

Alcyr José Matthiesen

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**ATIVIDADES COLAGENÁSICA,
ELASTÁSICA E HIALURONIDÁSICA DE
VENENOS ANIMAIS: CARACTERIZAÇÃO
PARCIAL DA HIALURONIDASE DO
VENENO DA CASCAVEL
SULAMERICANA
*Crotalus durissus terrificus***

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Biólogo Alcyr José Matthiesen.

Campinas, 21 de novembro de 2000.


*Prof. Dr. Stephen Hyslop
- Orientador -*

**UNICAMP
Campinas
2000**

02.004.1.03.000

Alcyr José Matthiesen

**ATIVIDADES COLAGENÁSICA,
ELASTÁSICA E HIALURONIDÁSICA DE
VENENOS ANIMAIS: CARACTERIZAÇÃO
PARCIAL DA HIALURONIDASE DO
VENENO DA CASCAVEL
SULAMERICANA
*Crotalus durissus terrificus***

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Campinas
2000

UNIDADE 503
 N.º CHAMADA:
 V. Ex.
 TOMBO Nº 143830
 Proc. 16 392107
 C 1 D 2
 PREC. R\$ 1100
 DATA 2010-2-107
 N.º CFD.



CM-00153648-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP

M433a Matthiesen, Alcyr José
 Atividades colagenásica, elastásica e hialuronidásica de venenos animais : caracterização parcial da hialuronidase do veneno da cascavel sulamericana *Crotalus durissus terrificus* / Alcyr José Matthiesen. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Stephen Hyslop
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Enzimas. 2. Matriz extracelular. 3. Permeabilidade. I. Stephen Hyslop. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Stephen Hyslop

Membros:

1. Prof. Dr. Stephen Hyslop

Handwritten signature of Stephen Hyslop in black ink.

2. Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Handwritten signature of Hiroshi Aoyama in black ink.

3. Prof. Dr. José Luiz Donato

Handwritten signature of José Luiz Donato in black ink.

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21/11/2000

Descobri no convívio amigo com os colegas de Magistério e com os jovens, que o meu desejo de continuar aprendendo, bem como o entusiasmo para ensinar, requer muita paciência e resignação.

Alcyr J. Matthiesen

DEDICATÓRIA

*A Deus, pela força que me concedeu em
continuar os meus estudos, guiando-me e
sustentando-me pela fé em todos os momentos.*

*À Miriam e a meus filhos Anderson e Vinicius,
que incentivaram-me neste trabalho, apoiando-
me com carinho e muito amor.*

*À memória de meus pais, que teriam muito
orgulho em ver-me subindo mais um degrau
na educação que me iniciaram.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop, por ter me orientado, transmitindo seu conhecimento e demonstrando-se um amigo com quem pude contar durante a pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Ronilson A. Moreno, que incentivou-me a fazer pós-graduação na UNICAMP, contribuindo para o meu crescimento, acompanhando de perto o meu aprimoramento profissional.

Ao colega e amigo Vitor Rogério Medeiros, que colaborou comigo na realização de alguns experimentos e ao Técnico José Ilton dos Santos, pela amizade e assistência prestada em todas as etapas deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Farmacologia pelos conhecimentos transmitidos nas disciplinas ministradas no decorrer do Curso.

Aos amigos do laboratório e demais colegas do Departamento de Farmacologia, em particular, Luciene, Simone, Yoko, Carol e Prof. Dr. Nadim F. Heluany, pela atenção que me dispensaram sempre que necessitei.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente Gildo B. Leite e Joaquim F. do Prado, que sempre me dispensaram especial atenção.

Aos colegas de viagem que compartilharam os meus momentos de ansiedade e alegria, incentivando-me ao estudo, sempre com carinho e palavras amigas.

À Seção de Apoio Didático da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelos serviços prestados.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | xvii |
| LISTA DE TABELAS | xix |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xxi |
| RESUMO | 1 |
| 1. INTRODUÇÃO | 4 |
| 1.1. Os componentes do tecido conectivo e lâmina basal..... | 4 |
| 1.1.1. Glicosaminoglicanas e proteoglicanas..... | 4 |
| 1.1.2. Proteínas estruturais e adesivas..... | 11 |
| Colágeno..... | 11 |
| Elastina..... | 11 |
| Fibronectina..... | 14 |
| Laminina..... | 16 |
| 1.2. Enzimas de venenos de serpentes que degradam o tecido conectivo..... | 18 |
| 1.2.1. Colagenases..... | 18 |
| 1.2.2. Elastases..... | 19 |
| 1.2.3. Hialuronidases..... | 19 |
| 1.2.4. Proteases hemorrágicas..... | 22 |
| 1.2.5. Fibrinogenases..... | 25 |
| 1.3. Veneno da cascavel <i>Crotalus durissus terrificus</i> | 26 |
| 2. OBJETIVOS | 29 |
| 3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES..... | 64 |
| 5. SUMMARY..... | 71 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 72 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Seção esquemática da pele, evidenciando a organização do tecido conectivo..... | 5 |
| Figura 2: Estruturas de alguns dissacarídeos sulfatados presentes nas glicosaminoglicanas..... | 6 |
| Figura 3: Estrutura e organização do ácido hialurônico..... | 8 |
| Figura 4: Estrutura e organização de uma proteoglicana..... | 10 |
| Figura 5: Estrutura e organização do colágeno..... | 13 |
| Figura 6: Estrutura e organização da fibronectina..... | 15 |
| Figura 7: Estrutura e organização de laminina..... | 17 |

Figuras no artigo para publicação

| | |
|--|----|
| Figure 1: Hyaluronidase activity of arthropod (A) and snake (B) venoms..... | 56 |
| Figure 2: Hyaluronidase activity of different lots of <i>B. jararacussu</i> (A) and <i>C. d. terrificus</i> venoms (B)..... | 57 |
| Figure 3: Gel filtration elution profile of <i>C. d. terrificus</i> venom showing the position of hyaluronidase activity..... | 58 |
| Figure 4: Hyaluronidase of <i>C. d. terrificus</i> detected <i>in situ</i> after SDS-PAGE. | 59 |
| Figure 5: pH (A), salt (B) and temperature (C) dependence of <i>C. d. terrificus</i> venom hyaluronidase | 60 |
| Figure 6: Stability of <i>C. d. terrificus</i> venom hyaluronidase in solution (A) and neutralization of activity by commercial antisera (B)..... | 61 |
| Figure 7: Relationship between hyaluronidase levels and biological activities of <i>Bothrops</i> snake venoms..... | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Os principais tipos de colágeno..... | 12 |
| Tabela 2: Componentes da matriz extracelular degradados por algumas hemorraginas de venenos de serpentes..... | 24 |
| Tabela 3: Propriedades físico-químicas de hialuronidasas isoladas de venenos animais..... | 67 |

Tabelas no artigo para publicação

| | |
|--|----|
| Table 1: Collagenase, elastase and hyaluronidase activities of various animal venoms..... | 52 |
| Table 2: Hyaluronidase activity of different lots of <i>B. jararacussu</i> and <i>C. d. terrificus</i> venom..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|--|
| CTAB | Brometo de cetiltrimetilamônio |
| DEA | Domínio extracelular A |
| DEB | Domínio extracelular B |
| DFP | Diisopropilfluorofosfato |
| DMAB | Dimetilaminobenzidina |
| ECIII | Região extracelular III |
| GAG | Glicosaminoglicana |
| HYAL(S) | Hialuronidase(s) |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonila |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS |
| Stains-all | Brometo de (1-etil-2[3-(1-etilnaftol[1,2]tiazolin-2-ilideno)-2-metilpropenil]naftol[1,2-d]tiazólio |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina |
| TRU | Unidade de atividade hialuronidásica ("turbidity reducing unit") |

RESUMO

A difusão de toxinas do sítio de inoculação de veneno é atribuída à ação de enzimas como colagenases, elastases, hemorraginas e hialuronidases que degradam os componentes da lâmina basal e da matriz extracelular. Neste trabalho avaliamos a atividade hialuronidásica de vários venenos animais e investigamos algumas propriedades da enzima encontrada no veneno da cascavel sul americana *Crotalus durissus terrificus*. A atividade hialuronidásica foi medida por um método turbidimétrico usando-se ácido hialurônico como substrato e também por detecção *in situ* após SDS-PAGE. A hialuronidase foi parcialmente purificada por gel filtração em coluna de Sephacryl S200 HR. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações foram testadas para atividade enzimática. A capacidade de antisoros em neutralizar a enzima foi avaliada medindo-se a atividade residual após co-incubação durante 30 min à 37°C. De modo geral, os venenos investigados possuíam atividade hialuronidásica, com níveis mais altos em venenos de artrópodes [15.3 ± 4.7 - 166 ± 19.2 unidades (TRU ou "turbidity reducing units")/mg] do que em serpentes (0 - 7.0 ± 1.7 TRU/mg; média \pm E.P.M.; n=3-6). Houve variação dentro e entre espécies e subespécies, conforme observado com os venenos botrópicos e crotálicos, respectivamente. Assim, a atividade hialuronidásica de diferentes amostras de veneno de *C. d. terrificus* variou de 4.5 ± 0.5 à 13.2 ± 4.8 unidades TRU/mg (n=3-6), enquanto a de *C. d. cascavella* e *C. d. collilineatus* era de 25.7 ± 1.2 e 6.8 ± 1.1 TRU/mg, respectivamente. A hialuronidase mostrou pH ótimo de 4,0, e atividade máxima na presença de 50-100 mM de NaCl. A enzima perdeu atividade acima de 37°C, e também perdeu 50% de atividade durante as primeiras 6 h em solução (acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0, contendo 0,15 NaCl), mas

depois se manteve relativamente constante até 24 h, independente da temperatura de incubação (4°C, 25°C, 37°C). A cromatografia do veneno de *C. d. terrificus* por gel filtração resultou em um pico de atividade hialuronidásica com peso molecular >30.000, o que foi confirmado por eletroforese (SDS-PAGE) seguido por detecção de atividade *in situ*. Com esta técnica, apenas uma banda de atividade foi observada com os diferentes lotes de veneno e o peso molecular foi estimado em ~75.000. A atividade da enzima foi inibida de forma dose-dependente por antisoros comerciais (anti-botrópico, anti-crotálico, anti-elapídico e anti-escorpiônico), sendo o anti-escorpiônico o menos eficaz; em altas doses, todos inibiram a atividade em $\geq 90\%$. Estes resultados indicam que há variação nos níveis de atividade hialuronidásica no veneno de *C. d. terrificus*, mas que existe apenas uma isoforma. As propriedades desta enzima se assemelharam às de outras hialuronidases de venenos. A neutralização da atividade enzimática por diferentes antisoros comerciais indicou que há identidade imunológica entre hialuronidases de diferentes venenos.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

No estado normal em animais, as células parenquimatosas estão unidas entre si por um cimento gelatinoso composto de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e proteínas fibrosas como o colágeno e a elastina (Figura 1). A seguir, descrevemos os principais componentes desta matriz extracelular e a ação de venenos sobre a mesma.

1.1. Os componentes do tecido conectivo e da membrana basal

1.1.1. Glicosaminoglicanas e proteoglicanas

As glicosaminoglicanas (GAGs), também denominadas mucopolissacarídeos, são macromoléculas formadas por cadeias não ramificadas de polissacarídeos, onde se repetem os resíduos de dissacarídeos. Nos dissacarídeos, um dos açúcares é sempre a *N*-acetil-glicosamina ou *N*-acetil-galactosamina. As GAGs são divididas em quatro grupos principais, de acordo com a molécula de açúcar, o tipo de ligação que ocorre entre eles e o número e localização dos grupos sulfato: (1) hialuronana ou ácido hialurônico, (2) condroitina sulfato e dermatan sulfato, (3) heparan sulfato e (4) queratan sulfato (ALBERTS *et al.*, 1994) (Figura 2). As GAGs unem-se por ligações covalentes à proteínas predominantemente estruturais (colágeno e elastina) e adesivas (fibronectina e laminina).

Com exceção do ácido hialurônico, todas as GAGs são polissacarídeos ligados à proteínas, formando proteoglicanas ou mucoproteínas que são encontradas nas células dos tecidos conectivos e matrizes extracelulares da superfície de muitas células. Na biossíntese das GAGs, a célula inicialmente produz mono e dissacarídeos que, posteriormente, são modificados e sulfatados no complexo de Golgi, onde

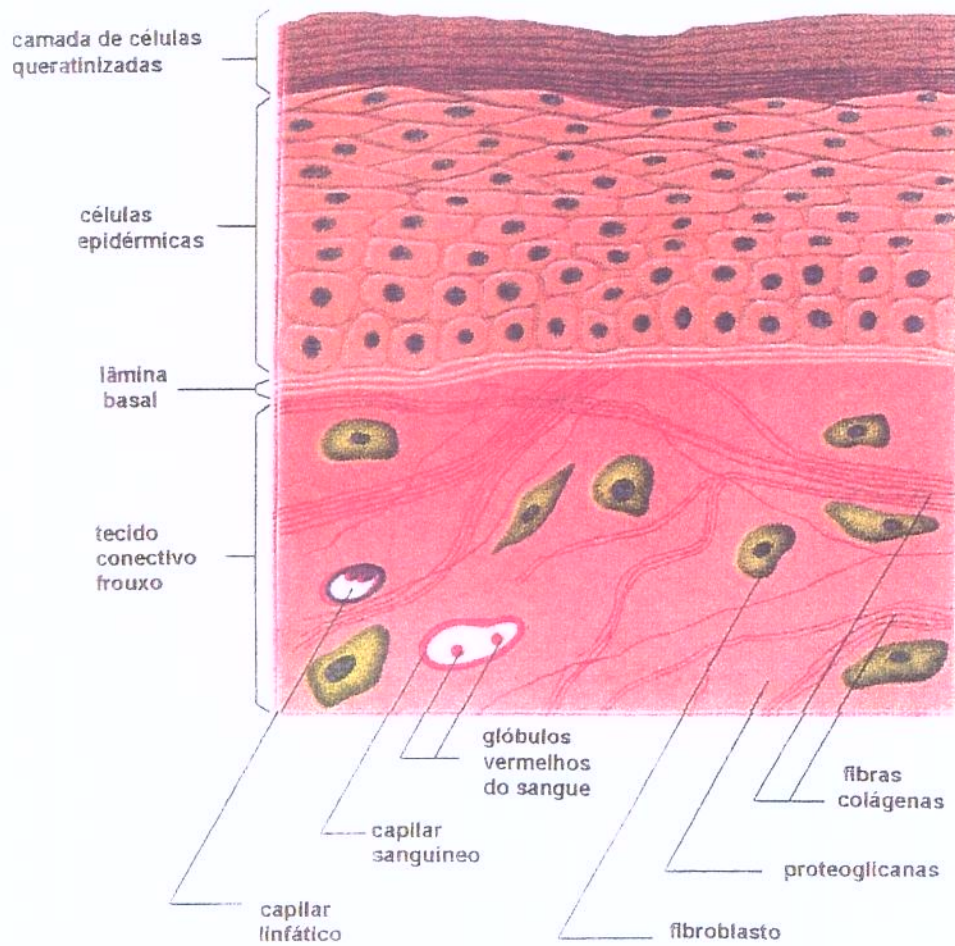


Figura 1. Seção esquemática da pele, evidenciando a organização do tecido conectivo. (LODISH *et al.*, 1995).

também ocorre a sua polimerização (< 300 resíduos) e, por ligação covalente, unem-se a resíduos de serina nas proteínas que compõem as proteoglicanas.

As proteoglicanas são moléculas de até 1×10^6 Daltons, com 90-95% de carboidratos (em peso), os quais formam longas cadeias não ramificadas. As cadeias podem variar muito quanto às espécies de glicosaminoglicanas que as formam e quanto à extensão de cada uma. Uma proteoglicana pode conter uma ou mais glicosaminoglicanas. Como as cadeias de polissacarídeos não se dobras facilmente, cada molécula ocupa considerável espaço. Essas macromoléculas, com numerosos grupos carboxila e sulfato, têm fortes cargas negativas e são altamente hidrófilas, pelo que, retém água e formam um gel hidratado. Como atraem também cátions osmoticamente ativos, como o Na^+ , o tecido conectivo tende a intumescer, adquirindo forte resistência às compressões. Por outro lado, sua estrutura porosa e hidratada facilita a migração de células. O tecido conectivo contém vários tipos de células, tais como fibroblastos, mastócitos, macrófagos, linfócitos e leucócitos polimorfonucleares, entre outras. Os mastócitos possuem grânulos que contêm heparina, histamina e ácido hialurônico que faz parte da matriz extracelular.

O ácido hialurônico, também conhecido como hialuronato, é o maior componente da matriz extracelular e é produzido em grandes quantidades em tecidos onde ocorre migração e proliferação celular, bem como durante o desenvolvimento ou reparação de um ferimento. Uma molécula de ácido hialurônico possui cerca de 50.000 dissacarídeos simples de β -ácido glucurônico (1 \rightarrow 3) e N-acetilglucosamina e pode atingir cerca de 20 μm de comprimento (Figura 3). O ácido hialurônico é

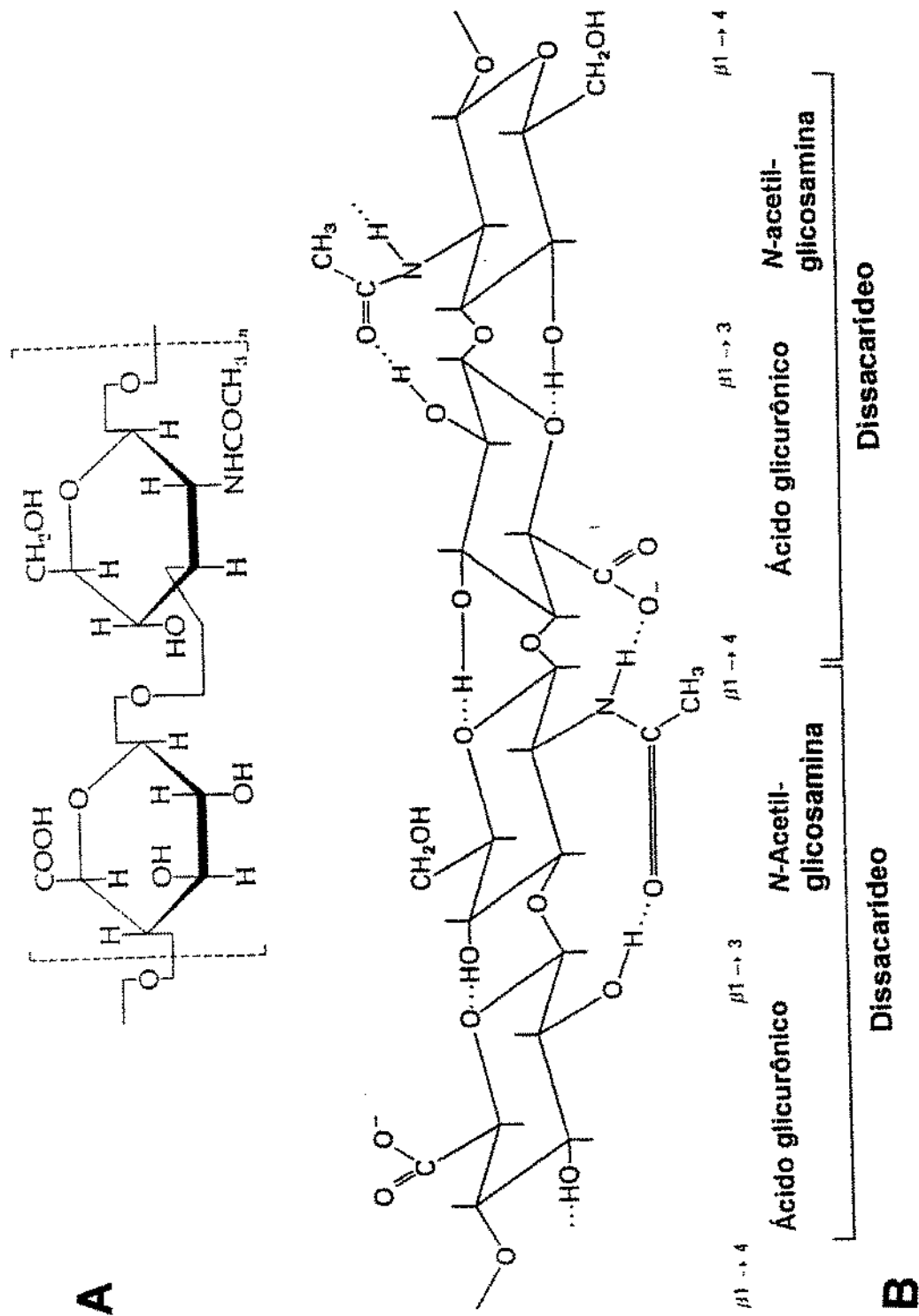


Figura 3. Estrutura do ácido hialurônico (A) e sua organização como glicosaminoglicana (B) (LODISH et al., 1995).

carregado negativamente e é formado por uma cadeia muito comprida, com peso molecular de até 8×10^6 , onde o dissacarídeo que se repete consta de um resíduo de ácido glicurônico e outro de N-acetil-glicosamina. Não contém grupos sulfatados, nem se liga à proteína covalentemente (ALBERTS *et al.*, 1994) e é degradada por enzimas específicas, as hialuronidases.

Em virtude do grande número de resíduos hidrófilos na sua superfície, o ácido hialurônico se liga a uma grande quantidade de água, levando à formação de um gel hidratado. Assim, uma única molécula de ácido hialurônico pode ocupar um volume de 1000-10.000 vezes o seu volume não-hidratado. Quando colocado em espaço confinado, como na matriz entre duas células, a pressão de turgor dentro do espaço empurra e comprime algumas fibras das células que bloqueiam seus movimentos. Devido à ligação de ions como o Na^+ com os grupos COO^- da superfície do ácido hialurônico, ocorre um aumento na concentração desses ions, levando a um aumento na pressão osmótica do gel. Com estas propriedades físicas, o ácido hialurônico confere enrijecimento, elasticidade e ação lubrificante a muitos tipos de tecidos, inclusive ao tecido conectivo, dando-lhes a capacidade de resistir às forças de compressão (LODISH *et al.*, 1995).

Além do ácido hialurônico, há outras glicosaminoglicanas como a condroitina sulfato e o heparan sulfato, que interagem com o colágeno (tipos I, III e V). Estas glicosaminoglicanas estão ligadas ao centro protéico através da seqüência Ser-Gli-X-Gli, onde X é qualquer aminoácido (LODISH *et al.*, 1995) (Figura 4). Assim, as proteoglicanas da superfície celular servem de âncora para as fibras protéicas da matriz extracelular.

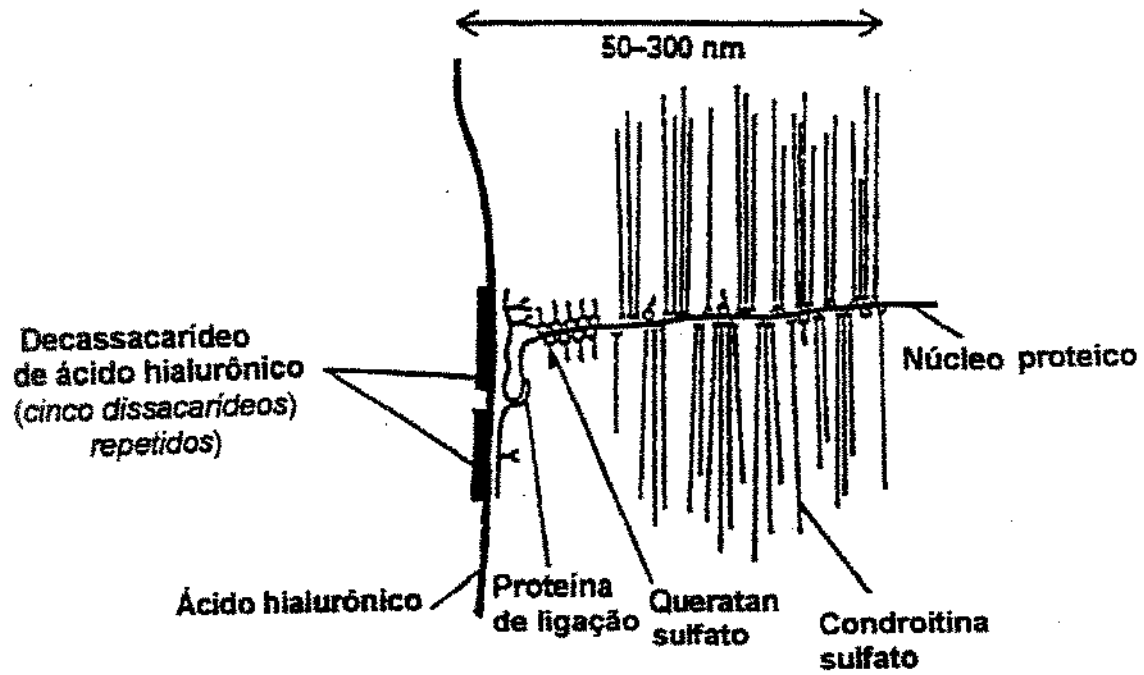


Figura 4. A relação do ácido hialurônico com outras glicosaminoglicanas na formação de uma proteoglicana (LODISH *et al.*, 1995).

1.1.2. Proteínas estruturais e adesivas

Colágeno - O colágeno é a principal proteína presente na matriz do tecido conectivo. Constitui a maior classe de proteínas fibrosas do reino animal, com pelo menos 12 tipos (Tabela 1), sendo os mais abundantes os tipos I, II e III, todos os quais formam estruturas fibrilares parecidas (Figura 5). O tipo IV é de grande importância na formação da lâmina basal. Frente à sua abundância em tecidos como a cauda de rato, o colágeno tipo I é facilmente isolado, tendo sido o primeiro a ser caracterizado e ter sua estrutura de trípla-hélice estabelecida.

A estrutura básica dos colágenos consiste em uma longa proteína com três subunidades enroladas: duas cadeias $\alpha 1(I)$ e uma $\alpha 2(I)$ (LODISH *et al.*, 1995). Os colágenos são abundantes em prolina e glicina que constituem a base da sua estrutura, formando cadeias de vários trípletos de seqüências Gli-X-Y, onde X e Y podem ser outros aminoácidos (na maioria dos colágenos X é a prolina e Y, a hidroxiprolina) (ALBERTS *et al.*, 1994).

Acreditava-se que todos os colágenos eram secretados através de células chamadas fibroblastos mas, atualmente, sabe-se que há também produção específica de colágenos por outros tipos de células (Tabela I). Durante sua síntese, os colágenos são secretados para o espaço extracelular e suas moléculas agrupam-se em polímeros ordenados (fibrilas de colágeno), as quais se organizam em feixes maiores, em forma de bastão, para constituírem fibras de colágeno de vários micrômetros de diâmetro (Figura 5). Os colágenos são degradados por colagenases.

Elastina - A elastina é um componente importante do tecido conectivo e da lâmina basal. Essa proteína possui alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos e, como

Tabela 1. Os principais tipos de colágeno.

| Tipo | Cadeias | Localização |
|-------------|--|--|
| I | $[\alpha 1(I)]_2 [\alpha 2(I)]$ | Pele, tendão, ossos, ligamento da córnea, órgãos internos (cerca de 90% do corpo), dentina |
| II | $[\alpha 1(II)]_3$ | Cartilagem, humor vítreo, notocorda, disco intervertebral |
| III | $[\alpha 1(III)]_3$ | Pele, músculos, notocorda, disco intervertebral |
| IV | $[\alpha 1(IV)]_2 [\alpha 2(IV)]$ | Todas as lâminas basais |
| V | $[\alpha 1(V)] [\alpha 2(V)] [\alpha 3(V)]$ | Tecidos e membranas fetais, pele, osso, placenta, tecido intersticial |
| VI | $[\alpha 1(VI)] [\alpha 2(VI)] [\alpha 3(V)]$ | Maioria dos tecidos intersticiais associados ao colágeno tipo I |
| VII | $[\alpha 1(VII)]_3$ | Fibrilas de ancoragem nas membranas basais da pele e do âmnio |
| VIII | $[\alpha 1(VIII)]_3$ | Células endoteliais |
| IX | $[\alpha 1(IX)] [2(IX)] [3(XI)]$ | Cartilagem associada com colágeno tipo II, humor vítreo |
| X | $[\alpha 1(X)]_3$ | Cartilagem mineralizada e hipertrófica |
| XI | $[\alpha 1(XI)] [\alpha 2(XI)] [\alpha 3(XI)]$ | Cartilagem nas proximidades dos colágenos tipos I e II, com os quais interage |
| XII | $[\alpha 1(XII)]_3$ | Tendão e pele embrionários |

Fontes: ALBERTS *et al.* (1994), LODISH *et al.* (1995).

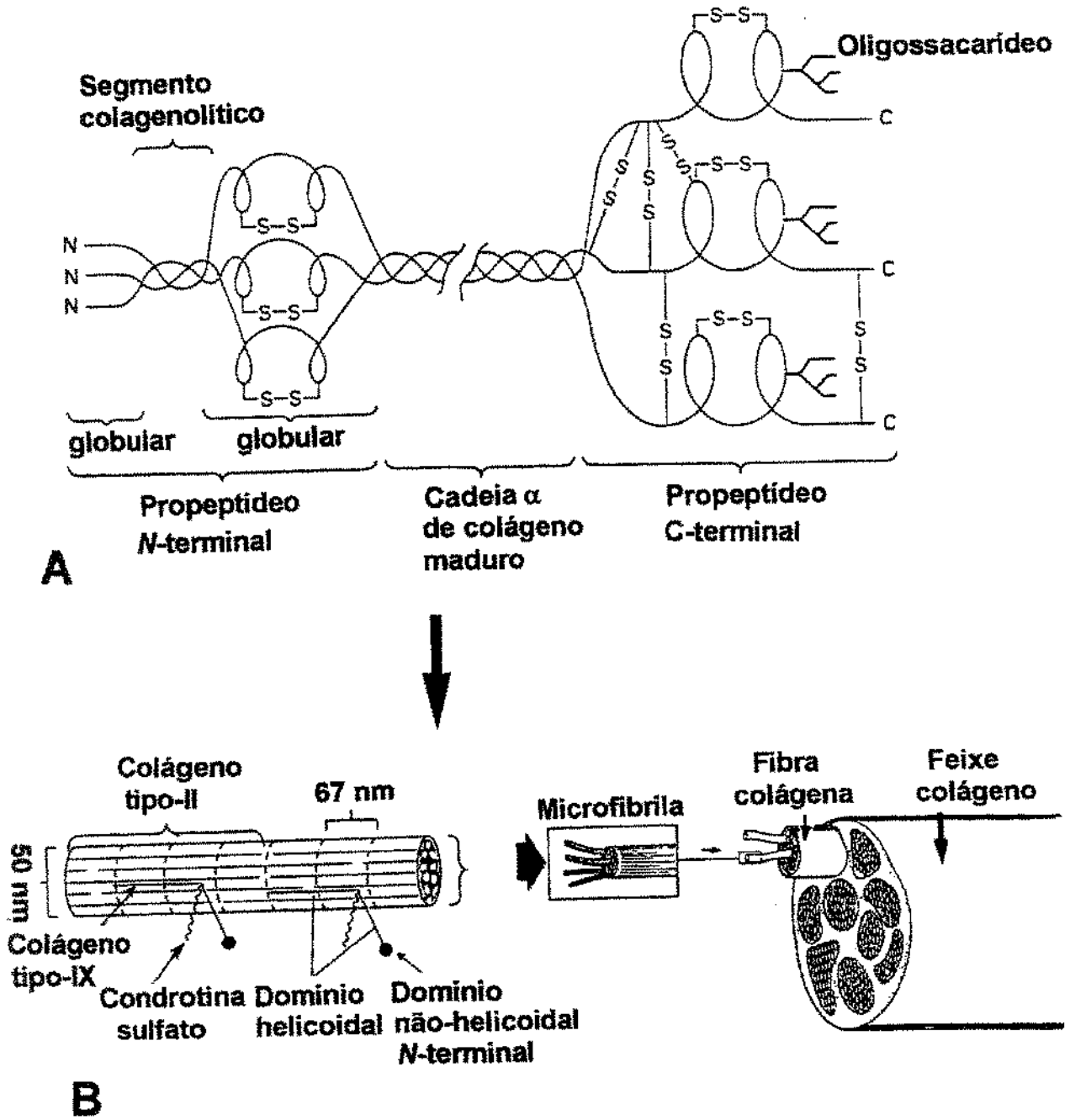
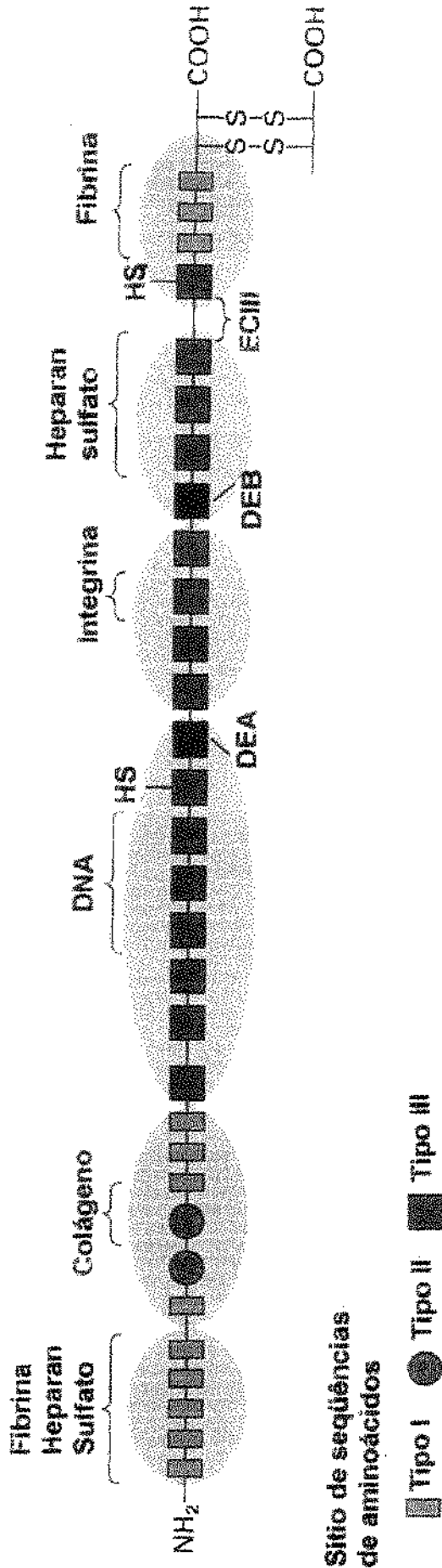


Figura 5. Estrutura do colágeno (A) e sua organização em filamentos, microfibrilas, fibras e feixes (B) (LODISH et al., 1995).

o colágeno, é produzida por fibroblastos. A elastina possui uma estrutura aleatoriamente enovelada no estado relaxado. Esta estrutura pode ser estirada, mas se enovela em uma conformação diferente quando ocorre o relaxamento. Suas moléculas são ligadas covalentemente em fileiras e podem se organizar como fibras ou lâminas. As fibras elásticas conferem elasticidade aos tecidos, permitindo que eles se retraiam depois do estiramento. Estas fibras são formadas pela interação de elastina e fibrilina. Nesta organização, as microfibrilas de fibrilina parecem organizar a elastina depositada entre as microfibrilas.

A elastina é constituinte importante de muitos tecidos de sustentação (STEVENS & LOWE, 1995) onde é encontrada em proporções variáveis, estando presente em grandes quantidades em tecidos como o pulmão, pele e bexiga. Na maioria dos tecidos, a elastina ocorre como fibras ramificadas curtas que formam uma rede irregular em todo o tecido (BURKITT, YOUNG, HEATH, 1995). A elastina é suscetível à degradação por enzimas denominadas elastases encontradas em diversos tipos celulares, sendo muito importante em neutrófilos e algumas outras células envolvidas no processo inflamatório (SHOTTON, 1970).

Fibronectina - As fibronectinas (Figura 6) constituem uma classe importante de glicoproteínas. Seu papel principal é prender as células à matriz extracelular através de receptores específicos, ancorando-as ao colágeno e fibrina. Esta característica também é importante na interação da fibronectina com a superfície de células não transformadas em cultura ou de células tumorigênicas. As fibronectinas regulam a forma das células e a organização do citoesqueleto, e são essenciais para migração



Sítio de seqüências de aminoácidos

Figura 6. Estrutura esquemática da fibronectina, mostrando uma das duas cadeias da molécula (ligadas por uma ponte -S-S-) e os domínios ou regiões de ligação a outros componentes da matriz extracelular (LODISH et al., 1995).

celular, exercendo importante papel na diferenciação celular durante a embriogênese. As fibronectinas são também importantes para a cicatrização de uma ferida, facilitando a migração de macrófagos e outras células do sistema imunológico dentro da área afetada, iniciando a formação dos coágulos de sangue, uma vez que permite as plaquetas aderirem à regiões danificadas dos vasos sanguíneos.

Os receptores celulares para fibronectina pertencem à classe dos receptores denominados integrinas. Quando os tecidos crescem, a fibronectina liga-se à superfície celular por meio das integrinas. Acredita-se que a fibronectina exerce um papel importante na deposição e orientação das fibrilas de colágeno precoces por meio dos sítios de ligação da fibronectina ao colágeno. Como os receptores de fibronectina estão ligados à actina intracelular, a orientação da organização e estrutura interna de uma célula influencia a orientação da matriz extracelular (STEVENS & LOWE, 1995).

Laminina - Outro componente da matriz extracelular é a laminina que desempenha papel importante na adesão celular e é sintetizada e secretada por vários tipos celulares, incluindo células epiteliais, endoteliais e tumorais. A laminina contém três polipeptídeos com um peso molecular total de 820.000. O arranjo estrutural de laminina envolve a formação de três braços curtos com dois domínios globulares e um braço longo que termina num grande domínio globular (JACKSON, BUSCH, CARDIN, 1991) (Figura 7). Devido à orientação dos seus braços, assume a forma de cruz com sítios de ligação de alta afinidade para receptores celulares específicos (integrinas), GAGs como o heparan sulfato, colágeno tipo IV, glicolípídios sulfatados e entactina, uma glicoproteína sulfatada que é um dos componentes de todas as membranas

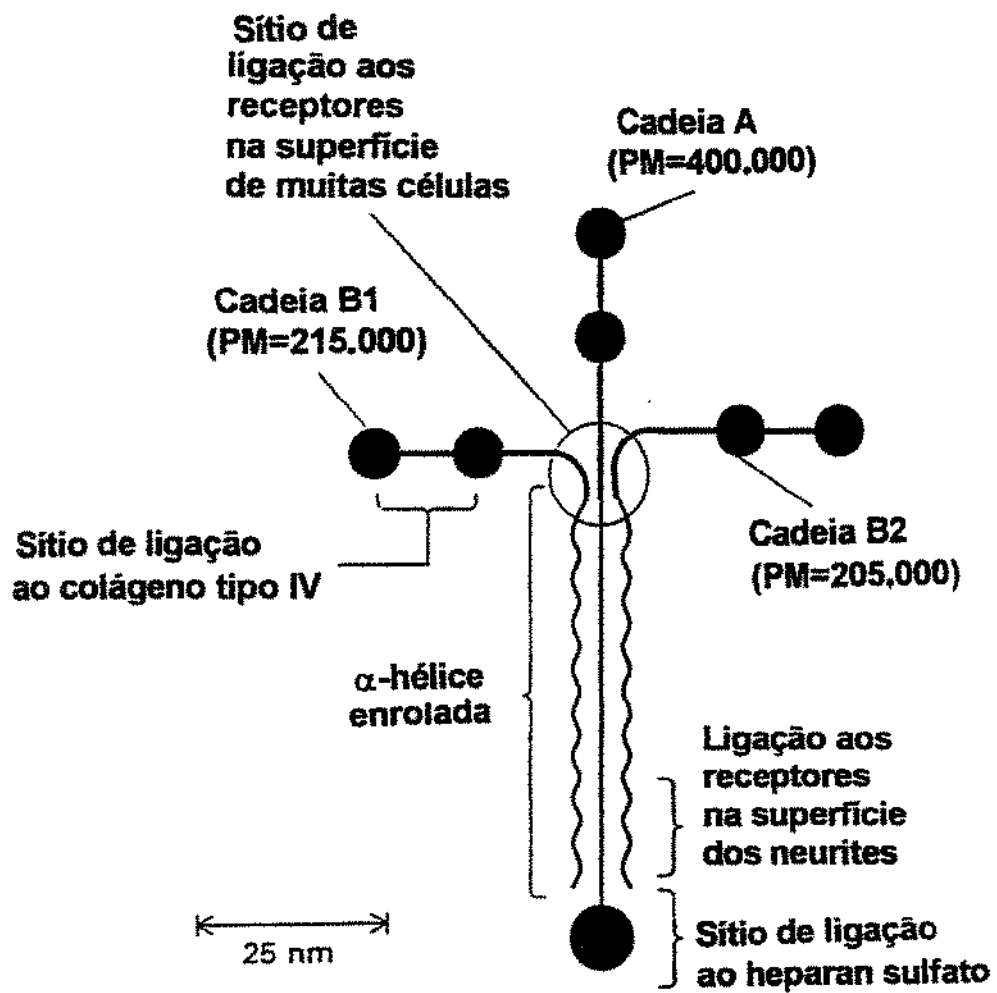


Figura 7. Estrutura e organização da laminina (LODISH *et al.*, 1995).

basais. A laminina pode ter um papel no controle do movimento de proteínas e outras moléculas do sangue para os tecidos através dos capilares.

1.2. Enzimas de venenos de serpentes que degradam o tecido conectivo

Venenos de serpentes são ricas fontes de diversos tipos de proteínas, inclusive enzimas, peptídeos e toxinas (MEBS, 1970; TU, 1977, 1982; ELLIOTT, 1978; IWANAGA & SUZUKI, 1979). As respostas fisio-farmacológicas decorrentes da injeção dessas misturas complexas diferem muito, freqüentemente envolvendo efeitos locais e sistêmicos que podem variar bastante na sua manifestação e gravidade, dependendo da família, gênero e espécie (e até subespécie) de serpente (CHIPPAUX, WILLIAMS, WHITE, 1991). Apesar desta variabilidade, em todos os casos, há necessidade do veneno difundir do sítio de inoculação para o tecido vizinho e para a circulação geral. Tal distribuição ocorre principalmente através da ação de proteases presentes no veneno que são capazes de degradar os componentes da lâmina basal e o "cimento" intercelular, especialmente na parede dos vasos, ocasionando lesões que levam à hemorragia local e/ou sistêmica. Além disso, outras enzimas atacam estruturas específicas da matriz extracelular, tais como o ácido hialurônico, colágeno e elastina, aumentando assim a permeabilidade do tecido e a difusão de toxinas.

1.2.1. Colagenase

As principais enzimas capazes de digerir o colágeno são as colagenases, as quais já foram detectadas em bactérias (MINS *et al.*, 1995), diversos tecidos (EVANSON, JEFFEY, KRAUZ, 1967; WALKER, LAPIERE, GLOSS, 1964), leucócitos

granulócitos (LAZARUS *et al.*, 1968) e em venenos de serpentes (SIMPSON, 1971, 1972, 1975; SIMPSON *et al.*, 1971; SIMPSON & RIDER, 1971; HONG, 1982), com baixa ou nenhuma atividade em venenos de artrópodes (SIMPSON, 1975). Embora tal atividade em venenos possa ser atribuída à uma enzima distinta (HONG, 1982), muitas vezes ela faz parte integral de outras proteases (por ex. hemorraginas) comuns em venenos de alto teor proteolítico, como nos venenos dos gêneros *Agkistrodon*, *Bitis*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Trimerusurus* e *Vípera* (ver a seguir). Em apenas alguns casos, esta enzima tem sido isolada de venenos e estudada (HONG, 1982). A colagenase do veneno da cascavel norte americana *Crotalus atrox* cliva o colágeno dimérico de cadeias β em monômeros de cadeias α (SIMPSON & RIDER, 1971; HONG, 1982).

1.2.2. Elastase

Comparada a outras enzimas em venenos que atuam sobre a matriz extracelular, pouco se sabe da elastase presente em venenos animais (WERB *et al.*, 1982). Os venenos de serpentes Viperidae e Crotalidae contêm elastase, embora na maioria dos casos, os níveis são bem baixos (SIMPSON & TAYLOR, 1973; BERNICK & SIMPSON, 1976). Por outro lado, essa enzima já foi caracterizada de alguns tipos celulares, especialmente neutrófilos onde ela aparentemente exerce importante função na resposta inflamatória. Também já foi caracterizada em algumas bactérias.

1.2.3. Hialuronidase (HYAL)

A HYAL é uma endoglicosaminidase que age quebrando as ligações β 1-4-N-acetilhexosaminida do ácido hialurônico e sulfatos de condroitina. Os testículos

mamíferos e o sêmen são fontes ricas em HYAL (SRIVASTAVA & FAROOQUI, 1979).

DURAN-REYNALS (1936, 1938, 1946) e HOFFMAN & DURAN-REYNALS (1931) foram os primeiros a investigar em detalhe a distribuição do "fator de difusão", subsequentemente identificado como a HYAL em diferentes fluídos e tecidos de diversos animais (bactéria, abelhas, aranhas, mosquitos e outros insetos, e extratos testiculares). Subsequentemente, vários autores mostraram a presença desta enzima em venenos animais (FAVILLI, 1956; JAQUES, 1956; KAISER, 1956; BOQUET, IZARD, DETRAIT, 1958). Atualmente, sabe-se que a HYAL ocorre em venenos de formigas (SCHMIDT, BLUM, OVERAL, 1986), abelhas (HABERMANN, 1957; BARKER *et al.*, 1963, 1966), escorpiões (DINIZ & GONÇALVES, 1960; WRIGHT *et al.*, 1977; BASU *et al.*, 1990; RAMANAIAH, PARTHASARATHY, VENKAIAH, 1990), aranhas (SCHANBACHER *et al.*, 1973; WRIGHT *et al.*, 1973), vespas (SAID, 1960; ALLALOUF, BER, ISHAY, 1972; EDERY *et al.*, 1972; SCHMIDT *et al.*, 1986), peixe (POH *et al.*, 1992; SUGAHARA *et al.*, 1992), um lagarto (TU & HENDON, 1983) e serpentes (XU *et al.*, 1982; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1988, 1990; TAN & PONNUDURAI, 1990a,b,c, 1991a,b, 1992a,b; TAN, POH, TAN, 1989).

As HYALS de venenos englobam uma variedade de pesos moleculares que vão de 14.000 (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1988) a >120.000 (CEVALLOS *et al.*, 1992), embora em muitos casos este peso esteja em torno de 30.000-80.000 (SCHANBACHER *et al.*, 1973; WRIGHT *et al.*, 1973; XU *et al.*, 1982, TU & HENDON, 1983; RAMANAIAH *et al.*, 1990; CEVALLOS *et al.*, 1992). As HYALS geralmente são glicoproteínas de cadeia simples (única), sensíveis ao calor (XU *et al.*, 1982; TU & HENDON, 1983; RAMANAIAH *et al.*, 1990), e possuem pontos isoelétricos que podem

ser tanto ácido (TU & HENDON, 1983) como básico (XU *et al.*, 1982). O ácido hialurônico é o substrato normal para estas enzimas e elas tem pouco efeito sobre sulfato de condroitina A, B, e C ou heparina (DURAN-REYNALS, 1936; MacCLEAN, 1941; WRIGHT *et al.*, 1973; TU & HENDON, 1983). A ação da HYAL de bactéria difere um pouco da enzima de venenos. WHITE, HANDLER, SMITH (1976) demonstraram que a HYAL de muitas bactérias patogênicas degrada o ácido hialurônico e condroitina, ao quebrar a ligação hexamínica. Dessa forma, esta HYAL quebra em dois dissacarídeos o tetrassacarídeo resultante da ação da HYAL mamífera.

A presença de cloreto de sódio é um pré-requisito para a atividade plena e também para a estabilidade da enzima em baixas temperaturas ($\leq 4^{\circ}\text{C}$). HYALS são geralmente resistentes a vários ciclos de descongelamento (TU & HENDON, 1983; RAMANAIAH *et al.*, 1990). A sua atividade enzimática é insensível à inibição por EDTA e β -mercaptoetanol mas pode ser inativada por Fe^{3+} , Cu^{2+} e heparina (XU *et al.*, 1982; TU & HENDON, 1983; RAMANAIAH *et al.*, 1990).

As HYALS parecem ter uma boa atividade antigênica uma vez que a atividade enzimática é facilmente neutralizada por antisoro (WRIGHT *et al.*, 1973; GENÉ *et al.*, 1985; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1990). Há poucos estudos imunológicos comparativos dessas enzimas. GENÉ *et al.* (1985) demonstraram que um antiveneno produzido contra o veneno de *C. d. terrificus*, *Lachesis muta stenophrys* e várias espécies de *Bothrops* da América Central neutralizou efetivamente a atividade hialuronidásica destes venenos, melhor até do que as atividades proteolíticas, hemorrágicas e hemolíticas, talvez devido à alta imunogenicidade das HYALS.

Em termos de atividade biológica, HYALS de venenos não são tóxicas e nem hemorrágicas, mas são capazes de potencializar o aumento na permeabilidade vascular induzida por toxinas hemorrágicas (TU & HENDON, 1983; XU *et al.*, 1982). Assim, devido à sua capacidade de degradar o ácido hialurônico da lâmina basal e tecido conectivo, a HYAL presente em venenos animais tem importante papel na difusão de toxinas do sítio de inoculação para a circulação (TU & HENDON, 1983). A ação rápida das HYALS (observada dentro de alguns minutos após a injeção de veneno ou toxina) contrasta com o efeito bem mais lento das collagenases e elastases sobre a matriz extracelular e sugere que a primeira destas (HYAL) é a mais importante do ponto de vista clínico imediato. As HYALS não são o único componente envolvido na difusão de veneno já que outras enzimas, tais como fosfolipases e proteases também podem influenciar a disseminação de toxinas ou a migração celular.

1.2.4. Proteases hemorrágicas

Além de enzimas como collagenases, elastases e hialuronidases que atuam exclusivamente sobre componentes da matriz extracelular e da membrana basal, os venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae são ricos em proteínas capazes de causar hemorragia através de uma ação sobre a parede vascular (BJARNASON & TU, 1978; TU, 1988; KAMIGUTI, THEAKSTON, DESMOND, 1991; KAMIGUTI *et al.*, 1996). As proteínas hemorrágicas ou hemorraginas são metaloproteases de peso molecular entre 20.000 e 90.000 cuja atividade plena depende da presença de zinco, geralmente ligado à proteína na proporção de um mol de metal por mol de enzima (TU, 1983; BJARNASON & FOX, 1994, 1995a,b; HATI *et*

al., 1999). A estrutura destas toxinas bem como a sua relação com outras metaloproteases, especialmente de mamíferos, têm sido bastante estudada (HITE, FOX, BJARNASON, 1992; HITE *et al.*, 1994; KINI, 1995; STOCKER *et al.*, 1995; JIA *et al.*, 1996; MATSUI, FUJIMURA, TITANI, 2000). Estas toxinas são responsáveis tanto pela hemorragia local como a sistêmica frequentemente observada após envenenamentos (TU, 1988; KAMIGUTI *et al.*, 1996).

As hemorraginas aumentam a permeabilidade dos vasos através de uma ação proteolítica sobre as junções intercelulares e, em alguns casos, também sobre componentes da matriz extracelular e da lâmina basal da microvasculatura (OHSAKA, 1979). Esta degradação dos componentes vasculares pode ocorrer via uma ação proteolítica direta das hemorraginas, ou indiretamente pela ativação de mediadores endógenos, ou por ambos estes caminhos (KAMIGUTI *et al.*, 1996). A dissolução da matriz extracelular leva à hemorragia ou escape de eritrócitos do lumen dos vasos por hemorragia *per diapedesis* (através das junções entre células endoteliais) ou *per rhexis* (através de fendas dentro das células endoteliais). Em alguns casos, as hemorraginas também atuam sobre o sistema hemostático (MARKLAND, 1988, 1991; ANDREWS & BERNDT, 2000), como é o caso da jararagina, isolada do veneno da jararaca *Bothrops jararaca*, que atua sobre plaquetas *in vitro* (KAMIGUTI *et al.*, 1996).

As hemorraginas atuam sobre uma variedade de componentes da matriz extracelular (Tabela 2), porém, nem todas as metaloproteases em venenos que atuam sobre estes substratos possuem atividade hemorrágica, conforme demonstrado para a protease básica do veneno de *Bothrops moojeni* (SERRANO, SAMPAIO, MANDELBAUM, 1993). Estudos estrutura-função têm mostrado que a especificidade

Tabela 2. Componentes da matriz extracelular degradados por algumas hemorraginas de venenos de serpentes.

| Espécie | Toxina | Substrato | | | | Referências |
|--|---|--|--------------|---|----------|--|
| | | Colágeno (tipo) | Fibronectina | Gelatina (tipo) | Laminina | |
| <i>Agkistrodon halys brevicaudus</i> | Produto recombinante do gene MT-c | + (IV, V) - (I, II, III) | - | + (I) | | JEON & KIM (1999) |
| <i>Bitis gabonica</i> | Hta, Htb | + | | | | MARSH, FYFFE, BENNETT (1995) |
| <i>Bothrops asper</i> | BaP1 BaH4 | + (I, IV) + (IV) | + | | + | RUCAVADO <i>et al.</i> (1995) FRANCESCHI <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Bothrops jararaca</i> | Jararafibrases I e II III e IV | + (IV) + (IV) | + | + | + | MARUYAMA <i>et al.</i> (1992) MARUYAMA <i>et al.</i> (1993) |
| <i>Crotalus atrox</i> | Ht-a Ht-c Ht-d Ht-e | + (IV), - (I, III, V) + (IV), - (I, III, V) + (IV), - (I, III, V) + (IV), - (I, III, V) | + | + (I) + (I) + (I, III, IV) + (I) | + | BJARNASON & FOX (1987); BJARNASON, HAMILTON, FOX (1988); BARAMOVA <i>et al.</i> (1989, 1990a,b; 1991) |

de algumas destas toxinas, tais como a Ht-c e Ht-d do veneno da cascavel norte americana *Crotalus atrox*, se assemelha à de colagenases mamíferas (FOX *et al.*, 1986; GOMIS-RUTH, KRESS, BODE, 1993). A ação destas enzimas pode ser atenuada *in vivo* por inibidores endógenos tais como a α_2 -macroglobulina (BARAMOVA *et al.*, 1990b) enquanto a sua ação dentro da glândula venenífera parece ser modulada por peptídeos contendo piro-Glu (ROBEVA *et al.*, 1991).

1.2.5. Fibrinogenases

A ocorrência de sangue incoagulável através da ação de enzimas fibrino (geno)líticas presentes nos venenos de muitas espécies de serpentes (MARKLAND, 1988, 1991; MATSUI, FUJIMURA, TITANI, 2000) pode agravar o efeito hemorrágico por facilitar o extravasamento de sangue através de lesões produzidas por hemorraginas. Essas enzimas degradam as cadeias α e β do fibrinogênio e podem estar presentes no mesmo veneno (OUYANG & TENG, 1977; OUYANG & HUANG, 1979). As α -fibrin(ogen)ases são metaloendoproteases com peso molecular entre 20.000 e 58.000 e destituídas de atividade arginina esterase (MARKLAND, 1988, 1991). De modo semelhante às hemorraginas, estas enzimas contêm zinco e várias delas demonstram atividade hemorrágica e são suscetíveis à inibição por α_2 -macroglobulina (PANDYA & BUDZINSKI, 1984; MARKLAND, 1988, 1991). Por outro lado, as β -fibrin(ogen)ases, que têm peso molecular entre 23.000 e 34.000, diferem das anteriores por serem serina proteases com atividade esterásica e, de modo geral, não possuem atividade hemorrágica. Estas fibrin(ogen)ases são inibidas por DFP e PMSF, mas não por EDTA, e geralmente são mais termoestáveis do que as α -fibrin(ogen)ases

(OUYANG & HUANG, 1979; PANDYA & BUDZINSKY, 1984; SAPPURU, TU, BAILEY, 1983).

MARUYAMA *et al.* (1992) demonstraram que duas enzimas fibrinolíticas (jararafibrases I e II) isoladas do veneno de *B. jararaca* degradam colágeno tipo IV e, em menor grau, colágeno tipo I, além de atuarem sobre entactina, fibronectina, gelatina e laminina. Com a destruição da membrana basal, houve a ativação de collagenase tipo IV endógena cuja ação potencializou a degradação de colágeno tipo IV.

1.3. Veneno da cascavel *Crotalus durissus terrificus*

A cascavel tropical *Crotalus durissus* se encontra distribuída pela América Latina, desde o México até a Argentina. Atualmente, são reconhecidas 14 subespécies, sendo que sete destas ocorrem no Brasil (CAMPBELL & LAMAR, 1989). Das várias subespécies de *C. durissus*, apenas duas, *C. d. durissus*, da América Central e *C. d. terrificus* do Brasil, têm os seus venenos bem estudados.

O veneno de *C. d. terrificus* consiste em uma variedade de toxinas, enzimas e peptídeos. Das toxinas, a mais conhecida é, certamente, a crotoxina que corresponde à aproximadamente 50% do peso seco de veneno bruto e que foi inicialmente isolada e cristalizada por SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT (1938). Essa toxina de PM 30.000 é composta de duas subunidades, uma básica com atividade fosfolipásica A_2 e a outra ácida, a crotapotina, sem atividade enzimática mas cuja presença na estrutura dimérica tem uma contribuição importante para a toxicidade deste complexo (HENDON & FRAENKEL-CONRAT, 1971; RUBSAMEN, BREITHAUPT, HABERMANN, 1971). A ação da crotoxina é principalmente pré-juncional, inibindo a liberação de acetilcolina

dos terminais nervosos em junções neuromusculares (VITAL BRAZIL, 1966; VITAL BRAZIL & EXCELL, 1972). Outras toxinas já caracterizadas do veneno de *C. d. terrificus* incluem a convulxina (PM 78.000; PRADO-FRANCESCHI & VITAL BRAZIL, 1981) com potente atividade pró-agregante sobre plaquetas, a crotamina, peptídeo básico de PM ~4.000-5.000 (GONÇALVES, 1956; GONÇALVES & DEUTSCH, 1956) que produz miotonia (VITAL BRAZIL, PRADO-FRANCESCHI, LAURE, 1979), mionecrose (CAMERON & TU, 1978) e analgesia (MANCIN *et al.*, 1998; PICOLO, GIORGIO, CURY, 2000), e a giroxina, proteína de PM 35.000 (BARRIO & VITAL BRAZIL, 1958) que possui atividade enzimática tipo-trombina.

Além dessas toxinas, o veneno de *C. d. terrificus* contém várias enzimas tais como L-amino-ácido oxidase, fosfodiesterase (PM ~105.000), NAD-hidrolase e 5'-nucleotidase (PM ~200.000), e também alguns peptídeos de PM entre 8.000-10.000 (BERCOVICI *et al.*, 1987).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Neste trabalho, propusemo-nos a investigar:

1. A distribuição de atividade colagenásica, elastásica e hialuronidásica em alguns venenos animais que degradam a matriz extracelular.
2. A variação na atividade hialuronidásica presente no veneno de *Crotalus durissus terrificus*.
3. Algumas propriedades físico-químicas da HYAL do veneno de *C. d. terrificus*.

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**COLLAGENASE, ELASTASE AND HYALURONIDASE IN
VENOMS: SOME PROPERTIES OF *CROTALUS DURISSUS*
TERRIFICUS SNAKE VENOM HYALURONIDASE**

Alcyr José Matthiesen^{1,2}, Vitor Rogério Medeiros¹,
Renato de Araújo Faro¹, Ronilson Agnaldo Moreno^{1,2}, Stephen Hyslop^{1*}

¹Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
CP 6111, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

and

²Fundação Hermínio Ometto (UNIARARAS),
Araras, SP, Brasil

Running title: Venom collagenase, esterase and hyaluronidase
activities

Keywords: Collagenase, elastase, extracellular matrix, hyaluronidase,
permeability, venom

Category: Regular paper

*Author for correspondence at the above address. Tel.: (55)-(19)-3788-7185/7178. Fax:
(55)-(19)-3289-2968. E-mail: hyslop@fcm.unicamp.br

Abstract

Animal venoms contain enzymes capable of degrading basement membrane and extracellular matrix components. We examined the collagenase, elastase and hyaluronidase activities of several venoms and some of the properties of hyaluronidase in *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. Collagenase and elastase were assayed colorimetrically. Hyaluronidase activity was measured turbidimetrically and by in situ detection following SDS-PAGE. The enzyme was also partially purified by gel filtration on Sephacryl S200 HR. Neutralization of hyaluronidase by antisera was tested by measuring the residual activity after co-incubation. Arthropod and snake venoms showed similar levels of collagenase; elastase activity varied from 0 – 0.713 A_{495} nm/mg/24 h. The hyaluronidase content of arthropod venoms [15.3±4.7 to 166±19.2 units/mg; mean±SEM] was higher than in snake venoms ($\leq 7.0 \pm 1.7$ units/mg; n=3-6). In *C. d. terrificus* venoms, hyaluronidase activity varied from 4.5±0.5 to 13.2±4.8 units/mg (n=3-6). *C. d. terrificus* hyaluronidase eluted as a single peak after gel filtration and migrated as a single band (~75 kDa) based on in situ detection after SDS-PAGE. The pH optimum was 4.0, with maximum activity in 0.05-0.1 M NaCl. The enzyme lost activity at >37°C and after 6 h in solution (~50% reduction) at 4°C, 25°C and 37°C. Commercial antisera neutralized the enzyme. These properties of *C. d. terrificus* hyaluronidase were similar to those of other venom hyaluronidases.

1. Introduction

Following inoculation, animal venoms diffuse into surrounding tissue to produce local and systemic effects. This diffusion frequently requires the action of venom proteases and other enzymes capable of degrading components of the basement membrane and extracellular matrix such as collagen, elastin, fibronectin, laminin and hyaluronic acid, and of disrupting the intercellular junctions of blood vessel walls. The enzymes responsible for this action on tissues include phospholipases A₂, non-specific proteases, collagenases, elastases, hyaluronidases and hemorrhagins [1-3].

Collagenolytic activity has been reported in snake [4-7], hornet [8] and some spider [9] venoms, but is absent from bee venom and venoms of the spiders *Aranea diadema* and *Loxosceles mactans* [5]. In some cases, this activity is associated with a specific enzyme [10] unrelated to the trypsin-like activity of the venom [6, 11], while in other cases, collagenolytic activity may or may not be associated with hemorrhagins [12].

Simpson and Taylor [13] and Bernick and Simpson [14] reported elastolytic activity in snake venoms, with the levels in venoms of the Elapidae generally being lower than in the Crotalidae and Viperidae. The enzymes responsible for this activity have not yet been purified but appear to be serine proteases with a requirement for divalent cations, probably Ca²⁺, and can be inhibited by heavy metals (HgCl₂) and cysteine [14].

Hyaluronidases (HYAL; hyaluronate 4-glycano-hydrolase, E.C. 3.2.1.25) are endohexosaminidases which cleave β1-4-N-acetylhexosaminic bonds in hyaluronic acid and, to a lesser extent, in sulfated derivatives of chondroitin. The existence of HYAL

has been recognized since the 1930s when Hoffman AND Duran-Reynals [15] and later, MacClean [16], described the presence of a "spreading factor" (so called because of its ability to enhance the diffusion of dyes from injection sites in animal skin) in fluids and tissues of various organisms and in testicular extracts. This enzyme was also shown to occur in animal venoms [17-21] where it facilitates the diffusion of venom components from the site of inoculation [22]. Many studies have since confirmed that HYAL is widely distributed in animal venoms. Recent work has shown structural homology between the HYAL of bee and wasp venoms and the PH-20 HYAL of mammalian spermatozoa [see 23].

In this work, we examined the collagenase, elastase and HYAL activities of several mainly Brazilian snake and arthropod venoms, and also determined some properties of the HYAL in the venom of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Acrylamide, ammonium persulfate, blue dextran, bovine testicular HYAL, bromophenol blue, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), collagen (type I), Coomassie brilliant blue R250, elastin-Congo red, dimethylaminobenzidine (DMAB), glycine, hyaluronic acid (human umbilical cord), N,N'-methylene-bis-acrylamide, protein molecular weight markers for SDS-PAGE, Trizma base, sodium dodecyl sulphate (SDS), N,N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), and Stains all (1-ethyl-2-[3-(1-ethylnaphtho[1,2-d]thiazolin-2-ylidene)-2-methylpropenyl] naphtho[1,2-d-thiazolium bromide) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sephacryl

S200 HR was from Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ, USA). The other chemicals of reagent or analytical grade were purchased locally.

2.2. Venoms

Desiccated or lyophilized venoms were from the Instituto Butantan (São Paulo, SP, Brazil), the Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP, Botucatu, SP, Brazil), the Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG, Brazil), the Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica (*Bothrops asper* venom) or private venom suppliers. *Bothrops jararacussu* venom lots 1-3 were from snakes collected in the State of São Paulo (SP), lot 4 was from snakes caught in the State of Minas Gerais (MG), and lot 5 was from snakes collected in the south of the State of Bahia (BA) (Brazil). *C. d. terrificus* venom lots 1, 2 and 5-7 were pools from snakes captured in Minas Gerais and lots 3 and 4 were from snakes collected in São Paulo. *C. d. collilineatus* and *C. d. cascavella* venoms were provided by Mr. Luiz Henrique (Ribeirão Preto, SP, Brazil) and by a private supplier in the State of Maranhão (MA), Brazil, respectively. The age, number and sex of the specimens from which the venoms used in this study were obtained are unknown. Bee (*Apis mellifera*) venom was from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All quantities of venom indicated refer to the dry weight of material used. Commercial antisera were obtained from the Instituto Butantan or from FUNED.

2.3. Enzyme assays

Collagenase activity was assayed by the method of Seddon et al. [24]. Venom

samples were incubated with a 1% suspension of collagen in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, containing 5 mM CaCl_2 . At the end of the incubation, the mixture was briefly centrifuged at room temperature and 1 ml of the supernatant was then mixed with 1 ml each of 0.01 M CuSO_4 , 2.5 M NaOH and 6% H_2O_2 . The mixture was shaken for 5 min at room temperature and then incubated at 80°C for 5 min followed by cooling under running water. Subsequently, 4 ml of 1.5 M H_2SO_4 were added with mixing followed by 2 ml of DMAB (5% w/v solution in propanol) and further agitation. The samples were then incubated at 70°C for 16 min, cooled under running water and the resulting absorbance read at 556 nm to detect hydroxyproline. Enzymatic activity was expressed as the increase in absorbance at 556 nm/mg venom/18 h.

Elastase activity was determined as described by Shotton [25]. Venom samples (in 0.25 ml) were incubated for 24 h at 37°C with 4 ml of 0.02 M sodium borate buffer, pH 8.8, containing 1 mg of elastin-Congo red/ml. At the end of this period, the samples were centrifuged (5-10 min) in a clinical centrifuge at room temperature and the absorbances were read at 495 nm. Enzymatic activity was expressed as the increase in absorbance at 495 nm/mg venom/24 h.

HYAL activity was assayed by the method of Di Ferrante [26]. The reaction mixture consisted of venom or chromatographic fraction (0.1 ml), 0.2 ml of hyaluronic acid solution (1 mg/ml in 0.2 M sodium acetate buffer, pH 6.0, containing 0.15 M NaCl) and 0.2 ml of sodium acetate buffer. The mixture was incubated at 37°C for 15 min and the reaction stopped by adding 2 ml of CTAB solution (2.5% in 2% NaOH) followed by rapid mixing. The resulting turbidity was determined at 400 nm after incubation for 30 min at room temperature ($23 \pm 3^\circ\text{C}$). One unit of enzymatic activity, defined as a turbidity

reducing unit or TRU, corresponded to the amount of venom required to produce a 50% reduction in the turbidity caused by 0.2 mg of substrate. The activity was calculated from $\log (\% \text{turbidity}/100\% - \% \text{turbidity})$ vs. $\log (\text{amount of venom})$ plots of the dose-response curves obtained. The amount of venom (read from the x-axis) corresponding to zero on the y-axis, i.e. $\log(50\%/100\% - 50\%) = \log 1 = 0$, represented one TRU. The extremes (non-linear portions) of the dose-response curves were not used in the log-log plots in order to avoid their influence in the calculation.

All absorbances were read on a Uvikon 810 spectrophotometer (Kontron Instruments) using polystyrene cuvettes.

2.4. In situ detection of HYAL activity after SDS-PAGE

HYAL activity was detected in situ as described by Cevallos et al. [27] following electrophoresis of venom samples in SDS-polyacrylamide gels containing hyaluronic acid (0.6 mg/ml of non-polymerized acrylamide:bis-acrylamide solution). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was done in 10% gels. Venom samples were diluted in 0.063 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 2% SDS, 10% glycerol and 0.001% bromophenol blue and electrophoresed (without prior boiling) at a fixed voltage (100 V) in a Mighty Small SE-260 mini-gel apparatus (Hofer-Pharmacia BioTech, San Francisco, CA, USA). After electrophoresis, the gels were stained with Stains-all followed by rinsing in 0.015 M Tris-HCl, pH 7.9, containing 5% formamide and 20% isopropanol and then photographed. The bands of HYAL activity appeared as clear zones against a purple/blue background.

2.5. Gel filtration chromatography

C. d. terrificus venom was dissolved in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0, containing 0.15 M NaCl and applied to a column (1.6 cm x 50 cm) of Sephacryl S200 HR pre-equilibrated and eluted with the same buffer at a flow rate of 20 ml/h. The elution profile was monitored at 280 nm and 2 ml fractions were collected. HYAL activity of the fractions was assayed as described above.

2.6. Thermostability

The effect of temperature on *C. d. terrificus* HYAL was examined by incubating the venom at temperatures up to 80°C for 30 min and then measuring the residual activity. The stability of the enzyme in solution was examined by assaying the activity in venom samples incubated at 4°C, 25°C and 37°C for up to 24 h. In both experiments, the venom was dissolved in 0.2 M sodium acetate, pH 6.0 containing 0.15 M NaCl.

2.7. pH optimum

To evaluate the effect of pH on HYAL activity, venom samples were dissolved in 0.9% (w/v) saline and the activity then assayed at 37°C using the standard assay described above with 0.2 M sodium acetate buffer of different pH values.

2.8. Salt concentration

The influence of salt (NaCl) concentration on HYAL activity was tested by assaying venom samples in 0.2 M sodium acetate buffer, pH 6.0, containing different amounts of NaCl (0-500 mM). For these assays, the venom and hyaluronic acid were

prepared in acetate buffer without NaCl and the salt then added separately to give the desired final concentration.

2.9. Neutralization by antisera

To examine the neutralization of *C. d. terrificus* venom HYAL by commercial antisera, venom samples were incubated for 30 min at 37°C with different amounts of antisera against snake (*Bothrops*, *Crotalus* or *Micrurus* sp.) and scorpion (*Tityus* sp.) venoms in 0.2 M sodium acetate buffer, pH 6.0, in a volume of 0.3 ml, after which substrate (0.2 ml) was added and the residual enzymatic activity then determined.

3. Results

Table 1 shows the collagenase and elastase activities of various arthropod and snake venoms. Both activities were detected, although to varying degrees. Collagenase activity was lowest in *B. asper* venom and highest in *B. jararaca*, with the arthropod venoms showing levels similar to those of several snake venoms. Among the snake venoms, *B. asper* venom had the greatest elastase activity and *B. cotiara*, the least; the latter was similar to that of scorpion (*T. serrulatus*) venom. Bee venom had no elastase activity whereas the level in spider venom was comparable to some snake venoms.

Figure 1 shows dose-response curves for the HYAL activity of the venoms screened. Activity was detected in all venoms except for that of *B. atrox*; the highest levels occurred in arthropod venoms which, in the case of bee (*A. mellifera*) venom, was similar to that of bovine testicular HYAL (positive control). Of particular interest was the

very high activity in spider (*P. nigriventer*) venom. Among the snake venoms with activity, the most active was that of *C. d. terrificus*, and the least active, that of *B. jararacussu*; the other venoms had values intermediate to these. The levels of HYAL, expressed in TRU/mg (Table 1) confirmed the findings of the dose-response curves.

Figure 2 shows variations in the HYAL content of different lots of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus* venoms. In the former species, only one lot of venom produced a 50% reduction in turbidity over the range tested; the large quantities of venom required to detect even moderate activity in the other lots precluded full dose-response curves from being done. All lots of *C. d. terrificus* venom tested contained HYAL activity, as did the venoms of two other rattlesnake subspecies, *C. d. cascavella* (from northeastern Brazil) and *C. d. collilineatus* (from the State of São Paulo, overlapping in range with *C. d. terrificus*). Table 2 summarizes the HYAL activities of the various lots of *C. d. terrificus* venom compared with the other two subspecies. *C. d. terrificus* venom HYAL levels differed by up to three-fold between the least and most active lots. *C. d. cascavella* venom was more active than *C. d. terrificus* venoms whereas *C. d. collilineatus* venom was similar to the less active *C. d. terrificus* lots. Comparison with Table 1 shows that *C. d. terrificus* venoms generally had higher HYAL activity than *Bothrops* venoms.

Gel filtration of *C. d. terrificus* venom resulted in the characteristic profile for this venom in which the first peak contains convulxin (MW ~80,000) and the second (principal) peak contains crotoxin (MW ~25-30,000). HYAL activity eluted as a single peak between these two components (Fig. 3). In situ detection of HYAL following electrophoresis revealed varying band intensities for the venom lots tested (Fig. 4A)

which generally agreed with the activities in Figure 1 and Table 1. Serial dilution of *C. d. terrificus* venom revealed the presence of only one isozyme with an estimated mass of 75 kDa (Fig. 4B).

C. d. terrificus venom HYAL had a pH optimum of 4.0 with maximum activity occurring at an NaCl concentration of 50-100 mM (Fig. 5A,B). The enzyme lost activity above 37°C (Fig. 5C) and also lost about 50% of its activity after 6 h in solution, but then remained relatively stable for up to 24 h, regardless of the temperature of incubation (Fig. 6A). *C. d. terrificus* HYAL was effectively neutralized by all of the antisera tested, although antiserum against scorpion (*Tityus* sp.) venom was less potent than those raised against snake venoms (Fig. 6B).

4. Discussion

The detection of collagenase activity in snake venoms agrees with work by Simpson et al. [5], and indicates that this activity is widespread among venoms. The overall low collagenolytic activity in Table I may reflect the use of type I collagen which is less sensitive to digestion by venom collagenases than type II and IV collagens. The results for elastase activity (Table 1) confirm and extend the earlier observations of Bernick and Simpson [14] on the occurrence of this activity in snake venoms and also indicate that this enzyme may occur in arthropod venoms. The levels of activity (corrected for a 24 h incubation) for two of the snake venoms (*B. atrox* and *B. alternatus*) examined by Bernick and Simpson [14] were similar to those measured here for these same species (*B. atrox* - 0.093 vs. 0.101 $A_{495}/\text{mg}/24$ h and *B. alternatus* - 0.077 vs. 0.079 $A_{495}/\text{mg}/24$ h, from Bernick and Simpson [14] and Table 1, respectively).

The general importance of elastases in the lethality and other actions of venoms remains to be determined.

The presence of collagenase and elastase activities in the venoms of *P. nigriventer* and *T. serrulatus* is interesting, particularly since these venoms are primarily neurotoxic and do not produce marked local effects such as hemorrhage and/or necrosis seen with certain spider [9, 28-30] and many snake venoms [12, 31]. Collagenolytic activity has been implicated in the necrosis caused by some spider venoms [9], and the venom of the brown spider *Loxosceles intermedia* can degrade fibronectin and gelatin [32], but the contribution of this action to the local effects of the venom is uncertain. General proteolytic activity has been reported in the venoms of several species of spider, although it is not always clear whether such activity is a true venom component or the result of contamination with salivary or gastric contents [33, and references therein]. In the case of *P. nigriventer*, Brazil and Vellard [34] reported that venom obtained directly from dissected glands contained no proteolytic activity whereas venom collected from the chelicerae during venom extraction did [35-37].

HYAL activity was detected in all venoms studied, with the levels in arthropod venoms generally being higher than in snake venoms. The levels of this enzyme in *Bothrops* venoms were similar to those reported for several Asian snake species (*Naja kaouthia*, *N. naja sputatrix*, *Trimeresurus albolabris* and *T. popeorum*), but lower than those in *Bungarus candidus*, *Calloselasma rhodostoma*, *Trimeresurus macrops*, and *Vipera russelli* subspecies [38]. As shown in Fig. 2, the levels of HYAL varied among lots of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus* venoms (~3 fold in the latter case). Variations in the levels of enzymes in venoms are not uncommon and may be influenced by the

age, sex and geographic origin of the snakes as well as the method used to dry the venom (lyophilization, desiccation in vacuo, or air drying) [39]. Indeed, variations in the levels of other venom enzymes and toxins have been reported for *Bothrops* sp. [40, 41] and *C. d. terrificus* [42, 43]. Since *C. d. terrificus* venoms have little or no proteolytic [43] and hemorrhagic [44] activities, the generally higher levels of HYAL in the venoms examined here compared to *Bothrops* venoms may represent a compensation for this lack of enzymes capable of enhancing toxin diffusion.

There were no clear correlations among the levels of the three enzymes assayed. Although venom HYAL are generally non-toxic and non-hemorrhagic [22, 45, 46], their ability to increase vascular permeability and potentiate the hemorrhage produced by hemorrhagins [22] shows that this group of enzymes has an important role in the diffusion of venom and toxins from the site of injection. Indeed, the rapid action of HYAL on hyaluronic acid (within a few minutes) compared to the much slower action of collagenases and elastases (hours) on extracellular matrix components indicates that HYAL is likely to be more important in the immediate local diffusion of venom than the latter two activities.

The relationship between HYAL levels and the biological activities of *Bothrops* venoms was examined using values for the latter reported in the literature [47]. Figure 7 shows that there was a positive correlation between the levels of HYAL and the reported hemorrhagic and edematogenic activities of several *Bothrops* venoms whereas the correlation was negative for necrosis and myonecrosis. These relationships probably reflect the fact that hemorrhage and edema are rapid events (within minutes) which the presence of HYAL would potentiate by facilitating faster diffusion of the toxins

into surrounding tissue. In contrast, myotoxicity and necrosis are slower events (hours). In the presence of high levels of HYAL, the diffusion of toxins responsible for the latter activities from the site of injection would be greater, leading to lower local concentrations and hence lower effects over the time scales required for myotoxicity and necrosis. Similar relationships were not observed for the collagenolytic and elastolytic activities.

Venom HYAL are single chain glycoproteins [22, 45, 46, 48-50] with isoelectric points that may be acidic [22] or basic [45, 46, 50]. These enzymes range in molecular weight from 14,000 [38] to >120,000 [27], although in most cases this value is between 30,000-80,000 [22, 27, 45, 46, 48, 50-53], as also shown here for the *C. d. terrificus* enzyme. Although some venoms contain isozymes of HYAL [27], the enzyme in *C. d. terrificus* venom apparently occurs in a single isoform as shown by in situ detection of activity following SDS-PAGE.

Hyaluronic acid is the usual substrate for venom HYAL, with little action on chondroitin sulfates A, B, and C or heparin [22, 51, 54]. Sodium chloride is required for full enzyme activity, and this was confirmed here for *C. d. terrificus*, with maximum activity occurring in buffer containing 50-100 mM NaCl. HYAL activity is insensitive to EDTA and β -mercaptoethanol but can be inhibited by flavenoids [55, 56], Fe^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and heparin [22, 35, 45, 46, 50], the latter probably acting through a non-specific electrostatic interaction with the enzyme. HYAL are also generally resistant to several freeze-thaw cycles [22, 48, 50], but are inactivated by heating [38], as observed for *C. d. terrificus* venom HYAL. Xu et al. [45] reported that the HYAL from *Agkistrodon acutus* venom lost 90% of activity after 6 h in solution at pH 5 and 20°C but showed no

significant loss of activity when stored for two months at 4°C in phosphate buffer, pH 6.4, containing 0.4 M NaCl. A similar stability (up to 46 days) was reported by Tan and Tan [57] for venom HYAL in saline solution at 4°C, but activity was lost in 0.05 M Tris-HCl, pH 8.5 at this same temperature. The *C. d. terrificus* HYAL lost approximately 50% of its activity after 6 h in 0.2 M sodium acetate, pH 6.0 containing 0.15 M NaCl, independent of the storage temperature (4°C, 25°C or 37°C).

Venom HYAL have good antigenic activity, as shown by their reactivity with antisera [51, 58-61] and monoclonal antibodies [62] and the neutralization of enzyme activity [60-62]. However, there have been few comparative immunological studies of venom HYAL. Cross-reactivity has been reported with antisera to HYAL from white-faced hornet, yellow hornet and yellow jacket venoms (*Vespula* species) [58, 59], although this does not necessarily extend to other hornet and wasp venoms [63, 64] or to bee venom [58]. In contrast, HYAL from the white face hornet *Dolichovespula maculata* cross-reacts with bee venom HYAL, probably because of the considerable sequence similarity (56%) between the two proteins [65]. An antiserum produced against the venoms of the snakes *C. d. durissus*, *Lachesis muta stenophrys* and various Central American species of *Bothrops* effectively neutralized the HYAL activity compared to the effect on the hemolytic, hemorrhagic and proteolytic activities of these venoms [60, 61]. The neutralization of *C. d. terrificus* HYAL seen with the different antisera tested here agrees with the antigenic nature of these enzymes and indicates that there is some immunological identity among HYAL of snake and arthropod (scorpion, *Tityus* sp.) venoms.

Acknowledgements

The authors thank Mr. José Ilton dos Santos for technical assistance and Dr. Julia Prado-Franceschi (Department of Pharmacology, UNICAMP) for providing many of the venoms used and for making available laboratory space. This work was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- [1] A. Ohsaka, Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms, in: C.Y. Lee (Ed.), Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52, Snake Venoms, Springer-Verlag, Berlin, 1979, pp. 480-546.
- [2] W.B. Elliott, Chemistry and immunology of reptilian venoms, in: C. Gans, K.A. Gans (Eds.), Biology of the Reptilia, vol. 8, Physiology B, Academic Press, London, 1978, pp. 163-436.
- [3] S. Iwanaga, T. Suzuki, Enzymes in snake venoms, in: C.Y. Lee (Ed.), Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 52, Snake Venoms, Springer-Verlag, Berlin, 1979, pp. 61-158.
- [4] J.W. Simpson, L.J. Rider, Collagenolytic activity from venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137 (1971) 893-895.
- [5] J.W. Simpson, A.C. Taylor, B.M. Levy, Collagenolytic activity in some snake venoms, Comp. Biochem. Physiol. 39B (1971) 963-967.
- [6] J.W. Simpson, Collagenolytic activity of snake venom: the absence of collagenolytic activity in the trypsin-like enzyme from *Crotalus atrox* venom, Comp. Biochem. Physiol. 40B (1971) 633-636.
- [7] J.W. Simpson, Distribution of collagenolytic enzyme activity among snake venoms, Comp. Biochem. Physiol. 51B (1975) 425-428.
- [8] D. Dayan, L. Barr-Nea, M. Sandbank, I. Binderman, G.L. Mechanic, J.S. Ishay, Oriental hornet venom enhances wound healing and repair in rat skin, possibly through its collagenolytic activity, Acta Trop. 40 (1983) 147-153.

- [9] R.K. Atkinson, L.G. Wright, The involvement of collagenase in the necrosis induced by the bites of some spiders, *Comp. Biochem. Physiol.* 102C (1992) 125-128.
- [10] B.S. Hong, Isolation and identification of a collagenolytic enzyme from the venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*), *Toxicon* 20 (1982) 535-545.
- [11] J.W. Simpson, Collagenolytic activity of snake venom: the effects of enzyme inhibitors on the collagenolytic and trypsin-like enzymes derived from *Crotalus atrox* venom, *Int. J. Biochem.* 3 (1972) 243-245.
- [12] J.B. Bjarnason, J.W. Fox, Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, *Pharmacol. Ther.* 62 (1994) 325-372.
- [13] J.W. Simpson, A.C. Taylor, Elastolytic activity from venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 144 (1973) 380-383.
- [14] J.J. Bernick, J.W. Simpson, Distribution of elastase-like enzyme activity among snake venoms, *Comp. Biochem. Physiol.* 54B (1976) 51-54.
- [15] D.C. Hoffmann, F. Duran-Reynals, The influence of testical extract on the intradermal spread of injected fluids and particles, *J. Exp. Med.* 53 (1931) 387-398.
- [16] D. MacClean, Studies on diffusing factors. The hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other agents that increase tissue permeability, *Biochem. J.* 35 (1941) 159-183.
- [17] F. Duran-Reynals, Invasion of the body by animal poisons, *Science* 83 (1936) 286-287.
- [18] F. Duran-Reynals, Content in spreading factor and toxins in organs and poisonous secretions of snakes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 38 (1938) 763-765.
- [19] G. Favilli, Occurrence of spreading factors and some properties of hyaluronidases in animal parasites and venoms, in: E.E. Buckley, N. Porges (Eds.), *Venoms*, Publication No. 44, American Association for the Advancement of Science, Washington DC, 1956, pp. 281-289.
- [20] R. Jaques, The hyaluronidase content of venoms, in: E.E. Buckley, N. Porges (Eds.), *Venoms*, Publication No. 44, American Association for the Advancement of Science, Washington DC, 1956, pp. 291-293.
- [21] P. Boquet, Y. Izard, J. Detrait, Recherches sur le facteur de diffusion des venins

- de serpents, C. R. Seanc. Soc. Biol. 152 (1958) 1363-1365.
- [22] A.T. Tu, R.R. Hendon, Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor, *Comp. Biochem. Physiol.* 76B (1983) 377-387.
- [23] G. Kreil, Hyaluronidases – a group of neglected enzymes, *Protein Sci.* 4 (1995) 1666-1669.
- [24] S.V. Seddon, I. Hemingway, S.P. Borriello, Hydrolytic enzyme production by *Clostridium difficile* and its relationship to toxin production and virulence in the hamster male, *J. Med. Microbiol.* 31 (1990) 169-174.
- [25] D.M. Shotton, Elastase, *Meth. Enzymol.* 19 (1970) 113-140.
- [26] N. Di Ferrante, Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity, *J. Biol. Chem.* 220 (1956) 303-306.
- [27] M.A. Cevallos, C. Navarro-Duque, J.M. Varela, A.C. Alagon, Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Toxicon* 30 (1992) 925-930.
- [28] R.K. Atkinson, L.G. Wright, A study of the necrotic actions of the venom of the wolf spider, *Lycosa godeffroyi*, on mouse skin, *Comp. Biochem. Physiol.* 95 (1990) 319-325.
- [29] K.C. Barbaro, J.L.C. Cardoso, V.R.D. Eickstedt, I. Mota, Dermonecrotic and lethal components of *Loxosceles gaucho* spider venom, *Toxicon* 30 (1992) 331-338.
- [30] A.R. Young, S.J. Pincus, Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles fuscens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*, *Toxicon* 39 (2001) 391-400.
- [31] D. Mebs, C.L. Ownby, Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities, *Pharmacol. Ther.* 48 (1990) 223-236.
- [32] L. Feitosa, W. Gremski, S.S. Veiga, M.C. Elias, E. Graner, O.C. Mangili, R.R. Brentani, Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom, *Toxicon* 36 (1998) 1039-1051.
- [33] B.A. Perret, Proteolytic activity of tarantula venoms due to contamination with saliva, *Toxicon* 15 (1977) 505-510.
- [34] V. Brazil, J. Vellard, Contribuição ao estudo do veneno das aranhas, *Mem. Inst. Butantan* 2 (1925) 5-77.

- [35] E. Kaiser, The enzymatic activity of spider venom: on the influence of sulfonated polysaccharides on the proteolytic and hyaluronic acid splitting activity of spider venom, *Mem. Inst. Butantan* 25 (1953) 35-30.
- [36] E. Kaiser, Enzymatic activity of spider venoms, in: E.E. Buckley, N. Porges (Eds.), *Venoms*, Publication No. 44, American Association for the Advancement of Science, Washington DC, 1956, pp. 91-93.
- [37] E. Kaiser, W. Raab, Collagenolytic activity of snake and spider venoms, *Toxicon* 4 (1967) 251-255.
- [38] S. Pukrittayakamee, D.A. Warrell, V. Desakorn, A.J. McMichael, N.J. White, D. Bunnag, The hyaluronidase activities of some southeast Asian venoms, *Toxicon* 26 (1988) 629-637.
- [39] J.P. Chippaux, V. Williams, J. White, Snake venom variability: methods of study, results and interpretation, *Toxicon* 11 (1991) 1279-1303.
- [40] A. Barrio, Variaciones en el contenido de riboflavina y L-oxo-aminoacido-oxidasa em venenos de Crotalidae de la Argentina, *Rev. Inst. Malbran* 16 (1954) 204-214.
- [41] I.M. Francischetti, H.C. Castro, R.B. Zingali, C.R. Carlini, J.A. Guimarães, *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions, *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 119 (1998) 21-29.
- [42] S. Schenberg, Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies, *Science* 129 (1959) 1361-1363.
- [43] I.M. Francischetti, M.E. Gombarovits, J.G. Valenzuela, C.R. Carlini, J.A. Guimarães, Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 127 (2000) 23-36.
- [44] E.F. Sanchez, T.V. Freitas, D.L. Ferreira-Alves, D.T. Velarde, M.R. Diniz, M.N. Cordeiro, G. Agostini-Cotta, D.R. Diniz, Biological activities of venoms from South American snakes, *Toxicon* 30 (1992) 95-103.
- [45] X. Xu, X. Wang, X. Xi, J. Liu, J. Huang, Z. Lu, Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom, *Toxicon* 20 (1982) 973-981.
- [46] C.H. Poh, R. Yuen, M.C.M. Chung, H.E. Khoo, Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom, *Comp. Biochem. Physiol.* 110B (1992) 160-162.

- [47] M.L. Ferreira, A.M. Moura-da-Silva, F.O.S. França, J.L. Cardoso, I. Mota, Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis, *Toxicon* 30 (1992) 1603-1608.
- [48] M. Ramanaiah, P.R. Parthasarathy, B. Venkaiah, Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom, *Biochem. Int.* 20 (1990) 301-310.
- [49] L. Marz, C. Kuhne, H. Michl, The glycoprotein nature of phospholipase A₂, hyaluronidase and acid phosphatase from honey-bee venom, *Toxicon* 21 (1983) 893-896.
- [50] D.M. Kemeny, N. Dalton, A.J. Lawrence, F.L. Pearce, C.A. Vernon, The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*, *Eur. J. Biochem.* 139 (1984) 217-223.
- [51] R.P. Wright, K.D. Elgert, B.J. Campbell, J.T. Barrett, Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider, *Arch. Biochem. Biophys.* 159 (1973) 415-426.
- [52] F.L. Schanbacher, C.K. Lee, J.E. Hall, I.B. Wilson, D.E. Howell, G.V. Odell, Composition and properties of tarantula (*Dugesia hentzi* Girard) venom, *Toxicon* 11 (1973) 21-29.
- [53] L.D. Possani, P.L. Fletcher Jr., M. Fletcher, G.S. Rode, J. Mochca-Morales, S. Lucas, F.V. Coronas, A.C. Alagon, B.M. Martin, Structural and functional characteristics of toxins purified from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus* Lutz and Mello, *Mem. Inst. Butantan* 54 (1992) 35-52.
- [54] K. Sugahara, S. Yamada, M. Sugiura, K. Takeda, R. Yeun, H.E. Khoo, C.H. Poh, Identification of the reaction products of the purified hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom, *Biochem. J.* 283 (1992) 99-104.
- [55] U.R. Kuppusamy, N.P. Das, Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases, *Experientia* 47 (1991) 1196-1200.
- [56] U.R. Kuppusamy, N.P. Das, Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice, *Pharmacol. Toxicol.* 72 (1993) 290-295.
- [57] N.H. Tan, C.S. Tan, Thermal stability of venom enzymatic activities, *Toxicon* 126 (1988) 42.

- [58] T.P. King, A.K. Sobotka, A. Alagon, L. Kochoumian, L.M. Lichtenstein, Protein allergens of white-faced hornet, yellow hornet, and yellow jacket venoms, *Biochemistry* 17 (1978) 5165-5174.
- [59] T.P. King, Sensitivity of immunoassays for detecting cross-reactivity of homologous venom proteins of yellow jackets, *J. Allergy Clin. Immunol.* 79 (1987) 59-67.
- [60] G. Rojas, J.M. Gutiérrez, J.A. Gené, M. Gomez, L. Cerdas, Neutralization of toxic and enzyme activities of four venoms from snakes of Guatemala and Honduras by the polyvalent antivenin produced in Costa Rica, *Rev. Biol. Trop.* 35 (1987) 59-67.
- [61] J.A. Gené, M. Gomez, J.M. Gutiérrez, L. Cerdas, Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities by antivenom, *Toxicon* 23 (1985) 1015-1018.
- [62] S. Pukrittayakamee, A. Nontprasert, N.J. White, D.A. Warrell, D. Bunnag, Characterization of a monoclonal antibody that neutralizes the hyaluronidase activity of Russell's viper venom, *S. E. Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth.* 21 (1990) 231-232.
- [63] T.P. King, A. Joslyn, L. Kochoumian, Antigenic cross-reactivity of venom proteins from hornets, wasps, and yellow jackets, *J. Allergy Clin. Immunol.* 75 (1985) 621-628.
- [64] T.P. King, G. Lu, M. Gonzalez, N. Qian, L. Soldatova, Yellow jacket venoms allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 98 (1996) 588-600.
- [65] G. Lu, L. Kochoumian, T.P. King, Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 4457-4465.

Table 1. Collagenase, elastase and hyaluronidase activities of various animal venoms.

| Venom | Enzyme activity | | |
|--|--|---|---------------------------|
| | Collagenase (A ₅₅₆ /mg/18 h) | Elastase (A ₄₉₅ /mg/24 h) | Hyaluronidase TRU (µg) |
| Snakes | | | |
| <i>Bothrops alternatus</i> | 0.039 | 0.079 ± 0.015 | 210.1 ± 47.8 |
| <i>atrox</i> | 0.044 | 0.101 ± 0.003 | n.d. |
| <i>asper</i> | 0.006 | 0.713 ± 0.001 | 457.1 ± 33.0 |
| <i>cotiara</i> | 0.026 | 0.016 ± 0.007 | 364.3 ± 128.9 |
| <i>erythromelas</i> | 0.057 | 0.141 ± 0.011 | 340.5 ± 96.9 |
| <i>jararaca</i> | 0.080 | 0.171 ± 0.007 | 167.7 ± 4.3 |
| <i>jararacussu</i> | 0.017 | 0.201 ± 0.005 | 857.0 ± 163.5 |
| <i>moojeni</i> | 0.036 | 0.182 ± 0.010 | 471.3 ± 90.2 |
| <i>neuwiedi</i> | 0.023 | 0.234 ± 0.005 | 553.4 ± 63.3 |
| <i>Crotalus durissus terrificus</i> | 0.026 | 0.065 ± 0.011 | 148.9 ± 38.6 |
| Arthropods | | | |
| <i>Apis mellifera</i> (bee) | 0.024 | 0.0 ± 0.0 | 70.6 ± 25.7 |
| <i>Phoneutria nigriventer</i> (spider) | 0.058 | 0.108 ± 0.024 | 6.7 ± 0.7 |
| <i>Tityus serrulatus</i> (scorpion) | 0.033 | 0.017 ± 0.007 | 11.1 ± 0.7 |

Enzyme activities were measured as described in Methods. With the exception of collagenase (n=2), the other values are the mean ± S.E.M. of 3-4 determinations, each in duplicate. n.d., not detected (activity too low). One turbidity reducing unit (TRU) corresponds to the amount of venom required to cause a 50% reduction in the turbidity produced by 200 µg of hyaluronic acid.

Table 2. Hyaluronidase activity of *C. d. terrificus* venoms.

| Venom | Lot** | Hyaluronidase | |
|-------------------------------|-------|------------------|----------------|
| | | TRU (μ g) | TRU/mg |
| <i>C. d. terrificus</i> | 1 | 224.2 \pm 24.6 | 4.5 \pm 0.5 |
| | 2 | 191.3 \pm 45.3 | 5.5 \pm 1.5 |
| | 3 | 135.9 \pm 20.8 | 7.5 \pm 1.3 |
| | 4 | 126.5 \pm 27.5 | 8.2 \pm 1.6 |
| | 5 | 100.7 \pm 22.1 | 10.1 \pm 2.1 |
| | 6 | 95.5 \pm 10.6 | 10.9 \pm 1.4 |
| | 7 | 81.8 \pm 24.7 | 13.2 \pm 4.8 |
| <i>C. d. cascavella</i> ** | | 38.9 \pm 1.7 | 25.7 \pm 1.2 |
| <i>C. d. collilineatus</i> ** | | 158.0 \pm 16.9 | 6.8 \pm 1.1 |

*In order of increasing activity (TRU/mg). **Included for comparison. The values are the mean \pm S.E.M. of 3-6 determinations assayed in duplicate. One turbidity reducing unit (TRU) corresponds to the amount of venom required to cause a 50% reduction in the turbidity produced by 200 μ g of hyaluronic acid.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Dose-response curves for the degradation of hyaluronic acid by arthropod (A) and snake (B) venoms. The points are the mean \pm S.E.M. of 3-4 determinations of hyaluronidase activity assayed in duplicate as described in Methods.

Figure 2. Variation in the hyaluronidase activity of different lots of *B. jararacussu* (A) and *C. d. terrificus* (B) venoms. The points are the mean \pm S.E.M. of 3-4 determinations of hyaluronidase activity assayed in duplicate as described in Methods.

Figure 3. Gel filtration elution profile of *C. d. terrificus* venom showing the position of hyaluronidase activity. Twenty-five milligrams of venom were chromatographed on a column (1.6 cm x 50 cm) of Sephacryl S200 HR pre-equilibrated with 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0 containing 0.15 M NaCl. The column was eluted at a flow rate of 20 ml/h and the elution profile was monitored at 280 nm. Two milliliter fractions were collected and assayed for hyaluronidase activity as described in Methods.

Figure 4. Hyaluronidase zymograms of selected lots of *C. d. terrificus* venoms (A) and dilution curve for one lot used to estimate the molecular weight of the enzyme (B). In A, 100 μ g of venom were applied to each lane. In B, serial two-fold dilutions were tested starting with 200 μ g of venom. The molecular mass markers run in the same gel were (in kDa): rabbit muscle myosin – 205, β -galactosidase – 116, phosphorylase b – 97.4, bovine serum albumin – 66, ovalbumin – 45 and carbonic anhydrase – 29. Note that only one isoform of the enzyme was detected. Cdc = *C. d. cascavella*.

Figure 5. Influence of pH (A), salt (B) and temperature (C) on *C. d. terrificus* venom hyaluronidase. The points are the mean \pm S.E.M. of 3-4 determinations of enzyme activity assayed in duplicate as described in Methods.

Figure 6. Stability of *C. d. terrificus* venom hyaluronidase in solution (A) and neutralization of enzyme activity by commercial antisera (B). The points are the mean \pm S.E.M. of 4 determinations of enzyme activity assayed in duplicate as described in Methods.

Figure 7. Relationship between hyaluronidase levels of several *Bothrops* sp. venoms and their biological activities. The data for the biological activities were from ref. [47].

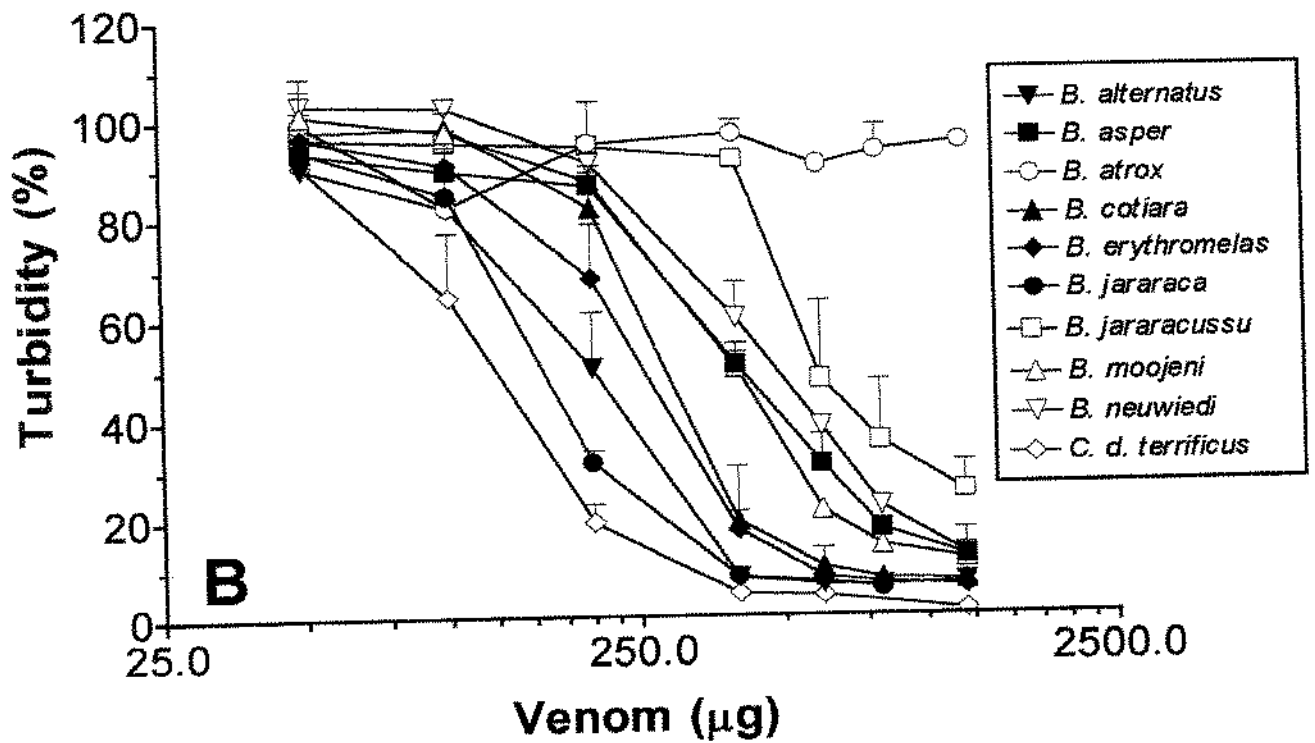
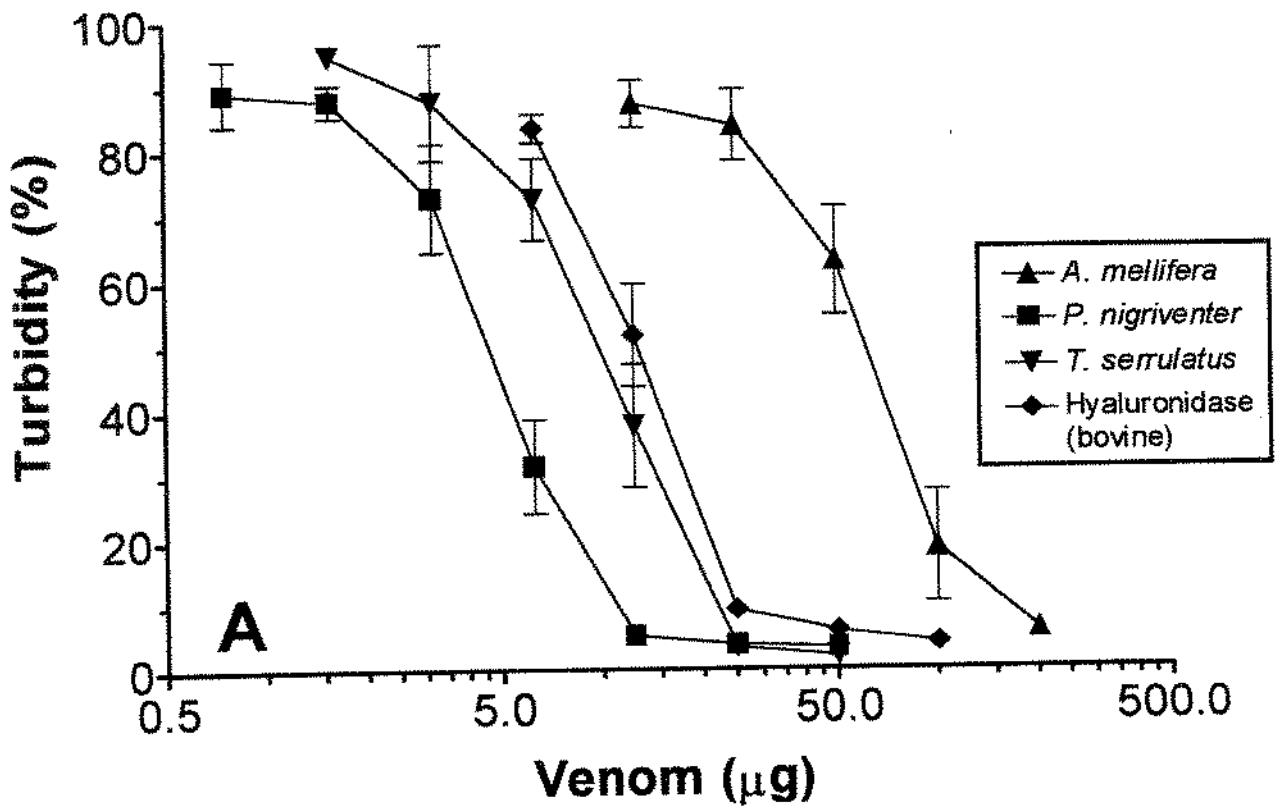


Figure 1

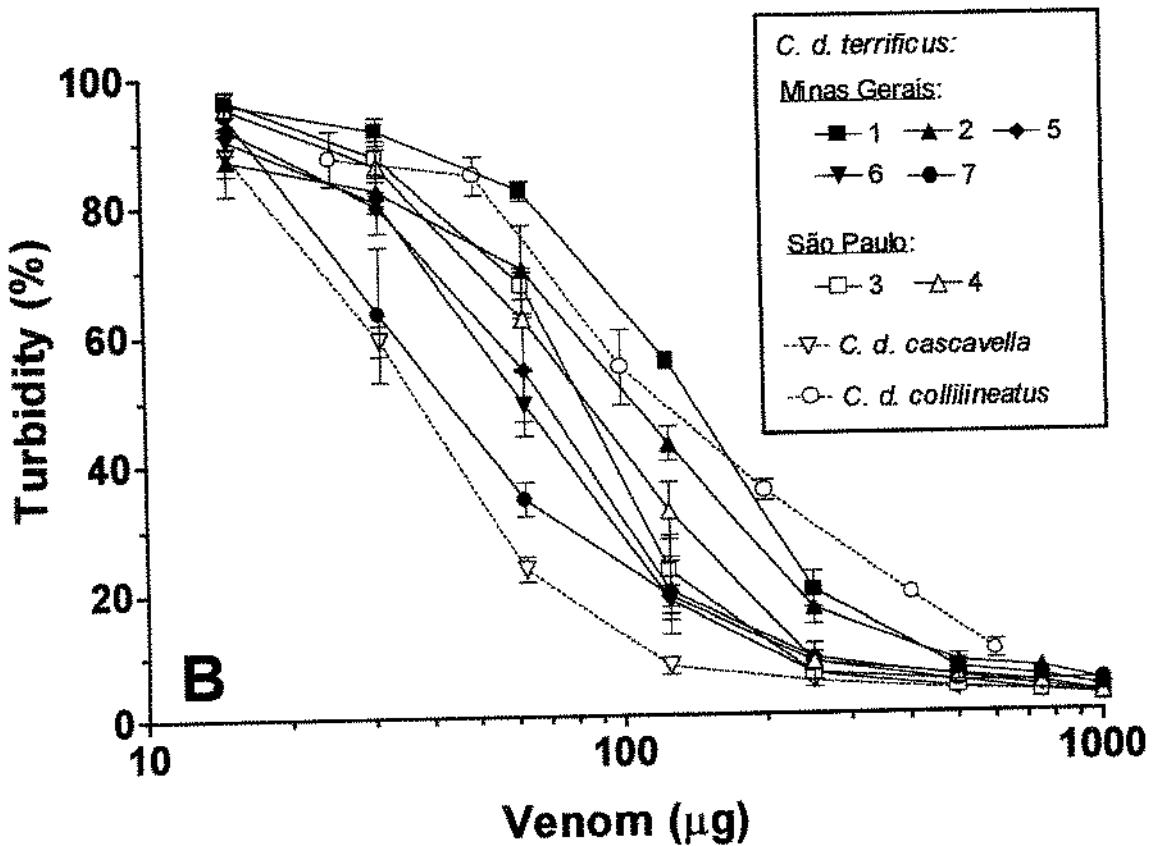
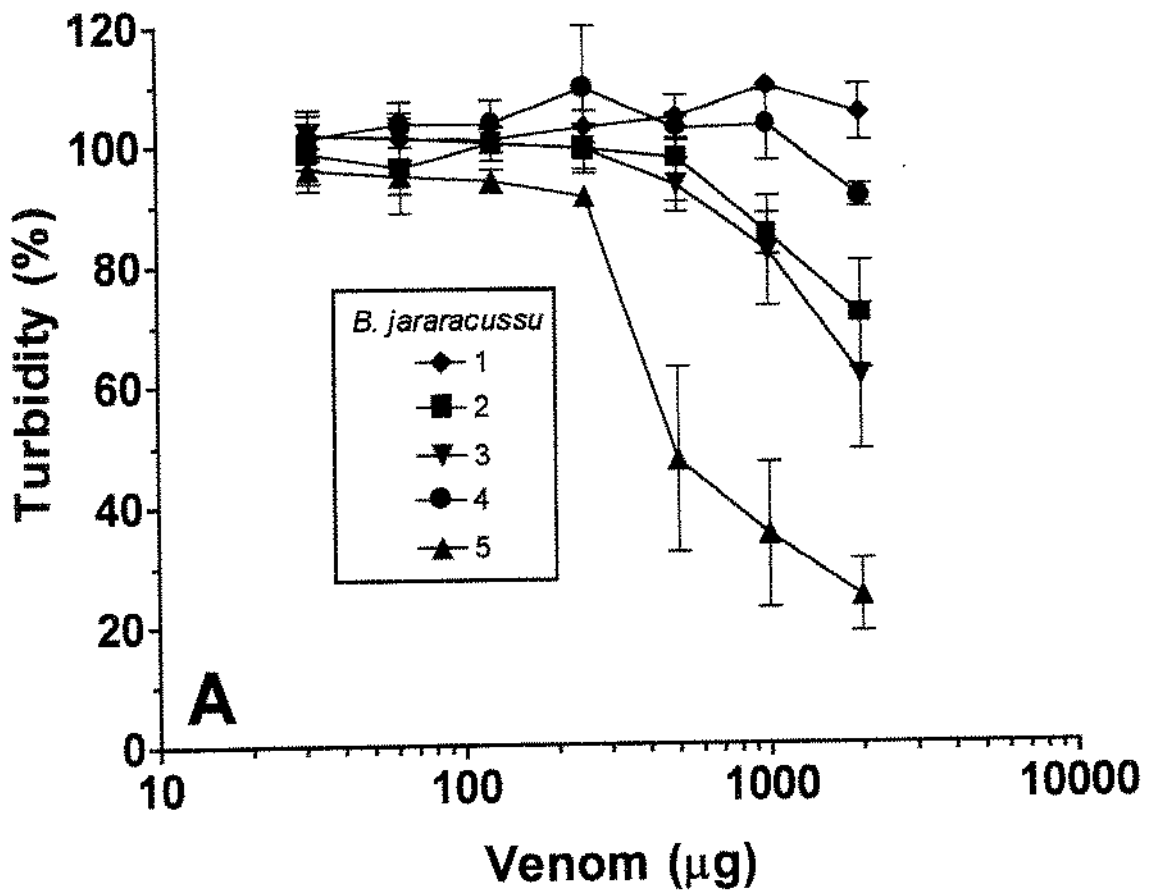


Figure 2

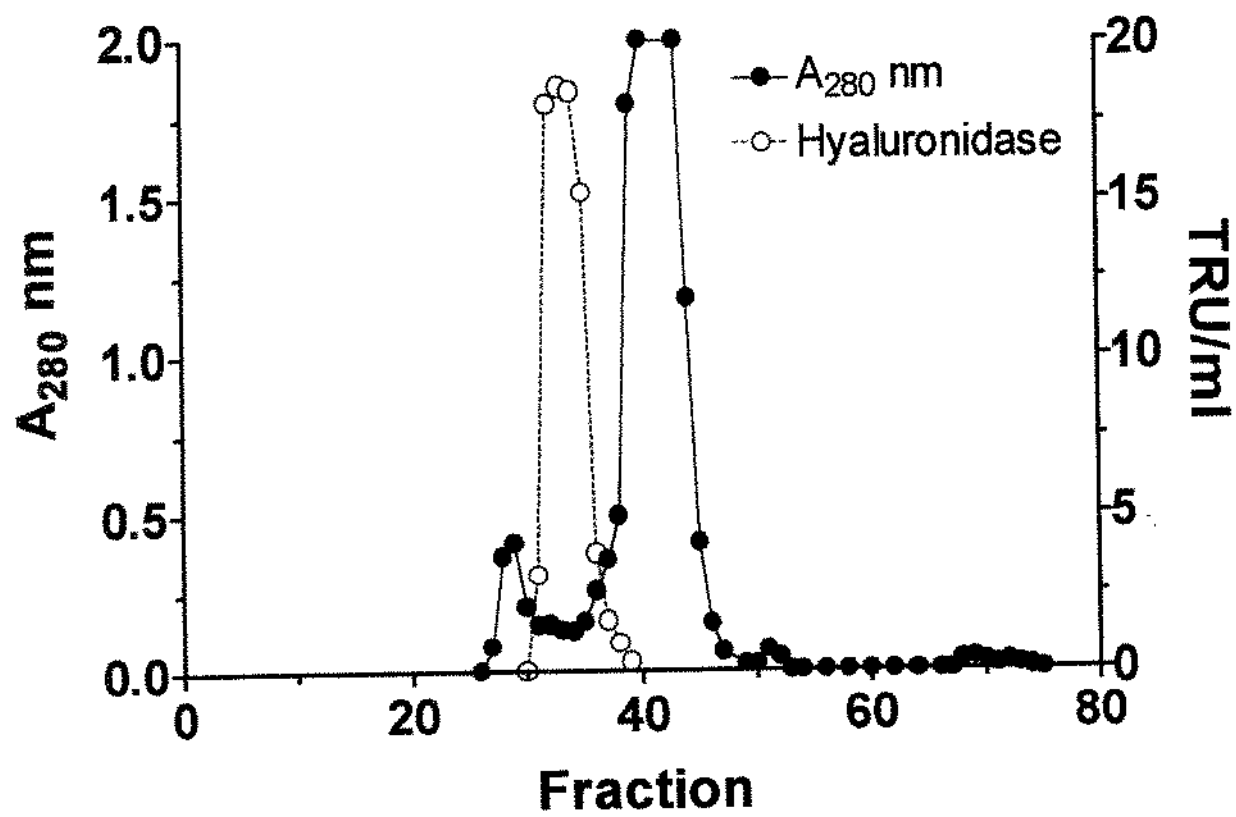
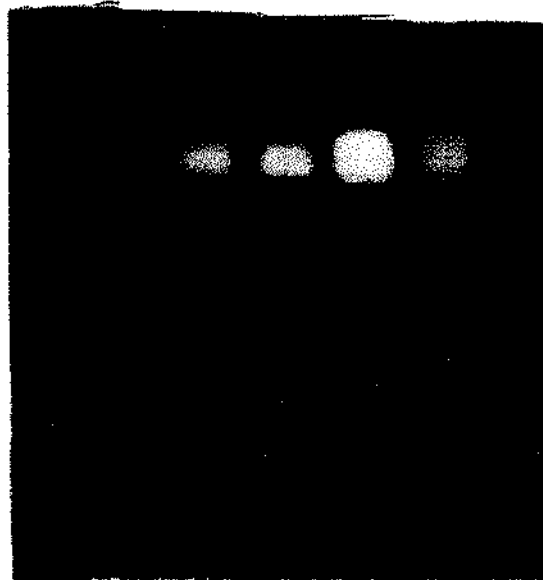
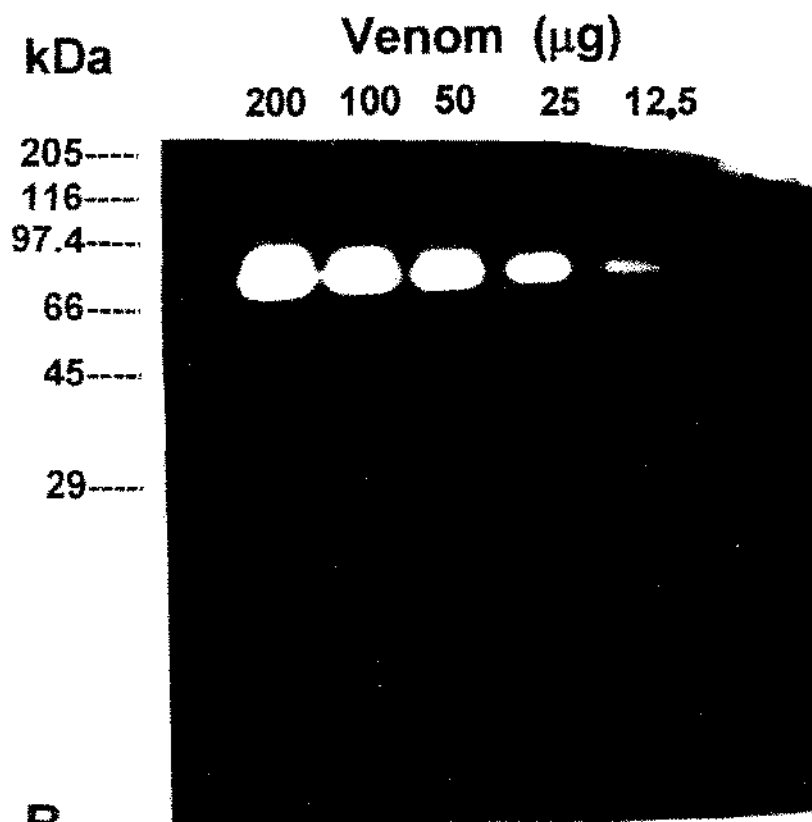


Figure 3

Venom lot
3 7 4 Cdc 1



A



B

Figure 4

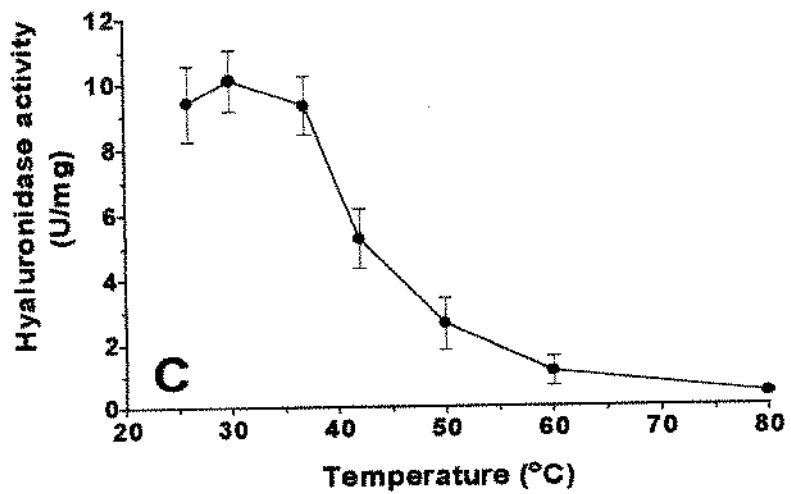
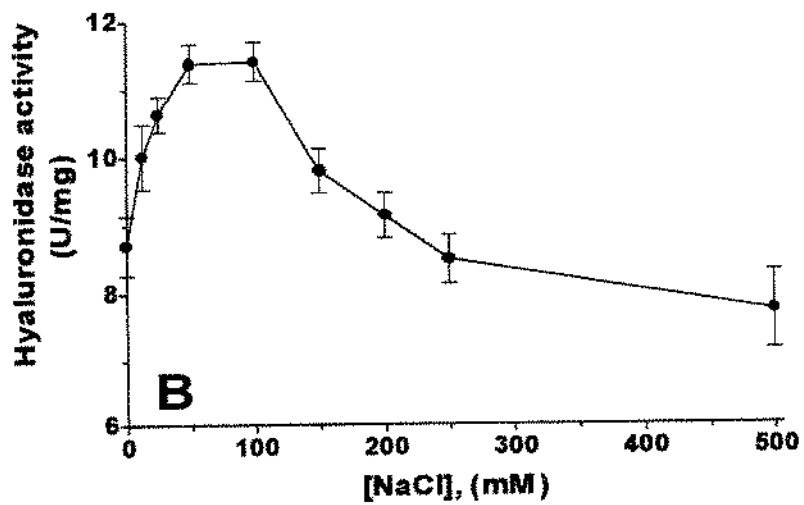
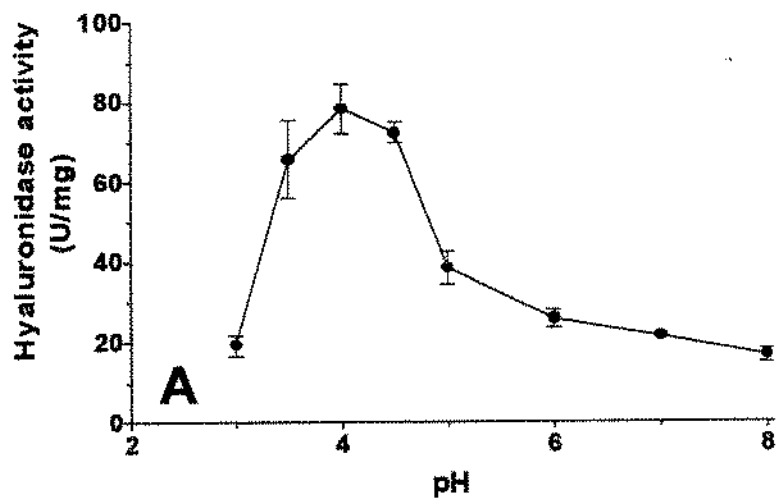


Figure 5

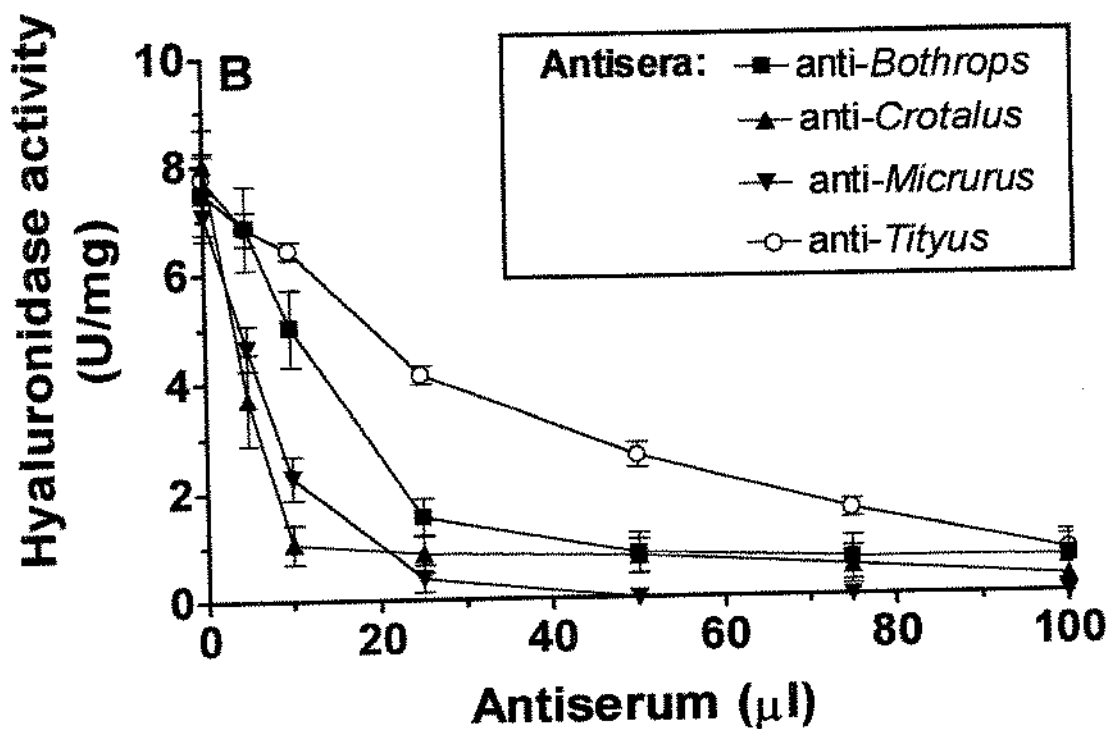
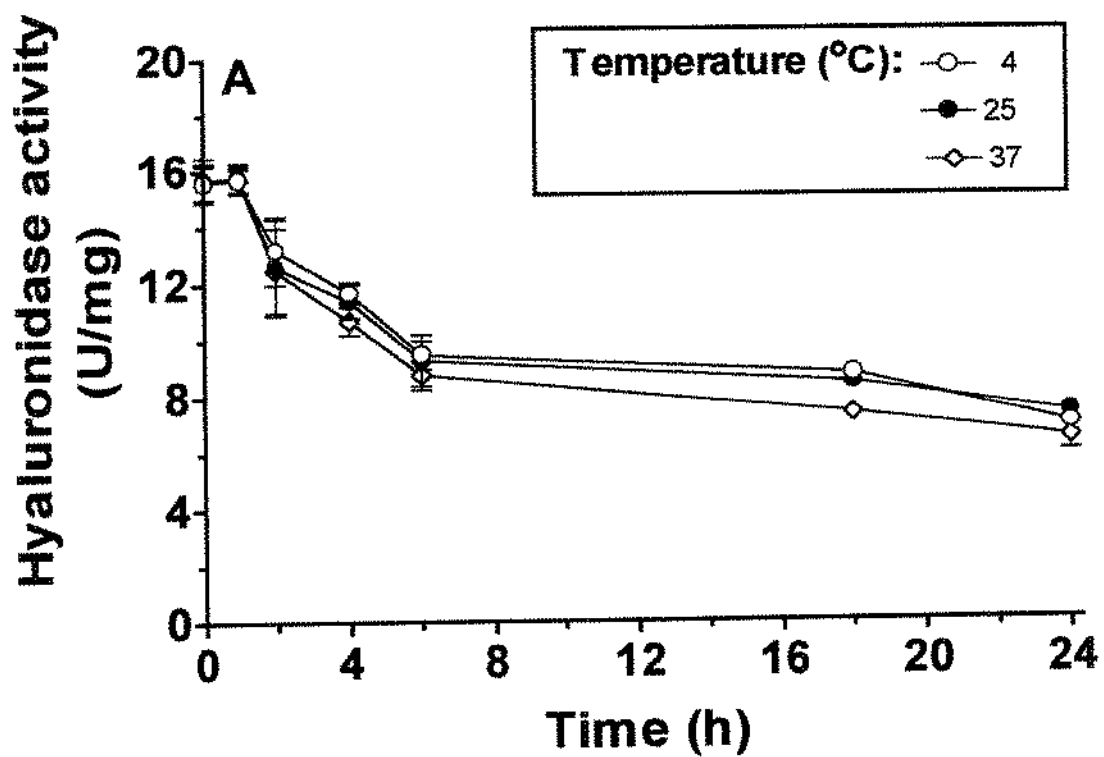


Figure 6

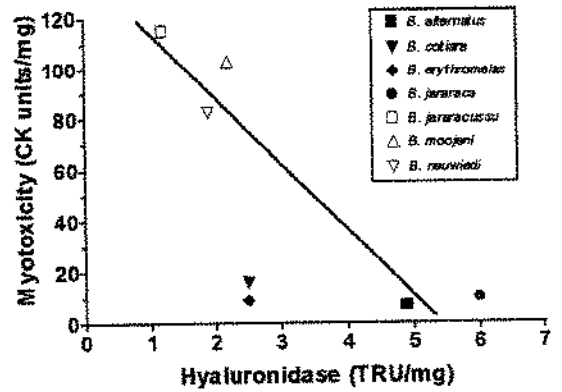
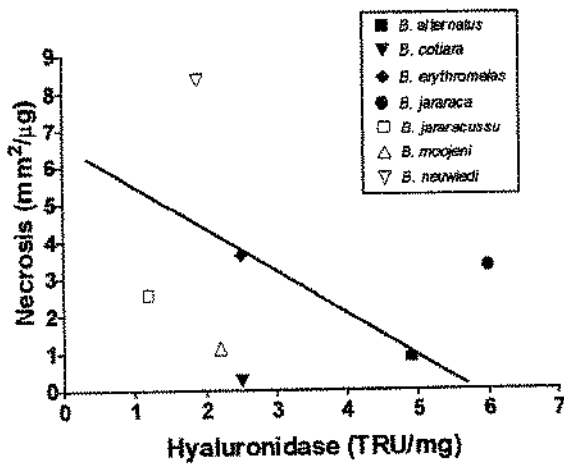
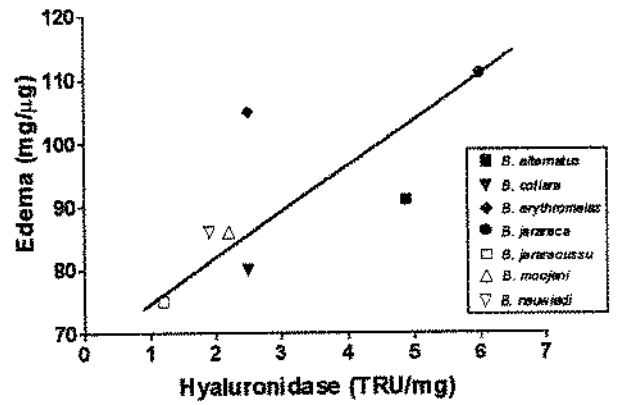
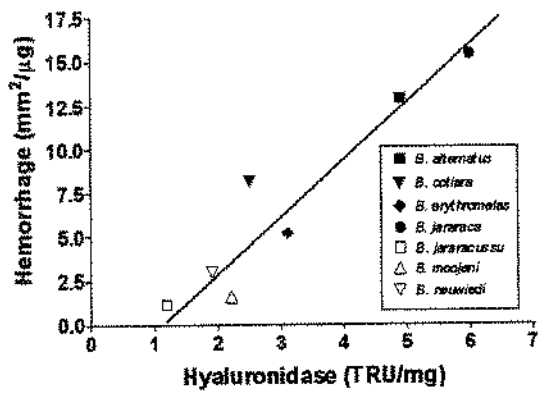


Figure 7

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Todos os venenos mostraram alguma atividade colagenolítica e elastásica, embora os níveis desta última eram bem maiores para o veneno de *B. asper* do que nos outros venenos. De modo geral, os níveis de colagenase e elastase detectadas eram compatíveis com os venenos de outras serpentes do mesmo gênero (BERNICK & SIMPSON, 1976; SIMPSON *et al.*, 1971).

Todos os venenos também possuíam atividade hialuronidásica. Os níveis de HYAL nos venenos das espécies de *Bothrops* e *Crotalus* eram parecidos, e se assemelhavam aos já relatados para vários gêneros de serpentes tais como a *Trimeresurus*, *Calloselasma*, *Vipera* e outros da Ásia (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1988; TAN & TAN, 1988). Alguns venenos, como o da *B. atrox*, não mostraram atividade nas quantidades testadas. Por outro lado, os resultados obtidos com os venenos de *B. jararacussu* e *C. durissus terrificus* indicam que pode haver variação nos níveis de HYAL em diferentes lotes de veneno de uma mesma espécie ou subespécie, e também entre subespécies, como no caso de *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*. A variação observada nos lotes de veneno de *C. d. terrificus* sugere que a diferença entre subespécies é mais quantitativa do que qualitativa (variação nas propriedades físico-químicas e enzimáticas) das enzimas. Essa variabilidade pode refletir, em parte, as formas de coleta, secagem e armazenamento do veneno, estação do ano em que a coleta foi feita, e o estado de alimentação e idade das serpentes, entre outras coisas (CHIPPAUX *et al.*, 1991). Não havia uma relação estreita entre os níveis das três enzimas dosadas. Assim, o veneno de *B. atrox* que não mostrou

atividade hialuronidásica possuía níveis de colagenase e elastase semelhantes aos outros venenos.

A atividade maior de HYAL nos venenos de artrópodes comparada com os venenos de serpentes provavelmente reflete uma compensação nestes venenos pela falta de outras enzimas, especialmente proteases, capazes de degradar componentes da matriz extracelular e causar efeitos locais marcantes, como edema, hemorragia e necrose causadas por venenos botrópicos. O fato desta enzima ter níveis tão elevados nestes venenos comparada com outras atividades tais como a colagenásica e elastásica também sugere que a HYAL realmente é mais importante para a difusão de venenos e toxinas do local de injeção.

A relação positiva observada entre a atividade hialuronidásica e as atividades hemorrágicas e edematogênicas dos venenos botrópicos é a primeira evidência de que a HYAL pode estar envolvida nos efeitos locais destes venenos. Esta conclusão está de acordo com o trabalho de TU & HENDON (1983) que mostraram a capacidade de HYAL purificada do veneno do lagarto *Heloderma horridum* em aumentar a permeabilidade vascular e o tamanho de lesões hemorrágicas.

A comparação das propriedades da HYAL do veneno de *C. d. terrificus* com as de outros venenos (resumidas na Tabela 3) indica que esta enzima se assemelha em muito com outras HYALS. O perfil de eluição da atividade hialuronidásica após cromatografia por gel filtração sugere a presença uma proteína de alto peso molecular, o que foi confirmado pela detecção de atividade após eletroforese em géis contendo SDS. A estimativa de um peso molecular de aprox. 75.000 para a enzima após eletroforese indica que esta proteína é de alto peso molecular, acima de vários outros

venenos, mas parecido com os valores obtidos para a enzima dos venenos do escorpião *Heterometrus fulvipes* (RAMANAIAH *et al.*, 1990) e do lagarto *H. h. horridum* (TU & HENDON, 1983) (Tabela 3). A detecção de uma única banda de atividade no veneno de *C. d. terrificus* também sugere que não há isoformas da enzima neste veneno. CEVALLOS *et al.* (1992) já demonstraram que alguns venenos possuem isoformas de HYAL.

O pH ótimo (na faixa ácida), a influência de sal na atividade enzimática e a estabilidade térmica eram parecidos com os de outras HYALS. Com relação à estabilidade em solução, TAN & TAN (1988) demonstraram que a atividade hialuronidásica de venenos de vários gêneros de serpentes era estável em salina fisiológica à 4°C por mais de 46 dias. Porém, houve perda significativa desta atividade quando os venenos foram diluídos e armazenados à 4°C em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5. As HYALS também perderam a atividade gradativamente à 37°C em solução fisiológica. Conforme mostrado aqui, a HYAL do veneno de *C. d. terrificus*, em tampão acetato de sódio 0,2 M pH 6,0, contendo NaCl 0,15 M, perdeu aproximadamente 50% da sua atividade após 48 h, independente se guardada à 4°C, 25°C, ou 37°C. Este resultado sugere que a perda de atividade era devido principalmente ao fato da enzima estar em solução e não à temperatura em que foi armazenada.

A neutralização da atividade hialuronidásica por antisoros tem sido pouco estudada. GENÉ *et al.* (1985) relataram a neutralização da atividade hialuronidásica de vários venenos de serpentes da América Central por um antisoro comercial. Em estudo um pouco diferente, PUKRITTAYAKAMEE *et al.* (1990) mostraram a

Tabela 3. Propriedades físico-químicas de hialuronidases isoladas de alguns venenos animais.

| Grupo | Espécie | PM | pl | pH ótimo | Temperatura ótima | Referência |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------|----------|-------------------|----------------------------------|
| <u>Invertebrados</u> Aranha | <i>Dugesia hentzi</i> | 39.000 | - | 3,5 | | SCHAMBACHER <i>et al.</i> (1973) |
| | <i>Loxocelis reclusa</i> | 33.000 | - | 6,0 | | WRIGHT <i>et al.</i> (1973) |
| | <i>Heterometrus fulvipes</i> | 82.000 | - | 5,0 | 10-30°C | RAMANAIAH <i>et al.</i> (1990) |
| | <i>Palamneus gravimanus</i> | 45.000 | - | 8,5 | | WRIGHT <i>et al.</i> (1977) |
| | <i>Vespula germanica</i> | 42.000 | - | 4,0 | | CEVALLOS <i>et al.</i> (1992) |
| <u>Vertebrados</u> Lagarto | <i>Heloderma horridum horridum</i> | 63.000 33.000 110.000 | 5,1 | 5,0 | 37°C | TU & HENDON (1983) |
| | <i>Agkistrodon acutus</i> | 33.000 | 10,3 | 3,5-5,0 | | XU <i>et al.</i> (1992) |
| | <i>Synanceja horrida</i> | 62.000 | 9,2 | 6,0 | 37-40°C | POH <i>et al.</i> (1992) |
| Serpente | Hialuronidase testicular | 61.000 | 5,9 | 3,5-4,0 | 37°C | BORDERS & RAFTERY bovina (1968) |
| | <i>Ornithorhynchus anatinus</i> | 140.000 50.000 | 12,5 | 6,0 | 37,5°C | PLATER <i>et al.</i> (1995) |
| Mamífero * | | | | | | |
| <u>Microorganismos</u> Bactéria * | <i>Streptococcus uberis</i> | 54.000 | 4,9 | 6,0 | 45°C | SCHAUFUSS <i>et al.</i> (1989) |

*Incluídos para comparação

neutralização da atividade hialuronidásica do veneno de *Vipera russelli* por um anticorpo monoclonal. Nos nossos experimentos, a neutralização da atividade hialuronidásica por diferentes antisoros mostrou que todos reconheceram a enzima, embora em diferentes graus. Isso indica que as HYALS em diversos venenos compartilham alguma identidade imunológica, sendo que esta identidade é maior entre os venenos de serpentes do que entre venenos de serpentes e de escorpiões. Devido à grande semelhança entre as propriedades físico-químicas destas enzimas, tal imunoreatividade cruzada não é inesperada. Relações imunológicas estreitas também já foram relatadas para várias outras enzimas e toxinas de venenos (ELLIOTT, 1978).

A elevada antigenicidade das HYALS e sua capacidade de potencializar os efeitos locais de venenos, especialmente a hemorragia (TU & HENDON, 1983), sugerem que a neutralização precoce desta atividade durante a soroterapia poderia amenizar a gravidade dos efeitos locais observados após o envenenamento. Este é um aspecto terapêutico ainda pouco investigado.

Os resultados obtidos aqui indicam que a HYAL do veneno de *C. d. terrificus* possui propriedades semelhantes à outras HYALS de vertebrados e invertebrados, o que sugere que os mecanismos catalíticos e especificidade para substratos, embora não investigados aqui, sejam também parecidas com outras enzimas deste grupo.

Do ponto de vista prático, a HYAL é bastante usada na clínica terapêutica para aumentar a permeabilidade tecidual à penetração de substâncias aplicadas [1] topicamente (LAUGIER *et al.*, 2000), [2] durante a terapia gênica (FROMES *et al.*, 1999; TORRENTE *et al.*, 1999), [3] no tratamento de câncer (BAUMGARTNER *et al.*, 1998; DARSON & BARRETT, 1998; HASELSBERGER, RADNER, PENDLE, 1998) e [4]

na administração de anestésicos locais (NEVARRE & TZARNAS, 1998) (para revisão, ver FARR *et al.* (1997)). Na maioria dos casos, a enzima usada clinicamente é isolada de tecido bovino (sêmen e testículos). A ampla distribuição da HYAL em venenos animais sugere que estes também poderiam servir de fonte para a purificação comercial da enzima, mas esta possibilidade ainda não foi avaliada. Neste sentido, a caracterização parcial da HYAL feita aqui representa um passo inicial que pode levar à purificação e estudo comparativo desta enzima de venenos de *C. durissus* spp.

5. SUMMARY

5. SUMMARY

Animal venoms contain enzymes capable of degrading basement membrane and extracellular matrix components. We examined the collagenase, elastase and hyaluronidase activities of several venoms and some of the properties of hyaluronidase in *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom. Collagenase and elastase were assayed colorimetrically. Hyaluronidase activity was measured turbidimetrically and by in situ detection following SDS-PAGE. The enzyme was also partially purified by gel filtration on Sephacryl S200 HR. Neutralization of hyaluronidase by antisera was tested by measuring the residual activity after co-incubation. Arthropod and snake venoms showed similar levels of collagenase; elastase activity varied from 0 – 0.713 A_{495} nm/mg/24 h. The hyaluronidase content of arthropod venoms [15.3 ± 4.7 to 166 ± 19.2 units/mg; mean \pm SEM] was higher than in snake venoms ($\leq 7.0 \pm 1.7$ units/mg; n=3-6). In *C. d. terrificus* venoms, hyaluronidase activity varied from 4.5 ± 0.5 to 13.2 ± 4.8 units/mg (n=3-6). *C. d. terrificus* hyaluronidase eluted as a single peak after gel filtration and migrated as a single band (~75 kDa) based on in situ detection after SDS-PAGE. The pH optimum was 4.0, with maximum activity in 0.05-0.1 M NaCl. The enzyme lost activity at $>37^\circ\text{C}$ and after 6 h in solution (~50% reduction) at 4°C , 25°C and 37°C . Commercial antisera neutralized the enzyme. These properties of *C. d. terrificus* hyaluronidase were similar to those of other venom hyaluronidases.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. - **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. Garland Publishing Inc., New York, 1994. p. 971-978.
- ALLALOUF, D.; BER, A.; ISHAY, J. - Hyaluronidase activity of extracts of venom sacs of a number of vespinae (Hymenoptera). **Comp. Biochem. Physiol.**, **43B**: 119-123, 1972.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. - Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, **38**: 775-791, 2000.
- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. - Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem. Biophys.**, **275**: 63-71, 1989.
- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. - Identification of the cleavage sites by a hemorrhagic metalloproteinase in type IV collagen. **Matrix**, **10**: 91-97, 1990a.
- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; GONIAS, S.L.; FOX, J.W. - Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human alpha 2-macroglobulin. **Biochemistry**, **29**: 1069-1074, 1990b.
- BARAMOVA, E.N.; SHANNON, J.D.; FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. - Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. **Biomed. Biochim. Acta**, **50**: 763-768, 1991.
- BARKER, S.A.; BAYYUK, S.I.; BRIMACOMBE, J.S.; PALMER, D.J. - Characterization of the products of the action of bee venom hyaluronidase. **Nature**, **199**: 693-694, 1963.
- BARKER, S.A.; MITCHELL, A.W.; WALTON, K.W.; WESTON, P.D. - Separation and isolation of the hyaluronidase and phospholipase components of bee venom and investigation of bee venom, human serum interactions. **Clin. Chim. Acta**, **13**: 582-596, 1966.
- BARRIO, A.N. & VITAL BRAZIL, O. - Neuromuscular action of *Crotalus durissus terrificus* (Laur.) poisons. **Acta Physiol. Latinoamer.**, **1**: 291-308, 1958.
- BASU, A.; GOMES, A.; DASGUPTA, S.C.; LAHIRI, S.C. - Histamine, 5-HT and hyaluronidase in the venom of the scorpion *Lychas laevifrons* (Pock). **Indian J. Med. Res.**, **92B**: 371-373, 1990.

- BAUMGARTNER, G.; GOMAR-HOSS, C.; SAKR, L.; ULSPERGER, E.; WOGRITSCH, C. - The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors - experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. **Cancer Lett.** **131**: 85-99, 1998.
- BERCOVICI, D.; CHUDZINSKI, A.M.; DIAS, W.O.; ESTEVES, M.I.; HIRAICHI, E.; OISHI, N.Y.; PICARELLI, Z.P.; DA ROCHA, M.C.; UEDA, C.M.P.; YAMANOUYE, N.; RAW, I. - A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, **49**: 70-77, 1987.
- BERNICK, J.J. & SIMPSON, J.W. - Distribution of elastase-like enzyme activity among snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **54B**: 51-54, 1976.
- BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. - Characterization of two hemorrhagic zinc proteinases, toxin c and toxin d, from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **911**: 356-363, 1987.
- BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. - Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, **62**: 325-372, 1994.
- BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. - Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. **Meth. Enzymol.**, **248**: 345-368, 1995a.
- BJARNASON, J.B. & FOX, J.W. - Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Meth. Enzymol.**, **248**: 368-387, 1995b.
- BJARNASON, J.B.; HAMILTON, D.; FOX, J.W. - Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Hoppe Seyler Biol. Chem.**, **369 (suppl.)**: 121-129, 1988.
- BJARNASON, J.B. & TU, A.T. - Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. **Biochemistry**, **17**: 3395-3404, 1978.
- BOQUET, P.; IZARD, Y.; DETRAIT, J. - Recherches sur le facteur de diffusion des venins de serpents. **C. R. Seanc. Soc. Biol.**, **152**: 1363-1365, 1958.
- BORDERS, J.R.C.L. & RAFTERY, M.A. - Purification and partial characterization of testicular hyaluronidase. **J. Biol. Chem.**, **243**: 3756-3762, 1968.
- BURKITT, H.G.; YOUNG, B.; HEATH, J.W. - **Wheater - histologia funcional**. 3^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1995. p. 62-69.
- CAMERON, D.L. & TU, A.T. - Chemical and functional homology of myotoxin-a from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **532**: 145-154, 1978.

- CAMPBELL, J.A. & LAMAR, W.W. - **The venomous reptiles of Latin America.** Comstock Publishing Associates, Ithaca, NY, 1989. p. 340-345.
- CEVALLOS, M.A.; NAVARRO-DUQUE, C.; VARELA-JULIA, M.; ALAGON, A.C. - Molecular determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Toxicon**, **30**: 925-930, 1992.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. - Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, **11**: 1279-1303, 1991.
- DARSON, M.F. & BARRETT, D.M. - Transurethral enzyme injection - future management of benign prostatic hyperplasia. **Mayo Clin. Proc.** **73**: 908-911, 1998.
- DINIZ, C.R. & GONÇALVES, J.M. - Separation of biologically active components from scorpion venoms by zone electrophoresis. **Biochim. Biophys. Acta**, **41**: 47-49, 1960.
- DURAN-REYNALS, F. - Invasion of the body by animal poisons. **Science**, **83**: 286-287, 1936.
- DURAN-REYNALS, F. - Content in spreading factor and toxins in organs and poisonous secretions of snakes. **Soc. Exp. Biol. Med.**, **38**: 231-237, 1938.
- DURAN-REYNALS, F. - Tissue permeability and spreading factors in infection. A contribution to the host-parasite problem. **Bacteriol. Rev.**, **6**: 197-252, 1946.
- EDERY, H.; ISHAY, J.; LASS, I.; GITTER, S. - Pharmacological activity of Oriental hornet (*Vespa orientalis*) venom. **Toxicon**, **10**: 13-23, 1972.
- ELLIOTT, W.B. - Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: GANS, C. & GANS, K.A. **Biology of the reptilia. Vol. 8.** Academic Press, London, 1978. p. 163-436.
- EVANSON, J.M.; JEFFEY, J.J.; KRANZ, S.M. - Human collagenase: identification and characterization of an enzyme from rheumatoid synovium in culture. **Science**, **158**: 499-502, 1967.
- FARR, C.; MENZEL, J.; SEEBERGER, J.; SCHWEIGLE, B. - Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase "Dessau". **Wien. Med. Wochenschr.**, **147**: 347-355, 1997.
- FAVILLI, G. - Occurrence of spreading factors and some properties of hyaluronidases in animal parasites and venoms. In: BUCKLEY, E.E. & PORGES, N. **Venoms.** Publ. N° 44, AAAS, Washington, DC., 1956. p. 281-289.

- FOX, J.W.; CAMPBELL, R.; BEGGERLY, L.; BJARNASON, J.B. - Substrate specificities and inhibition of two hemorrhagic zinc proteases Ht-c and Ht-d from *Crotalus atrox* venom. **Eur. J. Biochem.**, **156**: 65-72, 1986.
- FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J.M. - Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, **38**: 63-77, 2000.
- FROMES, Y.; SALMON, A.; WANG, X.; COLLIN, H.; ROUCHE, A.; HAGEGE, A.; SCHWARTZ, K.; FISZMAN, M.Y. - Gene delivery to the myocardium by intrapericardial injection. **Gene Ther.** **6**: 683-688, 1999.
- GENÉ, J.A.; GOMEZ, M.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. - Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities by antivenom. **Toxicon**, **23**: 1015-1018, 1985.
- GOMIS-RUTH, F.X.; KRESS, L.F.; BODE, W. - First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **EMBO J.**, **12**: 4151-4157, 1993.
- GONÇALVES, J.M. Purification and properties of crotoamine. In: E. E. Buckley, N. Porges. **Venoms**. Publ. No. 44. American for Advancement of Science, Washington DC, 1956, pp. 261-274.
- GONÇALVES, J.M. & DEUTSCH, H.F. - Ultracentrifugal and zone electrophoresis studies of some Crotalidae venoms. **Arch. Biochem. Biophys.**, **60**: 402-411, 1956.
- HABERMANN, E. - Eigenschaften und Anreicherung der hyaluronidase von Bienengift. **Biochem. Z.**, **329**: 1-10, 1957.
- HASELSBERGER, K.; RADNER, H.; PENDL, G. - Boron neutron capture therapy for glioblastoma: improvement of boron biodistribution by hyaluronidase. **Cancer Lett.** **131**: 109-111, 1998.
- HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K.K. - Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, **29**: 1-19, 1999.
- HENDON, R.A. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Biological role of the two components of crotoxin. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **68**: 1560-1563, 1971.
- HITE, L.A.; FOX, J.W.; BJARNASON, J.B. - A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, **373**: 381-385, 1992.

- HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. - cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, **308**: 182-191, 1994.
- HOFFMAN, D.C. & DURAN-REYNALS, F. - The influence of testical extract on the intradermal spread of injected fluids and particles. **J. Exp. Med.**, **53**: 387-398, 1931.
- HONG, B.S. - Isolation and identification of a collagenolytic enzyme from venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). **Toxicon**, **20**: 535-545, 1982.
- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. - Enzymes in snake venoms. In: LEE, C.Y. **Handbook of experimental pharmacology**, Vol. 52. Springer Verlag, Berlin, 1979. p. 61-158.
- JACKSON, R.L.; BUSCH, S.J.; CARDIN, A.D. - Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. **Physiol. Rev.**, **71**: 500-504, 1991.
- JAQUES, R. - The hyaluronidase content of venoms. In: BUCKLEY, E.E. & PORGES, N. **Venoms**. Publ. N^o. 44, AAAS, Washington, DC., 1956. p. 291-293.
- JEON, O.H. & KIM, D.S. - Cloning, expression, and characterization of a cDNA encoding snake venom metalloprotease. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, **47**: 417-425, 1999.
- JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. - Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. **Toxicon**, **34**: 1269-1276, 1996.
- KAISER, E. - Enzymatic activity of spider venoms. In: BUCKLEY, E.E & PORGES, N. **Venoms**. Publ. N^o. 44, AAAS, Washington, DC, 1956. p. 91-93.
- KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.; THEAKSTON, R.D.G.; ZUZEL, M. - Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, **34**: 677-642, 1996.
- KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R. D. G.; DESMOND, H. - Systemic hemorrhage in rats induced by a hemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, **29**: 1097-1105, 1991.
- KINI, R.M. Do we know the complete sequence of metalloproteinase and nonenzymatic platelet aggregation inhibitor (disintegrin) precursors proteins? **Toxicon**, **33**: 1151-1160, 1995.

- LAUGIER, J.P.; SHUSTER, S.; ROSDY, M.; CSOKA, A.B.; STERN, R.; MAIBACH, H.I. - Topical hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in human skin and in reconstituted human epidermis: evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum. **Br. J. Dermatol.** **142**: 226-233, 2000.
- LAZARUS, G.S.; BROWN, R.S.; DANIELS, J.R.; FULLMER, I.I.M. - Human granulocyte collagenase. **Science**, **159**: 1483-1485, 1968.
- LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, D. - **Molecular cell biology**. 3rd ed. Scientific American Books, New York, 1995. p. 1123-1150.
- MacCLEAN, D. - Studies on diffusing factors. The hyaluronidase activity of testicular extracts, bacterial culture filtrates and other agents that increase tissue permeability. **Biochem. J.**, **35**: 159-183, 1941.
- MANCIN, A.C.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; FACA, V.M.; GREENE, L.J.; ZUCOLATTO, S.; PELA, I.R.; GIGLIO, J.R. - The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South-American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, **37**: 1927-1937, 1998.
- MARKLAND Jr., F.S. - Fibrin(ogen)olytic enzymes from snake venoms. In: PIRKLE, H. & MARKLAND Jr., F.S. **Hemostasis and animal venoms**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1988. p. 149-172.
- MARKLAND Jr., F.S. - Inventory of α - and β -fibrinogenases from snake venoms. **Thromb. Haemost.** **65**: 438-443, 1991.
- MARSH, N.A.; FYFFE, T.L.; BENNETT, E.A. - Isolation and characterisation of two haemorrhagic proteins (Hta and Htb) from the venom of *Bitis gabonica* (gaboon viper). **Toxicon**, **33**: 883-899, 1995.
- MARUYAMA, T.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. - Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. **Toxicon**, **30**, 1387-1397, 1992.
- MARUYAMA, M.; TANIGAWA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H. - Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*Bothrops jararaca*) venom. **Enzyme Protein**, **47**: 124-135, 1993.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, T.; TITANI, K. - Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, **1477**: 146-156, 2000.
- MEBS, D. - A comparative study of enzyme activities in snake venoms. **Int. J. Biochem.**, **1**: 335-334, 1970.

- MINS, C.A.; PLAYFAIR, J.L.; ROITT, I.M.; WALKER, D.; WILLIAMS, R. - **Microbiología médica**. 1^a ed. Editora Manole Ltda., São Paulo, 1995. p. 120-125.
- NEVARRE, D.R. & TZARNAS, C.D. - The effects of hyaluronidase on the efficacy and on the pain of administration of 1% lidocaine. **Plast. Reconstr. Surg.** **101**: 365-369, 1998.
- OHSAKA, A. - Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: LEE, C.Y. **Handbook of experimental pharmacology**. Vol. 52. Springer Verlag: Berlin, 1979. p. 480-546.
- OUYANG, C. & HUANG, T.F. - α - and β -fibrinogenases from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **571**: 270-283, 1979.
- OUYANG, C. & TENG, C.M. - Fibrinolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **481**: 622-630, 1977.
- PANDYA, B.V. & BUDZINSKY, A.Z. - Anticoagulant proteases from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochemistry**, **23**: 460-470, 1984.
- PICOLO, G.; GIORGI, R.; CURY, Y. - Delta-opioid receptors and nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Eur. J. Pharmacol.**, **391**: 55-62, 2000.
- PIRKLE, H. & MARKLAND Jr., F.S. - Fibrinolytic enzyme from southern copperhead. In: PIRKLE, H. & MARKLAND Jr., F.S. **Hemostasis and animal venoms**. Marcel Dekker Inc., New York, 1988. p. 172-189.
- PLATER, G.; MARTIN, R.L.; MILBURN, P.J. - A pharmacological and biochemical investigation of the venom from the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*). **Toxicon**, **33**: 157-167, 1995.
- POH, C.H.; YUEN, R.; CHUNG, M.C.M.; KHOO, H.E. - Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, **110B**:160-162, 1992.
- PRADO-FRANCESCHI, J. & VITAL BRAZIL, O. - Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, **19**: 875-887, 1981.
- PUKRITTAYAKAMEE, S.; NONTPRASERT, A.; WHITE, N.J.; WARRELL, D. A.; BUNNAG, D. - Characterization of a monoclonal antibody that neutralizes the hyaluronidase activity of Russell's viper venom. **S. E. Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth**, **21**: 231-232, 1990.

- PUKRITTAYAKAMEE, S.; WARRELL, D.A.; DESAKORN, V.; McMICHAEL, A.J.; WHITE, N.J.; BUNNAG, D. - The hyaluronidase activities of some Southeast Asian venoms. **Toxicon**, **26**: 629-637, 1988.
- RAMANAIAH, M.; PARTHASARATHY, P.R.; VENKAIAH, B. - Isolation and characterization of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. **Biochem. Int.**, **20**: 301-310, 1990.
- ROBEVA, A.; POLITI, V.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. - Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. **Biomed. Biochim. Acta**, **50**: 769-773, 1991.
- RUBSAMEN, K.; BREITHUPT, H.; HABERMANN, E. - Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex.I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, **270**: 274-288, 1971.
- RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. - Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.**, **63**: 186-199, 1995.
- SAID, E.E. - Enzymological study of the venom of *Polistes omisse* Weyr. **Bull. Soc. Ent. Egypte**, **44**: 167-170, 1960.
- SAPPRU, Z.Z.; TU, A.T.; BAILEY, G.S. - Purification and characterization of fibrinogenase from the venom of western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, **747**: 225-231, 1983.
- SCHANBACHER, F.L.; LEE, C.K.; HALL, J.E.; WILSON, I.B.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. - Composition and properties of tarantula (*Dugesiella hentzi* Girard) venom. **Toxicon**, **11**: 21-29, 1973.
- SCHAUFUSS, P.; STING, R.; SCHAEF, W.; BLOBEL, H. - Isolation and characterization of hyaluronidase from *Streptococcus uberis*. **Zbl. Bakt.** **271**: 46-53, 1989.
- SCHMIDT, J.O.; BLUM, M.S.; OVERAL, W.L. - Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. **Toxicon**, **24**: 907-921, 1986.
- SERRANO, S.M.; SAMPAIO, C.A.; MANDELBAUM, F.R. - Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom - II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP1 and MSP 2. **Toxicon**, **31**: 483-492, 1993.
- SHOTTON, D.M. - Elastase. **Meth. Enzymol.**, **19**: 113-140, 1970.

- SIMPSON, J.W. - Collagenolytic activity of snake venom: the absence of collagenolytic activity in the trypsin-like enzymes from *Crotalus atrox* venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, **40 B**: 633-636, 1971.
- SIMPSON, J.W. - Collagenolytic activity of snake venom: the effects of enzyme inhibitors on the collagenolytic and trypsin-like enzymes derived from *Crotalus atrox* venom. **Int. J. Biochem.** **3**: 243-245, 1972.
- SIMPSON, J.W. - Distribution of collagenolytic enzyme activity among snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **51B**: 425-428, 1975.
- SIMPSON, J.W. & RIDER, L.J. - Collagenolytic activity from venom of rattlesnake *Crotalus atrox*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **137**: 893-895, 1971.
- SIMPSON, J.W. & TAYLOR, A.C. - Elastolytic activity from venom of rattlesnake *Crotalus atrox*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **144**: 380-383, 1973.
- SIMPSON, J.W.; TAYLOR, A.C.; LEVY, B.M. - Collagenolytic activity in some snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **39B**: 963-967, 1971.
- SLOTTA, K.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. - Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, **12**: 505-512, 1938.
- SRIVASTAVA, P.N. & FAROOQUI, A. - Heparin-Sepharose affinity chromatography for the purification of bull seminal plasma hyaluronidase. **Biochem. J.**, **183**: 531-536, 1979.
- STEVENS, A. & LOWE, J. - **Histologia**. 1ª ed. Ed. Manole. Ltda., São Paulo, 1995. p. 44-48.
- STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F.X.; MCKAY, D.B.; BODE, W. The metzincins - topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.**, **4**: 823-840, 1995.
- SUGAHARA, K.; YAMADA, S.; SUGIURA, M.; TAKEDA, K.; YEUN, R.; KHOO, H.E.; POH, C.H. - Identification of the reaction products of the purified hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. **Biochem. J.**, **283**: 99-104, 1992.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - A comparative study of the biological properties of krait (genus *Bungarus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **95C**: 105-109, 1990a.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - A comparative study of the biological activities of venoms from snakes of the genus *Agkistrodon* (moccasin and copperheads). **Comp. Biochem. Physiol.**, **95B**: 577-582, 1990b.

- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - A comparative study of the biological properties of Australian elapid venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **97C**: 99-106, 1990c.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - A comparative study of the biological activities of rattlesnake (genera *Crotalus* and *Sistrurus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **99C**: 455-461, 1991a.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - A comparative study of the biological properties of *Dendroaspis* (mamba) snake venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **99C**: 463-466, 1991b.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, **103C**: 229-302, 1992a.
- TAN, N.H. & PONNUDURAI, G. - A comparative study of the biological properties of venoms of some Old World vipers (subfamily Viperinae). **Int. J. Biochem.**, **24**: 331-336, 1992b.
- TAN, N.H. & TAN, C.S. - Thermal stability of venom enzymatic activities. **Toxicon**, **126**: 42, 1988.
- TAN, N.H.; POH, C.H.; TAN, C.S. - The lethal and biochemical activities and properties of *Bungarus candidus* (Malayan krait) venom and venom fractions. **Toxicon**, **27**: 1065-1070, 1989.
- TORRENTE, Y.; D'ANGELO, M.G.; DEL BO, R.; DELISO, A.; CASATI, R.; BENTI, R.; CORTI, S.; COMI, G.P.; GERUNDINI, P.; ANICHINI, A.; SCARLATO, G.; BRESOLIN, N. - Extracorporeal circulation as a new experimental pathway for myoblast implantation in mdx mice. **Cell Transplant.** **8**: 247-258, 1999.
- TU, A.T. - **Venoms - chemistry and molecular biology**. John Wiley & Sons, New York, 1977. p.104-126.
- TU, A.T. - Chemistry of rattlesnake venoms. In: TU, A.T. **Rattlesnake venoms: their action and treatment**. Marcel Dekker, New York, 1982. p. 247-312.
- TU, A.T. - The role of zinc in snake toxins. In: SIGEL, H. **Metal ions in biological systems**. Vol. 15. **Zinc and its role in biology and nutrition**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1983. p. 193-211.
- TU, A.T. - Hemorrhagic proteases from snake venoms. In: PIRKLE, H. & MARKLAND Jr, F.S. **Hemostasis and animal venoms**. Marcel Dekker, Inc., New York, 1988. p. 425-441.

- TU, A.T. & HENDON, R.R. - Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. **Comp. Biochem. Physiol.**, **76B**: 377-387, 1983.
- VITAL BRAZIL, O. - Pharmacology of crystalline crotoxin. **Mem. Inst. Butantan**, **33**: 981-982, 1966.
- VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B.J. - Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. **J. Formosan Med. Assoc.**, **71**: 394-396, 1972.
- VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCESCH, J.; LAURE, C.J. - Repetitive muscle responses induced by crotamine. **Toxicon**, **17**: 61-67, 1979.
- WALKER, D.G.; LAPIERE, C.M.; GROSS, J. - A collagenolytic factor in rat bone promoted by parathyroid extract. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **15**: 397-402, 1964.
- WERB, Z.; BANDA, M.J.; MCKERROW, J.H.; SANDHAUS, R.A. - Elastases and elastin degradation. **J. Invest. Dermatol.** **79** (suppl. 1): 154S-159S, 1982.
- WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E.L. - **Princípios de bioquímica**. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1976. p. 236-303.
- WRIGHT, R.P.; CHAN, K.T.; HONETSCHLANGER, L.; HOWELL, D.E.; ODELL, G.V. - Enzymes and toxins of the scorpion venom *Palamneus gravimanus*. **Toxicon**, **15**: 197-205, 1977.
- WRIGHT, R.P.; ELGERT, K.D.; CAMPBELL, B.J.; BARRETT, J.T. - Hyaluronidase and esterase activities of the venom of the poisonous brown recluse spider. **Arch. Biochem. Biophys.**, **159**: 415-426, 1973.
- XU, X.; WANG, X.; XI, X.; LIU, J.; HUANG, J.; LU, Z. - Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. **Toxicon**, **20**: 973-981, 1982.