

KARINA KIYOKO KODAMA

**Efeito do BJKgn (B*othrops* *jararaca*
K*ininogen*) sobre proteases processadoras
de citocinas pró-inflamatórias e sobre
atividades biológicas de macrófagos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxinologia do Instituto Butantan,
para obtenção de título de Mestre
em Toxinologia.

São Paulo
2013

KARINA KIYOKO KODAMA

**Efeito do BJKgn (B*othrops* *jararaca*
K*ininogen*) sobre proteases processadoras
de citocinas pró-inflamatórias e sobre
atividades biológicas de macrófagos**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxinologia do Instituto Butantan,
para obtenção de título de Mestre
em Toxinologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Roberto
de Camargo Gonçalves

São Paulo
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Kodama, Karina Kiyoko

Efeito do BJKgn (*Bothrops jararaca* Kininogen) sobre proteases processadoras de citocinas pró-inflamatórias e sobre atividades biológicas de macrófagos. / Karina Kiyoko Kodama; orientador Luís Roberto de Camargo Gonçalves. – São Paulo, 2013.

71 fls. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan.

1. *Bothrops*. 2. citocinas. 3. proteína. 4. TACE. 5. ICE I. Orientador (Camargo Gonçalves, Luís Roberto.). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III Efeito do BJKgn (*Bothrops jararaca* Kininogen) sobre proteases processadoras de citocinas pró-inflamatórias e sobre atividades biológicas de macrófagos.

CDD 615.9

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, após a publicação do artigo científico, desde que citada a fonte.

De acordo: _____

Karina Kiyoko Kodama
Aluna

De acordo: _____

Dr. Luís Roberto de Camargo Gonçalves
Orientador

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO(A): Karina Kiyoko Kodama

DATA DO EXAME:/...../.....

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado(a)	Reprovado(a)
_____	_____	()	()
(Presidente)			
_____	_____	()	()
_____	_____	()	()

DECISÃO FINAL: APROVADO(A) () REPROVADO(A) ()

Comentários da Banca (opcional):



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br


CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito do BjHK (*Bothrops jararaca* High molecular mass Kininogen) sobre peptidases processadoras de citocinas pró-inflamatórias e sobre atividades biológicas de macrófagos", protocolo nº 894/12, sob a responsabilidade de Luís Roberto de Camargo Gonçalves e Karina Kiyoko Kodama - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/6/12.

We certify that the research entitled "Effect of BjKgn (*Bothrops jararaca* Kininogen) on processing peptidases of pro-inflammatory cytokine and on biological activities of macrophages", protocol number 894/12, under the responsibility of Luís Roberto de Camargo Gonçalves and Karina Kiyoko Kodama - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 6/20/12.

Vigência do Projeto: 02/2012 - 08/2013	Nº de animais/espécie
Laboratório de Fisiopatologia	30 serpentes <i>Bothrops jararaca</i> (<i>Bothropoides jararaca</i>) (M,F); 240 camundongos Swiss (M)

São Paulo, 22 de junho de 2012


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico este trabalho de mestrado às pessoas mais importantes em minha vida:

*Aos meus pais **Amélia** e **Cláudio** por todo o apoio, compreensão e dedicação.*

Sem eles eu não chegaria perto do que eu sou hoje.

*Aos meus irmãos **Alessandra** e **Flávio** por todo o carinho, apoio e força.*

*Ao meu noivo **Adriano Felix** por todo amor, dedicação, compreensão, incentivo,
força e companheirismo. Te amo muito!*

*Amo Todos Vocês!
Muito obrigada por TUDO!*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder paciência, força e virtude.

Ao meu Orientador Luís Roberto de Camargo Gonçalves pela oportunidade, paciência, dedicação, apoio, ensinamentos e por ser além de um orientador, um excelente amigo;

Aos meus parentes, familiares e amigas de infância Adriana, Dani, Letícia e Paula, por toda a força, apoio e ajuda que me deram;

À Dra. Fernanda Portaro e Dra Sandra Coccuzo Sampaio pelos ensinamentos e colaboração;

À Daniela e ao Alexandre pela paciência, dedicação e essencial ajuda na realização de experimentos;

À Bianca Zychar e André Sanson pelos ensinamentos e paciência;

À Dra. Patrícia Bianca Clissa por fornecer a Jararagina;

À Dra. Ida Sigueko Sano Martins pela amizade, conselhos e por ter me recebido no laboratório com carinho;

Às minhas amigas queridas e inesquecíveis: Sâmella, Carol, Luana, Tati, Eldilene e amigo Jefferson pela amizade, paciência, força, carinho, apoio e risadas que me proporcionaram um bem estar muito grande;

Aos meus amigos Gabriela, Hugo, Rene e Douglas pela alegria contagiante, amizade, carinho, apoio e brincadeiras;

Ao André Alves pela amizade, conversas, risadas e ajuda;

À Kimie pela paciência e compreensão;

À Rosana pela ajuda;

À Edna, Jane, Leni, Jusselino, Manoel, Meire pelo carinho, respeito e conversas. Sem contar as risadas!

À Neusinha por conversar e alegrar as minhas manhãs.

A todos do laboratório de Fisiopatologia que me ajudaram de alguma forma.

Muito obrigada!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

RESUMO

Kodama, Karina Kiyoko. Efeito do Bjkgn (*Bothrops jararaca* Kininogen) sobre proteases processadoras de citocinas pró-inflamatórias e sobre atividades biológicas de macrófagos. 2013. 71f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan. São Paulo, 2013.

O plasma da serpente *B. jararaca* é rico em inibidores de proteases. Dele foi isolado um potente inibidor de cisteíno-protease, o Bjkgn. Este possui características similares ao cininogênio de alto peso molecular humano (HK), já que possui uma massa molecular de 110kDa, libera um peptídeo farmacologicamente ativo e além de ser um inibidor de cisteíno-protease. Tanto o Bjkgn quanto o HK apresentam atividade inibitória sobre a jararagina (JAR), uma metaloprotease hemorrágica do veneno de serpentes da mesma espécie. A JAR é uma enzima capaz de induzir a liberação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), citocina relacionada com a atividade dermonecrosante do veneno. Essa citocina é expressa na superfície celular e clivada por uma metaloprotease, a TACE (TNF α -converting enzyme), resultando na liberação do TNF- α solúvel. Outra citocina importante durante o processo de envenenamento por serpentes *Bothrops* é a interleucina-1 β (IL-1 β), que é processada intracelularmente pela ICE (Interleukin converting enzyme), uma cisteíno-protease pertencente à família das caspases. Assim, os objetivos do presente trabalho foram testar o possível efeito inibitório do Bjkgn sobre a ICE, TACE, bem como o efeito sobre as funções de células peritoneais aderentes, como espraiamento, fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Óxido Nítrico (NO) e TNF- α e IL-1 β . Para os testes com TACE e ICE, utilizamos substratos fluorescentes respectivos às enzimas e diferentes concentrações de Bjkgn. Os testes de espraiamento e fagocitose foram realizados utilizando células peritoneais aderentes estimuladas ou não, e diferentes concentrações de Bjkgn (0,5 μ g, 1 μ g, 1,5 μ g, 2 μ g e 3 μ g). Os testes de produção de H₂O₂, NO e dosagem de citocinas foram realizados utilizando apenas células estimuladas e 3 μ g de Bjkgn. As células foram aderidas e incubadas na presença ou não da proteína Bjkgn por 1 hora em todos os experimentos em *ex vivo*, com exceção da dosagem de citocinas, que permaneceu em contato com a proteína por 12 horas. Os resultados demonstraram que o Bjkgn, nas doses utilizadas, foi capaz de inibir as enzimas TACE e ICE competitivamente, com constantes de inibição de 2 mM e 370 μ M, respectivamente. Em relação às atividades das células do exsudato peritoneal, a proteína não influenciou nenhuma das atividades nas doses de Bjkgn utilizadas, uma vez que apresentaram capacidade de espraiamento, fagocitose, produção de H₂O₂ e NO semelhantes às apresentadas pelas células dos grupos controle. Apesar de inibir as enzimas ICE e TACE, *in vitro*, o Bjkgn não influenciou na liberação de TNF- α e IL-1 β . Podemos concluir que a proteína Bjkgn é uma inibidora de cisteíno-proteases e metaloproteases já que inibiu *in vitro* a TACE e a ICE e que, ao menos nas doses utilizadas, não afeta as funções metabólicas ou biológicas de células peritoneais aderentes e não foi capaz de inibir a liberação do TNF- α e IL-1 β por estas células.

Palavras chave: *Bothrops*, citocinas, proteína, TACE, ICE.

ABSTRACT

Kodama, Karina Kiyoko. Effect of BJKgn (*Bothrops jararaca* Kininogen). on processing proteases of pro-inflammatory cytokines and on biological activities of macrophage 2013. 71p. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan. São Paulo, 2013.

The plasma of *B.jararaca* snake is rich in protease inhibitors. A potent inhibitor of cysteine-protease was isolated from its plasma and named BJKgn. This protein has similar characteristics to the human high molecular weight kininogen (HK), since it has a molecular mass of 110 kDa, releases a pharmacologically active peptide and besides that, It is an inhibitor of cysteine-protease. Both BJKgn and HK exhibit inhibitory activity on Jararhagin (JAR), hemorrhagic metalloprotease isolated from the venom of the same species snakes. JAR is an enzyme capable of inducing the release of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), cytokine-related to dermonecrosis activity of *Bothrops* snake venom. This cytokine is expressed on the cell surface and cleaved by a metalloprotease, called TACE (TNF- α converting enzyme) resulting in the release of soluble TNF- α . Another important cytokine that participates during the poisoning by *Bothrops* snakes is the Interleukin-1 β (IL-1 β). It is intracellularly processed by ICE (Interleukin converting enzyme), a cysteine-proteinase which belongs to the family of caspases. The objectives of this study were to evaluate the possible inhibitory effect of BJKgn on ICE, TACE, and the effect on some functions of peritoneal adherent cells, such as spreading, phagocytosis, production of hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO) and TNF- α and IL-1 β . The tests with TACE and ICE were performed using fluorescent substrates corresponding to their respective enzymes and different concentrations of BJKgn. Spreading and phagocytosis tests were conducted using adherent peritoneal cells stimulated or not, and different concentrations of BJKgn (0.5 μ g, 1 μ g, 1.5 μ g, 2 μ g and 3 μ g). Tests for production of H₂O₂, NO and cytokine release were performed only with stimulated cells and 3 μ g of BJKgn. Cells were adhered and incubated in the presence or absence of BJKgn for 1 hour in all *ex vivo* experiments but the ones for the cytokine release, which the cells were remained on contact with the protein for 12 hours. The results showed that BJKgn, on the used doses, was able to competitively inhibit TACE and ICE enzymes with the inhibition constants of 2 mM and 370 mM, respectively. Regarding the activities of peritoneal exudate cells, the protein did not affect any of the activities at doses of BJKgn used, since the cells presented the ability of spreading, phagocytosis, production of H₂O₂ and NO similar to those displayed by cells of the control group. Despite ICE and TACE inhibition *in vitro*, BJKgn did not influence on the release of TNF- α and IL-1 β . We have concluded that BJKgn protein is an inhibitor of cysteine-proteases and metalloproteases since it inhibited TACE and ICE *in vitro* and that, at least at the doses used, the protein does not affect the metabolic or biological adherent peritoneal cells function and it was not able to inhibit release of TNF- α and IL-1 β by these cells.

Keywords: *Bothrops*, cytokines, protein, TACE, ICE.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM – *A Disintegrin and Metalloproteinase* (Uma Desintegrina e metaloprotease)

Ala¹¹⁷ – Alanina 117

Ala⁷⁶ – Alanina 76

Asp – Asparato

Asp¹¹⁶ – Aspartato 116

BjKgn – *Bothrops jararaca* Kininogen (Cininogênio de *Bothrops jararaca*)

CM-Papaína – Papaína carboximetilada

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTT – Ditioneitol

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGF – Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio (água oxigenada)

HK – *High Molecular weight kininogen* (Cininogênio de alto peso molecular humano)

ICE – *Interleukin 1 Converting Enzyme* (Enzima conversora de Interleucina 1)

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

JAR – Jararagina

kDa – Kilodalton

Ki – Constante de Inibição

Km – Constante de Michaelis

LK – *Low molecular weight kininogen* (Cininogênio de baixo peso molecular humano)

LPS – *Lipopolysaccharide*

Lys – Lisina

NO – Óxido Nítrico

PBS – Tampão Fosfato de sódio

PLA₂ – Fosfolipase A₂

PMA – Phorbol-12-myristate-13-acetate

PMSF – Fluoreto de fenilmetil sulfonil

SDS-PAGE – Dodecil-sulfato de sódio (SDS) de gel de poliacrilamida (PAGE)

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMP – *Snake venom metalloproteases* (Metaloproteases de veneno de serpentes)

TACE – *TNF- α Converting Enzyme* (Enzima Conversora de *TNF- α*)

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor- α* (Fator de Necrose Tumoral Alpha)

UA – Unidades de Atividade

Val⁷⁷ – Valina 77

Vi – Velocidade final

Vo – Velocidade inicial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto de serpente <i>Bothrops jararaca</i>	17
Figura 2. Modelo hipotético do complexo Pró-TNF- α -TACE.....	20
Figura 3. Esquema da liberação da IL-1 β ativa. Figura.....	21
Figura 4. Classes de SVMP de acordo com seus domínios.....	24
Figura 5. Relação entre a estrutura das adam e da SVMP.....	25
Figura 6. Cininogênio de alto peso molecular (HK) e cininogênio de baixo peso Molecular (LK).....	26
Figura 7. Gel de eletroforese em SDS-PAGE 7,5%.....	39
Figura 8. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a TACE.	40
Figura 9. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a jararagina.....	41
Figura 10. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a ICE. Representação por gráfico dixon plot.....	42
figura 11. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a ICE. Representação por gráfico Cornish-Bowden.....	43
Figura 12. Número de células aderentes residentes do peritônio espiadas após o tratamento de 1 hora com a proteína BJKgn.....	44
Figura 13. Espriamento de células peritoneais aderentes.....	44
Figura 14. Número de células estimuladas espiadas.....	45
Figura 15. Número de células aderentes residentes que fagocitaram 4 ou mais partículas de zimosan após contato por uma hora com a proteína BJKgn.	46
Figura 16. Células peritoneais aderentes que fagocitaram ou não zimosan.....	47
Figura 17. Número de células estimuladas que fagocitaram 4 ou mais partículas de zimosan após estímulo por uma hora com a proteína BJKgn.	48
Figura 18. Efeito do BJKgn sobre a liberação de peróxido de hidrogênio por células peritoneais aderentes previamente estimuladas com tioglicolato a 4%, e posteriormente estimulados ou não com o PMA.....	49
Figura 19. Efeito do BJKgn sobre a liberação de óxido nítrico por células peritoneais aderentes previamente estimulados com tioglicolato 4%, posteriormente estimulados ou não com LPS.....	50

Figura 20. Efeito do BJKgn sobre a liberação de TNF- α por células peritoneais aderentes estimulados com 4% de tioglicolato por 4 dias.	51
Figura 21. Efeito do BJKgn sobre a liberação de IL-1 β por células peritoneais aderentes estimuladas com 4% de tioglicolato por 4 dias.	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Resposta inflamatória	18
1.1.1. TNF- α	19
1.1.2. IL-1 β	20
1.1.3. Citocinas no envenenamento ofídico	22
1.2. Metaloproteases de venenos botrópicos e hemorragia	23
1.3. Inibidores de protease: resistência ao veneno ofídico	25
1.4. Cininogênios	26
1.4.1. O cininogênio e a resposta inflamatória (domínio 5)	27
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. Animais	31
3.2. Delineamento experimental	31
3.3. Coleta do plasma de <i>Bothrops jararaca</i>	32
3.4. Processos para purificação do BJKgn (<i>Bothrops jararaca</i> kininogen)	32
3.4.1. Carboximetilação da papaína com ácido iodoacético	32
3.4.2. Preparação da resina e acoplamento da papaína carboximetilada	33
3.4.3. Purificação da proteína BJKgn	33
3.5. Ação da proteína BJKgn sobre a atividade da TACE (ADAM-17)	33
3.6. Ação da proteína BJKgn sobre a Jararagina	34
3.7. Ação da proteína BJKgn sobre a atividade da ICE (Caspase-1)	34
3.8. Avaliação sobre a atividade de células peritoneais aderentes	35
3.8.1. Obtenção de células peritoneais aderentes estimuladas ou não com tioglicolato a 4%	35
3.8.2. Determinação da capacidade de espriamento de células peritoneais aderentes residentes ou estimuladas	36
3.8.3. Determinação da capacidade fagocítica de células peritoneais aderentes residentes ou estimuladas	36
3.8.4. Determinação de peróxido de hidrogênio por células peritoneais aderentes estimuladas (H ₂ O ₂)	37

3.8.5. Determinação de Óxido Nítrico por células peritoneais aderentes estimuladas (NO)	37
3.8.6. Ação do Bjkgn sobre a TACE e ICE <i>in ex vivo</i> (liberação de TNF- α e IL-1 β).38	
3.9. Análises estatísticas.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1. Avaliação da purificação do Bjkgn	39
4.2. Ação da proteína Bjkgn sobre a atividade da TACE (ADAM-17).....	40
4.3. Ação da proteína Bjkgn sobre a atividade da Jararagina.....	41
4.4. Ação da proteína Bjkgn sobre a atividade da ICE (Caspase-1).....	42
4.5. Efeito do Bjkgn sobre a capacidade de espraiamento de células peritoneais aderentes residentes	43
4.6. Efeito do Bjkgn sobre a capacidade de espraiamento de células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato.....	45
4.7. Efeito do Bjkgn sobre a capacidade fagocítica de células peritoneais aderentes residentes	46
4.8. Efeito do Bjkgn sobre a capacidade fagocítica de células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato	48
4.9. Efeito do Bjkgn sobre a produção de peróxido de hidrogênio H₂O₂ por células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato.	49
4.10. Efeito do Bjkgn sobre a produção de Óxido Nítrico por células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato.....	50
4.11. Ação do Bjkgn sobre a liberação de TNF-α e IL-1β em <i>ex vivo</i>	51
5. DISCUSSÃO	53
6. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de Saúde Pública no Brasil, devido a sua gravidade e frequência. Anualmente ocorrem cerca de 25.000 casos de acidentes por serpentes peçonhentas, sendo a maioria causada por serpentes do gênero *Bothrops*, com aproximadamente 86% (SINAN, 2013). As serpentes deste gênero têm ampla distribuição geográfica, sendo encontradas desde o Sul do México até a Argentina e em algumas ilhas do Caribe (MELGAREJO, 2009). Dentro do gênero citado, a espécie *Bothrops jararaca* (Figura 1) é a responsável pela maioria dos acidentes ofídicos acometidos no estado de São Paulo (MINISTÉRIO DA SAÚDE-BRASIL, 2001).



Figura 1. Foto de serpente *Bothrops jararaca*. Foto tirada por Luciano Zandoná no Parque Estadual da Cantareira.

Os envenenamentos botrópicos caracterizam-se por reações sistêmicas e locais. As reações sistêmicas são representadas por graves distúrbios na coagulação sanguínea podendo ser observados sangramentos, como gengivorragia,

hematúria, sangramentos em feridas recentes, hemorragias intensas em regiões vitais assim como choque e insuficiência renal (ROSENFELD, 1971; CARDOSO *et al.*, 1993). Além do quadro sistêmico, ainda são observadas sérias reações locais representadas por bolhas, edema, abscesso, dor, lesões musculares, hemorragia e necrose, havendo a possibilidade de grandes perdas teciduais e graves sequelas. Grande parte das reações locais ocorre devido ao disparo exacerbado da resposta inflamatória no local de inoculação do veneno (ROSENFELD, 1971; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2009).

1.1. Resposta inflamatória

A resposta inflamatória é uma reação do tecido vivo vascularizado à lesão, podendo ser disparada por infecções microbianas, agentes físicos, substâncias químicas, tecidos necróticos ou lesionados ou ainda reação imune (KUMAR *et al.*, 2005).

A inflamação caracteriza-se por alterações vasculares como a vasodilatação e conseqüentemente o aumento do fluxo sanguíneo. Ainda, observa-se o aumento da permeabilidade vascular, o que leva ao extravasamento de fluidos ricos em proteína e aumento do influxo leucocitário para o local inflamado podendo resultar em reações como dor, calor, rubor, edema e perdas de função (PARHAM, 2000). Diversos tipos celulares fazem parte da resposta inflamatória. Entre eles estão, os circulantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas) e os do tecido conjuntivo (mastócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos) (KUMAR *et al.*, 2005).

Dentre as células citadas, destaca-se o macrófago ativado uma vez que é uma das principais células responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios, por exemplo, as citocinas (KUMAR *et al.*, 2005). A liberação das citocinas pode disparar a regulação positiva de outras citocinas e quimiocinas e amplificar a resposta inflamatória, além disso, influenciar no aumento da expressão de moléculas de adesão (SAKLATVALA *et al.*, 2003).

Os macrófagos são células derivadas dos monócitos sanguíneos recrutados para os tecidos através de estímulos químicos. Eles fazem parte da primeira linha de defesa do organismo e são responsáveis por diversas funções importantes e essenciais como a fagocitose (englobamento de partículas estranhas ou células

apoptóticas), produção de óxido nítrico (NO) e água oxigenada (H₂O₂) (responsáveis pela ação anti-bactericida), produção e liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas, ativação das respostas imune e humoral, apresentação de antígenos, entre outros (KUMAR *et al.*, 2005).

As citocinas são proteínas que se encontram em concentrações séricas baixas ou indetectáveis em indivíduos saudáveis, porém sua produção é estimulada durante a invasão ao hospedeiro por microorganismos patógenos ou em resposta aos danos do tecido (ORTEGA; FORNONI, 2010).

Duas das principais citocinas envolvidas na inflamação são o Fator de Necrose Tumoral Alpha (TNF- α) e a Interleucina-1 Beta (IL-1 β). Ambas são produzidas e liberadas principalmente por macrófagos e estão envolvidas, juntamente com outras citocinas, no processo inflamatório decorrente do envenenamento por *Bothrops jararaca* (PETRICEVICH *et al.*, 2000). No endotélio, elas induzem a expressão de moléculas de adesão, liberação de outras citocinas e quimiocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e NO, além de produzirem enzimas associadas ao remodelamento da matriz (KUMAR *et al.*, 2005).

1.1.1. TNF- α

O TNF- α é um potente agente pró-inflamatório, rapidamente produzido após um trauma, lesão ou infecção, e um dos mais abundantes mediadores liberados na fase inicial da inflamação aguda (FELDMANN *et al.*, 1994;). Apresenta-se inicialmente como uma proteína trimérica de 26 kDa, expressa na superfície celular, denominada de pro-TNF- α . Esta, é clivada, resultando na liberação da citocina TNF- α , solúvel e ativa, com 17 kDa de massa molecular. Essa clivagem se dá pela ação de uma protease, também expressa na superfície celular, a *TNF- α Converting Enzyme* (TACE) (BLACK *et al.*, 1997; MOSS *et al.*, 1997). A TACE é uma metaloprotease pertencente à família das ADAMs, (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) responsável pelo processamento de TNF- α clivando o pró-TNF- α entre as regiões Ala⁷⁶-Val⁷⁷ liberando o TNF- α em sua forma solúvel, como mostra a figura 2 (MILLA *et al.*, 1999).

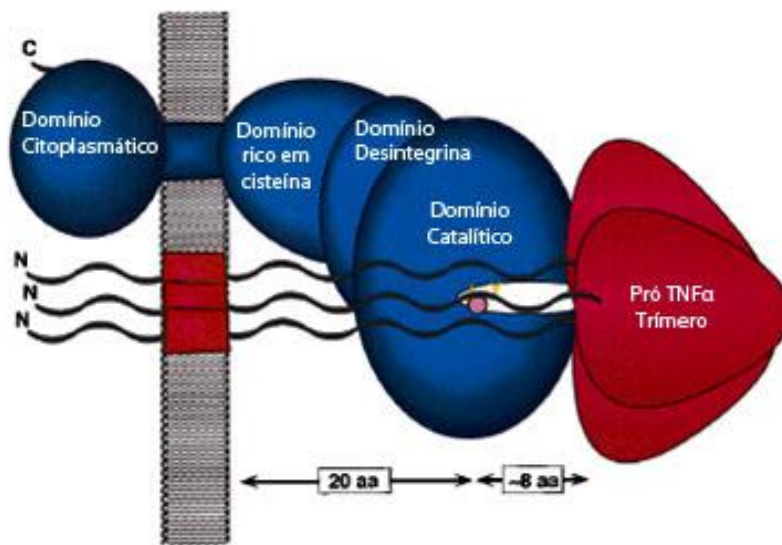


Figura 2. Modelo hipotético do complexo pro-TNF- α -TACE segundo Maskos (1998). O azul representa a TACE que consiste em um domínio citoplasmático (intracelular), segmento transmembrana, domínio rico em cisteína, domínio desintegrina e domínio catalítico, O vermelho consiste no trimérico pró-TNF- α que possui segmentos intracelulares, segmentos transmembranas, 26-28 resíduos formando uma haste que se encontra com o trimérico cone TNF- α . O cinza por sua vez representa a membrana plasmática.

Um dos estímulos mais importantes para a síntese de TNF- α é o *Lipopolysaccharide* (LPS), principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas (CORREA *et al.*, 2008)

A principal função do TNF- α é o recrutamento de polimorfonucleares e monócitos para o local inflamado. Esse evento ocorre devido à indução da expressão de moléculas de adesão, como as integrinas nos leucócitos e selectinas nas células endoteliais. Essa citocina ainda pode agir sobre outros monócitos ou macrófagos, estimulando a produção e a liberação de IL-1 β por essas células (ABBAS *et al.*, 2005).

1.1.2. IL-1 β

A IL-1 β é a citocina mais bem estudada da família das interleucinas-1 (IL-1) e, como o TNF- α , necessita de uma enzima processadora para sua ativação (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011). Assim, a IL-1 β é primeiramente sintetizada intracelularmente como uma proteína inativa de 31 kDa denominada de pró-IL-1 β . A pró-IL-1 β é, por sua vez, clivada, entre as regiões Asp¹¹⁶ – Ala¹¹⁷, por uma enzima

denominada de *Interleukin 1 Converting Enzyme* (ICE) (Figura 3). A ICE é uma enzima constitutiva, também sintetizada intracelularmente e necessita ser ativada para então clivar o pró- IL-1 β . Essa enzima é uma cisteíno-protease pertencente à família das caspases (caspase I), as quais também estão envolvidas no desencadeamento da apoptose (SINGER *et al.*, 1995).

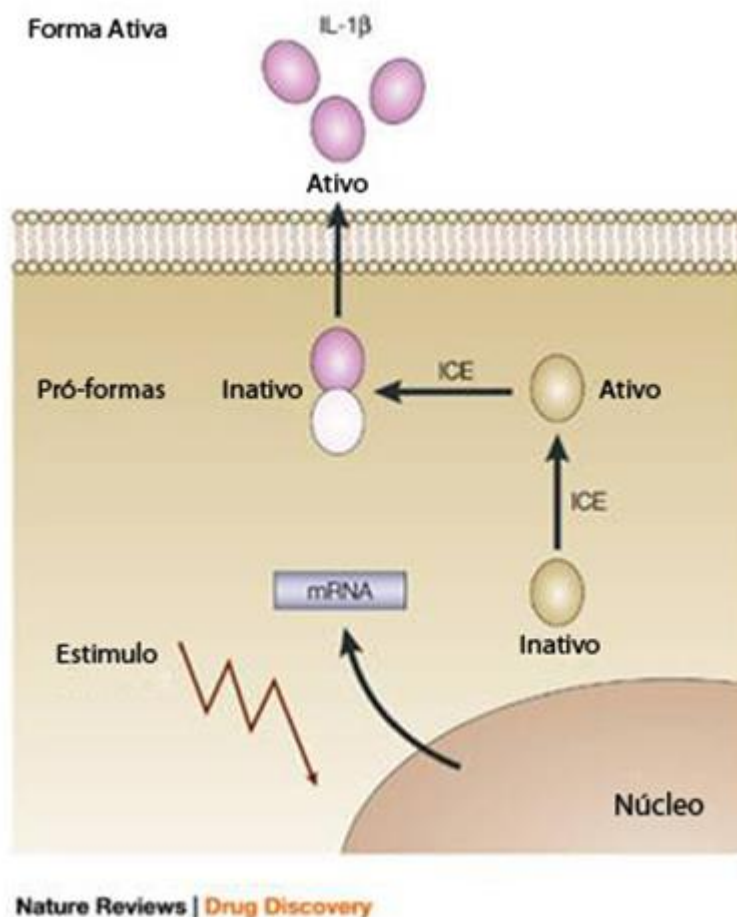


Figura 3. Esquema da liberação da IL-1 β ativa. Figura segundo Braddock e Quinn (2004), com modificações. Quando há um estímulo, intracelularmente há a produção de ICE e IL1 β inativas, a ICE então é ativada e esta em seu estado ativo, cliva a IL1 β transformando-a em ativa e liberando-a para o meio extracelular.

A produção de IL-1 β pode ser induzida por anafilatoxinas do sistema complemento, outras citocinas e também por LPS. Sua liberação pode induzir a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a Interleucina- 6 (IL-6) (CHRISTMAN *et al.*, 1998).

Quando secretado em baixa concentração, a IL-1 β funciona como um mediador da inflamação aumentando a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais. Quando secretada em grandes quantidades, essa citocina entra na corrente sanguínea e exerce um efeito endócrino. Sistemicamente, promove

sintomas como febre, síntese de proteínas de fase agudas, anorexia e sonolência (CHRISTMAN *et al.*, 1998).

1.1.3. Citocinas no envenenamento ofídico

As citocinas podem ter um papel relevante na fisiopatologia do envenenamento ofídico em humanos (BARRAVIERA *et al.*, 1995; AVILA-AGUERO *et al.*, 2001). Diversos estudos experimentais demonstram que ocorre um aumento do nível de citocinas, particularmente de TNF- α , IL-1 β e IL-6, após a injeção de veneno botrópico em animais ou a adição deste em cultura de macrófagos (LOMONTE *et al.*, 1993; BARROS *et al.*, 1998; PETRICEVICH *et al.*, 2000; CLISSA *et al.*, 2001; RUCAVADO *et al.*, 2002). Estas citocinas estão envolvidas em vários processos inflamatórios e fisiopatológicos decorrentes de envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*.

Os venenos botrópicos possuem três ações principais: a) proteolítica ou necrosante (inflamatória aguda); b) coagulante e c) hemorrágica. Essas atividades são muito complexas e podem ser atribuídas tanto a toxinas específicas quanto a diversas delas atuando sinergicamente (ROSENFELD, 1971).

As toxinas presentes no veneno de serpentes deste gênero podem ser de diversas classes como: fosfolipases A₂ (PLA₂s), serino-proteases, proteínas ricas em cisteínas, lectina tipo-C, L-aminoácido oxidase, além de metaloproteases também chamadas de Snake Venom Metalloprotease (SVMP), as toxinas mais abundantes desses venenos (CARDOSO *et al.*, 1993; CIDADE *et al.*, 2006; ZELANIS *et al.*, 2011).

As miotoxinas de venenos ofídicos possuem estrutura de PLA₂s, porém dependendo do aminoácido presente na posição 49, Asp ou Lys, essas toxinas podem ou não ter atividade enzimática (GUTIERREZ; LOMONTE, 1995). As Asp49 possuem a atividade enzimática baixa/moderada, enquanto que as Lys49 não demonstram nenhuma atividade de hidrólise sobre o substrato. As miotoxinas são as principais toxinas responsáveis pelo dano celular, o qual é ocasionado devido à hidrólise de fosfolipídios de membrana (SOARES *et al.*, 2004; LOMONTE; GUTIERREZ, 2011; LOMONTE; RANGEL, 2012). As lesões musculares podem ser diretas através da ação direta das miotoxinas ou indiretas como consequência de

uma isquemia resultante de distúrbios vasculares (MEBS; OWNBY, 1990). Estudos demonstram que as serpentes *Bothrops jararaca* possuem baixas quantidades de PLA₂s e miotoxinas (MOURA DA SILVA *et al.*, 1991; CIDADE *et al.*, 2006).

As toxinas classificadas como serino-proteases podem agir sobre a agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003) Dentre os principais componentes desta classe de toxinas encontram-se as serino-protease trombina-símile que podem atuar diretamente na cadeia A α do fibrinogênio levando à liberação do fibrinopeptídeo A, convertendo o fibrinogênio em fibrina (HESSELL; BLOMBACK, 1971).

As toxinas classificadas como lectina tipo C podem possuir atividades pró-coagulantes, anticoagulante, agonista ou antagonista da ativação plaquetária (MORITA, 2004). Entre as toxinas desta classe, destaca-se a botrojaracina, que possui atividade antitrombina (ZINGALI *et al.*, 1993).

As metaloproteases de venenos de serpentes são enzimas zinco-dependentes que podem atuar sobre os fatores II e X da coagulação resultando na formação da trombina endógena levando à coagulopatia de consumo (DENSON; ROUSSEAU, 1970; FURUKAWA E HAYASHI, 1977). Além disso, essas toxinas possuem ação fibrinogenolítica (MARUYAMA *et al.*, 1992; KAMIGUTI *et al.*, 1994) e inibem a agregação plaquetária (KAMIGUTI *et al.*, 1996).

Estudos ainda demonstram que as metaloproteases presentes nos venenos botrópicos são as principais enzimas responsáveis pela resposta inflamatória induzida e ainda estão associadas à hemorragia local e sistêmica observadas no envenenamento (TREBIEN; CALIXTO, 1989; PERALES *et al.*, 1992; STROKA *et al.*, 2005, ZYCHAR *et al.*, 2010). Essas toxinas estão também relacionadas à degranulação de mastócitos, aumento do número de macrófagos, liberação de citocinas, aumento da expressão de moléculas de adesão e ativação do sistema complemento (FARSKY *et al.*, 2000; RUCAVADO *et al.*, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

1.2. Metaloproteases de venenos botrópicos e hemorragia

As metaloproteases isoladas de venenos ofídicos são as responsáveis pelas hemorragias locais observadas nos envenenamentos. Essas toxinas foram

agrupadas na família das SVMP e, de acordo com os seus domínios, foram classificadas em 3 ou 4 classes. A classe P1 possui apenas o pró-domínio e o domínio catalítico; a P2 apresenta o pró-domínio, o domínio catalítico e um domínio disintegrina. A classe P3 apresenta, além destes, um domínio rico em cisteína. Alguns autores apresentam uma classe P4, que possui ainda um domínio tipo lectina, outros a classificam como uma sub-classe das P3 (Figura 4) (RAMOS; SELISTRE-ARAÚJO, 2006; FOX; SERRANO, 2008).

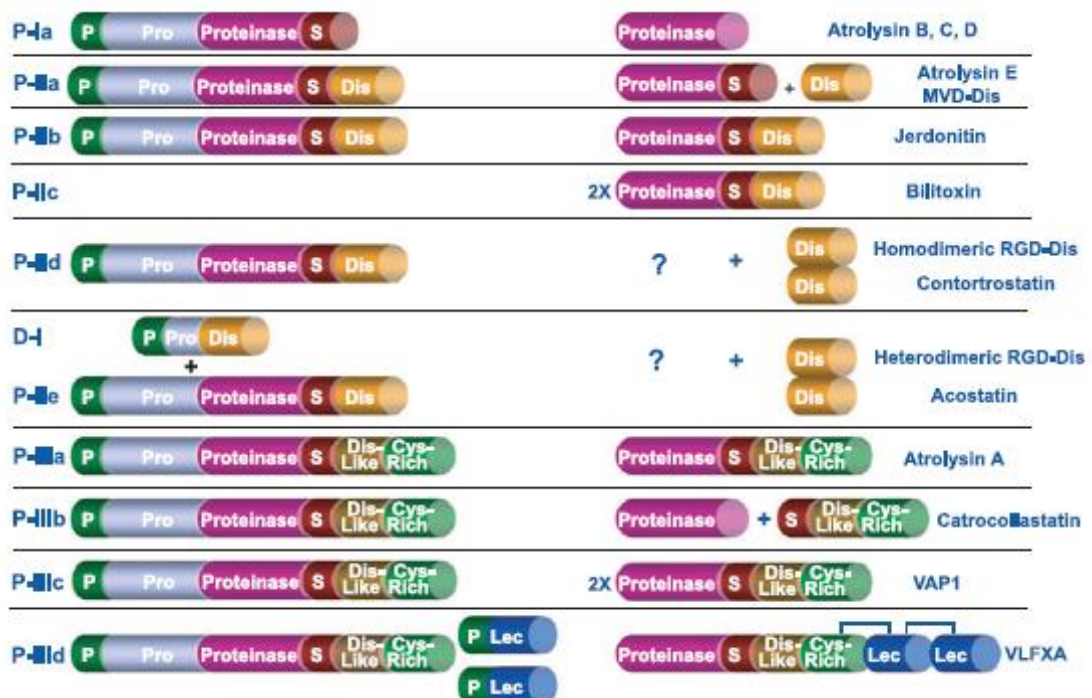


Figura 4. Classes de SVMP de acordo com seus domínios. Figura de Fox e Serrano (2008).

Entre as diversas metaloproteases hemorrágicas foi isolada do veneno de *B. jararaca* (MANDELBAUM *et al.*, 1976; 1982; PAINE *et al.*, 1992; MARUYAMA *et al.*, 1992; 1993) a jararagina (JAR), uma das metaloproteases mais bem caracterizadas (JAR) (PAINE *et al.*, 1992).

A JAR é uma toxina que contém, além do domínio catalítico, um domínio ECD-disintegrina e um domínio rico em cisteína e, portanto, classificada como uma P3. Essa toxina apresenta homologias com uma classe de ADAM (Figura 5), dentre as quais se encontra a TACE (MOURA DA SILVA *et al.*, 1996). A TACE, também chamada de ADAM17 é responsável pela liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α em sua forma solúvel (SCHELLER *et al.*, 2011).

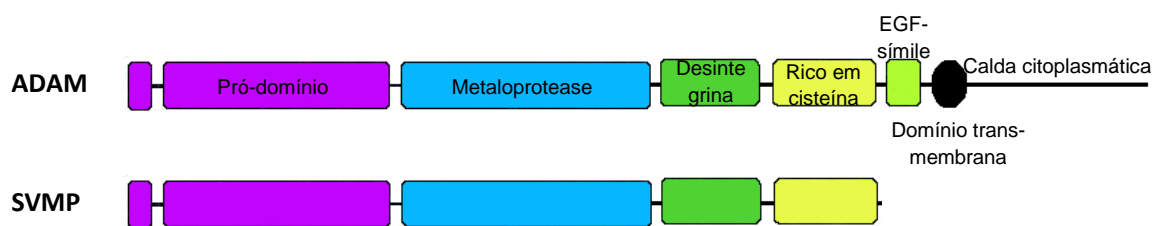


Figura 5. Relação entre a estrutura das ADAM e da SVMP. A figura demonstra a similaridade dos domínios entre ambas onde se diferenciam, pois a ADAM possui o EGF-símile, o domínio transmembrânico e a calda citoplasmática a mais do que a SVMP. EGF=Fator de crescimento epidermal. Figura adaptada de Seals and Courtneidge (2003).

Estudos demonstraram que a JAR pode processar o precursor do TNF- α e induzir a sua liberação endógena. Ao inibir a liberação endógena dessa citocina, inibe-se também a atividade dermonecrosante local promovida pelo veneno (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1996; CLISSA *et al.*, 2001).

1.3. Inibidores de protease: resistência ao veneno ofídico

Alguns mamíferos e serpentes são resistentes às toxinas do veneno de serpentes, isso porque eles possuem inibidores de proteases no seu sangue. Várias proteínas foram isoladas do sangue destes animais sendo descritas como fatores anti-hemorrágicos (DOMONT *et al.*, 1991; TWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998). Esses fatores são glicoproteínas ácidas, termo-resistentes, sem atividade enzimática (DOMONT *et al.*, 1991). Aparentemente inibem especificamente as metaloproteases dos venenos ofídicos através da formação de complexos não covalentes, não atuando sobre serinoproteases (DOMONT *et al.*, 1991; NEVES-FERREIRA, *et al.*, 1997; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998).

O plasma de serpentes *Bothrops jararaca* é rico em inibidores de proteases (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 1995). Do soro dessa serpente foram isoladas proteínas que inibem metaloproteases do veneno de serpentes da mesma espécie (TANIZAKI *et al.*, 1991; VALENTE *et al.*, 2001).

Além destas, um potente inibidor de cisteíno-proteases foi isolado do plasma dessa serpente. Essa proteína foi relacionada ao cininogênio de alto peso molecular encontrado no plasma de mamíferos, uma vez que tinha a massa molecular de 110 kDa, liberava um peptídeo ativo sobre musculatura lisa homóloga, além de ser, como citado acima, um potente inibidor de cisteíno-proteases (CHUDZINSKI *et al.*, 1989). Verificou-se que essa proteína – a qual denominaremos cininogênio de *B.*

jararaca (BjKgn) - foi capaz de inibir atividades do veneno de serpentes da mesma espécie, nas quais metaloproteases estavam envolvidas direta ou indiretamente (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004), entretanto, diferentemente do descrito para outros fatores anti-hemorrágicos, sem a formação de complexos.

Estudando-se uma proteína similar, porém com estrutura e seqüência completamente conhecida, o cininogênio de alto peso molecular humano (HK), verificou-se a presença de atividade inibitória sobre a atividade hemorrágica do veneno total de *Bothrops jararaca* e sobre a JAR (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004), mas não sobre outras metaloproteases de matriz tais como a *Matrix Metalloproteinase 2* (MMP2) e *Matrix Metalloproteinase 9* (MMP9), efeitos até então não descritos para essa proteína. Utilizando peptídeos sintéticos, verificou-se que esse efeito inibitório está relacionado a regiões do domínio 5 do HK (GONÇALVES *et al.*, 2003).

1.4. Cininogênios

Os cininogênios são glicoproteínas ácidas, sintetizadas no fígado e encontradas no plasma humano sob duas formas: o cininogênio de alto e o de baixo peso molecular, HK e LK, respectivamente. Ambos possuem uma cadeia pesada formada por quatro domínios, porém diferem na cadeia leve, que no caso do HK é formada por outros dois domínios e, no de LK é reduzida, como demonstra na figura 6 (KATO *et al.*, 1981).

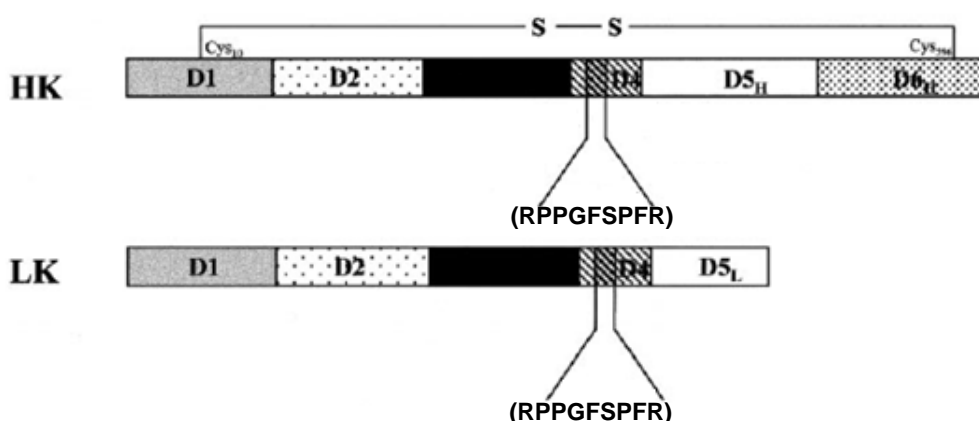


Figura 6. Cininogênio de alto peso molecular (HK) e cininogênio de baixo peso molecular (LK). O HK com 6, domínios D1; D2 (Inibidor de Cisteíno-protease); D3 (1.ligação endotelial;2. Inibidor de cisteíno-pretease, 3.ligação com TSP-1); D4 (bradicinina - RPPGFSPFR); D5 (ligação endotelial; ligação com superfície aniônica); D6 (ligação com fator XI, ligação com pré-caliceína). O LK com os 4 domínios da cadeia pesada D1; D2; D3; D4 e o D5_L, diferente do encontrado no HK. Figura de Zhang e colaboradores (2000).

O cininogênio de alto peso molecular é uma proteína que participa de diversos processos fisiopatológicos, dentre os quais se destacam o sistema de contato, inibição de cisteíno-proteases, inibição de agregação plaquetária (CHAVAKIS *et al.*, 2002A), inibição da adesividade de neutrófilos (COLMAN, 1996; CHAVAKIS *et al.*, 2001), resposta inflamatória pela liberação de bradicinina, dentre outros.

Estas atividades estão distribuídas entre os seis domínios da proteína, quatro domínios da cadeia pesada e dois da cadeia leve. O domínio 1 contém sítios ligantes de cálcio. Os domínios 2 e 3 contêm a sequência QVVAG (Glutamina, Valina, Valina, Alanina e Glicina), altamente conservada em inibidores de cisteíno-proteases, o que confere essa atividade inibitória a estes dois domínios. O domínio 4 contém a bradicinina, que é liberada pela ação proteolítica da calicreína plasmática. O domínio 5 contém sítios ligantes de zinco, em uma região rica em histidina e glicina e juntamente com os domínios 3 e 4 são responsáveis pela ligação da proteína a células endoteliais. Já o domínio 6 contém o sítio de ligação da pré-calicreína e fator XI (Figura 6) (COLMAN, 1994).

1.4.1. O cininogênio e a resposta inflamatória (domínio 5)

Tanto o Fator XII como o cininogênio de alto peso molecular ligam-se a células endoteliais. O fator XII sofre uma autoativação transformando-se em fator XIIa. Este vai ativar a pré-calicreína e o fator XI. A calicreína formada cliva o HK liberando bradicinina e o Fator XIa continua a via intrínseca da coagulação (KAPLAN *et al.*, 2002).

A bradicinina participa do processo inflamatório ativando células endoteliais, levando a vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico e mobilização de ácido araquidônico, além de também estimular terminações nervosas sensitivas causando dor e hiperalgesia. A formação de bradicinina pode resultar no aparecimento dos quatro sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, tumor e dor (LALMANACH *et al.*, 2010).

Além de participar do processo inflamatório agudo com a liberação da bradicinina, o cininogênio, uma vez clivado pela ação de calicreínas, exibe propriedades antiadesiva e antiinflamatória (COLMAN, 1996). Essas propriedades são descritas como relacionadas ao domínio 5 do cininogênio de alto peso

molecular, que possui ainda, propriedades antiangiogênica (COLMAN *et al.*, 2000), anti-trombótica (CHAVAKIS *et al.*, 2002B) antiagregante sobre plaquetas (CHAVAKIS *et al.*, 2002A) e antiinflamatória (CHAVAKIS *et al.*, 2001; COLMAN, 1996) além de inibir a proliferação e de induzir apoptose de células endoteliais (GUO *et al.*, 2001).

Dependendo de sua conformação, se clivado, o cininogênio de alto peso molecular humano funciona ainda como um agonista que pode promover a liberação de citocinas como o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e quimiocinas como a Interleucina-8 (IL-8), (KHAN *et al.*, 2006) e ainda inibir a proliferação de células endoteliais (ZHANG *et al.*, 2000)

Inibidores de metaloproteases têm sido estudados visando a inibição da liberação de TNF- α no tratamento de choque séptico e no tratamento de reações locais de envenenamentos ofídicos (GALLEA-ROBACHE *et al.*, 1997; MORIMOTO *et al.*, 1997; DEKKERS *et al.*, 1999; ESCALANTE *et al.*, 2000; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; MOSS *et al.*, 2001).

Uma vez que o cininogênio de alto peso molecular isolados dos plasmas humano e de *B. jararaca* apresentaram atividade inibitória sobre a jararagina e como essa metaloproteinase pertence à mesma família que a enzima conversora de TNF- α , decidiu-se verificar uma possível ação inibitória do BjKgn sobre a produção de TNF- α avaliando-se, primeiramente, uma possível ação inibitória sobre a TACE *in vitro*. Com o mesmo raciocínio, uma vez que o cininogênio inibe cisteíno-proteinases e a IL-1 β é liberada da superfície celular pela ação da enzima conversora de IL-1 β (ICE), uma cisteíno-proteinase, também verificamos a existência de uma possível influência do cininogênio na produção dessa citocina por macrófagos submetidos aos mesmos estímulos citados acima.

A produção destas citocinas por macrófagos dependem da funcionalidade destas células. Como o cininogênio de alto peso molecular inibe algumas funções de neutrófilos como adesividade e migração (CHAVAKIS *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2002), verificamos os possíveis efeitos inibitórios do BjKgn sobre alguns parâmetros da funcionalidade de macrófagos, tais como: capacidade de espraiamento, fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio e de óxido nítrico.

A utilização do BJKgn nesses experimentos pode dar uma melhor compreensão da estrutura dessa proteína e da preservação de domínios nas proteínas similares encontradas em animais de outras filogenias.

2. OBJETIVOS

Pelo exposto acima, os objetivos do presente trabalho foram:

- Testar possível efeito inibitório do BJKgn sobre as enzimas TACE e ICE;
- Testar o efeito do BJKgn na produção de citocinas (TNF- α e IL-1 β) por células peritoneais aderentes;
- Testar o efeito do BJKgn sobre funções biológicas e metabólicas de células peritoneais aderentes, tais como espraiamento, fagocitose, produção de água oxigenada (H₂O₂) e produção de NO.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

O presente trabalho foi desenvolvido utilizando serpentes *Bothrops jararaca*, machos e fêmeas, fornecidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, São Paulo. Os animais não possuíam peso nem tamanho pré-estabelecidos já que os mesmos foram provindos da natureza.

Foram utilizados, também, camundongos Swiss, machos, pesando entre 18-22g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais permaneceram no Biotério do Laboratório de Fisiopatologia, em ambiente com exatidão apropriada e ciclo claro/escuro (12/12), por pelo menos 1 dia antes dos experimentos, tiveram acesso livre a água e ração peletizada comercial própria para roedores fornecida pelo Biotério Central do Instituto Butantan.

Todos os procedimentos utilizando os animais foram realizados dentro das normas éticas da Sociedade Internacional de Toxinologia e foram submetidos à comissão de Ética de Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), protocolo 894/12.

3.2. Delineamento experimental

Para determinar a possível inibição da proteína BJKgn sobre as enzimas TACE e ICE, bem como a produção de TNF- α e IL-1 β e funções de células peritoneais aderentes, primeiramente purificamos a proteína de interesse (BJKgn) do plasma de serpentes *Bothrops jararaca* e então os seguintes parâmetros foram avaliados:

- *In vitro*

Ação do sobre enzimas TACE e ICE utilizando substratos fluorogênicos para avaliar a cinética enzimática;

- *Ex vivo*

Capacidade de espraiamento e de fagocitose de partículas de zimosan de células peritoneais aderentes estimuladas ou não, i.p., com 4% de tioglicolato, utilizando o N=5 para cada experimento;

Capacidade de produção de H₂O₂ e NO de células peritoneais aderentes estimulados, i.p., com 4% de tioglicolato, utilizando o N=5 para cada experimento;

Produção de TNF- α e IL-1 β sobre influência do BjKgn, utilizando kits de ELISA para a quantificação.

3.3. Coleta do plasma de *Bothrops jararaca*

O sangue de *Bothrops jararaca* foi colhido através de punção na artéria aorta abdominal, após a laparotomia em serpentes *Bothrops jararaca* anestesiadas com pentobarbital sódico (30 mg/kg, via subcutânea). Colhido o sangue, este então foi imediatamente misturado ao citrato de sódio 3,8% (p/v) na proporção de 9 partes de sangue para 1 de anticoagulante e centrifugado a 2000 x g /15 minutos a 4 °C. Logo após a obtenção do plasma, o mesmo foi misturado (1:1. v:v) com um tampão acrescido de inibidores de proteases (0,1 mM de EDTA, 1.0 mM de PMSF, 100 μ g/mL de polibrene, 2,5% de sacarose e 150 mM de NaCl. Todo o procedimento foi realizado em material plástico descartável e o plasma obtido foi aliqotado, congelado rapidamente com gelo seco e mantido a -80 °C até o momento do uso.

3.4. Processos para purificação do BjKgn (*Bothrops jararaca* kininogen)

A purificação do BjKgn se deu conforme descrito por Chudzinski e colaboradores (1989). Antes da purificação da proteína foi realizada a carboximetilação da papaína, preparação da resina de afinidade, acoplamento da papaína carboximetilada à resina e purificação na coluna de afinidade.

3.4.1. Carboximetilação da papaína com ácido iodoacético

A papaína (100mg) foi diluída em 14 ml de tampão de ativação (NaH₂PO₄-0,1 M; L-cisteína-HCl- 2mM; EDTA-1,0mM; DMSO 4%; pH-6,0) e deixada por 30 minutos em temperatura ambiente. Acrescentamos então, 28mg de ácido

iodoacético (10mM) e mantivemos a solução sobre o abrigo da luz por 40 minutos. Assim, a papaína carboximetilada foi dialisada *overnight* contra um tampão carbonato (NaHCO₃-0,1M; NaCl-0,5M).

3.4.2. Preparação da resina e acoplamento da papaína carboximetilada

Realizamos o trabalho utilizando a resina Sepharose 4B ativada por brometo de cianogênio (CNBr) (GE Healthcare). A resina foi lavada com solução HCl (1mM) para a retirada dos aditivos e deixada por 15 minutos para expandir. Após o tempo citado, a resina foi lavada com um tampão de acoplamento (NaHCO₃ -0,1M; NaCl-0,5M; pH-9,5).

A resina foi mantida em contato com a papaína-carboximetilada (CM-papaína) por 2 horas para acoplamento e equilibrada com tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7.0.

3.4.3. Purificação da proteína BJKgn

Uma vez obtida a resina acoplada à CM-papaína, a mesma foi colocada em contato com o plasma de *Bothrops jararaca*, em temperatura ambiente e sob agitação leve por 1 h. Essa resina foi então montada na coluna PD-10 mL (GE Healthcare) e lavada com o tampão de equilíbrio (Tris/HCl 50 mM, pH 7.0.) até que a densidade óptica (DO) chegasse a 0,001nm. Para a medição da DO foi utilizado o aparelho espectrofotômetro – ULTROSPEC 2100 Pro (Amersham Pharmacia Biotech) com o comprimento de onda a 280nm.

O material retido foi eluído por acidificação com KCl/HCl 0.5M, pH 2.0. O pH do eluato foi imediatamente neutralizado com tampão Tris/HCl 1.0 M, pH 8.0 e em seguida dialisado contra salina 0,85%, congelado e mantido a -80 °C.

A homogeneidade do material purificado (BJKgn) foi avaliada por eletroforese em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

3.5. Ação da proteína BJKgn sobre a atividade da TACE (ADAM-17)

A cinética de inibição foi realizada utilizando a TACE recombinante e o substrato fluorescente MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-DPA-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂

(ambos adquiridos da Calbiochem). Para a realização dos testes, foram utilizados 0,02 µg da TACE recombinante em 100 µL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 contendo 5 µM ou 10 µM do substrato. A proteína BJKgn foi utilizada nas concentrações de 4,4 µg, 6,6 µg e 8,8 µg para cada uma das doses de substrato utilizadas. Após um período de incubação de 30 minutos a 37°C da TACE e do BJKgn, o substrato foi adicionado e seguiu-se leitura em fluorímetro (Victor3, Perkin Elmer) utilizando placas opacas de 96 poços e temperatura da reação mantida a 37°C em compartimento termoestabilizado e sob agitação. O fluorímetro foi ajustado para leitura de excitação e emissão em 380 e 460 nm, respectivamente. Controles idênticos foram utilizados, com exceção da adição da TACE. Os cálculos envolvendo os parâmetros cinéticos (K_i) foram realizados utilizando a equação descrita por Dixon no programa GRAFIT para Windows 5.0 (LEATHERBARROW, 1992). O mecanismo de inibição foi determinado através da equação: $V_o/V_i = 1 + [I]/K_{i \text{ aparente}}$
 $//K_i = K_{i \text{ aparente}} / (1 + [S]/K_m)$, sendo o K_m do substrato igual a 19 µM (SEGEL, 1975) e confirmado através do gráfico Cornish-Bowden (SEGEL, 1975). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

3.6. Ação da proteína BJKgn sobre a Jararagina

A cinética de inibição foi realizada utilizando a Jararagina purificada e substrato fluorescente Abz-Pher-Ala-Ser-Ser-Ala-EDDnp. Para a realização dos testes, foram utilizados 0,044 µg da Jararagina em 100 µL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 contendo 5 µM ou 10 µM do substrato. A proteína BJKgn foi utilizada nas concentrações de 2 µg, 3 µg e 4 µg para cada uma das doses de substrato utilizadas. Após um período de incubação de 15 minutos a 37°C da Jararagina e do BJKgn, o substrato foi adicionado e seguiu-se leitura em fluorímetro como descrito acima (Item 3.5.) Como modificação o fluorímetro foi ajustado para leitura de excitação e emissão em 320 e 420 nm, respectivamente. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

3.7. Ação da proteína BJKgn sobre a atividade da ICE (Caspase-1)

Para a realização da cinética de inibição da ICE (0,1 UA, UA = Unidades de Atividade) foram utilizadas duas concentrações do substrato Ac-Tyr-Glu-Val-Asp-

MCA (Ac; acetil, MCA; metilcoumarina) correspondentes a 5 μ M e 10 μ M. (ambos adquiridos da Sigma-Aldrich). A proteína BJKgn foi utilizada em cinco concentrações: 0,5 μ g, 1,0 μ g, 2,0 μ g, 3,0 μ g e 4,0 μ g para cada uma das doses de substrato utilizadas. O tampão utilizado foi o indicado pelo fabricante (50mM Hepes, 50 mM NaCl, 0,1% Chaps, 10mM EDTA, 10mM DTT, 5% glicerina e pH= 7,2). Após um período de incubação de 30 minutos a 37°C da ICE e do BJKgn, o substrato foi adicionado e seguiu-se leitura em fluorímetro como descrito acima (Item 3.5.). Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

3.8. Avaliação sobre a atividade de células peritoneais aderentes

3.8.1. Obtenção de células peritoneais aderentes estimuladas ou não com tioglicolato a 4%

Para a obtenção das células, quando estimulados, camundongos foram injetados i.p. com 1 mL de tioglicolato a 4 % (Sigma-Aldrich) e o exsudato peritoneal colhido após 4 dias. As células residentes foram obtidas diretamente do peritônio sem qualquer tipo de tratamento.

Para a obtenção do exsudato, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Em seguida, após a exposição do peritônio, a cavidade peritoneal dos animais foi lavada com uma injeção de 5.0 ml de Tampão Fosfato de Sódio - PBS (pH= 7,4). Após uma leve massagem no abdômen, o PBS contendo as células peritoneais foi colhido e colocado em tubos. O PBS contendo as células peritoneais foi centrifugado na centrífuga (Eppendorf) a 1100 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1.0 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco) para a realização da contagem total de leucócitos.

A contagem total das células foi realizada utilizando o hemocítmetro de Neubauer com a diluição de 1:2 (80 μ L célula: 80 μ L Turk). As células foram mantidas no gelo até o momento da realização dos experimentos de espraiamento, fagocitose, dosagem de Óxido Nítrico (NO) e dosagem de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3.8.2. Determinação da capacidade de espraio de células peritoneais aderentes residentes ou estimuladas

Avaliamos a capacidade de espraio de células estimuladas ou residentes utilizando $1,0 \times 10^5$ células/100 μ l. Para isso, as células foram aplicadas sobre lamínulas redondas de vidro e mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente, de modo que ocorresse a adesão das células. Em seguida, as lamínulas contendo as células aderentes foram lavadas em PBS e incubadas com meio RPMI 1640 contendo as doses de 0,5 μ g, 1 μ g, 1,5 μ g, 2,0 μ g e 3,0 μ g do BjKgn (grupos tratados) ou contendo apenas o meio (grupo controle) por 1 hora, a 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Após o tempo referido, as lamínulas foram lavadas repetidamente com PBS e fixadas com glutaraldeído a 2,5% por 20 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia com uma solução de glicerol e vedadas com esmalte. A quantidade de células espraídas foi determinada pela contagem total de 200 células, diferenciando em células espraídas ou não espraídas. A análise foi realizada em microscópio de contraste de fase (Leika).

3.8.3. Determinação da capacidade fagocítica de células peritoneais aderentes, residentes ou estimuladas

A capacidade fagocítica foi determinada utilizando células peritoneais residentes ou estimuladas ($1,0 \times 10^5$ células/100 μ l), aderidas e espraídas nas lamínulas. As células foram previamente incubadas, durante o processo de espraio, com o meio RPMI 1640 contendo diferentes doses (0,5 μ g, 1 μ g, 1,5 μ g, 2,0 μ g e 3,0 μ g da proteína BjKgn (grupos tratados) ou apenas com o meio RPMI 1640 (grupo controle) por 1 hora, conforme descrito no item 3.8.1. Após o tempo de incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS e recobertas com zimosan não opsonizado ($1,0 \times 10^6$ partículas/ lamínula diluídos em meio RPMI 1640) e mantidas por 40 minutos, a 37°C, em atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Passado o tempo citado, as lamínulas foram lavadas com PBS, fixadas e coradas com corante Rosenfeld. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia com entellan e analisadas com microscópio de campo claro. Um total de 100 células

foi contado e a quantidade foi determinada pelo número de células que fagocitaram 4 ou mais partículas de zimosan.

3.8.4. Determinação de peróxido de hidrogênio por células peritoneais aderentes estimuladas (H₂O₂).

No presente trabalho, determinamos a produção de peróxido de hidrogênio utilizando as técnicas de Pick e Mizel (1981) e Russo e colaboradores. (1989) com algumas modificações. Para tal, as células foram estimuladas (4×10^5 células/100 μ l), aderidas à placa de cultura de 96 poços de fundo chato por 60 minutos e incubadas com 100 μ L/poço de meio RPMI 1640 ou com meio RPMI 1640 na presença de 3 μ g de BJKgn. Após o período de uma hora de incubação, as células foram suspensas em 100 μ l solução de fenol vermelho (Sigma-Aldrich) e 10 μ l de solução de acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma-Aldrich) (20 ng) foram adicionados nos poços de placa de cultura. A placa foi incubada a 37°C, em atmosfera úmida, por 1 hora e, após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 20 μ l de uma solução de hidróxido de sódio a 1 N. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (SPECTRAmax) em um comprimento de onda de 620 nm, contra um branco constituído por solução de fenol vermelho. Os resultados foram obtidos em densidade óptica e apresentados em nmols de H₂O₂/4 x 10⁵ células. Os ensaios foram realizados em duplicatas e a produção espontânea de peróxido de hidrogênio foi avaliada em células não estimuladas pelo PMA.

3.8.5. Determinação de Óxido Nítrico por células peritoneais aderentes estimulados (NO)

A determinação de óxido nítrico se deu conforme o micro ensaio descrito por Ding e colaboradores (1988) com modificações. A produção de NO foi determinada através da medição de nitrito liberado no sobrenadante de culturas de células peritoneais aderentes. Para tal, células estimuladas (1×10^5 células/ 100 μ L em meio RPMI) foram aderidas à placa de cultura de 96 poços de fundo chato por 60 minutos. Após o período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 100 μ l/poço meio RPMI 1640 (controle) ou com meio RPMI mais a concentração de 3 μ g BJKgn

(tratados) a 37°C, por 1 hora, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Passadas as 1 hora, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e 100 µL de meio RPMI 1640 com ou sem LPS foram adicionados em cada poço da placa e a mesma incubada pelo período de 48 horas. Os sobrenadantes foram transferidos para placa de leitura contendo reagente de Griess (partes iguais de Sulfanilamida 1 % em H₃PO₄ a 5% e α-naftiletilenodiamina 1%) na proporção de 1:1 (v:v). Em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA em 550 nm. Os valores de leitura foram comparados a uma curva padrão de NaNO₂ (de 5 a 60 µM) e os resultados foram expressos em µM de nitrito liberado por 1 x 10⁵ células.

3.8.6. Ação do Bjkgn sobre a TACE e ICE em ex vivo (liberação de TNF-α e IL-1β)

A ação do Bjkgn sobre a TACE e a ICE *in ex vivo* foi realizada utilizando cultura de células peritoneais aderentes, pré estimulados com 4% de tioglicolato por 4 dias. As células (5x10⁵ células/500µL) foram colocadas em placas de 24 poços e deixadas para aderir a 37°C, por 1 hora, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após o tempo citado, as células foram lavadas com PBS e incubadas pelo período de 12 horas. Os grupos experimentais foram os seguintes: controle (contendo apenas as células), LPS (contendo as células e 3µg de LPS). Bjkgn (contendo células e 3µg de Bjkgn) e LPS+Bjkgn (contendo as células, 3µg de LPS e 3µg de Bjkgn). Após 12 horas, o sobrenadante foi coletado e o nível de TNF-α e IL-1β foram mensuradas utilizando um kit de ELISA comercial. Para a dosagem de TNF-α utilizamos o Kit Quantikine ELISA- Mouse TNF-α Immunoassay e para a dosagem de IL-1β utilizamos o Kit Quantikine ELISA- Mouse IL-1β Immunoassay. Ambos os kits foram providos da R&D Systems. Os procedimentos para a dosagem com os kits foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9. Análises estatísticas

A fim de avaliar possíveis diferenças estatísticas entre os grupos tratados (Bjkgn) ou controles (PBS), utilizamos o teste ANOVA de uma via, acompanhada pelo teste Tukey. Esta análise foi realizada pelo programa Graphpad Prism 5.0. Foram consideradas significativas as diferenças com p<0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da purificação do BjKgn

A BjKgn purificada a partir do plasma de serpentes *Bothrops jararaca*, através da cromatografia de afinidade em CM-Papaína Sepharose e avaliada utilizando eletroforese em gel de SDS-PAGE 7,5% demonstrou-se purificada uma vez que apresentou 1 banda de aproximadamente 110kDa (Figura 7).

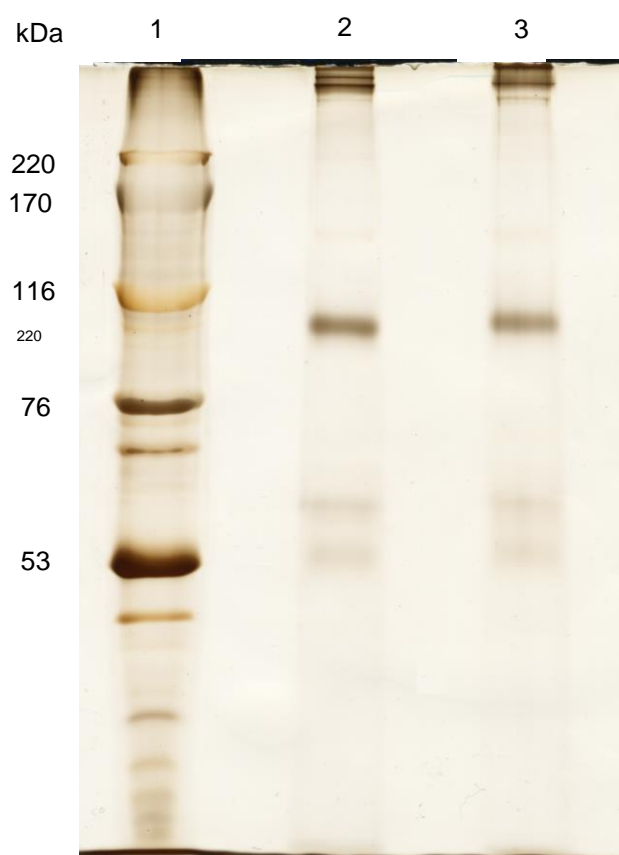


Figura 7. Gel de Eletroforese em SDS-PAGE 7,5%. O gel foi corado por prata: **Linha 1:** padrão de massa molecular (2 μ g), **Linha 2** BjKgn purificada por cromatografia de afinidade (2 μ g), **Linha 3:** BjKgn purificada por cromatografia de afinidade e reduzida com a adição de betamercaptoetanol (2 μ g).

4.2. Ação da proteína BJKgn sobre a atividade da TACE (ADAM-17)

Os resultados demonstram que a proteína BJKgn foi capaz de inibir *in vitro* a atividade da enzima TACE sobre o seu substrato fluorescentes. De acordo com o gráfico de “Dixon Plot” (Figura 8A) e CORNISH-BOWDEN (Figura 8B), essa inibição ocorreu de maneira competitiva uma vez que o intercepto das retas ocorreu no segundo quadrante. O valor da constante de inibição (K_i) foi 22,5 μg . O cálculo do K_i foi realizado utilizando as fórmulas: $V_o/V_i = 1 + [I]/K_{i \text{ aparente}}$ e $K_i = K_{i \text{ aparente}} / (1 + [S]/K_m)$, sendo o K_m do substrato igual a 19 μM (K_m fornecido pela Calbiochem) (Figura 8).

Tomando como peso molecular de 110 kDa para o BJKgn (Figura 7), transformamos o valor de $K_i = 22,5 \mu\text{g}$ para 2 mM.

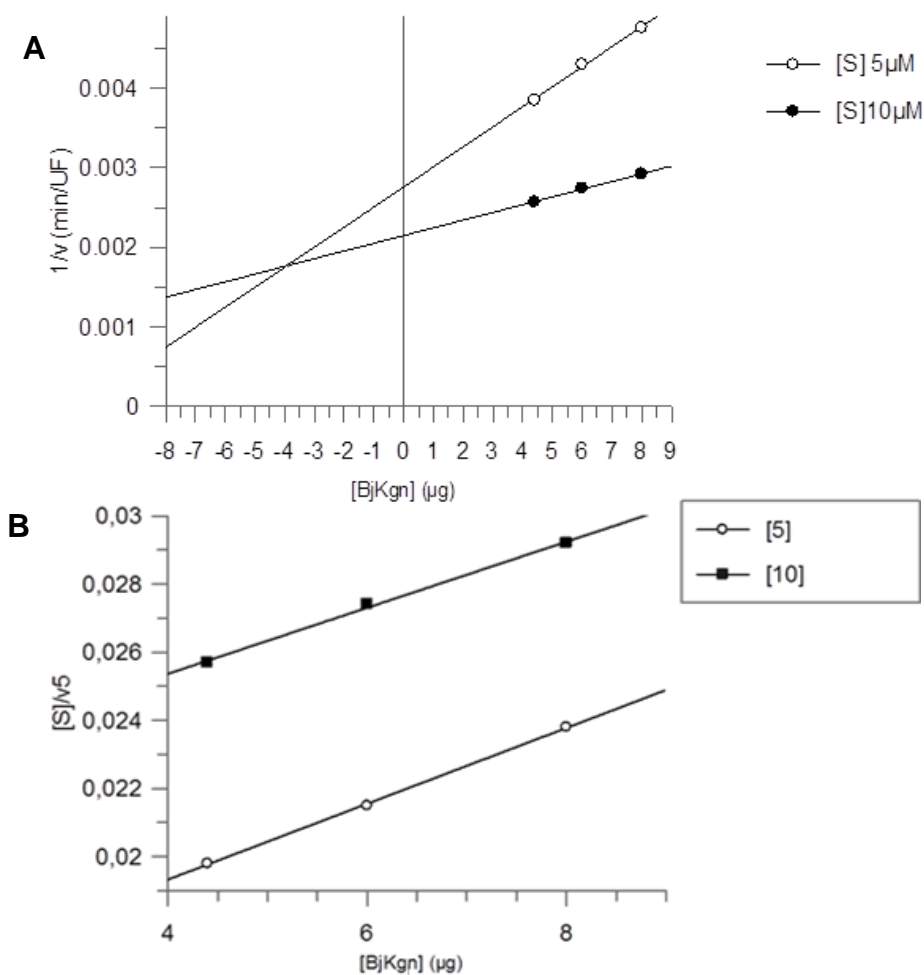


Figura 8. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a TACE. Representação através do gráfico Dixon Plot ($1/V \times [BJKgn]$) em gráfico A e Cornish-Bowden em gráfico B. Utilizamos 0,02 μg da TACE recombinante em 100 μL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 contendo 5 μM ou 10 μM do substrato de TACE (MCA-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-DPA-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂) e 4,4 μg , 6,6 μg e 8,8 μg de BJKgn como inibidor.

4.3. Ação da proteína BJKgn sobre a atividade da Jararagina

Da mesma maneira que para a TACE, os resultados demonstram que a proteína BJKgn também foi capaz de inibir *in vitro* a atividade da enzima Jararagina sobre o seu substrato fluorescentes. De acordo com o gráfico de “Dixon Plot” (Figura 9A), essa inibição ocorreu de maneira competitiva uma vez que o intercepto das retas ocorreu no segundo quadrante. Esse mecanismo pôde ser confirmado através do gráfico de Cornish-Bowden onde foram obtidas retas paralelas (Figura 9 B). O valor da constante de inibição determinada foi de 7,0 μg ($K_i = 7 \mu\text{g}$) e pôde ser calculada após a visualização em “zoom” da área do intercepto (Figura 9).

Tomando como peso molecular de 110 kDa para o BJKgn (Figura 7), transformamos o valor de $K_i = 7,0 \mu\text{g}$ para 0,6 mM.

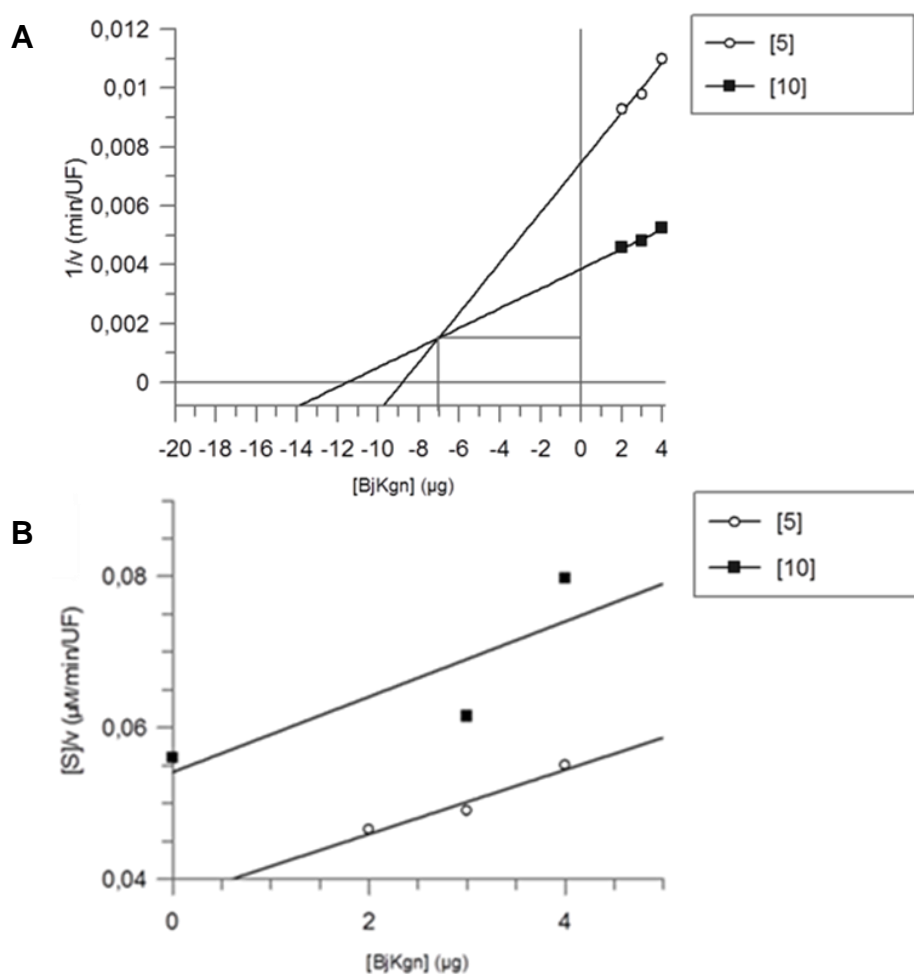


Figura 9. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a Jararagina. Representação através do gráfico Dixon Plot ($1/v \times [BjKgn]$) em gráfico A e Cornish-Bowden em gráfico B. Utilizamos 0,044 μg da Jararagina recombinante em 100 μL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 contendo 5 μM ou 10 μM do substrato de Jararagina (Abz-Pher-Ala-Ser-Ser-Ala-EDDnp) e 2 μg , 3 μg e 4 μg de BJKgn como inibidor.

4.4. Ação da proteína BJKgn sobre a atividade da ICE (Caspase-1)

Assim como para a TACE e a JAR, os resultados indicam que a proteína BJKgn também foi capaz de inibir *in vitro* a ICE, uma cisteíno-protease, sobre o seu substrato fluorescente e que esse mecanismo de inibição é competitivo, uma vez que as retas obtidas apresentaram intercepto simples no segundo quadrante, segundo o gráfico de “Dixon Plot” na figura 10. Esse mecanismo pôde ser confirmado após a realização de um segundo gráfico, o Cornish-Bowden (Figura 11), onde foram obtidas retas paralelas. O valor da constante de inibição determinada foi de 4,2 μg ($K_i = 4,2 \mu\text{g}$) e pôde ser calculada após a visualização em “zoom” da área do intercepto (Figura 10).

Tomando como peso molecular de 110 kDa para o BJKgn (Figura 7), transformamos o valor de $K_i = 4,2 \mu\text{g}$ para 370 μM .

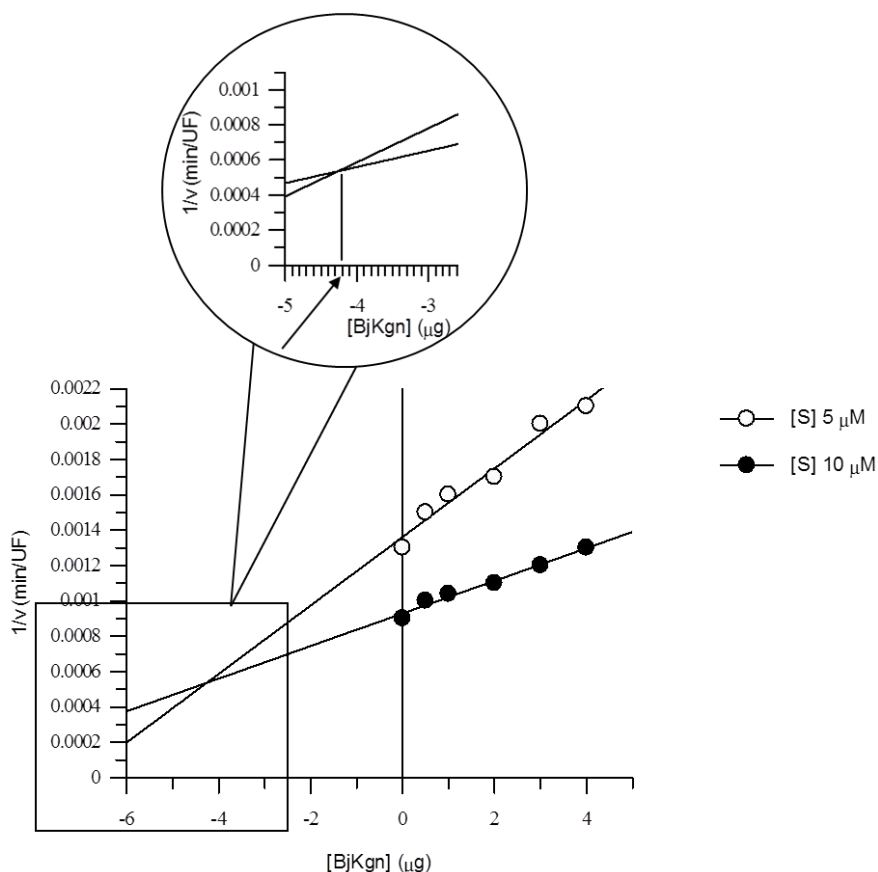


Figura 10. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a ICE. Representação por gráfico Dixon Plot ($1/V \times [BJKgn]$). Utilizamos 0,1 UA de ICE, 5 μM e 10 μM de MAC-Tyr-Glu-Val-Asp-MCA como substrato e 0 μg , 0,5 μg , 1 μg , 2 μg , 3 μg e 4 μg de BJKgn como inibidor. O valor da constante de inibição (K_i) foi o valor obtido com o rebatimento do intercepto das curvas no eixo X ($K_i = 4,2 \mu\text{g}$) como mostrado no zoom.

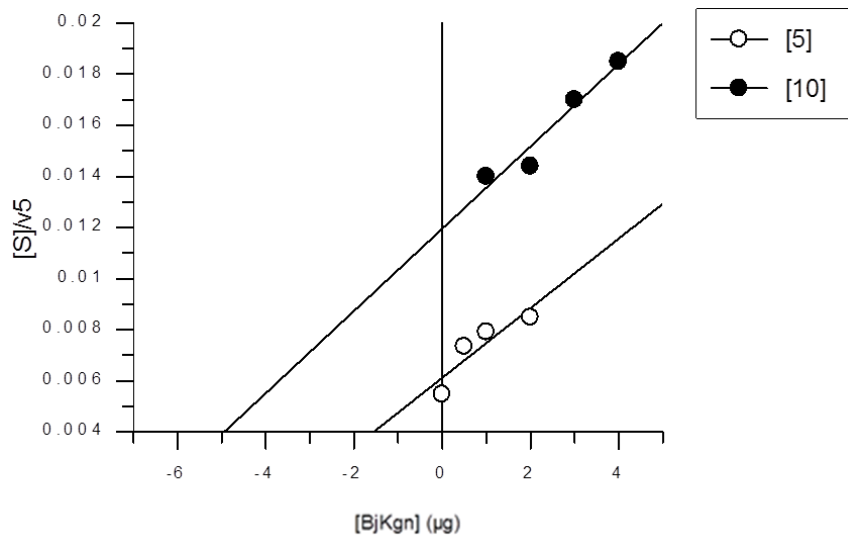


Figura 11. Gráfico representando o mecanismo de inibição do BJKgn sobre a ICE. Representação por gráfico CORNISH-BOWDEN. Utilizamos 0,1 UA de ICE, 5µM e 10µ de MAc-Tyr-Glu-Val-Asp-MCA como substrato e 0 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg e 4 µg de BJKgn como inibidor.

4.5. Efeito do BJKgn sobre a capacidade de espraiamento de células peritoneais aderentes e residentes

De acordo com os resultados obtidos, a proteína BJKgn parece não influenciar no desempenho da função de espraiamento das células, já que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados (0,5 µg; 1,0 µg; 1,5 µg; 2,0 µg; 3,0 µg BJKgn) e o controle (Figura 12). Cabe ressaltar que a Figura 13 é representativa do grupo controle, uma vez que não houve diferenças estatísticas de espraiamento em relação aos outros grupos estudados.

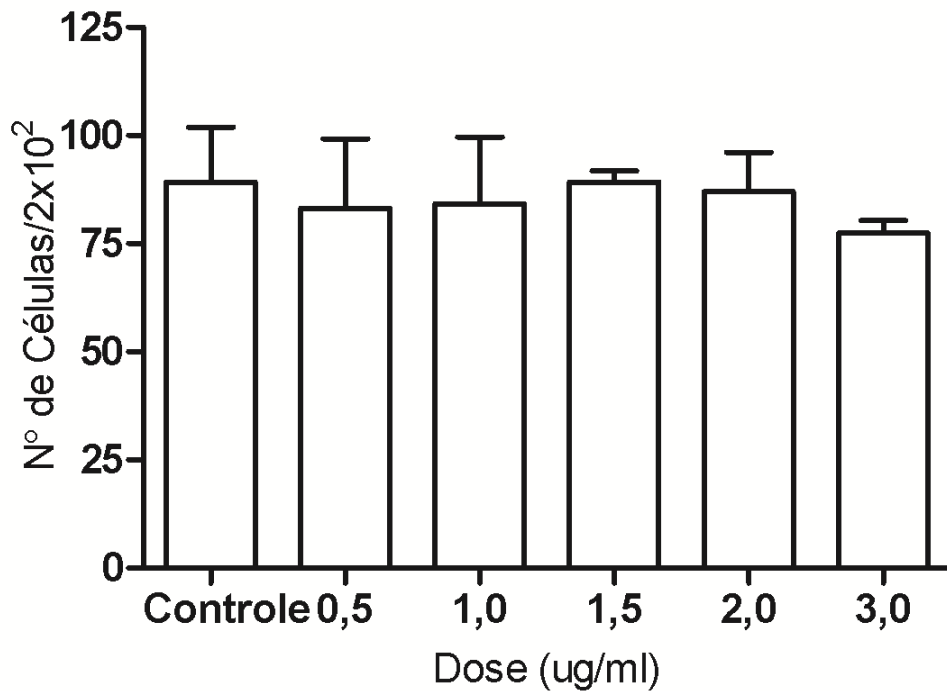


Figura 12. Número de células aderentes residentes do peritônio espreiadas após o tratamento de 1 hora com a proteína BjKgn. As células foram incubadas por 1 hora apenas com o meio de cultura RPMI 1640 nos grupos controles e nos tratados, as células foram incubadas com o meio citado mais a adição de 0,5µg, 1,0µg, 1,5µg, 2,0µg ou 3,0µg da proteína BjKgn. A quantidade de células espreiadas foi determinada pela contagem total de 200 células em campos aleatórios. Os resultados correspondem à média ± e.p.m. (n=5).

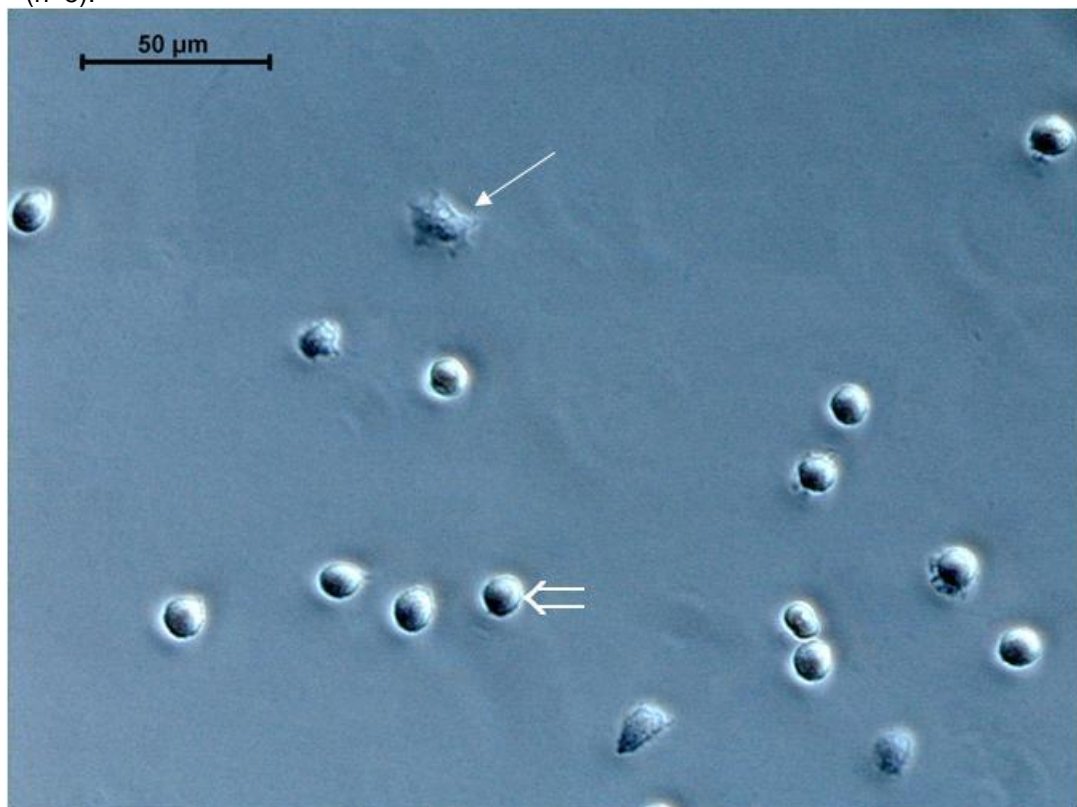


Figura 13. Espreiamento de células peritoneais aderentes. A seta (←) indica uma célula espreiada e a seta (⇐) indica uma célula não espreiada. Foto representativa do grupo controle.

4.6. Efeito do BjKgn sobre a capacidade de espraio de células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato

Da mesma forma que para as células residentes, a capacidade de espraio, mesmo após o estímulo com o agente flogístico, a capacidade de espraio das células não foi afetada pelo tratamento da proteína em nenhuma das doses avaliadas quando comparado ao controle (Figura 14).

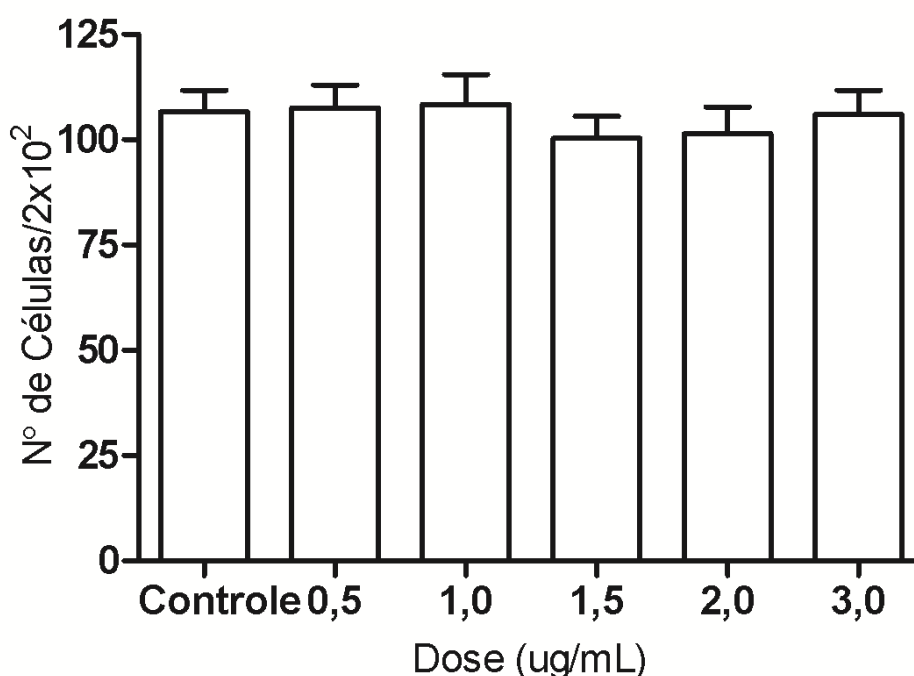


Figura 14. Número de células estimuladas espraídas. As células estimuladas com 4% de tioglicolato 4 dias antes da coleta foram incubadas por 1 hora apenas com o meio de cultura RPMI 1640 nos grupos controles e nos tratados, as células foram incubadas com o meio citado mais a adição de 0,5µg, 1,0µg, 1,5µg, 2,0µg ou 3,0µg da proteína BjKgn. A quantidade de células espraídas foi determinada pela contagem total de 200 células em campos aleatórios. Os resultados correspondem à média ± e.p.m. (n=5).

4.7. Efeito do BJKgn sobre a capacidade fagocítica de células peritoneais aderentes residentes

Os resultados sugerem que a proteína não influenciou na capacidade fagocítica, uma vez que os dados estatísticos não demonstraram significância quando comparados os grupos tratados ao controle (Figura 15). A Figura 16 ilustra células aderentes peritoneais que fagocitaram ou não partículas de zimosan.

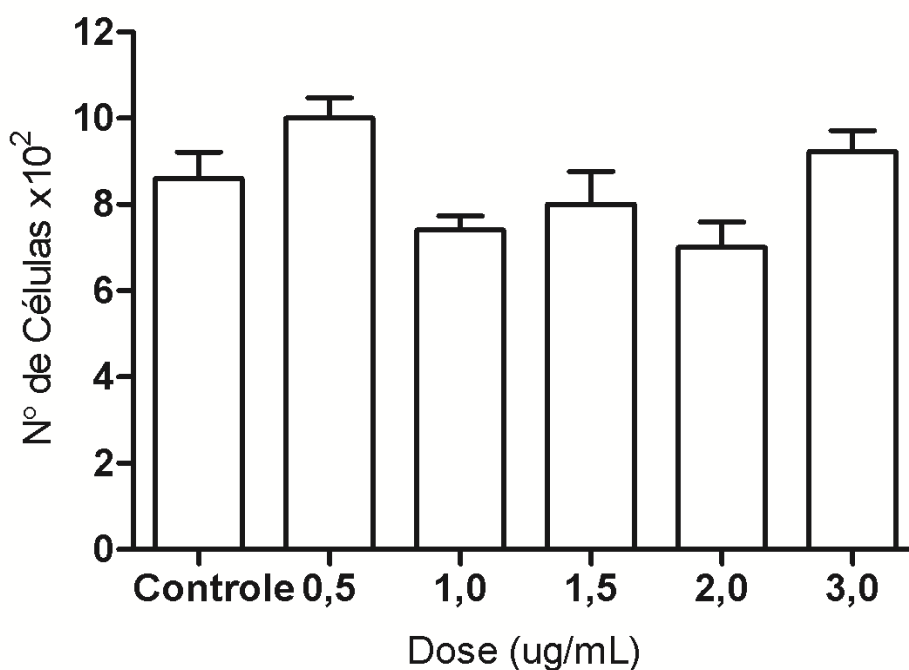


Figura 15. Número de células aderentes residentes que fagocitaram 4 ou mais partículas de zimosan após contato por uma hora com a proteína BJKgn. No grupo controle, as células foram incubadas apenas com o meio de cultura RPMI 1640 e nos grupos tratados, as células foram incubadas com o meio citado mais a adição de 0,5µg, 1,0µg, 1,5µg, 2,0µg ou 3,0µg da proteína BJKgn. Um total de 100 células foi contado e a quantidade de células determinada pelo número de células que fagocitaram 4 ou mais partículas de zimosan. Os resultados correspondem a média ± e.p.m. (n=5).



Figura 16. Células peritoneais aderentes que fagocitaram ou não zimosan. A seta indica um célula que fagocitou 5 partículas de zimosan. Os grupos não foram distinguidos como tratado ou controle, uma vez que não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Foto representativa do grupo controle.

4.8. Efeito do BJKgn sobre a capacidade fagocítica de células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato

Mesmo após serem estimuladas com o tioglicolato a 4%, as células não demonstraram alterações em suas funções fagocíticas após o contato com diferentes concentrações de BJKgn (Figura 17).

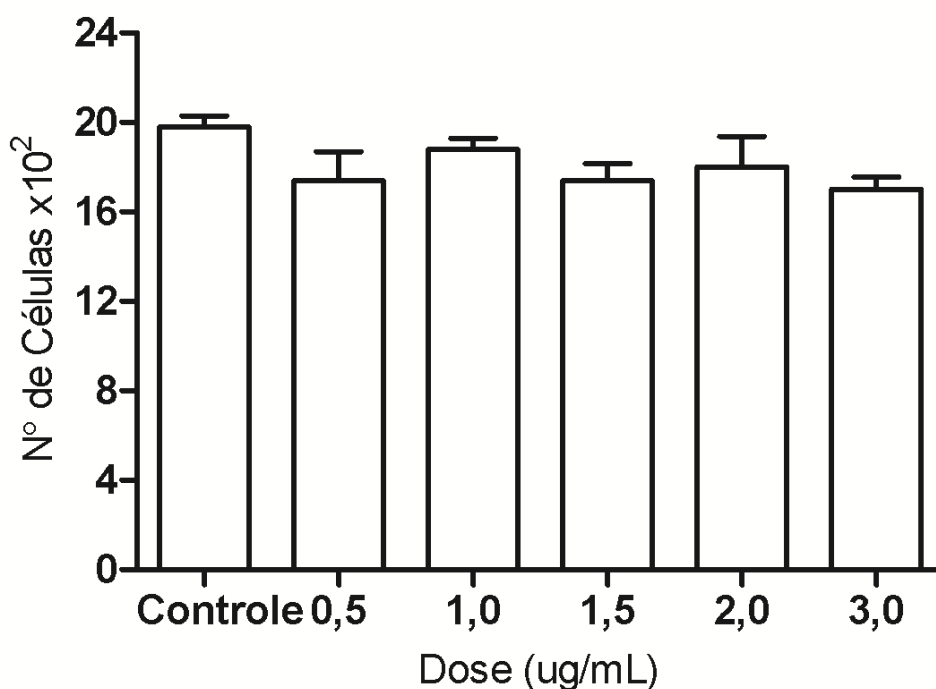


Figura 17. Número de células estimuladas que fagocitaram 4 ou mais partículas de zimosan após estímulo por uma hora com a proteína BJKgn. No grupo controle, as células foram incubadas apenas com o meio de cultura RPMI 1640 e nos grupos tratados, as células foram incubadas com o meio citado mais a adição de 0,5µg, 1,0µg, 1,5µg, 2,0µg ou 3,0µg da proteína BJKgn. Um total de 100 células foi contado e a quantidade de células determinada pelo número de células que fagocitaram 4 ou mais partículas de zimosan. Os resultados correspondem à média ± e.p.m. (n=5).

4.9. Efeito do BjKgn sobre a produção de peróxido de hidrogênio H₂O₂ por células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato.

A proteína BjKgn aparentemente não influencia na produção de H₂O₂ por células aderentes peritoneais obtidos de grupos estimulados ou não com PMA, como demonstra na figura 18.

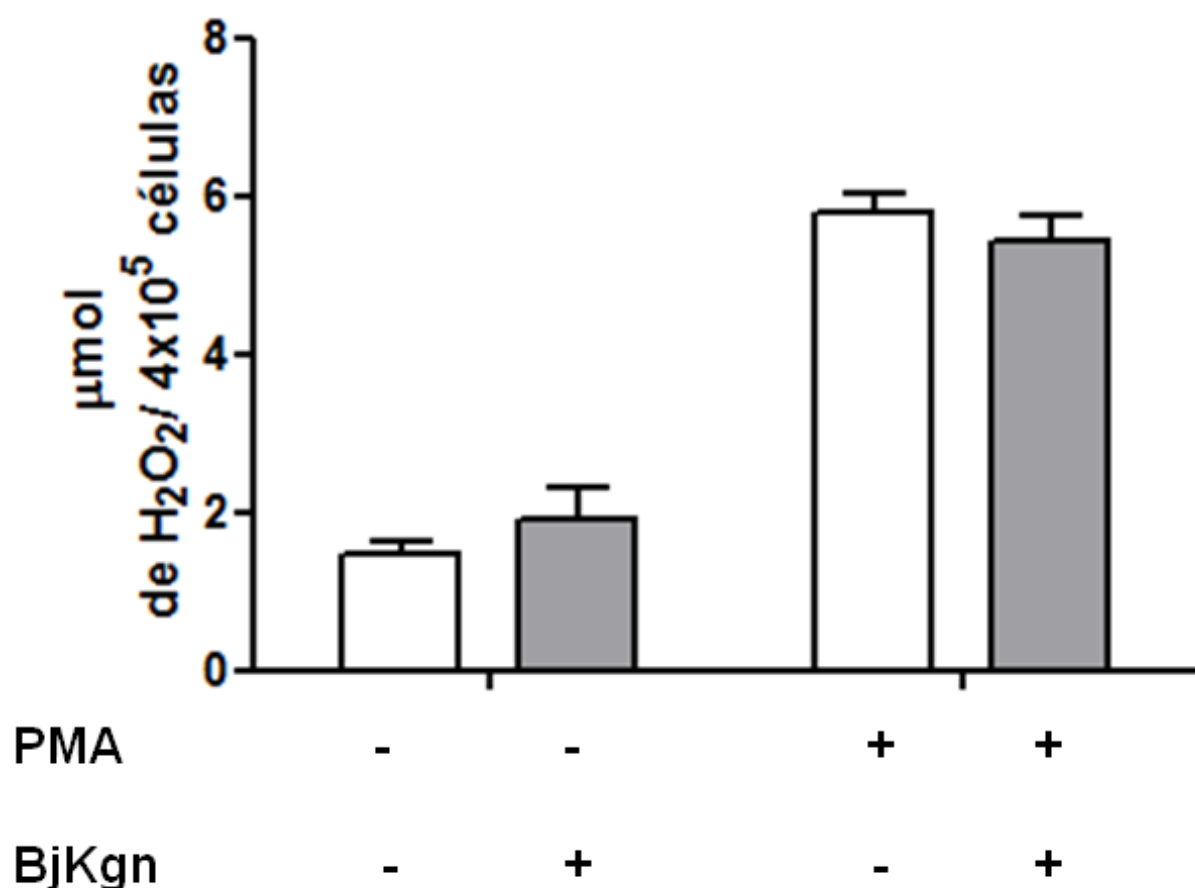


Figura 18. Efeito do BjKgn sobre a liberação de Peróxido de Hidrogênio por células peritoneais aderentes previamente estimuladas com tioglicolato a 4%, e posteriormente estimulados ou não com o PMA. As células foram coletadas da cavidade peritoneal de camundongos, após o período de 4 dias da injeção i.p. (intraperitoneal) com tioglicolato a 4%. O tratamento das células com o BjKgn (3μg) foi de 1 hora. O (+) representa a presença do PMA ou do BjKgn e o (-) representa a ausência das mesmas. Os resultados expressam média e.p.m. de 5 animais.

4.10. Efeito do BJKgn sobre a produção de Óxido Nítrico por células peritoneais aderentes previamente estimuladas com 4 % de tioglicolato.

De acordo com o gráfico abaixo (Figura 19), a proteína BJKgn não influenciou na produção de NO nos grupos estimulados ou não com LPS quando comparado ao controle sem a proteína.

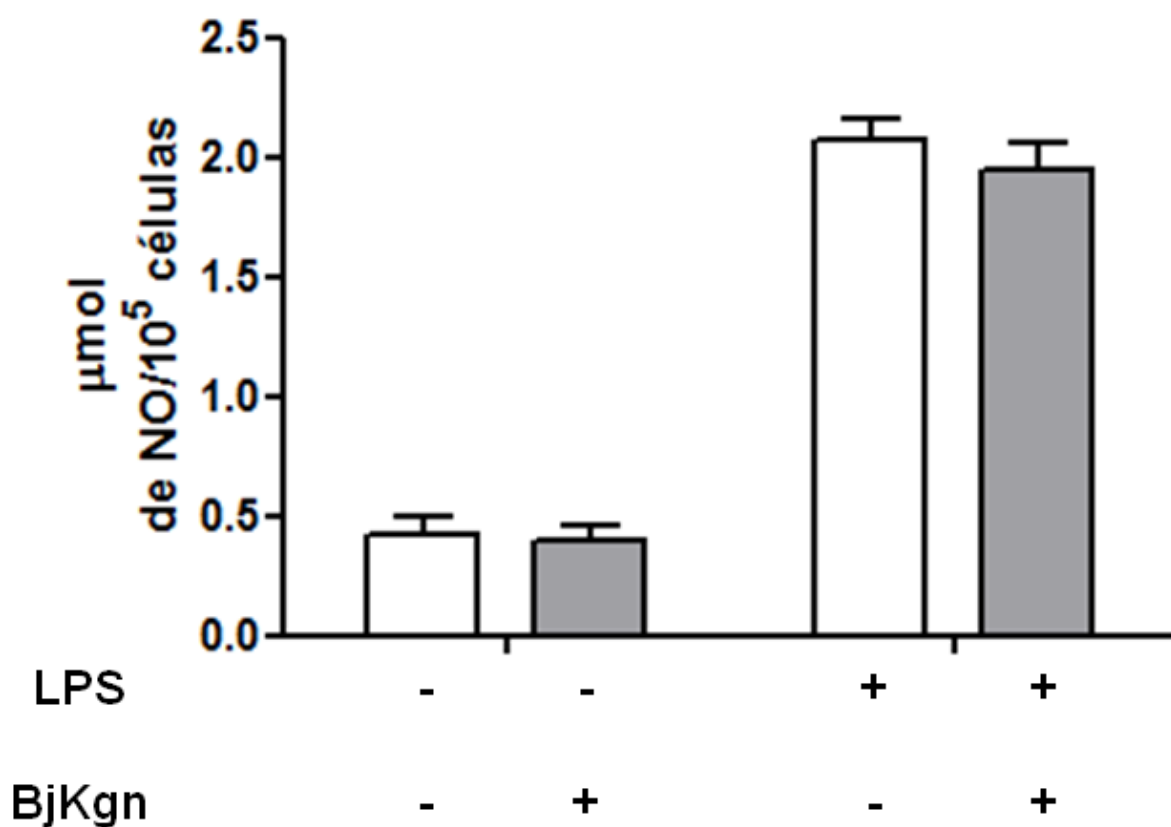


Figura 19. Efeito do BJKgn sobre a liberação de óxido nítrico por células peritoneais aderentes previamente estimulados com tioglicolato 4%, posteriormente estimulados ou não com LPS. As células foram coletadas da cavidade peritoneal de camundongos, após o período de 4 dias da injeção i.p. (intraperitoneal) com tioglicolato a 4%. As células permaneceram em contato com o BJKgn ($3\mu\text{g}$) por de 1 hora. Os resultados correspondem à média \pm e.p.m. ($n=5$).

4.11. Ação do BJKgn sobre a liberação de TNF- α e IL-1 β em *ex vivo*

Como podemos observar nas figuras 20 e 21, o BJKgn não inibiu e nem estimulou a liberação de TNF- α e IL-1 β , uma vez que não há diferenças estatísticas do grupo com a presença da proteína quando comparado ao grupo sem a mesma. Podemos observar que com a presença do LPS houve um aumento significativo de liberação de citocinas, porém ao comparar o grupo LPS ao grupo LPS+BJKgn, não observamos diferenças. Demonstrando assim que a proteína não influenciou, ao menos na dose de 3 μ g, a liberação de TNF- α e IL-1 β .

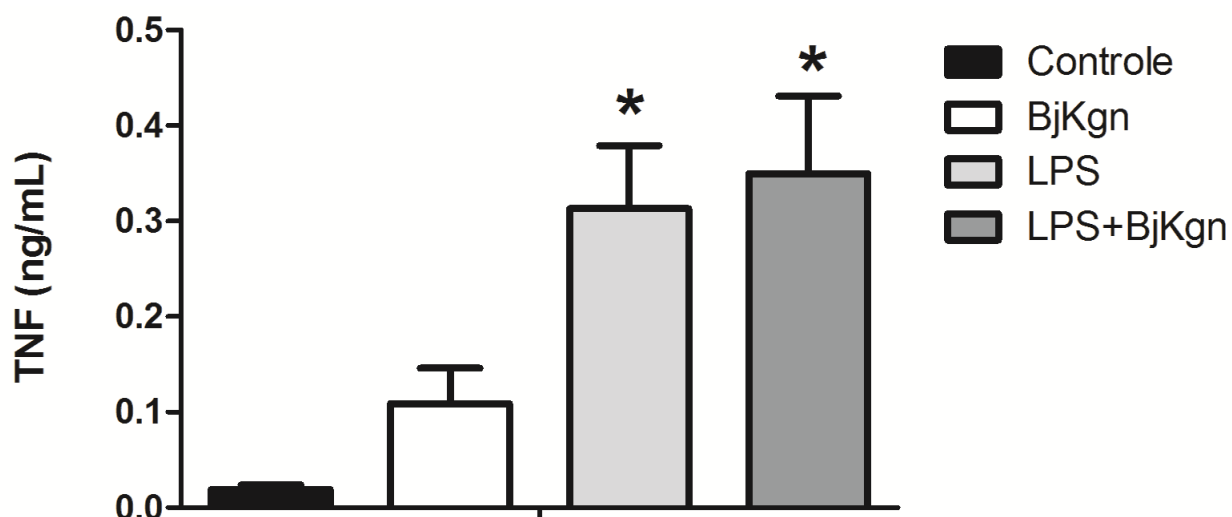


Figura 20. Efeito do BJKgn sobre a liberação de TNF- α por células peritoneais aderentes estimuladas com 4% de tioglicolato por 4 dias. As células estimuladas com 4% de tioglicolato foram incubadas por 12 horas na presença ou não de BJKgn (3 μ g) e/ou LPS (3 μ g) e seu sobrenadante foi mensurado utilizando o kit de ELISA. Os resultados correspondem à média \pm e.p.m. (n=5).

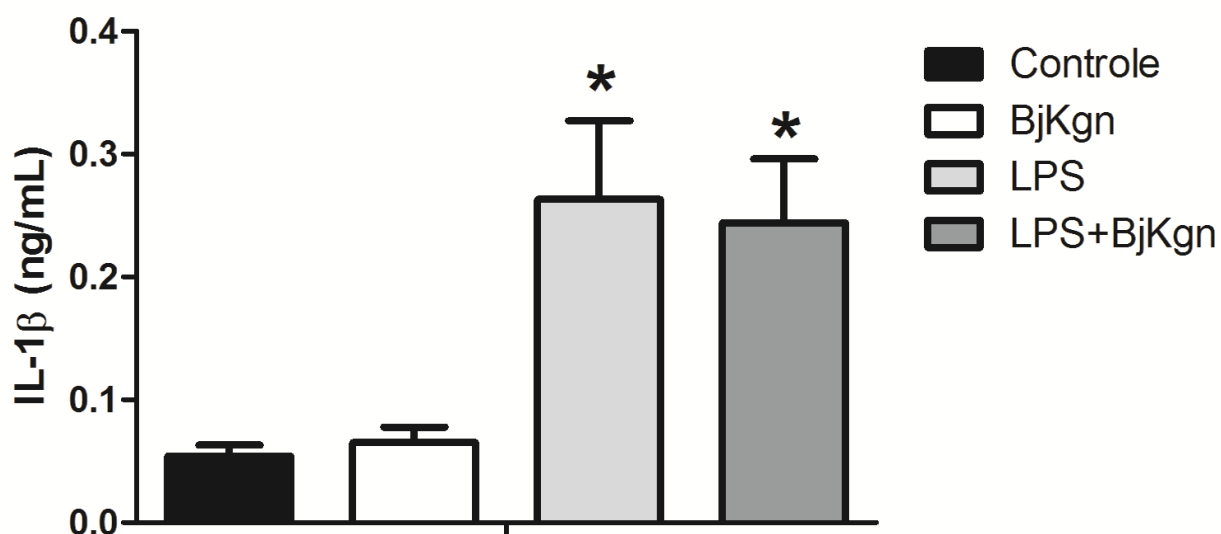


Figura 21. Efeito do BjKgn sobre a liberação de IL-1 β por células peritoneais aderentes estimuladas com 4% de tioglicolato por 4 dias. As células estimuladas com 4% de tioglicolato foram incubadas por 12 horas na presença ou não de BjKgn (3 μ g) e/ou LPS (3 μ g) e seu sobrenadante foi mensurado utilizando o kit de ELISA. Os resultados correspondem à média \pm e.p.m. (n=5).

5. DISCUSSÃO

O plasma de serpentes *Bothrops jararaca* é rico em inibidores de proteases (CHUDZINSKI-TAVASSI *et al.*, 1995). Estudos anteriores, demonstraram que uma proteína isolada do plasma dessas serpentes, o BjKgn, inibe atividades do veneno de serpentes da mesma espécie, particularmente aquelas em que metaloproteases estavam envolvidas (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004). Essa proteína apresenta características relacionadas ao cininogênio de alto peso molecular presente no plasma de mamíferos, como por exemplo, apresentar massa molecular de 110 kDa, ser um potente inibidor de cisteíno-proteases e liberar peptídeos farmacologicamente ativos sobre musculatura lisa homóloga (CHUDZINSKI *et al.*, 1989). Tanto o BjKgn como o cininogênio de alto peso molecular isolado do plasma humano apresentam atividade inibitória sobre a jararagina (JAR), uma metaloprotease hemorrágica isolada do veneno de serpentes *Bothrops jararaca* (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004).

A JAR apresenta similaridades com a TACE, e também é capaz de processar o pró-TNF- α (MOURA DA SILVA *et al.*, 1996). Assim sendo, testamos nesse trabalho se o BjKgn também possuiria atividade inibitória sobre a TACE. Em experimentos de cinética enzimática, verificamos que o BjKgn inibe a TACE, atuando como um inibidor competitivo e com um K_i de 2 mM. Essa atividade inibitória foi menor do que a observada na inibição de JAR ($K_i = 600 \mu\text{M}$), porém com o mesmo mecanismo de inibição.

Comparando-se ao cininogênio de alto peso molecular humano (HK), o BjKgn foi menos eficiente na inibição da JAR. O HK inibe a JAR por um mecanismo do tipo misto, com um K_i de $1,5 \mu\text{M}$, sem a formação de complexos entre protease-inibidor (GONÇALVES *et al.*, 2003). O BjKgn também não forma complexo com a JAR (GONÇALVES; CHUDZINSKI-TAVASSI, 2004), porém isso não foi analisado no presente trabalho na interação BjKgn e TACE.

De forma análoga, a pró-IL1 β é processada por uma protease da família das caspases, a ICE (Interleukin 1 β -converting enzyme), uma cisteíno-protease também envolvida no processo da apoptose (SINGER *et al.*, 1995; LOPEZ-CASTEJON;

BROUGH, 2011). Entretanto, diferentemente do que ocorre com o TNF- α , esse processamento se dá no meio intracitoplasmático (SINGER *et al.*, 1995).

Como a base de purificação do BjKgn é sua atividade inibitória sobre cisteíno-proteases, testamos se essa proteína também apresenta atividade inibitória sobre ICE.

Verificamos que a proteína BjKgn foi capaz de inibir, *in vitro*, a enzima ICE, precursora da IL-1 β . A inibição do BjKgn sobre a ICE ocorreu de maneira competitiva, com a constante de inibição (K_i) de 4,2 μ g (370 μ M). Esse dado corrobora com estudos descritos por Sanson (2012), que verificou a inibição também competitiva do BjKgn sobre a papaína. Embora apresentassem os mesmos mecanismos de inibição, o BjKgn foi menos efetiva em inibir a ICE (K_i = 370 μ M) em relação a papaína (K_i = 34,5 μ M). É importante ressaltar que os inibidores mais potentes para o bloqueio destas proteases são compostos orgânicos sintéticos de baixa massa molecular, especialmente desenhados para a inibição da TACE ou da ICE. Ao contrário, a BjKgn é uma macromolécula natural capaz de inibir as duas proteases de importância fisiopatológica simultaneamente.

A utilização das porções específicas do BjKgn responsáveis pela inibição dessas proteases pode resultar em uma inibição mais efetiva, com constantes de inibição mais baixas. Infelizmente, até o presente momento não conhecemos a estrutura do BjKgn. Análises por espectrometria de massas indicaram que essa proteína poderia ser uma forma complexada (dimérica ou trimérica) da proteína Bj46a (SANSON, 2012). Entretanto, novas análises sugerem se tratar de uma proteína inédita (dados não publicados). Por essa razão, consideramos a massa molecular de 110 kDa para o cálculo das constantes de inibição obtidas no presente estudo.

Novos experimentos para definir a estrutura da proteína BjKgn já estão em andamento em nosso laboratório.

No HK, os domínios responsáveis pela inibição dessas classes de proteases estão localizados, respectivamente nos domínios 2 e 3, para cisteíno proteases (DELA-CADENA; COLMAN, 1992) e no domínio 5, para metaloproteínases (GONÇALVES *et al.*, 2003; NORDAHL *et al.*, 2005).

Várias evidências sugerem que a inibição de proteases processadoras de citocinas, como a TACE e a ICE, pode resultar em uma diminuição na produção das

respectivas citocinas processadas (TNF- α e IL-1 β), diminuindo os sinais e sintomas inflamatórios em diversos modelos experimentais (LE; ABBENANTE, 2005).

Assim, uma vez que tanto o TNF- α como a IL-1 β são secretadas por macrófagos (KUMAR *et al.*, 2005) e essa secreção depende do processamento dessas citocinas pela TACE e pela ICE, respectivamente, verificamos no presente trabalho se o BJKgn afetaria a produção dessas citocinas por células peritoneais estimuladas por LPS.

Antes disso, verificamos se essa proteína não afetaria alguma das atividades biológicas próprias de macrófagos. Nossos resultados mostram que o BJKgn não alterou a capacidade de espraiamento e de fagocitose em células peritoneais residentes, ou estimuladas com tioglicolato. Verificamos ainda, que não houve alteração da produção e secreção de H₂O₂ e NO nessas células.

Apesar de não termos realizado testes específicos para esse fim, nossos resultados indicam que, pelo menos nas concentrações utilizadas, o BJKgn não alterou a viabilidade destas células.

Estudos demonstram que a porção C-terminal da proteína S100A9, que apresenta atividade inibitória sobre metaloproteases (DALE *et al.*, 2004), foi capaz de inibir o espraiamento e a capacidade fagocítica de macrófagos, mediada por vários receptores (PAGANO *et al.*, 2005). Cabe ressaltar que essa porção da proteína S100A9 apresenta uma similaridade importante com a região rica em histidina e glicina da cadeia leve do cininogênio de alto peso molecular humano (HESSIAN *et al.*, 1995) que é a região responsável pela inibição de JAR (GONÇALVES *et al.*, 2003)

Em nossos experimentos verificamos apenas a fagocitose mediada por receptores do tipo Toll-like. Por isso, a observação de que o BJKgn não alterou a capacidade fagocítica de células do exsudato peritoneal não pode ser estendida para a fagocitose mediada pelos outros tipos de receptores, como o Fc, C3b e manose.

Apesar de não ter alterado essas atividades destas células do exsudato peritoneal, verificamos anteriormente que o BJKgn é capaz de inibir as alterações de interações leucócito-endotélio induzidas por metaloproteases isoladas de venenos botrópico na microcirculação do músculo cremaster de camundongos, efeito este relacionado principalmente à atividade inibitória sobre a atividade enzimática dessas toxinas (ZYCHAR *et al.*, 2011).

Uma vez verificado que o BjKgn não alterou a fisiologia dessas células do exsudato peritoneal, investigamos se essa proteína alteraria a produção de TNF- α e IL-1 β por estas células.

Nossos resultados mostraram que, pelo menos nas condições utilizadas, a BjKgn não alterou a produção dessas citocinas nas células peritoneais após estímulo *in vitro* com LPS.

Estudo com a porção C-terminal da proteína S100A9 demonstrou uma inibição de TNF- α por parte de macrófagos após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos (DE-LORENZO *et al.*, 2010). Por outro lado, o HK humano, apesar de, como citado anteriormente, apresentar domínios com atividade inibitória sobre cisteína e metaloproteases, quando clivado para a liberação da bradicinina pela calicreína plasmática, é capaz de estimular a liberação de citocinas como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 pela ligação a diversos receptores de monócitos (KHAN *et al.*, 2006).

Essa ausência de inibição, tanto das propriedades fisiológicas dessas células, quanto da secreção de citocinas processadas por proteases, observada após a incubação com o BjKgn pode ter vários motivos.

O primeiro seria uma real ausência dessa atividade inibitória por parte dessa proteína. Entretanto, os resultados *in vitro* do presente trabalho e outros resultados obtidos anteriormente em experimentos *in vivo* (ZYCHAR *et al.* 2011), poderiam resultar em uma atividade inibitória, mesmo que mínima. A utilização de uma maior concentração de BjKgn poderia auxiliar a esclarecer esse ponto.

Outro motivo seria o tamanho da molécula. Com 110 kDa, apesar de não se conhecer a estrutura tridimensional da proteína, essa poderia dificultar o contato com os sítios catalíticos das enzimas e com os receptores das células. Contra esse argumento, temos que o HK humano, dependendo de sua conformação estrutural, com cadeia única, ou dupla, após clivagem pela calicreína plasmática, pode se ligar a células por alguns receptores e inibir, por exemplo, a adesão de neutrófilos (CHAVAKIS *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2002). Sabe-se também que o HK liga-se a macrófagos, de forma zinco dependente (BARBASZ *et al.*, 2008).

Por se tratar de uma proteína de um réptil e termos utilizado células de mamíferos, o reconhecimento de receptores e a consequente ligação podem ter ficado dificultados. Na verdade, não sabemos se o BjKgn se liga às células do exsudato peritoneal utilizadas, ou se ligaria com uma especificidade maior à células

provenientes de répteis. Embora, no que diz respeito à algumas citocinas e seus receptores, haja uma certa conservação filogenética (GLINSKI; BUCZEK, 1999).

O melhor conhecimento da estrutura do BJKgn poderá esclarecer alguns desses pontos. Por ser uma glicoproteína plasmática, inibidor de cisteíno-proteases (CHUDZINSKI *et al.*, 1989) e com mais de um domínio, o BJKgn poderia ser classificada como uma cistatina do tipo 3 (LEE *et al.*, 2009). Essa classe de inibidores endógenos de proteases está envolvida em vários processos fisiopatológicos, como a atividade antibacteriana, controle da coagulação sanguínea e agregação plaquetária, angiogênese e crescimento de tumores (LEE *et al.*, 2009).

Vários estudos relacionados à TACE, ICE e seus inibidores vêm sendo realizados visando uma reação anti-inflamatória para o tratamento de algumas doenças inflamatórias (LE; ABBENANTE, 2005). Doenças como Artrite Reumatóide, Doença de Crohn, Psoríase, Choque Séptico, Inflamação Pulmonar Esclerose múltipla Câncer de Mama, Câncer de Cólon, Carcinoma Hepatocelular, Câncer no Fígado Carcinoma Pancreático, Câncer de Próstata, Câncer Renal, são doenças inflamatórias relacionadas com a expressão de TACE e ICE com liberação de TNF- α e IL-1 β (OHTA *et al.* 2001; CESARO *et al.*, 2009; KAWAGUCHI *et al.*, 2007; HORIUCHI *et al.*, 2007; JU *et al.*, 2007; SEIFERT *et al.*, 2002; LENDECKEL *et al.*, 2005; BLANCHOT-JOSSIC *et al.*, 2005; DING *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2006; RINGEL *et al.*, 2006; KARAN *et al.*, 2003; ROEMER *et al.*, 2004). A realização de trabalhos a fim de inibir essas enzimas e desenvolver drogas terapêuticas que melhorem as condições das doenças citadas deve ser promissora para o futuro.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os argumentos apresentados nas sessões acima, podemos concluir que o BJKgn possui a capacidade de inibição sobre as proteínas TACE, JAR e ICE, o que confirma seu papel de inibidor de cisteíno-proteases e metaloproteases, a proteína em estudo, ao menos nas doses e condições utilizadas, não afeta as atividades biológicas ou metabólicas de células mononucleares peritoneais aderentes e, possivelmente, o BJKgn não seja tóxico para essas células na concentração utilizada.

Apesar da inibição das enzimas TACE e ICE *in vitro*, nas condições utilizadas, o BJKgn não inibiu e nem estimulou a liberação de TNF α e IL-1 β por células peritoneais aderentes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K, LITCHTMAN A.H, POBER J.S. Cytokines in: Abbas A K, Litchman A.H, Pober J.S. **Cellular and molecular immunology**. 5ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p. 243-274.

AVILA-AGUERO, M.L.; PARÍS, M.M.; HU, S.; PETERSON, P.K.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; FAINGEZICHT, I.L.. Systemic cytokines response in children bitten by snakes in Costa Rica. **Pediatr Emerg Care** [S.l.], v.17, n.6, p. 425-429,2001.

BARARASZ, A.; GUEVARA-LORA, I.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Kininogen binding to the surfaces of macrophages. **Int. Immunopharmacol.**, v.8, n.2, p.211-216, 2008.

BARRAVIERA, B.; LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.; MEIRA, D.A. Acute-phase reaction, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. **Brazil. J. Venom. Anim.** [S.l.], v.1, n.1, p. 11-22, 1995.

BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V.L.; KIPNIS, T.L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators. Inflamm.** [S.l.], v.7, n.5, p. 339-346, 1998.

BLACK, R.A.; RAUCH, C.T.; KOZLOSKY, C.J.; PESCHON, J.J.; SLACK, J.L.; WOLFSON, M.F.; CASTNER, B.J.; STOCKING, K.L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K.A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J.N.; JOHNSON, R.S.; PAXTON, R.J.; MARCH, C.J.; CERRETTI, D.P. A metalloproteinase disintegrin that releases Tumor-Necrosis Factor-Alpha from cells. **Nature**, v.385, p. 729-733, 1997.

BLANCHOT-JOSSIC, F.; JARRY, A.; MASSON, D.; BACH-NGOHOU, K.; PAINEAU, J.; DENIS, M.G.; LABOISSE, C.L.; MOSNIER, J.F. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. **J. Pathol.**, v.207, n.2, p.156–163, 2005.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRADDOCK, M.; QUINN A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. **Nat. Rev. Drug. Disco.**, v.3, n.4, p.330-340, 2004.

CARDOSO, J.L.; FAN, H.W.; FRANÇA, F.O.; JORGE, M.T.; LEITE, R.P.; NISHIOKA, S.A.; AVILA, A.; SANO-MARTINS I.S.; TOMY, S.C.; SANTORO, M.L. *et al.* Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil, **Q. J. Med.**, v.86,n.5, p. 315-125, 1993.

CESARO, A.; ABAKAR-MAHAMAT, A.; BREST, P.; LASSALLE, S.; SELVA, E.; FILIPPI, J.; HÉBUTERNE, X.; HUGOT, J.P.; DOGLIO,A.; GALLAND, F.; NAQUET, P.; VOURET-CRAVIARI, V.; MOGRABI, B.; HOFMAN, P.M. Differential expression and regulation of ADAM17 and TIMP3 in acute inflamed intestinal epithelia. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 296, n.6, p.G1332–G1343, 2009.

CHAVAKIS, T.; KANSE, S.M.; PIXLEY, R.A.; MAY, A.E.; ISORDIA-SALAS, I.; COLMAN, R. W.; PREISSNER, K. T. Regulation of leukocyte recruitment polypeptides derived from high molecular weight kininogen. **Faseb. J.** [S.I.], v. 15, n. 13, p. 2365-76, 2001.

CHAVAKIS, T.; BOECKEL, N.; SANTOSO, S.; VOSS, R.; ISORDIA-SALAS, I.; PIXLEY, R.A.; MORGENSTERN, E.; COLMAN, R.W.; PREISSNER, K.T. Inhibition of platelet adhesion and aggregation by a defined region (Gly-486-Lys-502) of high molecular weight kininogen. **J. Biol. Chem.** [S.I.], v. 277, n. 26, p. 23157-64, 2002 (A).

CHAVAKIS, T.; PIXLEY, R.A.; ISORDIA-SALAS, I.; COLMAN, R.W.; PREISSNER, K.T. A novel antithrombotic role for high molecular weight kininogen as inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 function. **J. Biol. Chem.** [S.I.], v. 277, n. 36, p. 32677-82, 2002 (B).

CHRISTMAN, J.W.; LANCASTER, L.H.; BLACKWELL, T.S. Nuclear factor kappa B: A pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. **Intensive. Care. Med.**, v.24, n.11, p.1131-1138, 1998.

CHUDZINSKI, A.M.; SAMPAIO, M.U.; OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, C.A.M. A *Bothrops jararaca* plasma cysteine-proteinase inhibitor related to mammalian kininogen. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v.22, n.8, p.945-948, 1989.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; POLIZELLO, A.C.M.; GONÇALVES, L.R.C.; ROTHSCHILD, Z.; KELEN, E.M.A. High inhibitory activity on proteases in a reptile

plasma (*Bothrops jararaca* snake) impairs its intrinsic fibrinolytic-like mechanism. **Fibrinolysis**, v.9, n.2, p.79-85, 1995.

CIDADE, D.A.; SIMÃO, T.A.; DÁVILA, A.M.R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M.; HO, P.L.; BON, C.; ZINGALI, R.B.; ALBANO, R.M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v.48, n.4, p.437-461, 2006.

CLISSA, P.B.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.G.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DA-SILVA, A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v.39, n.10, p.1567-1573, 2001.

COLMAN, R.W. Structure-function correlates of human high molecular weight kininogen. **Braz. J. Med. Biol. Res.** [S.I.], v. 27, n. 8, p. 1839-1853, 1994.

COLMAN, R.W. Inhibitory and antiadhesive properties of human kininogens. **Immunopharmacology**, v.32, n.1-3, p.9-18, 1996.

COLMAN, R.W.; JAMESON, B.A.; LIN, Y.; JOHNSON, D.; MOUSA, S.A. Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. **Blood** [S.I.], v. 95, n. 2, p. 543-50, 2000.

CORREA, M.S.F; FERNANDES, S.R.C.; BERNARDI, M.M. Efeitos da exposição de ratos adultos ao lipopolissacarídeo (LPS) no comportamento estereotipado e na catatonia experimental. **Rev. Inst. Ciênc. Saúde.**, v. 26, n. 2, p. 215-220, 2008.

COSTA, E. P.; CLISSA, P.B.; TEIXEIRA, C.F.P.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. **Inflammation** [S.I.] v. 26, n. 1, p. 13-17, 2002.

DALE, C.S.; GONÇALVES, L.R.C; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; MOURA DA SILVA, A.M.; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. **Peptides**, v.25, n.1, p. 81-89, 2004.

DEKKERS, P. E.; LAUW, F.N.; HOVE, T.T.; VELDE, A.A.T.; LUMLEY, P.; BECHERER, D.; VAN DEVENTER, S.J.; VAN DER POLL, T. The effect of a metalloproteinase inhibitor (GI5402) on tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-alpha receptors during human endotoxemia. **Blood** [S.I.], v. 94, n. 7, p. 2252-8, 1999.

DELA-CADENA, R.A.D.; COLMAN, R. W. The sequence HGLGHGHEQQHGLGHGH in the light chain of high molecular weight kininogen serves as a primary structural feature for zinc-dependent binding to an anionic surface. **Protein. Sci.**, v.1, p.151-160, 1992.

DE LORENZO, B.H.P.; GODOY, L.C.; NOVAES E BRITO, R.R.; PAGANO R.L.; AMORIM-DIAS, M.A.; GROSSO, D.M.; LOPES, J.D. MARIANO, M. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein. **Immunobiology**, v.215, n.5, p.341-347, 2010.

DENSON, K.W.; ROUSSEAU, W.E. Separation of the coagulant components of *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v.8, n.1, p.15-9, 1970.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v.141, n.7, p. 2407-12, 1988.

DING, X.; YANG, L.Y.; HUANG, G.W.; WANG, W.; LU, W.Q. ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. **World. J. Gastroenterol.**, v.10, n.18, p.2735–2739, 2004.

DOMONT, G.B.; PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon** [S.I.], v.29, n.10, p.1183-1194, 1991.

ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinase, In neutralizing local tissue damage induced by BnP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. Pharmacol.** [S.I.], v. 60, n.2, p. 269-74, 2000.

FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L. R.; GUTIÉRREZ, J.M.; CORREA, A.P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D.V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. **Mediat. Inflamm.**, v.9, n.5, p. 213-221. 2000.

FELDMANN M.; BRENNAN, F.M.; ELLIOTT, M.; KATSIKIS, P.; MAINI, R.N. TNF alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. **Circ. Shock.**; v.43, n.4, p.179–184, 1994.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS. J.**, v.275, n.12. p.3016-30, 2008.

FRANÇA, F.O.S; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente botrópico. In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier; 2009. p 81-95.

FURUKAWA, Y.; HAYASHI, K. Factor X converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v.15, n.2, p.97-105, 1977.

GALLEA-ROBACHE, S.; MORAND, V.; MILLET, S.; BRUNEAU, J.M.; BHATNAGAR, N.; CHOUAIB, S.; ROMAN-ROMAN, S. A metalloproteinase prohibitor blocks the shedding of soluble cytokine receptor processing of transmembrane cytokine precursor in human monocytic cells. **Cytokine** [S.I.], v. 9, n. 5, p. 340-6, 1997.

GLINSKI, Z.; BUCZEK, J. Aspects of reptile immunity. **Medycyna. Wet.**, v.55, n.9, p.574-578, 1999.

GONÇALVES, L.R.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.;The light chain of the human high molecular weight kininogen is endowed with metalloproteinase inhibitory activity. **Mem. Inst. Butantan**, 2003. v.60, p.44.

GONÇALVES, L.R.C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; PORTARO,F.C.V.; ARAÚJO, M.C.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L. High molecular mass kininogen inhibits metalloproteinases of *Bothrops jararaca* snake venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.318, n.1, p.53–59, 2004.

GUO, Y.L.; WANG, S.; COLMAN, R.W. Kininostatin, an angiogenic inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human endothelial cells. **Arterioscler. Thromb. Vas Biol** [S.I.], v. 21, n. 21, p. 1427-33, 2001.

GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinase's:their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** [S.I], v. 82, n. 9, p. 9-10, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, n.11, p.1405-24, 1995.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Efeitos locais no envenenamento ofídico na América Latina. In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier; 2009. p. 366-376.

HESSEL, B; BLOMBACK, M. The proteolytic action of the snake venom enzymes arvin and reptilase on N-terminal chain-fragments of human fibrinogen. **FEBS. Lett.**, v.18, n.2, p.318-20, 1971.

HORIUCHI, K.; KIMURA, T.; MIYAMOTO, T.; TAKAISHI, H.; OKADA, Y.; TOYAMA, Y.; BLOBEL, C.P. Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. **J. Immunol.**, v.179, p.2686–2689, 2007.

JU, C.R.; XIA, X.Z.; CHEN, R.C. Expressions of tumor necrosis factor-converting enzyme and ErbB3 in rats with chronic obstructive pulmonary disease. **Chin. Med. J. (Engl.)** v.120, n.17, p.1505–1510, 2007.

KAMIGUTI, A.S.; SLUPSKY, J.R.; ZUZEL, M.; HAY, C.R. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb Haemost**, v.72, n.2, p.244-249, 1994.

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.

KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **J. Allergy. Clin. Immunol.** [S.I], v. 109, n. 2, p. 195-209, 2002.

KARAN, D.; LIN, F.C.; BRYAN, M.; RINGEL, J.; MONIAUX, N.; LIN, M.F.; BATRA, S.K. Expression of ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas. **Int. J. Oncol.**, v.23, n.5, p.1365–1371, 2003.

KATO, H.; NAGASAWA, S.; IWANAGA, S. HMW and LMW kininogens. **Methods. Enzymol.** [S.I], v. 80 Pt C, p. 172-98, 1981.

KAWAGUCHI, N.; HORIUCHI K.; BECHERER, J.D.; TOYAMA, Y.; BESMER, P.; BLOBEL, C.P. Different ADAMs have distinct influences on Kit ligand processing: phorbol-ester-stimulated ectodomain shedding of Kitl1 by ADAM17 is reduced by ADAM19. **J. Cell. Sci.**, v.120, n.Pt6, p.943–952, 2007.

KHAN, M. BRADFORD, H.N.; ISORDIA-SALAS, I.; LIU, Y.; WU, Y.; ESPINOLA, R.G.; GHEBREHIWET, B.; COLMAN, R.W. Upregulation of tissue factor in monocytes by cleaved high molecular weight kininogen is dependent on TNF- α and IL-1 β Upregulation of tissue factor in monocytes by cleaved high molecular weight kininogen is dependent on TNF- α and IL-1 β . **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.298, n.10, p.H652-H658, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBBINS E COTRAN. **Patologia- Bases patológicas das doenças**.7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 49-79.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 – 685, 1970.

LALMANACH, G.; Naudin, C.; Lecaille, F.; Fritz, H.; Kininogens: More than a cysteine protease inhibitors and kinin precursors. **Biochimie**, v. 92, n.11, p. 1568-1579, 2010.

LE, G.T.; ABBENANTE, G. Inhibitors of TACE and Caspase-1 as anti-inflammatory drugs. **Curr. Med. Chem.**, v.12, n.25, p. 2963-2977, 2005.

LEATHERBARROW R.J. (1992). **GraFit 3.0**. Erithacus Software. Staines, UK.

LEE, C.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; SOLLNER, C.; JAHNEN-DECHENT, W.; CLAESSION-WELSH, L. Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. **Front. Biosci.**, v.14, p.2911-2922, 2009.

LENDECKEL, U.; KOHL, J.; ARNDT, M.; CARL-MCGRATH, S.; DONAT, H.; RÖCKEN, C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. **J. Cancer. Res. Clin. Oncol.**, v.131, n.1, p.41–48, 2005.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** [S.I.], v.17, n. 2, p. 93-105, 1993.

LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M. Phospholipases A2 from Viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? **Acta. Chim. Slov.**, v.58, n.4, p.647–659, 2011.

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

LOPEZ-CASTEJON, G; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. **Cytokine. Growth. Factor. Rev.**, v.22, n.4, p. 189–195, 2011.

MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: Ohsaka A, Hayashi K, Sawai Y, editors. **Animal Plant and Microbial Toxins**. London: Plenum Press; v.1, p.111-121, 1976.

MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon**, v.20, n.6, p.955-972, 1982.

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.853-64, 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, n.3, p.124-135, 1993.

MASKOS, K.; FERNANDEZ-CATALAN, C.; HUBER, R.; BOURENKOV, G.P.; BARTUNIK, H.; ELLESTAD, G.A.; REDDY, P.; WOLFSON, M.F.; RAUCH, C.T.; CASTNER, B.J.; DAVIS, R.; CLARKE, H. R.; PETERSEN, M.; FITZNER, J.N.; CERRETTI, D.P.; MARCH, C.J.; PAXTON, R.J.; BLACK, R.A.; BODE, W. Crystal structure of the catalytic domain of human Tumor Necrosis Factor- α -Converting Enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, n. 7, p.3408-3412, 1998.

MEBS, D.; OWNBY, C.L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacol. Ther.**, v.48, n.2, p.223–236, 1990.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas no Brasil, In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad, Jr V, Editors. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier; 2009. p. 42-70.

MILLA, M.E.; LEESNITZER, M.A.; MOSS, M.L.; CLAY, W.C.; CARTER, H.L.; MILLER, A.B.; SU, J.L.; LAMBERT, M.H.; WILLARD, D.H.; SHEELEY, D.M.; KOST, T.A.; BURKHART, W.; MOYER, M.; BLACKBURN, R.K.; PAHEL, G.L.; MITCHELL, J.L.; HOFFMAN, C.R.; BECHERER, J.D. Specific sequence elements are required

for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). **J. Biol. Chem.**, v.274, n.43, p.30563–30570, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos (Fundação Nacional de Saúde, Brasília)** p. 131, 2001.

MORIMOTO, Y.; NISHIKAWA, K., OHASHI, M. KB-R7785, a novel matrix metalloproteinase inhibitor, exerts its antidiabetic effect by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. **Life. Sci.** [S.I], v. 61, n. 8, p. 795-803, 1997.

MORITA, T. C-type lectin related proteins from snake venoms. **Curr. Drugs. Target. Cardiovasc. Haematol. Disord.**, v.4, n.4, p. 357-373, 2004.

MOSS, M. L.; JIN, S.L.; MILLA, M.E.; BICKETT, D.M.; BURKHART, W.; CARTER, H.L.; CHEN, W.J.; CLAY, W.C.; DIDSBURY, J.R.; HASSLER, D.; HOFFMAN, C.R.; KOST, T.A.; LAMBERT, M.H.; LEESNITZER, M.A.; MCCAULEY, P.; MCGEEHAN, G.; MITCHELL, J.; MOYER, M.; PAHEL, G.; ROCQUE, W.; OVERTON, L.K.; SCHOENEN, F.; SEATON, T.; SU, J.L.; BECHERER, J.D. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. **Nature** [S.I], v. 385, n. 6618, p. 733-736, 1997.

MOSS, M.; WHITE, J.M.; LAMBERT, M.H.; ANDREWS, R.C. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. **Drug Discov Today** [S.I], v.6, n. 8, p. 417-426, 2001.

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, n.6, p.713-23, 1991.

MOURA-DA SILVA, A.M.; LAIN, GAVIN, D.; JOHN, M.; PAHE, I.; CRAMPTON, J.M.; DAVID, R.; THEAKSTON, G.; BUTANTAN, PAULO, S.B.O.; PLACE, P. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinase: a hypothesis explaining local tissue damage following snakebite. **Eur. J. Immunol.**, v.26, p.2000-2005, 1996.

NEVES-FERREIRA A.G.; PERALES, J.; OVADIA, M.; MOUSSATCHÉ, H.; DOMONT, G.B. Inhibitory properties of the antiothropic complex from the South America opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon** [S.I], v. 35, n. 6, p. 849-63, 1997.

NORDAHL, E. A.; RYDENGARD, V.; MORGELIN, M.; SCHMIDTCHEN, A. Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.41, p. 34832–34839, 2005.

OHTA, S.; HARIGAI, M.; TANAKA, H.; KAWAGUCHI, Y.; SUGIURA, T.; TAKAGI, K.; FUKASAWA, C.; HARA, H.; KAMATANI, N. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v.28, n.8, p.1756–1763, 2001.

ORTEGA, L.M.; FORNONI, A. Role of cytokines in the pathogenesis of acute and chronic kidney disease, glomerulonephritis, and end-stage kidney disease. **Int. J. Infeeron. Cytokine. Mediator. Res.**, v. 2, p. 41-47, 2010.

PAGANO, R.L.; SAMPAIO, S.C.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A. ; GIORGI, R. The C-terminus of murine S100A9 inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells. **Inflamm. Res.**, v.54, n.5, p.204-210, 2005.

PAINE, M.J.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.32, p. 22869-22876, 1992.

PARHAM, .P. The immune system, Chapter 1. **Elements of the immune systems and their roles in defense**. New York: Garland Publishing., p. 1-31; 2000.

PERALES, J.; AMORIM, C.Z.; ROCHA, S.L.; DOMONT, G.B.; MOUSSATCHÉ, H. Neutralization of the oedematogenic activity of *Bothrops jararaca* venom on the mouse paw by an antibothropic fraction isoled from opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Agents. Actions**, v.37, n.3-4, p.250-259, 1992.

PETRICEVICH, V.L.; TEIXEIRA, C.F.; TAMBOURGI, D.V.; GUTIÉRREZ, J.M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, n.9, p.1253-66, 2000.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in Culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods.**, v.46, p. 211-226, 1981.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteinases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol., Part C**, v.142, n.3-4, p.328-46, 2006.

RINGEL, J.; JESNOWSKI, R.; MONIAUX, N.; LÜTTGES, J.; RINGEL, J.; CHOUDHURY, A.; BATRA, S.K.; KLÖPPEL, G.; LÖHR, M. Aberrant expression of A Disintegrin And Metalloproteinase 17/tumor necrosis factor-alpha converting enzyme increases the malignant potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cancer. Res.**, v.66, n.18, p.9045–9053, 2006.

ROEMER, A.; SCHWETTMANN, L.; JUNG, M.; ROIGAS, J.; KRISTIANSEN, G.; SCHNORR, D.; LOENING, S.A.; JUNG, K.; LICHTINGHAGEN, R. Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. **Oncol. Rep.**, v.11, n.2, p.529–536, 2004.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America, in: **Venomous animals and their venoms**, Vol. 2, eds. W. Büchel e E. Buckley (Academic Press, New York), 1971, p. 345.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE-MUÑOZ, T.; TEIXEIRA, C.F.P.; FERNÁNDES, C.M.; DÍAZ-OREIRO, C.; GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, J.M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators. Inflamm.**, v.11, n.2, p.121-128, 2002.

RUSSO, M.; TEIXEIRA, H.C.; MARCONDES, M.C.; BARBUTO, J.A. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.22, n.10, p.1271-73, 1989.

SAKLATVALA, J.; DEAN, J.; CLARK, A. Control of the expression of inflammatory response genes. **Biochem. Soc. Symp.**, v.70, n.8, p. 95-106, 2003.

SANO-MARTINS, I.S E SANTORO, M.L. Distúrbios hemostáticos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso JL, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier; 2009. p. 331-351.

SANSON, A.L. **Caracterização estrutural e funcional de uma proteína isolada do plasma de serpentes *Bothrops jararaca*, relacionada ao cininogênio de mamíferos**. Instituto Butantan, 2012. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, São Paulo, 2012.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; GARBERS, C.; ROSE-JOHN, S. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. **Trends. Immunol.**, v.32, n.8, p.380-387, 2011.

SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes. Dev.**, v.17, n.1, p.7-30, 2003.

SEGEL, I. H., Enzyme Kinetics: **Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**, New York, John Wiley and Sons, 1975, p. 100-159.

SEIFERT, T.; KIESEIER, B.C.; ROPELE, S.; STRASSER-FUCHS, S.; QUEHENBERGER, F.; FAZEKAS, F.; HARTUNG, H.P. TACE mRNA expression in peripheral mononuclear cells precedes new lesions on MRI in multiple sclerosis. **Mult. Scler.**, v.8, n.6, p.447-451, 2002.

SINAN, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 6 Maio 2013.

SINGER, I.I.; SCOTT, S.; CHIN, J.; BAYNE, E.K.; LIMJUCO, G.; WEIDNER, J.; MILLER, D.K.; CHAPMAN, K.; KOSTURA, M.J. The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immuno-electron microscopy. **J. Exp. Med.**, v.182, n.5, p.1447-59, 1995.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v.8, n.17, p. 1677-1690, 2004.

STROKA, A.; DONATO, J.L.; BOM, C.; HYSLOP, S.; ARAÚJO, A.L. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Ferde-lance) snake venom. **Toxicon**, v.45, n.4, p.411-20, 2005.

TANIZAKI, M.M.; KAWASAKI, H.; SUZUKI, K.; MANDELBAUM, F.R. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.29, n.6, p. 673-81, 1991.

TWIN, M. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous protein: a mini review of the recent developments (1991-1997). **Toxicon** [S.l.], v.36, n.11 p. 1471-82, 1998.

TEIXEIRA, C.D.P.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, Suppl.1, p.181-184, 2005.

TREBIEN, H.A.; E CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw oedema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents. Actions.**, v. 26, n.3-4, p. 292-300, 1989.

VALENTE, R.H.; DRAGULEV, B.; PERALES, J.; FOX, J.W.; DOMONT, G.B. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **Eur. J. Biochem.**, v.268, n.10, p.3042-52, 2001.

ZHANG, J.C.; CLAFFEY, K.; SAKTHIVEL, R.; DARZYNKIEWICZ, Z.; SHAW, D.E.; LEAL, J.; WANG, Y.C.; LU, F.M.; MCCRAE, K.R. Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. **FASEB. J.**, v.14, n.15, p. 2589-2600, 2000.

ZELANIS, A. TASHIMA, A.K.; PINTO, A.F.; LEME, A.F.; STUGINSKI, D.R.; FURTADO, M.F.; SHERMAN, N.E.; HO, P.L.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomic**, v.11, n.21, p. 4218-28, 2011

ZHOU, B.B.; PEYTON, M.; HE, B.; LIU, C.; GIRARD, L.; CAUDLER, E.; LO, Y.; BARIBAUD, F.; MIKAMI, I.; REGUART, N.; YANG, G.; LI, Y.; YAO, W.; VADDI, K.; GAZDAR, A.F.; FRIEDMAN, S.M.; JABLONS, D.M.; NEWTON, R.C.; FRIDMAN, J.S.; MINNA, J.D.; SCHERLE, P.A. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. **Cancer. Cell.**, v.10, n.1, p.39–50, 2006.

ZINGALI, R.B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M.C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, n.40 p.10794-10802, 1993.

ZYCHAR, B.C.; DAL,E C.S.; DEMARCHI, D.S.; GONÇALVES, L.R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v.55, n.2-3, p.227-234, Mar 2010.

ZYCHAR, B.C.; SANSON, A.L.; CLISSA, P.B.; PORTARO, F.C.V.; GONÇALVES, L.R.C. *Bothrops jararaca* High molecular mass kininogen (BjHk) inhibits alterations of leukocyte-endothelial interactions induced by *B. jararaca* snake venom metalloproteinases. **Inflammation Reserch**, v.60, suplemento 1, p. s85-s86, Jun 2011.