Á. Development of simple standard assay procedure for the characterization of snake venom. **Bull. World Health Organ.**, v. 61, p. 949-956, 1983.

- THORNBERRY, N.A.; BULL, H.G.; CALAYCAY, J.R.; CHAPMAN, K.T.; HOWARD, A.D.; KOSTURA, M.J. *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required interleukin-1 beta processing in monocytes. **Nature**, v. 356, p. 768-774, 1992.
- TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 26, p. 292-311, 1989.
- USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIOKA, A. *et al.* 1994 A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 201, p.331-339, 1994.
- VASSALI, P. The Pathophysiology of Tumor Necrosis Factors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 411-452, 1992.
- VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 253-278, 1990.
- VAN WART, H.E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 87, p. 5578-5582, 1990.
- YAGAMI-HIROMASA, T.; SATO, T.; KURISAKI, T.; KAMIJO, K.; NABESHIMA, Y.; FUJISAWA-SEHARA, A. A metalloproteinase-disintegrin participating in myoblast fusion. **Nature**, v. 377, p. 659-659, 1995.
- WARREN, J.S. Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 28, p. 37-59, 1990.
- WESSELING, S.I.; LEVINE, B.; FOX, R.J.; CHOI, S.; GRIFFIN, D.E. Intracranial cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 cell response. **J. Immunol.** v. 152, p. 1289-1297, 1994.
- WUYTS, A.; PROOST, P.; PUT, W.; LENAERTS, J.P.; PAEMEN, L.; VAN DAMME, J. Leukocyte recruitment by monocyte chemotactic proteins (MCPs) secreted by human phagocytes. **J. Immunol. Methods.**, v. 174, p. 237-247, 1994.

ZHANG, M.; TRACEY, K.J. Tumor Necrosis Factor In: Thomson, A **The Cytokine Handbook**. California: Academic Press, 1998.

ZAMUNER, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MUSCARA, M.N.; TEIXEIRA, A.S.; TEIXEIRA, C.F.P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes *in vivo*. **Toxicon**, v.39, p. 1505-1513, 2001.

ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; FRANCISCHETTI, I.M.; GUIMARÃES, J.A. *Bothrops jararaca* snake venom: effects on platelet aggregation. **Thromb. Res.**, v. 58, p. 303-316. 1990.

VIII. ANEXO

A parte do trabalho relacionada aos experimentos *in vitro* foi publicado no *Toxicon* v. 39, p. 1567-1573, 2001.

“ The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, ON Pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. Patricia B. Clissa, Gavin D. Laing, R. David G. Theakston, Ivan Mota, Mark J. Taylor, Ana M. Moura-da-Silva ”.