



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**JOÃO VICTOR DE ALMEIDA SANTOS**

**USO DA TETRACICLINA NA NEUTRALIZAÇÃO DAS AÇÕES ENZIMÁTICAS  
CAUSADORES DE HEMORRAGIA, NECROSE E INFLAMAÇÃO INDUZIDOS  
PELA PEÇONHA DE *Bothropoides erythromelas***

**FORTALEZA**

**2013**

JOÃO VICTOR DE ALMEIDA SANTOS

USO DA TETRACICLINA NA NEUTRALIZAÇÃO DAS AÇÕES ENZIMÁTICAS  
CAUSADORES DE HEMORRAGIA, NECROSE E INFLAMAÇÃO INDUZIDOS PELA  
PEÇONHA DE *Bothropoides erythromelas*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

S235u Santos, João Victor de Almeida.  
Uso da tetraciclina na neutralização das ações enzimáticas causadores de hemorragia, necrose e inflamação induzidos pela peçonha de *Bothropoides erythromelas*/ João Victor de Almeida Santos. – 2013.  
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.  
Orientação: Profa. Dra. Helena Serra Azul Monteiro.

1. *Bothropoides erythromelas*. 2. Tetraciclina. I.Título.

CDD 615.908

---

JOÃO VICTOR DE ALMEIDA SANTOS

USO DA TETRACICLINA NA NEUTRALIZAÇÃO DAS AÇÕES ENZIMÁTICAS  
CAUSADORES DE HEMORRAGIA, NECROSE E INFLAMAÇÃO INDUZIDOS PELA  
PEÇONHA DE *Bothropoides erythromelas*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
da Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Serra Azul Monteiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof Dr Alexandre Havt Bindá  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Sampaio Assreuy  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha mãe, Fernanda.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Fernanda, que desde criança me incentivou a seguir a carreira acadêmica, e aos meus irmãos, Ananda e João Marcos, por quem tenho amor indescritível.

À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dra. Helena Serra Azul Monteiro, pelo acolhimento e orientação desde a graduação e, principalmente, pela postura política inspiradora, de mulher guerreira que traz na admirável trajetória o sonho e a luta pela justiça social.

Ao prof. Dr. Alexandre Havt Bindá, pela constante solicitude, pelas críticas e conselhos, e também pela amizade.

A Natacha Teresa Queiroz Alves, minha grande companheira de pós-graduação, cuja amizade transcende os espaços acadêmicos. Estimada amiga com quem eu sempre posso contar e a recíproca faz-se verdadeira.

A Rafael Matos Ximenes e Roberta Jeane Bezerra Jorge, pelo conhecimento, amizade e bons momentos divididos.

Aos demais colegas de pós-graduação, Isabel Cristina, Delvane Rodrigues, Lenise Nogueira, Rosa Freitas, Pedro Henrique Sá e Aline Diogo, e também aos alunos de iniciação científica, pelo convívio amistoso dos últimos anos.

A Mara Prata e Dânya Lima, pelo auxílio nos experimentos, que se tornavam mais leves pelas risadas compartilhadas.

Ao prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, pela colaboração científica que contribuiu para o aprimoramento deste trabalho e ao seu orientando, Eudmar Marcolino, pela ajuda inestimável e recente amizade.

Ao prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes, pela contribuição com os diagnósticos patológicos e as prazerosas histórias que contava sobre suas viagens.

Às funcionárias da secretaria da pós-graduação Aura, Márcia e Célia, pelo pronto auxílio.

Às amigas feitas durante esse período transformador da minha vida, Mariana Teixeira, Robson Fernandez, Emanuel Anísio, Saul Rodrigues, Diego Souza, Renan da Ponte, Marcos Norelle, Emille Melo, Paulo Henrique Queiroz, Karlinne Souza e Carolina Policarpo, que encheram minha vida de momentos felizes.

Aos amigos de sempre, Thaty e Camila Machado, e Jameson Abreu, pela amizade certa, confortante como um lar.

A Gabrieli Bezerra, Jean Góes, Lizi Menezes e Victor Nepomuceno, conhecedores dos meus segredos, defeitos, vícios, sonhos, loucuras e paixões, e detentores do meu mais profundo amor e confiança.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

*“La vida es como la espuma, por eso hay que darse como el mar”*

**Luisa (Maribel Verdú) em *Y Tu Mamá También***

## RESUMO

Envenenamentos por serpentes peçonhentas são uma emergência médica comum em zonas rurais de países tropicais. No Brasil, as serpentes botrópicas são as maiores responsáveis pelos acidentes ofídicos notificados no país. Na região Nordeste brasileira, encontra-se a serpente *Bothropoides erythromelas*, conhecida como jararaca-da-seca. Os venenos botrópicos causam dor, edema, hemorragia e necrose no local da picada. Tais efeitos não são revertidos pela soroterapia tradicional, o que incita a pesquisa por agentes neutralizantes. Vários estudos demonstraram a ação neutralizante das tetraciclinas contra os efeitos teciduais locais induzidos pela peçonha de serpentes. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da tetraciclina, quando pré-incubada, contra as atividades proteolítica e fosfolipásica  $A_2$  *in vitro*, e as ações hemorrágica, necrosante e inflamatória induzidas pela peçonha de *B. erythromelas* em tecido de pele de camundongos, além de investigar a transcrição gênica dos mediadores inflamatórios envolvidos. Os resultados mostraram que a atividade proteolítica da peçonha ( $101,2 \pm 2,56\%$ ) foi reduzida para o percentual de  $6,59 \pm 0,92\%$ . A atividade fosfolipásica  $A_2$  sofreu redução de  $0,04 \pm 0,001$  para  $0,02 \pm 0,003$ , em valores de absorbância. A formação dos halos hemorrágico ( $117,3 \pm 7,005 \text{ mm}^2$ ) e necrótico ( $20,79 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ ) foi totalmente abolida quando a concentração da tetraciclina foi superior à da peçonha na razão 10. A cinética da migração neutrofílica induzida pela peçonha obteve dois picos nos tempos 2 horas ( $19,977 \pm 3,054$  neutrófilos/mg) e 72 horas ( $115,265 \pm 20,106$  neutrófilos/mg). Tais valores foram reduzidos pelo tratamento com tetraciclina para  $2.020 \pm 210,2$  neutrófilos/mg e  $16.506 \pm 5.142$  neutrófilos/mg, respectivamente. A investigação dos mediadores inflamatórios envolvidos mostrou aumento dos níveis de transcrição gênica das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 30 minutos após o envenenamento. Sugere-se que estes efeitos foram, em parte, devidos a ação quelante da tetraciclina sobre as metaloproteinases e fosfolipases  $A_2$  presentes no veneno, enzimas envolvidas nos efeitos teciduais locais observados. Em conclusão, a tetraciclina previne as atividades proteolítica, fosfolipásica  $A_2$ , hemorrágica, necrosante e a migração neutrofílica induzidas pela peçonha de *B. erythromelas*.

**Palavras-chave:** *Bothropoides erythromelas*. Tetraciclina.

## ABSTRACT

Snake envenoming is a common medical emergency in the countryside of tropical countries. In Brazil, botropic snakes are the major responsible for the ophidian accidents related in that country. In Northeastern Brazil, *Bothropoides erythromelas*, popularly known as “jararaca-da-seca”, can be found. Botropic venoms cause tissue damage at the bitesite, such as pain, edema, hemorrhage and necrosis. Traditional serum therapy has no efficacy against these effects, which stimulate the research for neutralizer agents. Several studies showed the neutralizing action of tetracyclines against snake venom local tissue effects. This work aimed to evaluate the effect of tetracycline, when preincubated, against *in vitro* proteolytic and phospholipase A<sub>2</sub> activities, and hemorrhagic, necrotic and inflammatory actions in mice skin induced by *B. erythromelas* venom, besides investigating gene transcription of the inflammatory mediators involved. Results showed that proteolytic activity ( $101,2 \pm 2,56\%$ ) was reduced to  $6,59 \pm 0,92\%$ . Phospholipase A<sub>2</sub> activity was reduced from  $0,04 \pm 0,001$  to  $0,02 \pm 0,003$ , in absorbance values. The halo area of hemorrhagic ( $117,3 \pm 7,005 \text{ mm}^2$ ) and necrotic ( $20,79 \pm 0,003 \text{ mm}^2$ ) activities was totally abolished when tetracycline concentration was 10-fold the venom concentration. The neutrophil migration kinetics presented two peaks in 2h ( $19,977 \pm 3,054$  neutrophils/mg) and 72h times ( $115,265 \pm 20,106$  neutrophils/mg). These values were reduced by tetracycline treatment to  $2,020 \pm 210,2$  neutrophils/mg and  $16,506 \pm 5,412$  neutrophils/mg, respectively. Investigation of the inflammatory mediators involved showed increase in gene transcription levels IL-1 $\beta$  and IL-6 cytokines 30 minutes after envenomation. It was suggested that these effects are due, in part, to the chelation property of tetracycline on venom metalloproteinases enzymes, which are involved in the local tissue effects observed. In conclusion, tetracycline prevents proteolytic, phospholipase A<sub>2</sub>, hemorrhagic and necrotic activities, and neutrophil migration induced by *B. erythromelas* venom.

**Keywords:** *Bothropoides erythromelas*. Tetracycline.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1 ACIDENTES OFÍDICOS</b> .....	12
<b>1.2 GÊNERO <i>BOTHROPS SENSU LATO</i> E <i>BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS</i></b> .....	13
<b>1.3 COMPOSIÇÃO E AÇÕES DO VENENO DE <i>BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS</i></b> .....	15
<b>1.4 TETRACICLINAS: PROPRIEDADES NÃO-ANTIBIÓTICAS</b> .....	19
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	23
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	25
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
<b>4.1 VENENO, SUBSTÂNCIAS E REAGENTES</b> .....	27
<b>4.2 ANIMAIS</b> .....	27
<b>4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	27
<b>4.3.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA</b> .....	27
<b>4.3.2 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A2</b> .....	28
<b>4.3.3 ATIVIDADE HEMORRÁGICA</b> .....	28
<b>4.3.4 ATIVIDADE NECROSANTE</b> .....	29
<b>4.3.5 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA</b> .....	29
<b>4.3.5.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL</b> .....	30
<b>4.3.5.2 SÍNTESE DE CDNA</b> .....	30
<b>4.3.5.3 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR)</b> .....	30
<b>4.3.6 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)</b> .....	31
<b>4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA</b> .....	31
<b>4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	32
<b>4.6 ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	32
<b>5. RESULTADOS</b> .....	34
<b>5.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA</b> .....	34
<b>5.2 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A2</b> .....	34
<b>5.3 ATIVIDADE HEMORRÁGICA</b> .....	36

<b>5.4 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA</b> .....	37
<b>5.4.1 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE TNF-A</b> .....	37
<b>5.4.2 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE IL-1B</b> .....	39
<b>5.4.3 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE IL-6</b> .....	40
<b>5.4.4 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE COX-2</b> .....	42
<b>5.5 ATIVIDADE NECROSANTE</b> .....	44
<b>5.6 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)</b> .....	45
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	<i>Bothropoides erythromelas</i> .	14
<b>Figura 02</b>	Distribuição geográfica de <i>Bothropoides erythromelas</i> .	15
<b>Figura 03</b>	Alterações locais promovidas por acidentes botrópicos.	18
<b>Figura 04</b>	Estrutura química da tetraciclina com a posição C4 evidenciada.	20
<b>Figura 05</b>	Neutralização da atividade proteolítica do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> pela tetraciclina.	34
<b>Figura 06</b>	Neutralização da atividade fosfolipásica A <sub>2</sub> do veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> pela tetraciclina.	35
<b>Figura 07</b>	Fotografias das áreas internas da pele dorsal de camundongos.	36
<b>Figura 08</b>	Redução da área do halo hemorrágico induzido pelo veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> pela tetraciclina.	37
<b>Figura 09</b>	Níveis de transcrição gênica de TNF- $\alpha$ após 2 horas de tratamento.	38
<b>Figura 10</b>	Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de TNF- $\alpha$	38
<b>Figura 11</b>	Níveis de transcrição gênica de IL-1 $\beta$ após 2 horas de	39

	tratamento.	
<b>Figura 12</b>	Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de IL-1 $\beta$ .	40
<b>Figura 13</b>	Níveis de transcrição gênica de IL-6 após 2 horas de tratamento.	41
<b>Figura 14</b>	Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de IL-6.	41
<b>Figura 15</b>	Níveis de transcrição gênica de COX-2 após 2 horas de tratamento.	42
<b>Figura 16</b>	Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de COX-2.	43
<b>Figura 17</b>	Fotografias das áreas internas da pele dorsal de camundongos.	44
<b>Figura 18</b>	Fotomicrografias de luz de seções transversais de 4 $\mu$ m de pele de camundongo tratada com veneno de <i>Bothropoides erythromelas</i> .	45
<b>Figura 19</b>	Fotomicrografias de luz de seções transversais de 4 $\mu$ m de espessura de pele de camundongo dos grupos tratados com água Milli-Q e tetraciclina.	45
<b>Figura 20</b>	Curva cinética do número de neutrófilos por unidade de peso de tecido.	46
<b>Figura 21</b>	Neutralização dos picos neutrofílicos pela tetraciclina.	47

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ACIDENTES OFÍDICOS

Mundialmente, cerca de 5 milhões de pessoas são picadas por serpentes todos os anos. Dentre estas serpentes, as venenosas causam considerável morbidade e mortalidade. Anualmente, há a estimativa de 2,4 milhões de envenenamentos ofídicos, os quais provocam de 94 a 125 mil mortes, 400 mil amputações de membros e outras consequências severas como infecções, tétano, cicatrizes, contraturas musculares e sequelas permanentes. O difícil acesso a assistência médica e a escassez de antivenenos elevam a severidade das injúrias e sua recuperação (WHO, 2013).

A ocorrência do acidente ofídico está, em geral, relacionada a fatores climáticos (meses mais quentes e chuvosos do ano) e ao aumento do trabalho humano em atividades agrícolas nas zonas rurais. As picadas de serpentes afetam principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade variando de 10 a 49 anos. Quanto ao local da picada, o pé e a perna são os mais atingidos (FRANÇA *et al.*, 2003). Embora se trate de uma emergência médica frequente nas regiões rurais de países tropicais, a incidência dos envenenamentos é subestimada, pois a maior parte das vítimas é tratada por métodos de prática tradicional e, dessa forma, os casos não são notificados (WARREL, 2012).

O Brasil apresenta uma das mais ricas faunas de serpentes do planeta, sendo conhecidas 366 espécies. Destas, 15% (55 espécies) são consideradas peçonhentas (ARAÚJO *et al.*, 2003; BÉRNILS, 2010). As duas principais famílias de serpentes peçonhentas existentes no país são a *Viperidae* e a *Elapidae*, as quais possuem importância epidemiológica e despertam interesse na saúde pública (BRASIL, 2001, 2010).

A família *Viperidae* é representada pelos gêneros *Bothrops* (8 espécies), *Bothropoides* (11 espécies), *Bothriopsis* (2 espécies), *Bothrocophias* (1 espécie), *Rhinocerophis* (4 espécies), *Caudisona* (1 espécie), *Lachesis* (1 espécie) (FENWICK *et al.*, 2009). Os representantes desta família possuem a cabeça triangular com escamas quilhadas, fosseta loreal, olhos com a pupila em forma de fenda. Os dentes inoculadores de veneno são grandes, móveis e implantados no osso maxilar superior situado na parte anterior, denominada de dentição solenóglifa (BARRAVIERA, 1991; RAGE, 1997; BÉRNILS, 2010). Devido às manifestações similares e ao tratamento com o mesmo antiveneno, os primeiros 5 gêneros estão aqui agrupados como gênero *Bothrops sensu lato*.

A família *Elapidae* é representada pelos gêneros *Leptomicrurus* (3 espécies) e *Micrurus* (24 espécies). Os representantes desta família possuem a cabeça arredondada pouco diferenciada do corpo, ausência de fosseta loreal, olhos pequenos com as pupilas arredondadas. Os dentes inoculadores de veneno são pequenos, fixos e situados no maxilar superior, denominada de dentição proteróglifa (BARRAVIERA, 1991; RAGE, 1997; BÉRNILS, 2010).

Os gêneros *Bothrops sensu lato* (jararacas), *Leptomicrurus* e *Micrurus* (corais verdadeiras) ocorrem em todo o território nacional, enquanto o gênero *Caudisona* (cascavéis) se distribui principalmente pelo Sul e Sudeste e as serpentes do gênero *Lachesis* (surucucus), na região da Amazônia e de Mata Atlântica (BÉRNILS, 2010).

O Sistema Nacional de Notificação de Agravos (SINAN) do Ministério da Saúde calcula que somente no ano de 2012 ocorreram 140.578 casos de acidentes causados por serpentes. Quando excluídas as notificações que ignoram o agente causador e os acidentes por serpentes não peçonhentas, o gênero *Bothrops sensu lato* lidera com a maior percentagem de acidentes (86,02 %), seguido pelos gêneros *Caudisona* (9,34 %), *Lachesis* (3,63 %), *Leptomicrurus* e *Micrurus* (1,01 %) (BRASIL, 2013).

## 1.2 GÊNERO *BOTHRUPS SENSU LATO* E *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS*

O gênero *Bothrops sensu lato* constitui o mais numeroso gênero de serpentes peçonhentas do país, com 26 espécies catalogadas. Ocorrem na América Central e América do Sul, ocupando todo o território brasileiro. Possuem cauda lisa, não tem chocalho e suas cores variam muito, dependendo da espécie e da região onde vivem. Habitam zonas rurais e periféricas de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas, margens de rios, áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para a proliferação de roedores (paióis, celeiros e depósitos de lenha). Têm hábitos predominantemente noturnos e crepusculares (ARAÚJO e MARTINS, 2007; BRASIL, 2001). Além de ser o gênero mais numeroso, é o mais importante do ponto de vista médico, tanto pela porcentagem predominante dos acidentes registrados, quanto pelo seu potencial farmacológico (BOECHAT *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2010).

Em 1926, Amaral descreveu a serpente *Bothropoides erythromelas*, espécie que é encontrada na região Nordeste brasileira. Tal espécie é conhecida como jararaca malha-de-cascavel ou jararaca-da-seca por habitar áreas xerófilas como a caatinga. É encontrada no Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Maranhão, Bahia e norte

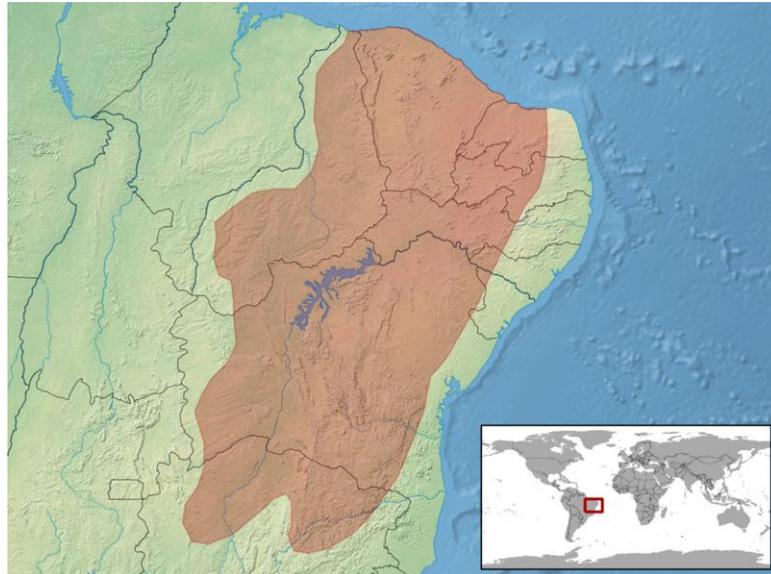
de Minas Gerais (Figura 02). Possui porte pequeno (82,5 a 125 cm) que fornece de 20 a 30 miligramas de veneno por extração, segundo Vellard (1938), e de 15 a 20 miligramas, de acordo com dados do Instituto Butantan. É uma das principais serpentes responsáveis pelos acidentes ofídicos registrados no Nordeste do Brasil (CARDOSO *et al.*, 1990).

Figura 01 – *Bothropoides erythromelas*



Fonte: NUROF-UFC

Figura 02: Distribuição geográfica de *Bothropoides erythromelas*



Fonte: IUCN Red List of Threatened Species

### 1.3 COMPOSIÇÃO E AÇÕES DO VENENO DE *BOTHROPOIDES ERYTHROMELAS*

Venenos de serpentes constituem-se em uma complexa mistura de componentes, com predominância para proteínas biologicamente ativas. Mais de 90% do peso seco dos venenos é composto por proteínas e peptídeos. Encontram-se também em sua composição cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas e baixos níveis de lipídeos e aminoácidos livres. Dentre os cátions presentes, o sódio é o principal. No entanto, seu papel ainda não foi bem elucidado. Zinco e cálcio estão presentes especialmente como cofatores de enzimas. Carboidratos também são descritos, mas na forma de glicoproteínas (MARKLAND *et al.*, 1998).

A fração proteica dos venenos é composta por metaloproteinases de veneno de serpente (SVMP – Snake Venom Metalloproteinases), fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> – Phospholipases A<sub>2</sub>) e serino-proteases; e promovem uma ampla gama de efeitos sobre a coagulação sanguínea, o sistema cardiovascular, a função renal, a fibrinólise e o sistema complemento (ROSENFELD, 1971; OYUANG; TENG; HUANG, 1992; FOX e LONG, 1998).

O veneno de *Bothropoides erythromelas* exibe considerável atividade hemorrágica (MARUYAMA *et al.*, 1992; VASCONCELOS, 1996), fibrinolítica, proteolítica (FURTADO *et al.*, 1991; SANCHEZ *et al.*, 1992) e fosfolipásica A<sub>2</sub> (FLORES; ZAPPELLINI; PRADO-

FRANCESCHI, 1993); induzindo também edema e necrose (VASCONCELOS, 1996; SANCHEZ *et al.*, 1992), e inibição da agregação plaquetária (ZAPPELLINI e PRADO-FRANCESCHI, 1990).

As PLA<sub>2</sub> são enzimas que catalisam a hidrólise a ligação sn-2 dos ácidos graxos de fosfolípídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolípídeos. Estas enzimas são encontradas em tecidos de mamíferos, em artrópodes e em todos os venenos de serpentes. PLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes são divididos nos grupos I e II, e a maioria das PLA<sub>2</sub> de venenos de serpentes da família *Viperidae* pertencem à classe II (SIX e DENNIS, 2000).

O dano ao tecido muscular esquelético pode ser induzido diretamente pela ação de miotoxinas, ou indiretamente como consequência da isquemia resultante de distúrbios vasculares (MEBS e OWNBY, 1990). As miotoxinas presentes nos venenos de serpente possuem estrutura de fosfolipase A<sub>2</sub>, mas, dependendo do aminoácido presente na posição 49, aspartato (Asp) ou lisina (Lys), essas toxinas exibem ou não atividade enzimática (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995).

A atividade miotóxica do veneno de *B. erythromelas* é baixa (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 1991), possuindo pouca capacidade de ligar-se ao tecido muscular, o que sugere que as fosfolipases que ele contém possuem outros alvos biológicos (VASCONCELOS *et al.*, 1998).

Albuquerque-Modesto *et al.* (2006) isolaram, clonaram e caracterizaram uma PLA<sub>2</sub> do veneno de *B. erythromelas*, nomeando-a como BE-I-PLA<sub>2</sub>. Neste mesmo estudo foi demonstrado a potente ação anti-plaquetária e indutora da liberação de prostaglandina I<sub>2</sub> desta fosfolipase.

A atividade da serino-protease tem sido principalmente correlacionada com a atividade trombina-símile dos venenos botrópicos (MATSUI *et al.*, 2000; SANTORO e SANO-MARTINS, 2003), mas tem sido demonstrado que cininogenases presentes nesses venenos também pertence a essa classe de proteases (ROCHA E SILVA, BERALDO, ROSENFELD, 1949; MATSUI *et al.*, 2000). Alguns distúrbios da coagulação também podem ser induzidos por metaloproteínas pró-coagulantes (SANTORO e SANO-MARTINS, 2003).

Os venenos da maioria das espécies botrópicas possuem atividade de ativação direta sobre protrombina, combinada, ou não, com atividade trombina-símile e/ou de ativação de Fator X. Contudo, o veneno de *B. erythromelas* é particularmente interessante por não apresentar atividade trombina-símile. A atividade coagulante desta serpente é atribuída à notável presença de ativadores de protrombina e de Fator X (NAHAS; KAMIGUTI; BARROS, 1979; MARUYAMA *et al.*, 1992).

Em 2003, Silva *et al.* caracterizaram e clonaram o primeiro ativador de protrombina de um veneno de uma espécie de serpente do gênero *Bohtrops sensu lato* a partir do veneno de *B. erythromelas*. Esta proteína foi nomeada de berythactivase e classificada como pertencente ao grupo A dos ativadores de protrombina (não-dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  ou fosfolipídeos para a sua atividade). Análise da sequência de cDNA revelou que a berythactivase é um membro da classe P-III da família de proteínas metaloproteinases.

As SVMPs são endopeptidases zinco-dependentes e são abundantes em venenos de serpentes da família *Viperidae* (GUTIÉRREZ *et al.*, 2005; FOX e SERRANO, 2008). Estas enzimas podem ser divididas em 4 grupos (P-I, II, III e IV), que diferem quanto à presença de outros domínios, além do próprio domínio metaloproteinase. Os membros da classe P-III distinguem-se pela presença de um domínio desintegrina-símile e outro rico em cisteína (GUTIERREZ e RUCAVADO, 2000); e foi demonstrado serem capazes de induzir hemorragia através da degradação das proteínas da matriz extracelular, da inibição da agregação plaquetária (atividade fibrinolítica e fibrinogenolítica) e do bloqueio da ligação do colágeno com integrinas da superfície plaquetária (KAMIGUTI *et al.*, 1996; KAMIGUTI; HAY; ZUZEL, 1996; FOX e LONG, 1998; WILLIS e TU, 1998; KINI; RAO; JOSEPH, 2001).

Também foi demonstrado que SVMPs induzem edema, liberação de metaloproteinases de matriz (MMPs – Matrix Metalloproteinases) e de citocinas envolvidas na patogênese da inflamação local (GUTIERREZ e RUCAVADO, 2000).

Apesar da semelhança estrutural, a berythactivase possui baixa atividade fibrinogenolítica e ausência de ação hemorrágica local, em contraste com outras metaloproteinases da classe P-III (SILVA *et al.*, 2003). Contudo, foi demonstrado que este ativador de protrombina possui atividades pro-inflamatórias, como suprarregulação da expressão endotelial de ICAM-1, liberação de fator von Willebrand (vWF – von Willebrand Factor) prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) e interleucina-8 (IL-8) e geração de óxido nítrico (NO) (SILVA *et al.*, 2003; SCHATTNER *et al.*, 2005).

O papel chave exercido pelas SVMPs na fisiopatologia do envenenamento viperídico tem incitado a pesquisa por inibidores dessas enzimas, no intuito de que a neutralização dos seus efeitos possa representar uma estratégia terapêutica eficaz que poderia complementar a administração de antiveneno no manejo desses envenenamentos (GUTIÉRREZ *et al.*, 1999, 2007).

Figura 03: Alterações locais promovidas por acidentes botrópicos



Fonte: A: OLIVEIRA, 2008; B: OROZEPA *et al.*, 2000; C e D, OMS, 2007.

A: Edema, sangramento e equimose em mão esquerda; B: Sangramento eritematoso e edema no tornozelo direito; C: Equimose, bolhas e edema em pé direito; e D: Necrose tecidual grave em perna direita.

#### 1.4 TETRACICLINAS: PROPRIEDADES NÃO-ANTIBIÓTICAS

A descoberta do primeiro membro da família das tetraciclina em 1945 por Benjamin Duggar, a clortetraciclina, um produto de fermentação natural de uma bactéria do solo, *Streptomyces aureofaciens*, provocou uma corrida na pesquisa e obtenção de novas tetraciclina com grande sucesso. Assim, de 1950 a 1970, vários membros da família das tetraciclina foram desenvolvidos, uns como produtos naturais, outros como produtos semissintéticos. Neste mesmo período, as tetraciclina figuraram entre os antibióticos mais utilizados nos Estados Unidos (SPEER; SHOEMAKER; SALYER, 1992; ZHANEL *et al.*, 2004; SHLAES, 2006).

Em relação às propriedades farmacológicas destes compostos, as tetraciclina são ativas contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas, mostrando-se eficazes também contra *Rickettsia*, *Coxiela burnetti*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia spp.*, *Legionella spp.*, *Ureaplasma*, algumas micobactérias atípicas e *Plasmodium spp.* (CHAMBERS, 2005).

Contudo, as tetraciclina possuem uma série de propriedades não antibióticas e há vários estudos sendo conduzidos no sentido de usar tetraciclina no tratamento de doenças não infecciosas, tais como artrite reumatoide e câncer (ROBERTS, 2003; SAPADIN e FLEISHMAJER, 2006).

A artrite reumatoide é uma condição inflamatória crônica, cuja causa não é totalmente conhecida. Mas sabe-se que a degradação das articulações é devida, pelo menos em parte, à atividade aumentada da colagenase no fluido e nos fibroblastos sinoviais (HANEMAAIJER *et al.*, 1997). Estudos mostraram que a administração oral de minociclina em um modelo de artrite induzida por colágeno em ratos reduziu a incidência de artrite (SEWELL *et al.*, 1996).

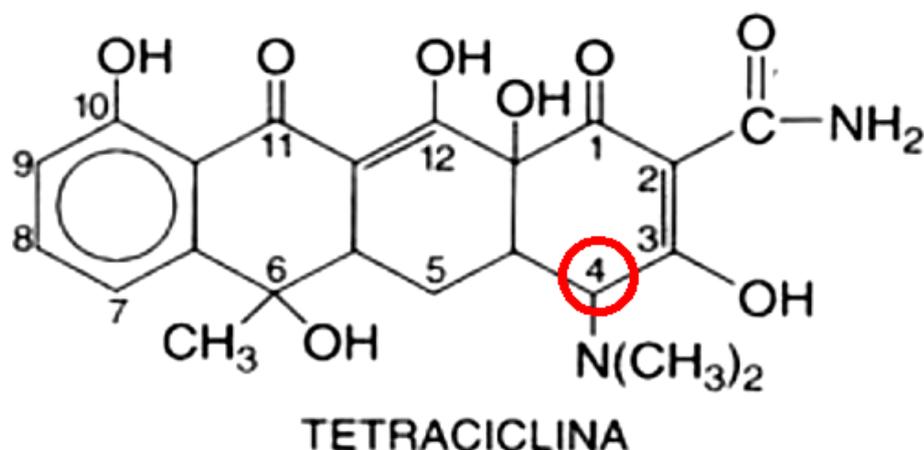
Também tem sido demonstrado que tetraciclina podem ser úteis no tratamento de outras condições patológicas nas quais há o envolvimento de inflamação aguda ou crônica, tais como doenças dermatológicas, periodontológicas e neurodegenerativas. A minociclina é efetiva no tratamento das lesões de acne inflamatória não apenas por causa de sua atividade contra *Propionibacterium acnes* (EADY *et al.*, 1990), mas também por causa de sua ação anti-inflamatória intrínseca (CÉLÉRIER; LITOUX; DRÉNO, 1996). Doses sub-antimicrobianas de doxiciclina foram efetivas e seguras como adjuvantes no tratamento da periodontite humana adulta (GOLUB *et al.*, 1990). A administração intratecal de minociclina atenuou a alodínia mecânica induzida pela neuropatia ciática inflamatória em ratos, um efeito associado com a redução da ativação microglial e da expressão de mRNA para interleucina -1 $\beta$

(IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e associado também com níveis reduzidos de citocinas no fluido cerebrospinal (LEDEBOER *et al.*, 2005).

Bastos *et al.* (2007) procuraram caracterizar a atividade anti-inflamatória da minociclina e da doxiciclina em diferentes modelos experimentais e concluíram que ambas as drogas apresentaram atividade inibitória para dor inflamatória, edema, febre, migração celular e formação de tecido fibrovascular, sugerindo que um estudo mais aprofundado das atividades dessa classe química pode resultar na descoberta de drogas seguras e eficazes no tratamento de diversas doenças inflamatórias e degenerativas.

Além das tetraciclina tradicionais, o grande interesse da aplicação dessa classe de moléculas no tratamento de tumores tem direcionado os estudos para um novo conjunto de substâncias análogas, conhecidas como CMTs (*Chemically Modified Tetracyclines*). As CMTs possuem o esqueleto básico das tetraciclina, com a principal alteração consistindo na remoção do grupo dimetilamino (DMA) da posição C4 (Figura 03). Essa modificação química elimina a ação antibacteriana e, conseqüentemente, potencializa efeitos secundários. O foco terapêutico é prevenir a angiogênese e a metástase, através da inibição de enzimas conhecidas como metaloproteinases de matriz (ACHARYA *et al.*, 2004). Estudos anteriores já haviam demonstrado que as CMTs inibem também a atividade de PLA<sub>2</sub> (PRUZANSKI *et al.*, 1998).

Figura 04: Estrutura química da tetraciclina com a posição C4 evidenciada



Fonte: CHAMBERS, 2005.

As metaloproteinases de matriz (MMPs – Matrix Metalloproteinases) são endopeptidases zinco-dependentes que exercem importante papel no remodelamento do tecido

conjuntivo e estão envolvidas na embriogênese, cicatrização de ferimentos, artrite reumatoide, invasão tumoral e metástase (STETLER-STEVESON; LIOTTA; KLEINER, 1993). As MMPs que degradam colágenos fibrilares são conhecidas como colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13) e aquelas que podem afetar colágenos da membrana basal (colágeno IV) são conhecidas como gelatinases (MMP-2, MMP-9). Tetraciclinas e seus análogos podem inibir tanto colagenases como gelatinases (GOLUB *et al.*, 1983, 1991, 1998). Dados experimentais utilizando linhagens celulares de carcinoma e modelos animais de carcinogênese demonstraram que a doxiciclina, minociclina e CMTs podem inibir o crescimento tumoral através da inibição das MMPs e através de um efeito direto na proliferação celular (DUIVENVOORDEN; HIRTE; SINGH, 1997; HIDALGO e ECKHARDT, 2001; RUBINS *et al.*, 2001; LOKESHWAR *et al.*, 2002).

As MMPs fazem parte de uma super-família de enzimas conhecidas como “metzincinas”, caracterizadas por semelhanças estruturais e a presença de um íon zinco no sítio catalítico, apresentando, assim, similaridade com as SVMPs (BODE; GOMIS-RUTH; STOCKLER, 1993). Tal similaridade entre MMPs e SVPMs abre a possibilidade de que inibidores desenvolvidos contra MMPs poderiam também ser efetivos contra SVMPs. Tal hipótese tem sido confirmada por diversos inibidores de MMPS sintéticos que tem obtido êxito em neutralizar as atividades tóxicas e enzimáticas de SVMPs (ESCALANTE *et al.*, 2000; HOWES; THEAKSTON; LAING, 2007).

Resultados obtidos por Paixão-Cavalcante *et al.* (2007) mostraram o envolvimento de MMPs na dermonecrose induzida pelo veneno da aranha *Loxosceles sp.* Neste estudo, a aplicação tópica de tetraciclina reduziu efetivamente a lesão induzida pelo veneno e a produção de MMP-2 e MMP-9, sugerindo que a tetraciclina pode oferecer um valioso e relativamente seguro agente terapêutico no tratamento da lesão cutânea induzida pela picada desta aranha.

O tratamento tópico com tetraciclina foi capaz de melhorar a injúria córnea provocada pelo veneno da cobra sul-africana conhecida como “naja cuspidera” (*Hemachatus haemachatus*) em um modelo experimental com coelhos (ISMAIL *et al.*, 1993).

Em 2008, Rucavado *et al.* avaliaram a capacidade da doxiciclina de inibir as atividades proteolítica, hemorrágica, coagulante e desfibrinante induzidas pelo veneno de *Bothrops asper*. Os resultados mostraram que a doxiciclina foi hábil em neutralizar estas atividades quando incubada com o veneno previamente ao teste.

# **JUSTIFICATIVA**

## 2 JUSTIFICATIVA

A imunoterapia antiveneno é o único tratamento específico contra o envenenamento por serpentes, sendo eficaz principalmente contra as alterações sistêmicas se administrado em tempo hábil. Embora a soroterapia seja, em geral, clinicamente eficaz no envenenamento sistêmico, sua eficácia é limitada contra os efeitos do envenenamento local que se desenvolvem rapidamente após uma picada, o que muitas vezes resulta em cicatrizes e deformidades permanentes (GOMES *et al.*, 2010).

A pesquisa por novos inibidores de venenos, de origem sintética ou natural, capazes de complementar à soroterapia, principalmente na neutralização dos danos teciduais locais, é necessária e de grande importância para a saúde pública (DA SILVA *et al.*, 2007).

Novas propriedades das tetraciclinas, que não dependem de sua ação antibiótica, já têm sido descritas por diversos estudos supracitados. Por possuírem atividade conhecida tanto contra homólogos como contra constituintes da peçonha botrópica e de outras espécies de animais peçonhentos, o estudo da ação dessas drogas frente ao veneno de *Bothropoides erythromelas* traz boas perspectivas para a obtenção de novos agentes bloqueadores.

Considerando-se que esta peçonha não é incluída na produção do soro antibotrópico do Instituto Butantan, talvez seja esta uma possível explicação para a ausência de neutralização dos efeitos locais supramencionados. Tal verificação fala a favor de uma regionalização da produção de anti-soros e da busca de uma alternativa viável para a complementação da soroterapia tradicional.

# **OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- ✚ Investigar a ação neutralizante da tetraciclina sobre os efeitos teciduais locais induzidos pela peçonha de *Bothropoides erythromelas*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Avaliar a ação neutralizante da tetraciclina frente às atividades proteolítica e fosfolipásica A<sub>2</sub> (*in vitro*) da peçonha de *Bothropoides erythromelas*.
- ✚ Avaliar a ação neutralizante da tetraciclina frente à atividade hemorrágica e investigar a transcrição gênica de mediadores inflamatórios envolvidos.
- ✚ Avaliar a ação neutralizante da tetraciclina sobre a atividade necrosante induzida pela peçonha de *Bothropoides erythromelas*.
- ✚ Avaliar a ação da tetraciclina sobre a migração de neutrófilos induzidas pela peçonha de *Bothropoides erythromelas*.

# **METODOLOGIA**

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 VENENO, SUBSTÂNCIAS E REAGENTES

O veneno de *Bothropoides erythromelas* foi gentilmente cedido pela Profa. Diva Maria Borges Nojosa do Núcleo Regional de Ofiologia (NUROF) da Universidade Federal do Ceará.

A tetraciclina e os demais reagentes e substratos foram obtidos da Sigma-Aldrich® (EUA) com especificação pró-análise e elevado grau de pureza. Os Kits para a realização de protocolos de biologia molecular foram obtidos de QIAGEN (Hilden, Alemanha) e Bio-Rad Laboratories (EUA).

### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (18-22 g) obtidos através do Biotério Central (BIOCEN) da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em temperatura constantes ( $22 \pm 2$  °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*.

### 4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 4.3.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para avaliar a ação proteolítica do veneno de *Bothropoides erythromelas* foi utilizada como substrato a proteína azocaseína (Sigma-Aldrich®, EUA). A azocaseína é um substrato de protease não específica. A hidrólise da caseína libera o corante azo para os meio (ESCALANTE *et al.*, 2006).

Para o estudo de inibição, adotou-se a razão 1:1 (veneno : tetraciclina, p/p). As substâncias foram dissolvidas na solução tampão de 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, com pH = 7,4. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se, em cada poço, 10 µL da solução de veneno (1 mg/mL), ou de tetraciclina (1 mg/mL), ou de veneno pré-incubado com tetraciclina (37 °C por 30 minutos) a 90 µL da solução de azocaseína (5 mg/mL). Após um período de incubação de 60 minutos a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido tricloroacético a 5%. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 5

minutos. O sobrenadante (100 µL) foi transferido para outra placa e, logo após, adicionou-se 100 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M. O branco não conteve as amostras em estudo. A atividade proteolítica foi quantificada em leitora de microplacas para ELISA Asys Hightech, modelo Expert Plus e as absorvâncias foram medidas a 450 nm. Uma unidade de atividade proteolítica é correspondente a um aumento de 0,2 na absorvância (por quantidade de veneno).

#### 4.3.2 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A<sub>2</sub>

A atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> foi mensurada seguindo o protocolo descrito por Cotrim *et al.* (2011) em placas de 96 poços, utilizando o lipídeo cromogênico ácido 4-nitro-3-octanoiloxi-benzóico (4N3OBA, Biomol®, EUA) como substrato. Foram utilizadas amostras com uma concentração de 1 mg/mL do veneno de *Bothropoides erythromelas* isolado, como amostras contendo as duas substâncias previamente incubadas a 37 °C por 30 minutos (1 mg + 1mg/mL). As amostras foram solubilizadas em água Milli-Q. A curva padrão do ensaio foi composta da adição de 200 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, pH = 8,0), 20 µL de substrato (4N3OBA), 20 µL de água e 20 µL de amostra para uma solução final de 260 µL. Como branco aplicam-se todos os componentes, exceto as substâncias de estudo. Também foi realizado o branco da tetraciclina. A atividade da enzima foi calculada com base no aumento da absorvância após 40 minutos de incubação da reação enzimática. O ensaio foi realizado com absorvância em 450 nm, usando um leitor de placas Spectramax 340 multiwell (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### 4.3.3 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A atividade hemorrágica foi determinada utilizando o método de Kondo *et al.* (1960) modificado, injetando-se intradermicamente (ID) na pele do dorso tricotomizado dos animais alíquotas de 50 µL do veneno de *B. erythromelas* (1 mg/mL, diluído em água Milli-Q). Duas horas após a injeção, os animais foram sacrificados e tiveram sua pele removida e estirada para análise macroscópica da face interna. Utilizando uma câmera Samsung Digimax A5 (Samsung, Kyungki-Do, Korea) e uma régua como referência, tirou-se fotografias digitais padronizadas. A atividade hemorrágica foi quantificada pela formação e mensuração da área do halo hemorrágico, em mm<sup>2</sup>. A área dos halos foi mensurada traçando-se a margem dos

halos e calculando-se a área dos pixels, através do programa de processamento e análise de domínio público Image J 1.37 (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

O efeito neutralizante da tetraciclina foi avaliado incubando-a previamente por 30 minutos a 37°C com o veneno antes das injeções nos animais em 3 razões diferentes: 1:1; 1:3 e 1:10, sendo a concentração do veneno fixa (1 mg/mL) e a da tetraciclina crescente. Dois grupos foram estabelecidos como controles: um com injeções apenas de água Milli-Q e outro com injeções de apenas tetraciclina na dose mais alta utilizada (10 mg/mL).

Ao final do experimento, amostras dos tecidos foram coletadas e armazenadas a -80 °C para a avaliação da transcrição gênica de mediadores inflamatórios possivelmente envolvidos na atividade hemorrágica.

#### **4.3.4 ATIVIDADE NECROSANTE**

A atividade necrosante foi determinada utilizando o método protocolo descrito para a atividade hemorrágica, diferenciando-se no tempo de sacrifício dos animais: 72 horas após a injeção do veneno. A atividade necrosante foi quantificada pela formação e mensuração da área do halo necrótico, em mm<sup>2</sup>.

O efeito neutralizante da tetraciclina foi avaliado incubando-a previamente por 30 minutos a 37°C com o veneno antes das injeções nos animais na razão de 1:10 (1mg de veneno + 10 mg de tetraciclina/mL). Dois grupos foram estabelecidos como controles: um com injeções apenas de água Milli-Q e outro com injeções de apenas tetraciclina (10 mg/mL).

Ao final do experimento, amostras de tecidos foram coletadas e armazenadas em formol tamponado a 10% para a análise e o diagnóstico histopatológico da presença de necrose.

#### **4.3.5 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA**

Foi avaliada a transcrição gênica do mRNA dos genes dos mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e COX-2) nos tecidos coletados no protocolo de atividade hemorrágica.

Como não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle negativo (água Milli-Q) e o grupo veneno (ver resultados), foi realizada uma curva do comportamento cinético da atividade hemorrágica nos tempos: 30 minutos, 1 hora e 2 horas.

#### 4.3.5.1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

O processo de extração de RNA foi realizada com o Kit RNeasy Lipid Tissue Mini (QIAGEN) de acordo com o protocolo do fabricante. Após a finalização do processo de extração, 1 µL de RNA total de cada amostra foi dosado com o Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com a finalidade de verificar a qualidade das amostras e quantificar suas concentrações para fornecer RNA para transcrição em DNA complementar (cDNA).

#### 4.3.5.2 SÍNTESE DE cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo da reação continha 1 µL da enzima transcriptase reversa, 4 µL do tampão 5x iScript Reaction Mix (solução constituída de oligonucleotídeos e iniciadores aleatórios), um volume da amostra de RNA uniformizado para 200ng/µL e completado a reação com água livre de nuclease em volume suficiente para completar 20µL. O protocolo padrão do termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, EUA) foi 25° C por 5 min., 42° C por 30 min., 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até sua posterior utilização no PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

#### 4.3.5.3 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QPCR)

A transcrição do mRNA dos genes dos mediadores inflamatórios foi avaliada com o aparelho do iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos ). O gene de referência utilizado foi o YWHAZ da fosfolipase A<sub>2</sub> (proteína zeta polipeptídeo de ativação tirosina 3-monoxigenase/ triptofano 5-monoxigenase) (CHEN *et al.*, 2007).

Para a reação foi utilizado 10 µL da SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra), 2 µL de cada iniciador (0,2 µM) e 1 µL de cDNA das amostras completando com água livre de nuclease para um volume final de 20µL. Todas as amplificações foram finalizadas com a curva de melting, realizada para assegurar especificidade da amplificação e detectar a formação de dímeros de iniciadores ou qualquer outro produto inespecífico.

Os valores do ciclo quantitativo (C<sub>q</sub> ou C<sub>t</sub>) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft, Estados Unidos) e os níveis relativos de mRNA foram

calculados de acordo com a metodologia  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , qual  $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do grupo tratado}) / (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene referência do controle})$  como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

#### **4.3.6 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)**

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, cuja presença foi determinada pelo método colorimétrico.

Nesse ensaio, foi realizada uma curva do comportamento cinético da presença de neutrófilos nos tempos: 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas e 72 horas, obtendo-se os tecidos através dos protocolos descritos para a atividade hemorrágica e atividade necrosante. Depois foram realizados bloqueios com tetraciclina (1 mg de veneno + 10 mg de tetraciclina/mL) nos picos de presença de neutrófilos dessa curva (ver resultados).

Uma porção da amostra de tecido foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (brometo de hexadeciltrimetilamônio), na proporção de 50mg de tecido por mL, e homogeneizada e centrifugada (1500g/15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante (placas de 96 wells), 200µL da solução de leitura (5mg O-dianisidine; 15µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3mL phosphate buffer; 27mL H<sub>2</sub>O) foram adicionados e lidos a 460nm ( $t_0=0\text{min}$  e  $t_1=1\text{min}$ ). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e expressa como neutrófilos/mg de tecido (atividade de MPO).

#### **4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA**

Depois da devida fixação dos tecidos (pele) em formol tamponado a 10% por 24 a 48 horas, foram realizados cortes transversais atingindo toda a espessura do fragmento e eleitos dois cortes para serem colocados em cassetes histológicos (PROPHET *et al.*, 1992). O material foi processado rotineiramente para exame histológico em processador automático de tecidos Lupe® modelo PT09 (histotécnico), para ser, então, desidratado em concentrações crescentes de 70% a 100% de etanol. Após o processamento, foi realizada a inclusão do material em parafina, utilizando o equipamento para Banho Histológico Modelo BH05. O material nos blocos de parafina foi cortado em 4 µm de espessura e colocado em lâminas histológicas para posterior processo de coloração. Os cortes histológicos foram obtidos

utilizando-se micrótomo de impacto (Poycut S, Leica, Alemanha) equipado com navalha de tungstênio de 16 cm, tipo D (Leica, Alemanha). As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi então realizada e registrada através de fotomicrografias. O diagnóstico histopatológico foi dado pelo patologista Dr. Dalgimar Beserra de Menezes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

#### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  SEM. A significância das diferenças entre as médias foi avaliada por análise de variância (ANOVA), one-way ou two-way, seguido pelo teste de Bonferroni, no caso onde havia mais de 2 grupos, ou através do teste de Mann Whitney, quando apenas 2 grupos foram comparados. Os resultados foram considerados significantes quando  $*p < 0,05$ .

#### **4.6 ASPECTOS ÉTICOS**

Os cuidados com os animais estão de acordo com os preceitos da Ética em Experimentação Animal e o presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo 52/13.

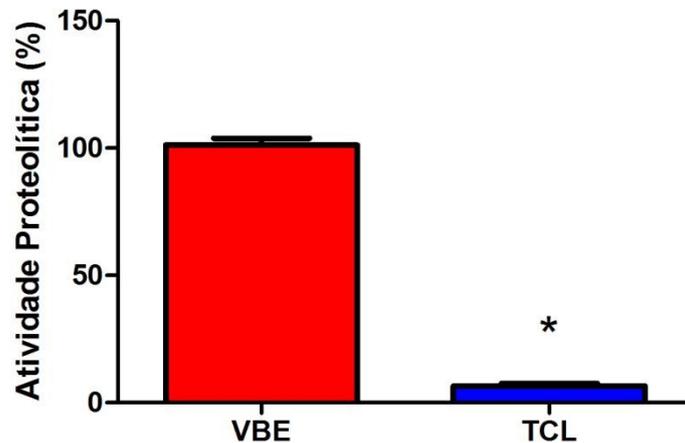
# **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A figura 05 mostra a atividade proteolítica do veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE) sobre a azocaseína. A atividade proteolítica do VBE foi de  $101,2 \pm 2,56$  %. Esta atividade foi reduzida para  $6,59 \pm 0,92$  % após incubação do veneno com a tetraciclina (TCL).

Figura 05: Neutralização da atividade proteolítica do veneno de *Bothropoides erythromelas* pela tetraciclina

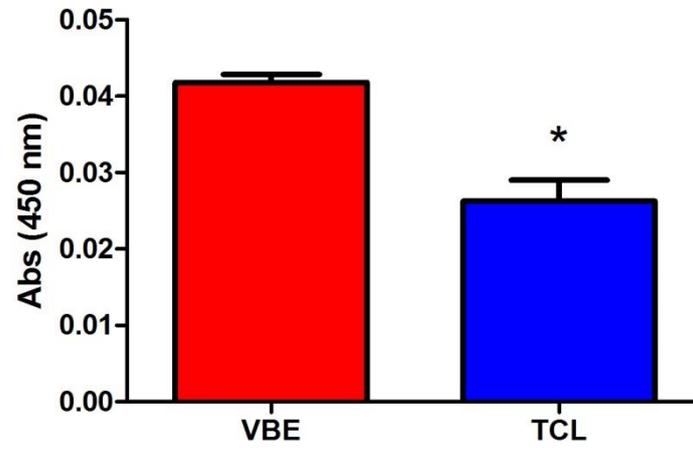


VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); TCL: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 1 mg/ml).

### 5.2 ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA A<sub>2</sub>

A figura 06 mostra a atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> do veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE), utilizando o ácido 4-nitro-3-ocatnoiloxi-benzóico (4N3OBA) como substrato. A atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> do VBE, após 40 minutos de reação, foi de  $0,04 \pm 0,001$ , em valor de absorbância. Esta atividade foi reduzida para  $0,02 \pm 0,003$  quando o veneno foi incubado com a tetraciclina (TCL).

Figura 06: Neutralização da atividade fosfolipásica  $A_2$  do veneno de *Bothropoides erythromelas* pela tetraciclina

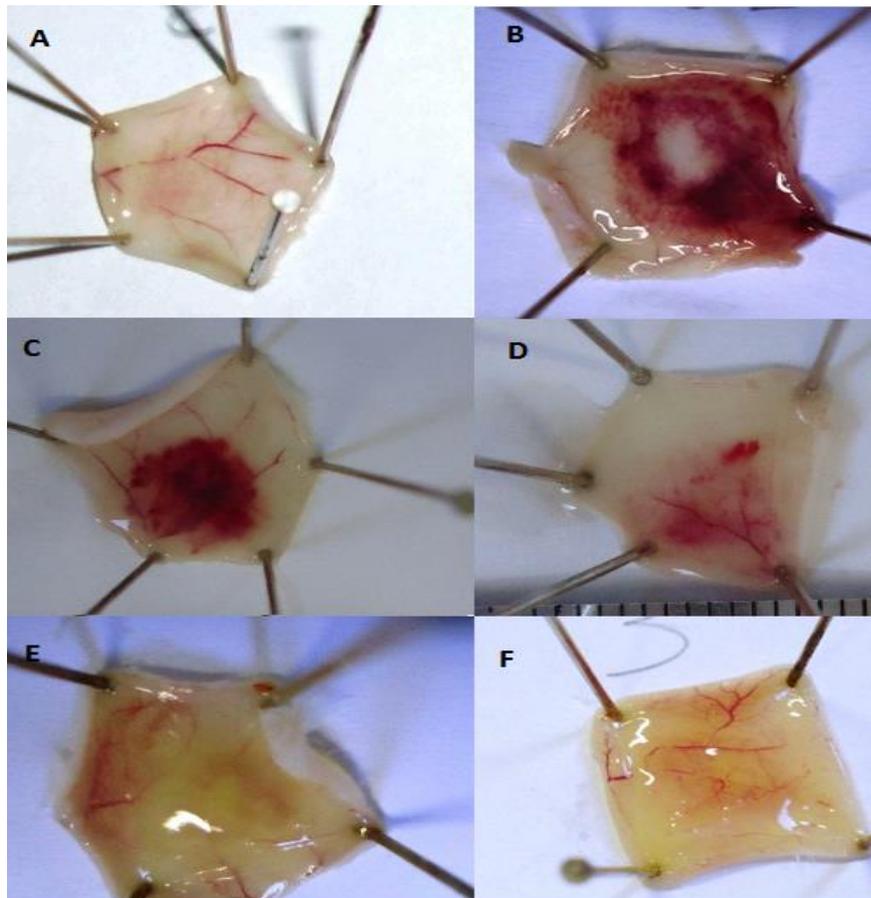


VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); TCL: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 1 mg/mL).

### 5.3 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Na figura 07, são mostradas as imagens das superfícies internas da pele dorsal dos camundongos, injetadas intradermicamente (i.d.) com os tratamentos, para a mensuração da área do halo hemorrágico após 2h de injeção.

Figura 07: Fotografias das áreas internas da pele dorsal de camundongos.

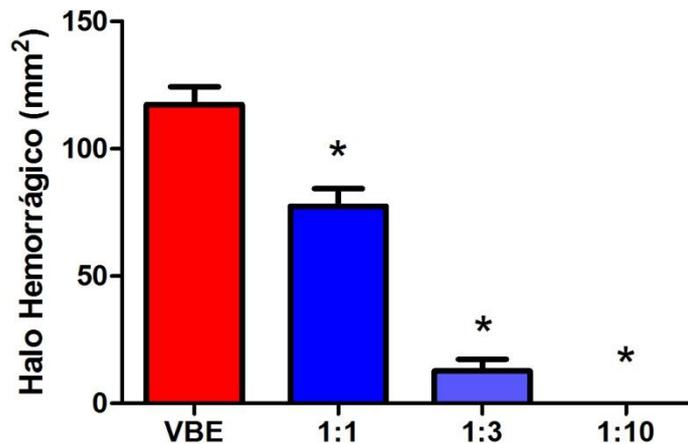


A: Controle (água Milli-Q); B: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); C, D e E: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1mg + 1 mg/mL, 1 mg + 3 mg/mL e 1 mg + 10 mg/mL, respectivamente); F: Controle (tetraciclina, 10 mg/mL).

A extensão da área do halo hemorrágico induzido pelo veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE) foi de  $117,3 \pm 7,005 \text{ mm}^2$ . Este valor foi gradativamente reduzido à medida que a dose de bloqueio de tetraciclina foi aumentada. Na razão 1:1, houve redução para o valor de  $77,45 \pm 6,88 \text{ mm}^2$ , enquanto que na razão 1:3 este valor foi para  $12,63 \pm 4,7 \text{ mm}^2$ . Na razão 1:10, o bloqueio foi total e não foi observada a formação de halo hemorrágico.

Os grupos controles (água Milli-Q e apenas tetraciclina) não induziram formação de halo e, portanto, não foram incluídos no gráfico (Figura 08).

Figura 08: Redução da área do halo hemorrágico induzido pelo veneno de *Bothropoides erythromelas* pela tetraciclina



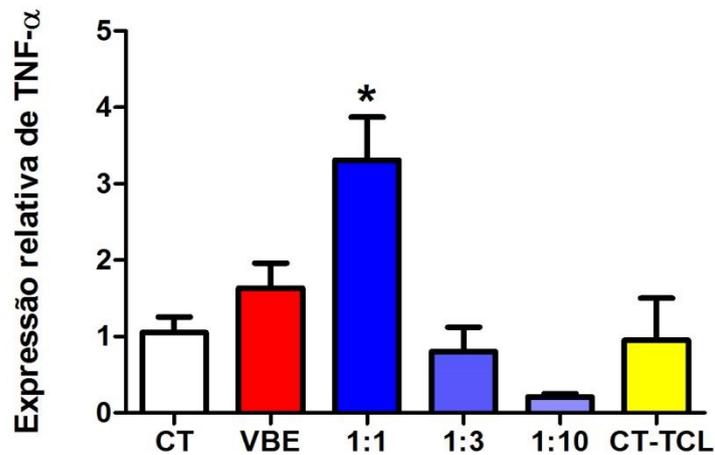
VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); 1:1; 1:3 e 1:10: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 1 mg/mL, 1 mg + 3 mg/mL e 1 mg + 10 mg/mL, respectivamente).

## 5.4 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA

### 5.4.1 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE TNF- $\alpha$

Na figura 09, observa-se que os níveis relativos da transcrição gênica de TNF- $\alpha$  induzidos pelo veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE) não diferiram significativamente do grupo controle (CT) (CT:  $1,0523 \pm 0,2025$ ; VBE:  $1,635 \pm 0,3268$ ). Contudo, quando incubado com a tetraciclina na razão 1:1, houve aumento da transcrição do mRNA ( $3,31 \pm 0,5643$ ). Nas razões 1:3 e 1:10, os valores mantiveram-se nos níveis basais ( $0,8 \pm 0,3242$  e  $0,21 \pm 0,04143$ , respectivamente). O grupo tratado apenas com tetraciclina (CT-TCL) também não apresentou diferença significativa com o grupo CT ( $0,9525 \pm 0,5502$ ).

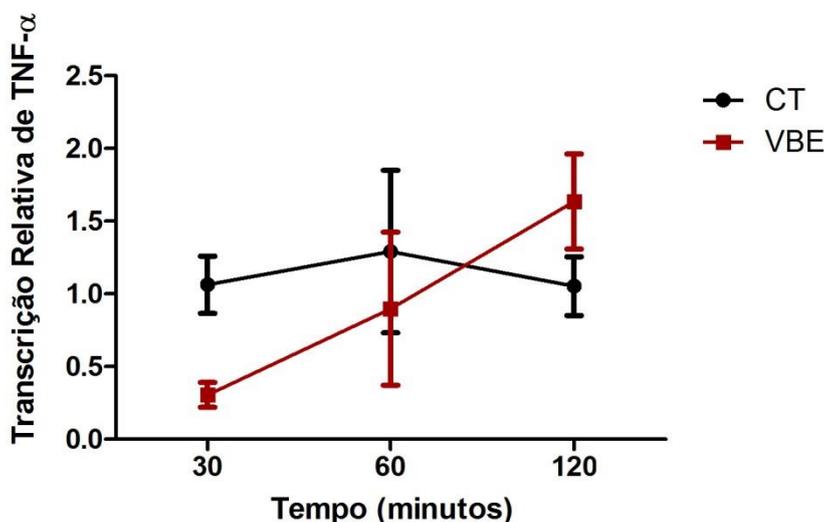
Figura 09: Níveis de transcrição gênica de TNF- $\alpha$  após 2 horas de tratamento



CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); 1:1, 1:3 e 1:10: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 1 mg/mL, 1 mg + 3 mg/mL e 1 mg + 10 mg/mL, respectivamente); CT-TCL: Tetraciclina (10 mg/mL).

De acordo com a figura 10, a curva do comportamento cinético da transcrição gênica de TNF- $\alpha$  induzida pelo VBE não apresentou diferença significativa em relação à curva do CT em nenhum dos tempos analisados (30 minutos: CT:  $1,063 \pm 0,197$  vs VBE:  $0,305 \pm 0,085$ ; 60 minutos: CT:  $1,29 \pm 0,558$  vs VBE:  $0,897 \pm 0,527$ ; 120 minutos: CT:  $1,053 \pm 0,203$  vs VBE:  $1,635 \pm 0,327$ ).

Figura 10: Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de TNF- $\alpha$

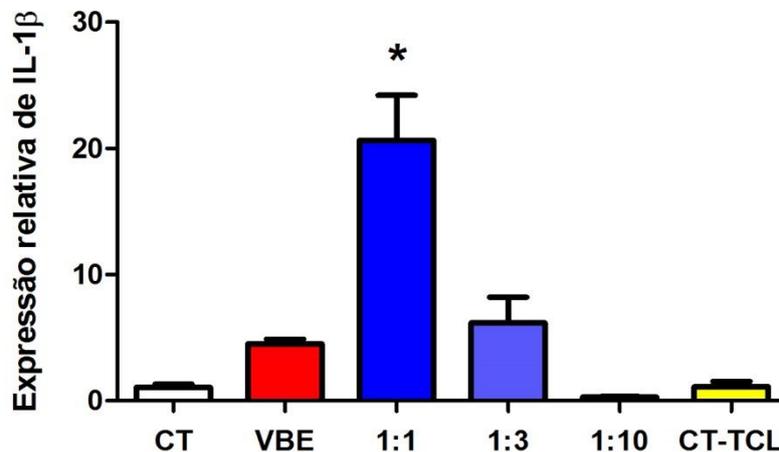


CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL)

### 5.4.2 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE IL-1 $\beta$

Os níveis relativos de expressão do mRNA de IL-1 $\beta$ , seguindo o mesmo padrão dos níveis de transcrição de TNF- $\alpha$ , apenas apresentou aumento significativo em relação ao controle (CT) quando o veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE) foi incubado com a tetraciclina na razão 1:1 (CT:  $1,068 \pm 0,2426$ ; VBE:  $4,523 \pm 0,3569$ ; 1:1:  $20,64 \pm 3,576$ ), como pode ser visto na figura 11. Novamente os tratamentos nas razões 1:3 e 1:10, e o grupo tratado apenas com tetraciclina (CT-TCL), mantiveram-se nos níveis basais.

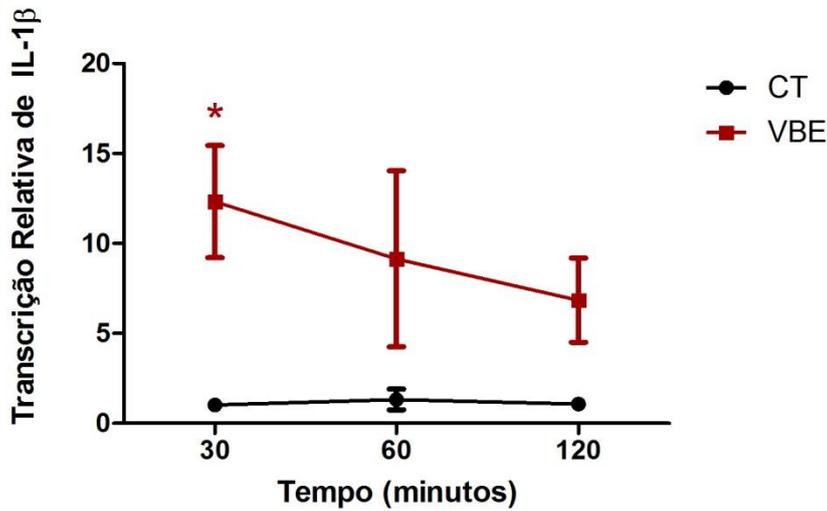
Figura 11: Níveis de transcrição gênica de IL-1 $\beta$  após 2 horas de tratamento



CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); 1:1, 1:3 e 1:10: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 1 mg/mL, 1 mg + 3 mg/mL e 1 mg + 10 mg/mL, respectivamente); CT-TCL: Tetraciclina (10 mg/mL).

A curva cinética dos níveis de expressão gênica de IL-1 $\beta$  apresentou aumento em relação à curva do CT no tempo de 30 minutos (CT:  $1,028 \pm 0,141$ ; VEB:  $12,327 \pm 3,114$ ). Nos tempos de 60 minutos (CT:  $1,33 \pm 0,141$ ; VEB:  $9,148 \pm 4,893$ ) e 120 minutos (CT:  $1,067 \pm 0,243$ ; VEB:  $6,847 \pm 2,338$ ), os valores mantiveram-se nos níveis basais.

Figura 12: Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de IL-1 $\beta$

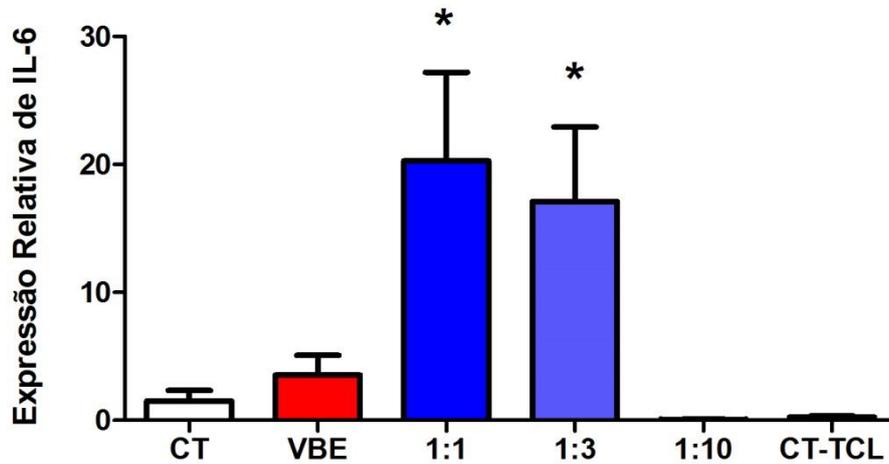


CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL)

#### 5.4.3 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE IL-6

De acordo com o gráfico dos níveis de transcrição gênica de IL-6 (figura 13), novamente nota-se que o veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE) não apresentou diferença significativa com o grupo controle (CT), assim como o grupo tratado apenas com tetraciclina (CT-TCL) e no grupo tratado na razão 1:10 (CT:  $1,523 \pm 0,8125$ ; VBE:  $3,54 \pm 1,560$ ; CT-TCL:  $0,2675 \pm 0,1022$ ). Entretanto, nos grupos tratados na razão 1:1 e 1:3, observou-se aumento dos níveis de expressão ( $20,29 \pm 6,916$  e  $17,11 \pm 5,817$ , respectivamente).

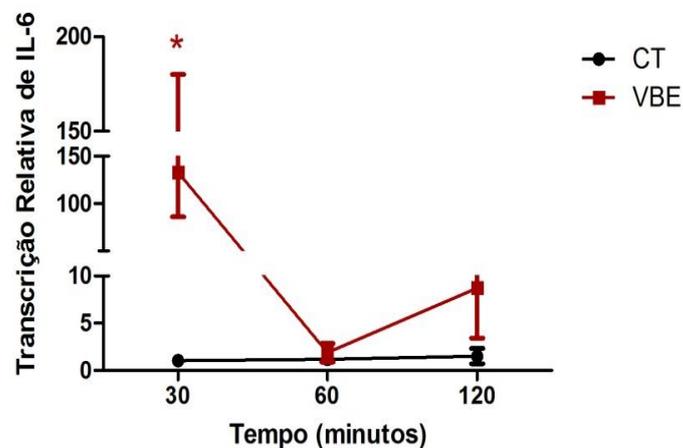
Figura 13: Níveis de transcrição gênica de IL-6 após 2 horas de tratamento



CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); 1:1, 1:3 e 1:10: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 1 mg/mL, 1 mg + 3 mg/mL e 1 mg + 10 mg/mL, respectivamente); CT-TCL: Tetraciclina (10 mg/mL).

No gráfico da curva cinética dos níveis de expressão de mRNA de IL-6 (figura 14), houve aumento expressivo induzido pelo VBE no tempo de 30 minutos (CT:  $1,058 \pm 0,206$ ; VEB:  $133,06 \pm 46,972$ ). Não foram observadas diferenças nos tempos de 60 minutos (CT:  $1,2 \pm 0,455$ ; VEB:  $1,883 \pm 0,981$ ) e 120 minutos (CT:  $1,523 \pm 0,813$ ; VEB:  $8,707 \pm 5,284$ ).

Figura 14: Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de IL-6

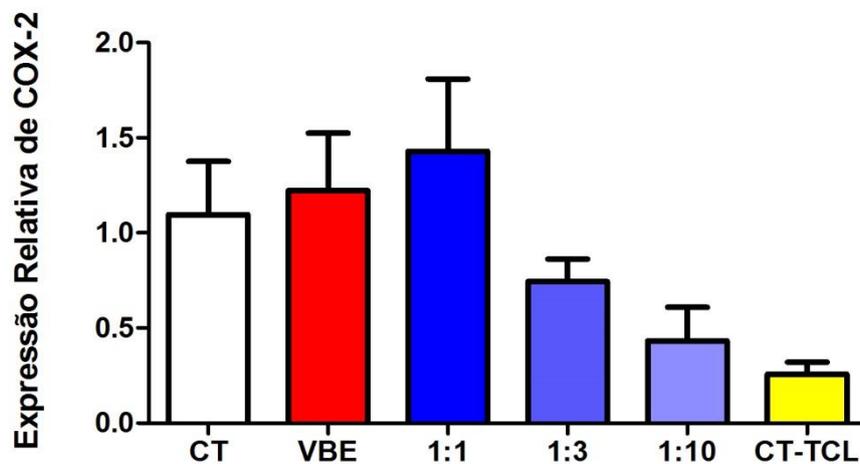


CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL)

#### 5.4.4 AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA DE COX-2

Na figura 15, verifica-se que não houve diferença significativa dos níveis de transcrição gênica entre nenhum dos grupos (CT:  $1,095 \pm 0,2808$ ; VBE:  $1,223 \pm 0,3021$ ; 1:1:  $1,430 \pm 0,3789$ ; 1:3:  $0,7433 \pm 0,1189$ ; 1:10:  $0,4325 \pm 0,1765$ ; CT-TCL:  $0,2575 \pm 0,06277$ ).

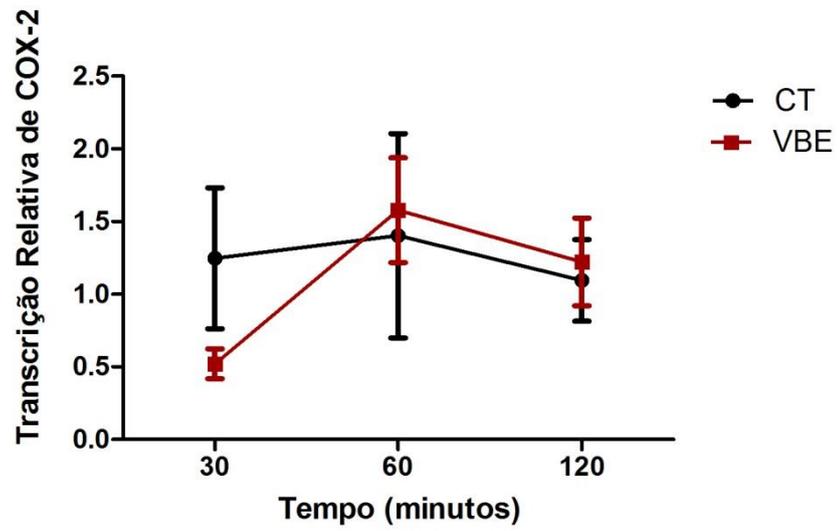
Figura 15: Níveis de transcrição gênica de COX-2 após 2 horas de tratamento



CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); 1:1, 1:3 e 1:10: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 1 mg/mL, 1 mg + 3 mg/mL e 1 mg + 10 mg/mL, respectivamente); CT-TCL: Tetraciclina (10 mg/mL).

De acordo com a figura 16, não houve diferença significativa entre a curva cinética dos níveis de expressão gênica de COX-2 induzidos pelo VBE e a curva do CT em nenhum dos tempos avaliados (30 minutos: CT:  $1,248 \pm 0,485$  vs VEB:  $0,52 \pm 0,103$ ; 60 minutos: CT:  $1,403 \pm 0,703$  vs VEB:  $1,577 \pm 0,36$ ; 120 minutos: CT:  $1,095 \pm 0,281$  vs VEB:  $1,222 \pm 0,302$ ).

Figura 16: Curva cinética dos níveis de transcrição gênica de COX-2

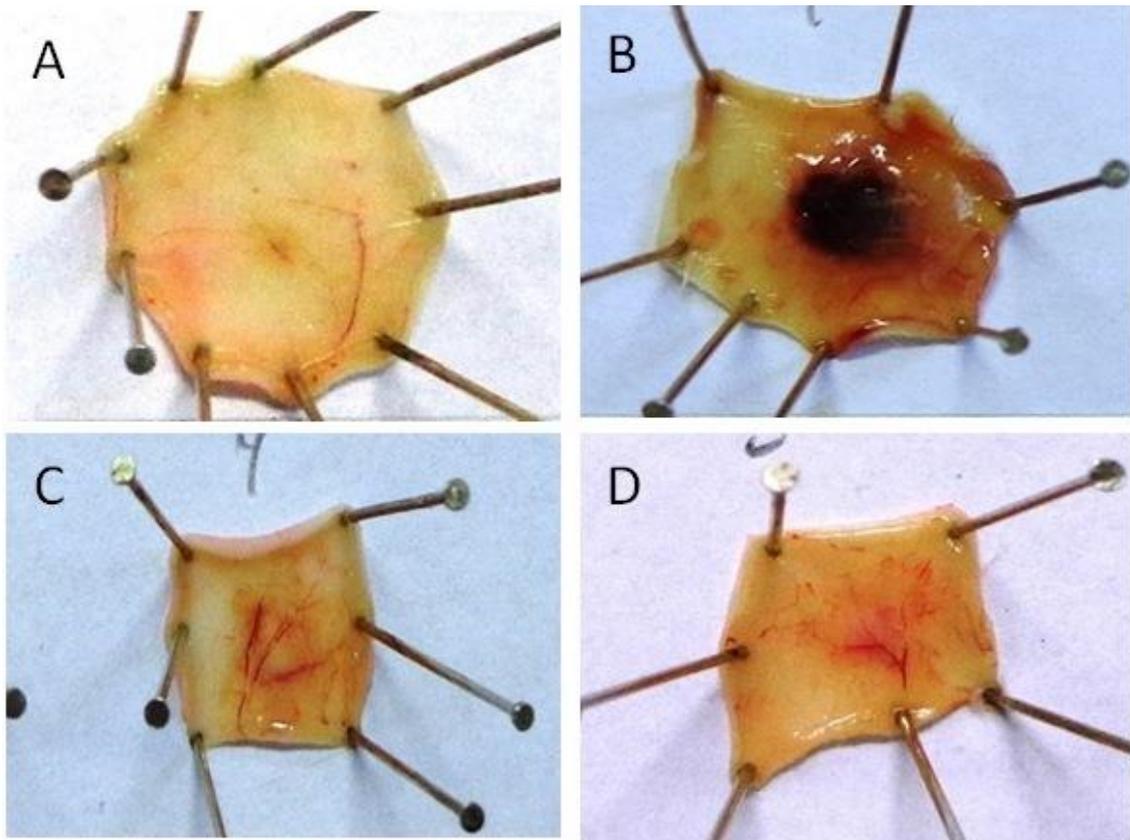


CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL)

### 5.5 ATIVIDADE NECROSANTE

Na figura 17, são mostradas as imagens das superfícies das faces internas das peles dorsais dos camundongos, injetadas intradermicamente (i.d.) com os tratamentos, para mensuração da área do halo necrótico 72 horas após a injeção.

Figura 17: Fotografias das áreas internas da pele dorsal dos camundongos.



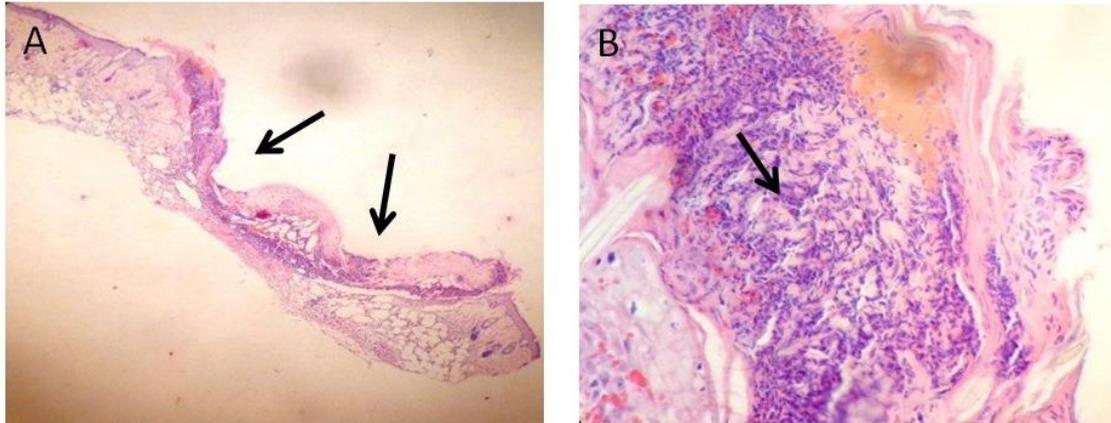
A: Água Milli-Q; B: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); C: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 10 mg/mL); D: Tetraciclina (10 mg/mL)

A extensão da área do halo necrótico induzido pelo veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE) foi de  $20,79 \pm 1,248 \text{ mm}^2$ . Não foi observada formação de halo necrótico quando o veneno foi incubado com a tetraciclina (1 mg + 10 mg/mL). Da mesma forma não houve formação de halo no grupo controle.

A análise histopatológica dos tecidos de pele foi realizada com os 3 grupos. A análise dos cortes de pele que foram tratadas com o VBE mostrou destruição parcial da epiderme, com ulceração e presença de crosta necrótica (figura 18). A derme apresentou grande afluxo

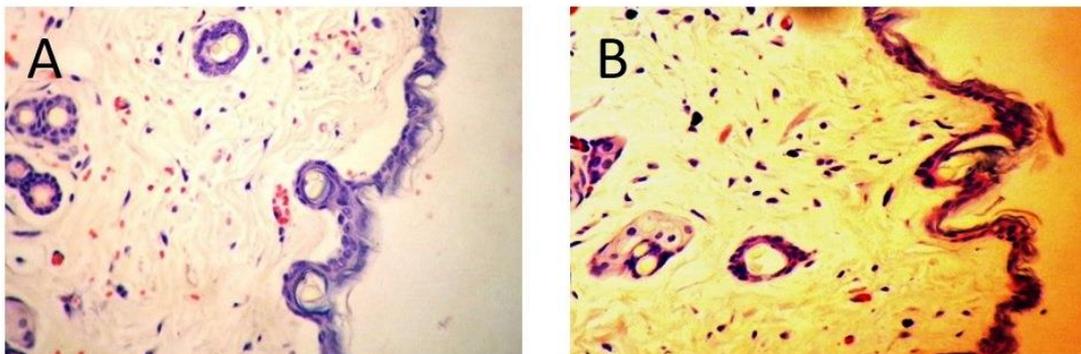
de infiltrado granulocítico. Já o grupo controle e o grupo tratado com tetraciclina, apresentaram epiderme e derme íntegras e sem alterações morfológicas (figura 19).

Figura 18: Fotomicrografia de luz de seções transversais de 4 µm de espessura de pele de camundongo tratada com veneno de *Bothropoides erythromelas*



A: Setas apontando ulcerações na epiderme, com destruição tecidual parcial e crosta necrótica; B: Seta evidenciando extenso infiltrado granulocítico no derme. (Aumento 400x)

Figura 19: Fotomicrografia de luz de seções transversais de 4 µm de espessura de pele de camundongo Swiss dos grupos tratados com água Milli-Q e tetraciclina



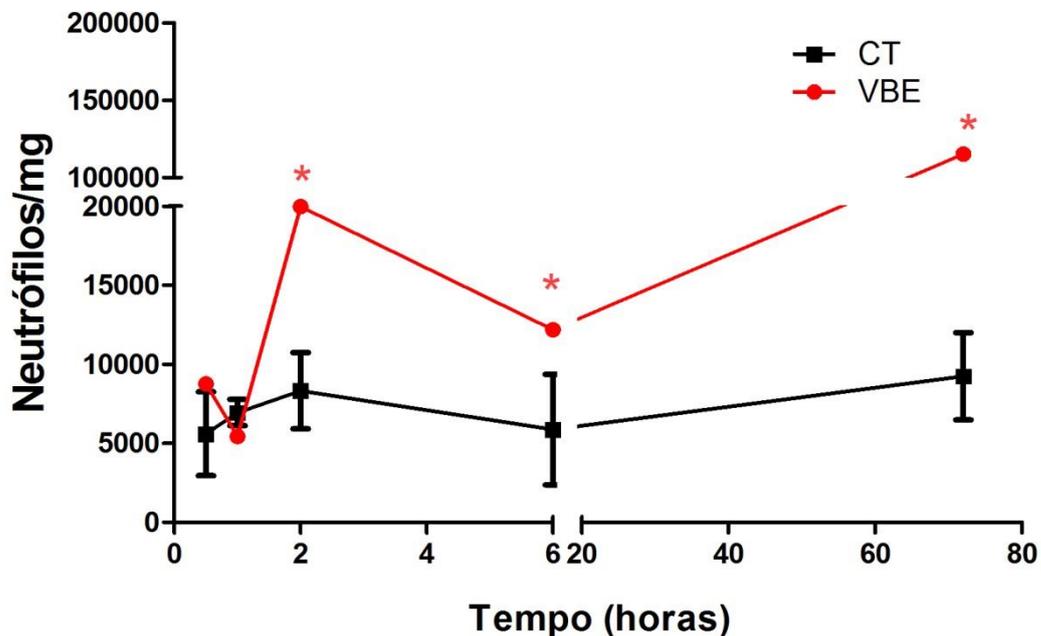
A: Grupo controle (Água Milli-Q); B: Grupo tratado com a tetraciclina (10 mg/mL). Ambos os grupos apresentam epiderme e derme normais, sem alterações morfológicas. (Aumento 400x)

## 5.6 ENSAIO DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

A curva cinética do número de neutrófilos por peso de tecido apresentou aumento induzido pelo veneno de *Bothropoides erythromelas* (VBE) nos tempos de 2 horas (CT:  $8.327 \pm 1.390$  neutrófilos/mg; VBE:  $19.977 \pm 3.054$  neutrófilos/mg), 6 horas (CT:  $5.872 \pm 2.017$

neutrófilos/mg; VBE:  $12.188 \pm 1.467$  neutrófilos/mg) e 72 horas (CT:  $9.243 \pm 1.592$  neutrófilos/mg; VBE:  $115.265 \pm 20.106$  neutrófilos/mg) em relação à curva do grupo controle (CT). Nos tempos de 30 minutos (CT:  $5.604 \pm 1.535$  neutrófilos/mg; VBE:  $8.760 \pm 1.549$  neutrófilos/mg) e 1 hora (CT:  $6.943 \pm 864$  neutrófilos/mg; VBE:  $5.432 \pm 477,2$  neutrófilos/mg), os valores mantiveram-se nos níveis basais (figura 20).

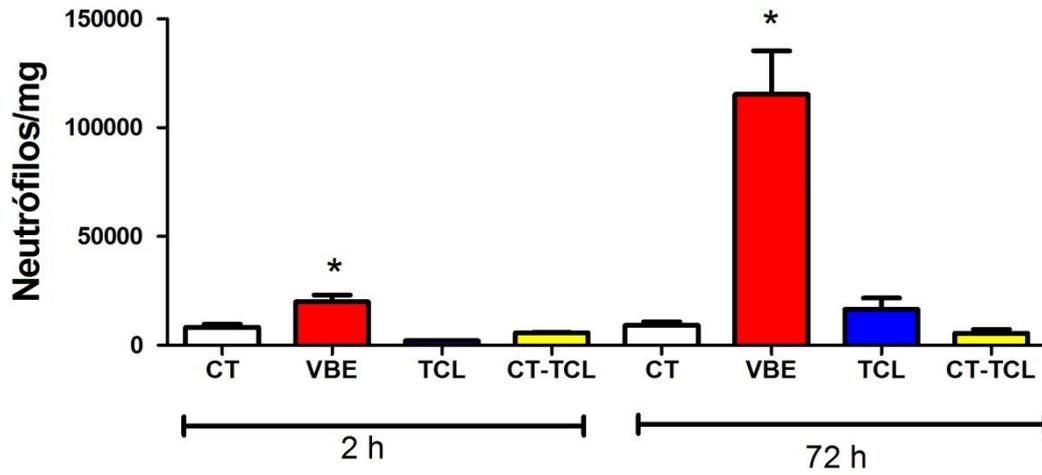
Figura 20: Curva cinética do número de neutrófilos por unidade de peso de tecido



CT: Água Milli-Q; VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL)

O tratamento dos picos da curva cinética (2 horas e 72 horas) com a tetraciclina (1 mg de veneno + 10 mg de tetraciclina/mL) reduziu os valores dos picos para os níveis basais (TCL 2 horas:  $2.020 \pm 210,2$  neutrófilos/mg; TCL 72 horas:  $16.506 \pm 5.142$  neutrófilos/mg). Os valores dos grupos tratados apenas com a tetraciclina (10 mg/mL) também mantiveram-se nos níveis basais (CT-TCL 2 horas:  $5.627 \pm 485,5$ ; CT-TCL 72 horas:  $5.565 \pm 1.779$  neutrófilos/mg) (figura 21).

Figura 21: Neutralização dos picos neutrofílicos pela tetraciclina



CT: Controle (água Milli-Q); VBE: Veneno de *Bothropoides erythromelas* (1 mg/mL); TCL: Veneno de *Bothropoides erythromelas* incubado com a tetraciclina (1 mg + 10 mg/mL); CT-TCL: Tetraciclina (10 mg/mL).

# DISCUSSÃO

## 6 DISCUSSÃO

A fisiopatologia do envenenamento ofídico envolve uma série complexa de eventos que são dependentes de uma ação combinada dos componentes farmacologicamente ativos da peçonha. Envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops sensu lato* são frequentemente associados com complexas e severas alterações patológicas locais, incluindo edema, hemorragia, formações vesiculares na pele, dermonecrose e necrose do músculo esquelético (WARREL, 2005; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2009). Esses efeitos são principalmente o resultado da ação direta de metaloproteinases e de fosfolipases A<sub>2</sub> miotóxicas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009; ZAMUNER *et al.*, 2005).

Os venenos botrópicos contêm muitas enzimas proteolíticas que degradam uma variedade de substratos naturais tais como caseína, fibrinogênio, colágeno e outros substratos sintéticos. Toxinas hemorrágicas estão entre estas enzimas, que são responsáveis pela degradação proteolítica a partir da matriz extracelular ou alterações na coagulação sanguínea e precisam de um íon metálico bivalente para sua atividade. Sabe-se que as metaloproteinases de veneno de serpente (SVMP) são as principais toxinas envolvidas no sangramento e necrose da pele, relacionadas com a capacidade destas em degradar as proteínas da matriz extracelular e da membrana basal (ESCALANTE *et al.*, 2011). Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias alvejando a inibição das SVMPs constitui um relevante passo no sentido de melhorar o tratamento de envenenamentos por serpentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2007).

O fato de que muitos inibidores de metaloproteinases de matriz (MMPs) têm sido desenvolvidos e testados na prática clínica para uma gama de doenças permite que tais inibidores sejam testados contra SVMPS. As tetraciclidas são inibidores de MMPs bem descritas e cuja ação é baseada, dentre outros mecanismos sugeridos, na quelatação do átomo de zinco presente no centro catalítico das metaloproteinases (TERONEN *et al.*, 1999; ACHARYA *et al.*, 2004). Assim, essas drogas possuem um potencial valor para o envenenamento por serpentes, especialmente por serem de fácil acesso e relativamente baratas.

A atividade proteolítica do veneno de *B. erythromelas* sobre a azocaseína foi inibida pela incubação com a tetraciclina, corroborando com estudo anterior de Rucavado *et al.* (2008), que também obteve sucesso em inibir a atividade proteolítica do veneno de *Bothrops*

*asper* com doxiciclina. Esses resultados sugerem que as SVMPS são em grande parte responsáveis pela proteólise do veneno.

Quando incubada com o veneno antes da injeção, a tetraciclina também foi capaz de abolir a formação do halo hemorrágico e do halo necrótico, quando a dose de tetraciclina foi 10 vezes maior que a de veneno. Rucavado, Escalante e Gutiérrez (2000) obtiveram resultado semelhante incubando o veneno de *B. asper* com doxiciclina antes da injeção.

Portanto, o provável mecanismo de inibição da tetraciclina sobre as atividades proteolítica, hemorrágica e necrosante do veneno de *B. erythromelas* é resultante da ação quelante sobre o íon zinco presente no sítio catalítico das SVMPS presente no veneno.

A redução da atividade fosfolipásica  $A_2$  do veneno de *B. erythromelas* pela tetraciclina vai ao encontro de um estudo realizado por Pruzanski *et al.* (1992), no qual foi demonstrado que as tetraciclinas doxiciclina e minociclina são úteis no tratamento de mamíferos sofrendo de condições associadas ao excesso de atividade fosfolipásica  $A_2$ , como artrite reumatoide, por exemplo. O resultado da ação da tetraciclina indica que ela também é eficaz contra homólogos de fosfolipases  $A_2$  presentes nos venenos de serpente.

A reação inflamatória local é característica do envenenamento de serpentes do gênero *Bothrops sensu lato*, envolvendo formação de edema e mobilização de leucócitos (GUTIÉRREZ; CHAVES; CERDAS, 1986). A progressão da resposta inflamatória é caracterizada por um progressivo recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, seguido por células mononucleares. Os neutrófilos são os primeiros polimorfonucleares a migrarem para a área inflamada e desempenham um papel fundamental na eliminação de agentes nocivos (TEIXEIRA *et al.*, 2005). Neutrófilos também podem contribuir para a resolução das alterações teciduais causadas por vários agentes tóxicos, tais como venenos, pela remoção dos detritos, levando à substituição ordenada das células, reparação e regeneração dos tecidos (TIDBALL *et al.*, 1995).

A possibilidade das células inflamatórias poderem contribuir para a patologia local de acidentes por serpentes botrópicas está relacionada com a ocorrência da ativação de leucócitos nos tecidos envenenados e não apenas porque há um recrutamento de células inflamatórias (ZAMUNÉR *et al.*, 2001).

Estudos com o veneno de *Bothrops atrox* sugerem que os neutrófilos exercem importante papel na síntese das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-6 através do aumento da expressão do mRNA dessas moléculas e da liberação de NO pelas células adjacentes (ESCOCARD *et al.*, 2006).

As tetraciclinas, para além de sua ação antibiótica, podem ser úteis no tratamento de condições nas quais há o envolvimento de inflamação aguda ou crônica. Até mesmo tetraciclinas quimicamente modificadas (CMTs), desprovidas de atividade antimicrobiana, atenuam algumas manifestações do processo inflamatório (PATEL *et al.*, 1999; D'Agostino *et al.*, 2001; SANDLER *et al.*, 2005).

Quando os níveis de transcrição gênica dos mediadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e COX-2 foram avaliados nos tecidos obtidos no protocolo de atividade hemorrágica, não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e o grupo veneno. Entretanto, o grupo tratado com tetraciclina na razão 1:1, paradoxalmente, induziu aumento da expressão do mRNA desses mediadores. À medida que a concentração de tetraciclina foi aumentada, os valores de transcrição gênica mantiveram-se nos níveis basais.

Não é claro se as atividades pleiotrópicas das tetraciclinas em modelos de dor e inflamação resultam da interação com alvos moleculares específicos ou são dependentes da quelatação de íons divalentes, particularmente Ca<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>. Ca<sup>2+</sup> é essencial para enzimas envolvidas na síntese de vários mediadores inflamatórios (MIRANDA *et al.*, 1992; CHARLES, 1994; SOLA *et al.*, 1999).

Os efeitos induzidos pelas tetraciclinas podem ser devido à inibição de um alvo molecular primário no processo inflamatório, inibindo, assim, diversos passos subsequentes. Foi demonstrado que a minociclina inibe a enzima poli-(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) (ALANO *et al.*, 2006). Esta enzima promove o reparo do DNA em condições de estresse e induz efeitos na transcrição gênica através da interação com fatores de transcrição, especialmente Kappa B, o que pode resultar na expressão de diversos mediadores inflamatórios e enzimas envolvidas na sua síntese, incluindo citocinas, COX-2 e iNOS (CUZZOCREA *et al.*, 2002). Sabe-se também que a ativação de PARP-1 requer a presença de Ca<sup>2+</sup> como cofator (BENTLE *et al.*, 2006).

Os venenos de serpentes são reconhecidos por sua complexidade bioquímica. Um dado veneno de serpente pode conter vários milhares de proteínas (FOX *et al.*, 2002). Alguns estudos sugerem, como o de Sousa *et al.* (2001), que os venenos de serpente possuem um mecanismo de auto inibição sobre seus próprios constituintes, através de pequenos peptídeos presentes. Pode-se especular que o resultado obtido com o tratamento com tetraciclina em concentração igual à do veneno é suficiente para inibir primariamente esses peptídeos, tornando outras proteases mais disponíveis para exercer suas ações, o que explicaria o aumento da transcrição gênica dos mediadores inflamatórios neste grupo. À medida que a concentração de tetraciclina foi aumentada, as proteases do veneno foram sendo

gradativamente inibidas e os níveis de transcrição gênica retornaram aos valores basais. Contudo, estudos mais específicos e aprofundados seriam necessários para confirmar essa hipótese.

Como não foi encontrada diferença significativa dos níveis de transcrição gênica dos mediadores inflamatórios avaliados, foi realizada uma curva cinética desses níveis de transcrição. Os resultados mostraram aumento significativo no tempo de 30 minutos dos níveis de transcrição para IL-6 e IL-1 $\beta$ , sugerindo o envolvimento dessas citocinas na atividade inflamatória de *B. erythromelas*. Para confirmar tal envolvimento, protocolos experimentais de avaliação de expressão proteica fazem-se necessários.

Flores, Zappellini e Prado-Franceschi (1993) demonstraram que os venenos de *B. erythromelas* e *Bothrops alternatus* causaram migração neutrofílica *in vivo* e que este efeito é indireto, via liberação de mediadores quimiotáticos derivados do ácido araquidônico. Estas observações reforçaram a importância do acúmulo celular que surge no local da picada, e sugeriram que este fenômeno pode ter importantes implicações para o desenvolvimento das reações locais severas após o envenenamento, incluindo edema e inflamação.

A enzima mieloperoxidase (MPO) é encontrada em grânulos azurófilos de neutrófilos. É a principal proteína de neutrófilos, correspondendo a aproximadamente 5% do peso seco da célula (KLEBANOFF, 2005). MPO também é encontrada em uma extensão menor em monócitos e alguns macrófagos. Na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e um haleto (cloreto [Cl], brometo [Br], tiocianato [SCN]), tirosina ou óxido nítrico (NO), MPO catalisa a formação de potentes intermediários reativos, incluindo ácido hipocloroso (HOCl), hipobromoso (HOBr) e hipotiociânico (HOSCN), radicais tirosil e espécies reativas de nitrogênio, respectivamente, causando profundos efeitos biológicos através da modificação de proteínas, lipídeos e/ou DNA (KLEBANOFF, 2005; DAVIES *et al.*, 2008).

A curva cinética do ensaio de mieloperoxidase (MPO) apresentou 2 picos (2 horas e 72 horas, sendo este o maior) que foram revertidos aos níveis basais pelo tratamento com a tetraciclina. A grande intensidade do maior pico foi confirmada pela análise histopatológica das lesões necróticas de 72 horas induzidas pelo veneno de *B. erythromelas*, onde foi observado um extenso infiltrado inflamatório neutrofílico, o qual não era presente nos tecidos tratados com a tetraciclina.

Estudos de Gabler e Creamer (1991) demonstraram que as tetraciclinas suprimiram funções neutrofílicas, como a síntese de ânion superóxido, a degranulação e a migração.

A inflamação induzida por carragenina é bem caracterizada e envolve migração celular, exsudação do plasma e produção de mediadores, como NO, prostaglandina E<sub>2</sub>

(PGE<sub>2</sub>), IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (SALVEMINI *et al.*, 1996; LORAM *et al.*, 2007). Estudos mostraram que as tetraciclina doxiciclina e minociclina foram eficazes em reduzir a imigração leucocitária induzida por carragenina i.p. (OGINO *et al.*, 1996; TAKANO *et al.*, 1999; FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001).

Estudos experimentais demonstraram que o edema induzido pelo veneno de *Bothropoides jararaca* é de origem inflamatória, primariamente mediado por metabólitos do ácido araquidônico (TREBIEN e CALIXTO, 1989; PERALES *et al.*, 1992; GONÇALVES e MARIANO, 2000), e as metaloproteinases contribuem para esse efeito (GUTIÉRREZ *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2005; MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007).

As metaloproteinases foram associadas à migração celular induzida pelos venenos de *B. jararaca* e de *B. asper*, e esta migração é mediada por eicosanoides. Além disso, migração leucocitária inflamatória também ocorre quando o sistema complemento é ativado por metaloproteinases de venenos botrópicos (FARSKY *et al.*, 1997; FARSKY *et al.*, 2000).

Em outros venenos botrópicos, além das metaloproteinases, as fosfolipases A<sub>2</sub> também contribuem para a migração celular (TEIXEIRA *et al.*, 2003). O veneno de *B. erythromelas* apresentou atividade fosfolipásica A<sub>2</sub> *in vitro*. Contudo, não se pode afirmar que a degradação do ácido araquidônico que resultaria na produção de prostaglandinas e leucotrienos é mediada pelas fosfolipases A<sub>2</sub> do veneno ou do próprio tecido inflamado. Mais estudos são necessários.

Dessa forma, sugere-se que a tetraciclina inibiu a atividade inflamatória do veneno de *B. erythromelas*, em parte devido à inibição das SVMPs e da migração celular.

Para uma maior elucidação dos mecanismos pelos quais a tetraciclina inibiu as ações hemorrágica, necrosante e inflamatória do veneno de *B. erythromelas*, é necessário estudos de modelagem molecular com as metaloproteinases e fosfolipase A<sub>2</sub> isoladas do veneno e protocolos de expressão proteica para investigar os mediadores inflamatórios envolvidos.

# CONCLUSÃO

## 7 CONCLUSÃO

A tetraciclina, quando pré-incubada, promove previne as atividades proteolítica e fosfolipásica A<sub>2</sub>, o efeito hemorrágico, o efeito necrosante e a migração neutrofílica promovidos pelo veneno de *Bothropoides erythromelas*, mostrando sua ação neutralizante sobre os efeitos teciduais locais induzidos por uma espécie botrópica.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, M. R.; VENITZ, J.; FIGG, W. D.; SPARREBOOM, A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 195-208, 2004.
- ALANO, C. C.; KAUPPINEN, T. M.; VALLS, A. V.; SWANSON, R. A. Minocycline inhibits poly(ADP-ribose) polymerase-1 at nanomolar concentrations. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v.103, p. 9685-9690, 2006.
- ALBUQUERQUE-MODESTO, J. C.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R. C.; OLIVA, M. L. V.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. C. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops erythromelas* venom: Isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I<sub>2</sub> release by endothelial cells, **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 377-384, 2006.
- AMARAL, A. A new genera and species of snakes. **Proceedings of The New England Zoological Club**, v. 8, p. 85-105, 1923.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Org.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, 2003. p. 6-12.
- ARAÚJO, M. S.; MARTINS, M. The defensive strike of five species of lanceheads of the genus *Bothrops* (Viperidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 2, p. 327-332, 2007.
- BARRAVIERA, B. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n.4, p.209-250, 1993.
- BASTOS, L. F. S.; MERLO, L. A.; ROCHA, L. T. S.; COELHO, M. M. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p. 171-179, 2007.
- BENTLE, M. S.; REINICKE, K. E.; BEY, E. A.; SPITZ, D. R.; BOOTHMAN, D. A. Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 281, p. 33684-33696.
- BÉRNILS, R. S. (Org.). **Brazilian reptiles: List of species**. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Herpetologia, 2010. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 23 maio 2013.
- BODE, W.; GOMIS-RUTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.

BOECHAT, A. L. R.; PAIVA, C. S.; FRANÇA, F. O. S.; DOS-SANTOS, M. C. Heparin-antivenom association: differential neutralization effectiveness in *Bothrops atrox* and *Bothrops erythromelas* venom envenoming. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 1, p. 7-14, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Relatórios Gerenciais. **Acidentes por animais peçonhentos: notificação por tipo de serpente segundo ano**. 2012. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/area.cfm?id\\_area=1539](http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/area.cfm?id_area=1539)>. Acesso em: 30 maio 2013.

CARDOSO, J. L. C. Bothropic accidents: a review. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 52, p. 43-44, 1990.

CÉLÉRIER, P.; LITOUX, P.; DRÉNO, B. *In vitro* modulation of epidermal inflammatory cytokines (IL- $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) by minocycline. **Archives for Dermatological Research**, v. 288, p. 411-414, 1996.

CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos (continuação): Inibidores da síntese proteica e antibacterianos diversos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Ed.). **Goodman & Gilman: as Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, RJ: McGraw Hill Interamericana do Brasil, 2005. p. 929-953.

CHARLES, A. C. Glia-neuron intercelular calcium signaling. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, p. 196-206, 1994.

CHEN, P.; XIE, H.; MASLIV, S.; RENDER, S. Finding scientific gems with Google. **Journal of Informetrics**, v.1, p. 8-15, 2007.

COTRIM, C. A.; DE OLIVEIRA, S. C.; DIAZ FILHO, E. B.; FONSECA, F. V.; BALDISSERA JR, L.; ANTUNES, E.; XIMENES, R. M.; MONTEIRO, H. S. A.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; DE OLIVEIRA, T. D.; TOYAMA, M. H. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A<sub>2</sub>. **Chemico-Biological Interactions**, v.189, n.1/2, p.9-16, 2011.

CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P. K.; MAZZON, E.; DUGO, L.; SERRAINO, L.; BRITTI, D.; MAZZULLO, G.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 496-510, 2002.

D'AGOSTINO, P.; FERLAZZO, V.; MILANO, S.; LA ROSA, M.; DI BELLA, G.; CARUSO, R.; BARBERA, C.; GRIMAUDDO, S.; TOLOMEO, M.; FEO, S.; CILLARI, E. Anti-inflammatory effects of chemically modified tetracyclines by the inhibition of nitric oxide and interleukin-12 synthesis in J774 cell line. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1765-1776, 2001.

DA SILVA, J. O.; FERNANDES, R. S.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, C. Z.; MAZZI, M. V.; FRANCO, J. J.; GIULIATTI, S.; PEREIRA, P. S.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V.

Triterpenoid saponins, new metalloproteases snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 52, n. 6, p. 283-291, 2007.

DAVIES, M. J.; HAWKINS, C. L. PATTISON, D. I.; REES, M. D. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, n. 7, p. 1199-1234, 2008.

DUIVENVOORDEN, W. C.; HIRTE, H. W.; SINGH, G. Use of tetracycline as an inhibitor of matrix metalloproteinase activity secreted by human bone-metastasizing cancer cells. **Invasion Metastasis**, v. 17, p. 321-322, 1997.

EADY, E. A.; COVE, J. H.; HOLLAND, K. T.; CUNLIFFE, W. J. Superior antibacterial action and reduced incidence of bacterial resistance in minocycline compared to tetracycline-treated acne patients. **British Journal of Dermatology**, v. 122, p. 233-244, 1990.

ESCALANTE, T.; FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 269-274, 2000.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIERREZ, J. M.; FOX, J. W. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 455, n. 2, p. 144-153, 2006.

ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, p.1-14, 2011.

ESCOCARD, R. C.; KANASHIRO, M. M.; PETRETSKI, J. H.; AZEVEDO-SILVA, J.; QUEIROZ-DE-CARVALHO, E. C.; DIAS-DA-SILVA, W. KIPNIS, T. L. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Immunobiology**, v. 211, p. 37-43, 2006.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, J. R. R.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of The Linnean Society**, p. 617-640, 2009.

FARSKY, S. H.P.; WALBER, J.; COSTACRUZ, M.; CURRY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P. Leucocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon**, v. 35, p. 185-193, 1997.

FARSKY, S. H. P.; GONÇALVES, L. R. C.; 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. **Mediators of Inflammation**, v.9, p. 213-221, 2000.

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

FOX, J. W.; LONG, C. The ADAMs/MDC family of proteins and their relationships to the snake venom metalloproteinases. In: BAILEY, G. (Ed.). **Snake Venom Enzymes**. Ft. Collins, USA: Alaken Press, 1998. p. 151-178.

FOX, J. W.; SHANNON, J. D.; STEFANSSON, B.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D. G.; SERRANO, S. M. T.; CAMARGO, A. C. M.; SHERMAN, N. Role of discovery science in toxinology: examples in venom proteomics. In: MENEZ, A. (Ed.). **Perspectives in Molecular Toxinology**. Wiley, UK, 2002. p. 97-108.

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. **The FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

FRANÇA, F. O. S. Causes of deaths in snakes bites in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1678-1699, 2003.

FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, p. 162-168, 2001.

FURTADO, M. F.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; ANTONIO, L. C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, p. 219-226, 1991.

GABLER, W. L.; CREAMER, H. R. Suppression of human neutrophil functions by tetracyclines. **Journal of Periodontal Research**, v. 26, p. 52-58.

GOLUB, L. M.; LEHRER, G.; NEMIROFF, A.; MCNAMARA, T. F.; KAPLAN, R.; RAMAMURTHY, N. S. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes: preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **Journal of Periodontal Research**, v. 18, p. 516-526, 1983.

GOLUB, L. M.; CIANCIO, S.; RAMAMURTHY, N. S.; LEUNG, M.; MCNAMARA, T. F. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. **Journal of Periodontal Research**, v. 25, p. 321-330, 1990.

GOLUB, L. M.; RAMAMURTHY, N. S.; MCNAMARA, T. F.; GREENWALD, R. A.; RIFKIN, B. R. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 2, p. 297-321, 1991.

GOLUB, L. M.; LEE, H. M.; RYAN, M. E.; GIANNOBILE, W. V.; PAYNE, J.; SORSA, T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. **Advances in Dental Research**, v. 12, p. 12-26, 1998.

GOMES, A.; RINKU DAS, S. S.; MISHRA, R.; MUKHERJEE, S. M.; BHATTACHARYA, S. Herbs and herbal constituents active against snake bites. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 865-878, 2010.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, E.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with Bothrops asper venom. **Revista de Biología Tropical**, v. 34, p. 209-219, 1986.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase a(2), myotoxins from Bothrops snake-venoms. **Toxicon**, v.33, p. 1405-1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEON, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by Bothrops asper (tercicopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, p. 1529-1538, 1998.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos locales em el envenenamento ofídico em América latina. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. H.; HADDAD V. (Ed.). **Animas Peçonhentos no Brasil. Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: Savier, 2003. p. 310-323.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LÉON, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ÂNGULO, Y. Trends in snake bite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2935-2950, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v.54, n.7, p.958-975, 2009.

HANEMAAIJER, R.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y. T.; DING, Y.; SUTINEN, M.; VISSER, H.; HELAAKOSKI, T.; KAINULAINEN, T.; RÖNKÄ, H.; TSCHESCHE, H.; SALO, T. Matrix metalloproteinase-8 is expressed in rheumatoid synovial fibroblast and endothelial cells. Regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  and doxycycline. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 31504-31509, 1997.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in câncer therapy. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 93, p. 178-193, 2001.

HOWES, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; LAING, G. D. Neutralization of the haemorrhagic activities of viperine snake venom using synthetic peptide inhibitors and chelators. **Toxicon**, v. 49, p. 734-739, 2007.

- ISMAIL, M.; AL-BEKAIRI, A. M.; EL-BEDAIWY, A. M.; ABD-EL SALAM, M. A. The ocular effects of spitting cobras: I. The ringhals cobra (*Hemachatus haemachatus*) venom-induced corneal opacification syndrome. **Journal of Toxicology – Clinical Toxicology**, v. 31, p. 31-41, 1993.
- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627-642, 1996.
- 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. **Biochemical Journal**, v. 320, n. 2, p. 635-641, 1996.
- KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins snake venoms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 31, p. 218-224, 2001.
- KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 13, p. 43-52, 1960.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.
- LEDEBOER, A.; SLOANE, E. M.; MILLIGAN, E. D., MAHONY, J. H.; MAIER, S. F.; WALKINS, L. R. Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokines expression in rat models of pain facilitation. **Pain**, v. 115, p. 71-83, 2005.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methodology and Methods**, v. 25, n.4, p. 402-408, 2001.
- LOKESHWAR, B. L.; SELZER, M. G.; ZHU, B. Q.; BLOCK, N. L.; GOLUB, L. M. Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. **International Journal of Cancer**, v. 98, p. 297-309, 2002.
- LORAM, L. C.; FULLER, A.; FICK, L. G.; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **The Journal of Pain**, v. 8, p. 127-136, 2007.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n.12, p. 1749-1800, 1998.
- MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; NAKAJIMA, N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, v. 30, p. 853-864, 1992.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

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

MIRANDA, H. F.; BUSTAMANTE, D.; KRAMER, V.; PELISSIER, T.; SAAVEDRA, H.; PAEILE, C.; FERNANDEZ, E.; PINARDI, G. Antinociceptive effects of Ca<sup>2+</sup> channel blockers. **European Journal of Pharmacology**, v. 217, p. 137-141, 1992.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LANG, G.; THEAKSTON, R. D. G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 713-723, 1991.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, p. 2893-2905, 2007.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S.; BARROS, M. A. Thrombin-like and factor-X activator components of *Bothrops* snake venoms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 41, p. 314-328, 1979.

OGINO, M.; MAJIMA, M.; KAWAMURA, M.; HATANAKA, K.; SAITO, M.; HARADA, Y.; KATORI, M. Increased migration of neutrophils to granulocyte-colony stimulating factor in rat carrageenin-induced pleurisy: roles of complement, bradykinin, and inducible cyclooxygenase-2. **Inflammation Research**, v. 45, p.335-346, 1996.

OYUANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 30, p. 945-966, 1992.

PAIXÃO-CAVALCANTE, D.; VAN DEN BERGH, C. W.; GONÇALVES-DE-ANDRADE, R. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F.; OKAMOTO, C. K.; TAMBOURGI, D. V. Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1410-1418, 2007.

PATEL, R. N.; ATTUR, M. G.; DAVE, M. N.; PATEL, I. V.; STUCHIN, S. A.; ABRAMSON, S. B.; AMIN, A. R. A novel mechanism of action of chemically modified tetracyclines: inhibition of COX-2-mediated prostaglandin E2 production. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 3459-3467, 1999.

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

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington, DC: Armed Institute of Pathology, 279p., 1992.

PRUZANSKI, W.; STEFANSKI, E.; VADAS, P.; MACNAMARA, T. F.; RAMAMURTHY, N.; GOLUB, L. M. Chemically modified non-antimicrobial tetracyclines inhibit activity of phospholipase A<sub>2</sub>. **Journal of Rheumatology**, v. 25, p. 1807-1812, 1998.

PRUZANSKI, W.; GREENWALD, R. A.; STREET, L. P.; LALIBERTE, F.; STEFANSKI, E.; VADAS, P. Inhibition of enzymatic activity of phospholipase A<sub>2</sub> by minocycline and doxycycline. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p.1165-1170, 1992.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, F. M. D. E.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snake venoms from *Bothrops* genus. **Toxicon**, v.52, n. 8, p. 842-851, 2008.

RAGE, J. Diversity of snakes. In: BAUCHOT, R. (Ed.). **Snakes a natural story**. New York: Sterling, 1997.

ROBERTS, M. C. Tetracycline therapy: update. **Clinical Infection Diseases**, v. 36, p. 462-467, 2003.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. **American Journal of Physiology**, v. 156, p. 261-273, 1949.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHEL, W.; BUCKLEY, E. (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms**. New York: Academic Press, 1971. p. 345-384.

RUBINS, J. B.; CHARBONEAU, D.; ALTER, M. D.; BITTERMAN, P. B.; KRATZKE, R. A. Inhibition of mesothelioma cell growth *in vitro* by doxycycline. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 138, p. 101-106, 2001.

RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agente CaNa<sub>2</sub>EDTA. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 313-319, 2000.

RUCAVADO, A.; HENRÍQUEZ, H.; GARCÍA, J.; GUTIÉRREZ, J. M. Assessment of metalloproteinase inhibitors clodronate and doxycycline in the neutralization of hemorrhage and coagulopathy induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 52, p. 754-759, 2008.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-838, 1996.

SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, L. S. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O.; FAN, H. W.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Eds.), **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica Dos Acidentes**, Sarvier, São Paulo, 2003, p. 289-309.

SAPADIN, A. N.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: non-antibiotic properties and their clinical implications. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 258-265, 2006.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes, **Toxicon**, v. 30, p. 95-103, 1992.

SANDLER, C.; EKOKOSKI, E.; LINDSTEDT, K. A.; VAINIO, P. J.; FINEL, M.; SORSA, T.; KOVANEN, P. T.; GOLUB, L. M.; EKLUND, K. K. Chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits histamine release and cytokine production in mast cells: possible involvement of protein kinase C. **Inflammation Research**, v. 54, p. 304-312, 2005.

SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; VENTURA, J. S.; DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; POZNER, R. G.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The snake venom metalloproteases berythrin and jararhagin activate endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 386, n. 4, p.369-374, 2005.

SEWELL, K. L.; BREEDVELD, F.; FURRIE, E.; O'BRIEN, J.; BRINCKERHOFF, C.; DYNESIUS-TRENTAM, R.; NOSAKA, Y.; TRENTAM, D. E. The effect of minocycline in rat models of inflammatory arthritis: correlation of arthritis suppression with enhanced T-cell calcium flux. **Cellular Immunology**, v. 167, p. 195-204, 1996.

SHALES, D. M. An update on tetracyclines. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 7, p. 167-171, 2006.

SILVA, M. B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; GUARNIERI, M. C.; LAZZARI, M. A.; SAMPAIO, C. A. M.; POZNER, R. G.; VENTURA, J. S.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v. 369, p. 129-139, 2003.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SOLA, C.; BARRON, S.; TUSELL, J. M.; SERRATOSA, J. The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signaling system in the neural response to excitability. Involvement of neuronal and glial cells. **Progress in Neurobiology**, v. 29, p. 207-232, 1999.

SOUSA, J. R.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, p.787-792, 2002.

SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYER, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 387-399, 1992.

STETLER-STEVESON, W. G.; LIOTTA, L. A.; KLEINER, D. E. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **The FASEB Journal**, v. 7, p. 1434-1441, 1993.

TAKANO, K.; AL-MOKDAD, M.; SHIBATA, F.; TSUCHIYA, H.; NAKAGAWA, H. Rat macrophage inflammatory protein-1 alpha, a CC chemokine, acts as a neutrophil chemoattractant *in vitro* and *in vivo*. **Inflammation**, v. 23, p. 411-424, 1999.

TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

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

TERONEN, O.; HEIKKILÄ, P.; KNOTTINEN, Y. T.; LAITINEN, M.; SALO, T.; HANEMAAIJER, R.; TERONEN, A.; MAISI, P.; SORSA, T. MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 878, p. 453-465, 1999.

TIDBALL, J. G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 27, n. 7, p. 1022-1032, 1995.

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

VASCONCELOS, C. M. L. **Estudo da peçonha de *Bothrops erythromelas*: Caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição**. Dissertação (Mestrado em Biofísica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

VASCONCELOS, C. M. L.; VALENÇA, R. C.; ARAUJO, E. A.; MODESTO, J. C. A.; PONTES, M. M.; BRAZIL, T. K.; GUARNIERI, M. C. Distribution of <sup>131</sup>I-labeled *Bothrops erythromelas* venom in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 3, p. 439-443, 1998.

VELLARD, J. Une Lachesis peu connue du nord-est du Brésil, *L. erythromelas*: Étude de son venin. **Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses filiales**, I, p. 127, 1938.

WARREL, D. A. Venomous bites, stings, and poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 207-223, 2012.

WARREL, D. A. Treatment of bites by adders and exotic venomous snakes. **British Medical Journal**, v. 26, n. 331, p. 1244-1247, 2005.

WHO. **Animal bites**. Geneva, 2013. (Fact sheet n° 373). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs373/en/>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; HARRISON, R.; WARREL, D. A.; JULIAN WHITE, M. D.; WINKEL, K. D.; Ponnampalam Gopalakrishnakone, D. S. C. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 77-88, 2010.

WILLIS, T. W.; TU, A. T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. **Biochemistry**, v. 27, p. 4769-4777, 1998.

ZAMUNNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, A. S.; TEIXEIRA, C. F. P. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom trigger microbicidal functions of peritoneal leucocytes *in vivo*. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1505-1513, 2001.

ZAMUNNER, S. R.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; DE FÁTIMA PEREIRA TEIXEIRA C. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 806-813, 2005.

ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Efeito do veneno de *Bothrops erythromelas* na agregação plaquetária. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA, 1., 1990, São Paulo, SP. **Resumos...** São Paulo, 1990.

ZHANEL, G. G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSY, J. A.; HOBAN, D. J. The glycyclines: A comparative review with the tetracyclines. **Drugs**, v. 64, p. 63-88, 2004.