

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DE LA BaP1, UNA METALOPROTEINASA  
HEMORRÁGICA DEL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops asper*  
(terciopelo), EN EPIDERMIS Y MICROVASCULATURA DE LA  
DERMIS EN UN MODELO DE OREJA MURINO**

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en  
Microbiología, Parasitología y Química Clínica para optar por el  
grado de Magister Scientiae en Microbiología

**NATALIA JIMÉNEZ ALVAREZ**

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2008

A mis padres

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alexandra Rucavado Romero por su guía, sus consejos, por corregirme cuando me equivocaba y por estar siempre al cuidado del desarrollo de mi investigación. Por haberse convertido no sólo en una excelente tutora pero también en una amiga.

Al Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez por su apoyo, por sus siempre oportunas observaciones, por su gran disposición de dedicar su tiempo a ayudarme. Por su calidez y carácter siempre afable que favorecían un ameno ambiente de trabajo.

A la Msc. Teresa Escalante Muñoz por su orientación en el desarrollo de muchos de los experimentos realizados, por sus críticas y consejos que siempre buscaban mejorar mi trabajo, y por su sincera amistad.

A la Dra. Yamileth Angulo, directora del Instituto Clodomiro Picado, por brindarme la oportunidad de realizar aquí mi investigación y tener así esta tan grata experiencia, que sin duda nunca olvidaré.

Al resto de la sección de investigación por apoyo, su interés y su disposición de orientarme siempre que lo necesité.

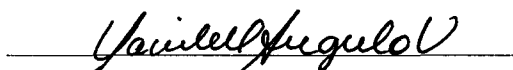
Al resto de los compañeros del Instituto, porque de una u otra forma colaboraron para la finalización de mi tesis y por mantener siempre un espíritu de camaradería.

A la Dra. Catarina Teixeira, del Instituto Butantán, por haberme brindado amablemente uno de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

A mi familia y amigos que estuvieron conmigo durante todo este tiempo apoyándome. En especial a mis padres por los sacrificios que tuvieron que hacer para permitirme llegar a culminar esta tesis, por sus consejos, su cariño incondicional, por escucharme e impulsarme siempre a seguir adelante.

Esta investigación fue financiada por la International Foundation for Science, mediante el proyecto F/ 4096-1 y la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, mediante el proyecto VIV-741-A4-061.

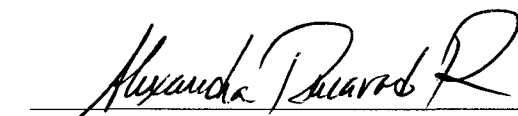
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de estudios de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magister Scientiae en Microbiología”.



Dra. Yamileth Angulo Ugalde

Representante de la Decana

Sistema de Estudios de Posgrado

  
Dra. Alexandra Rucavado Romero

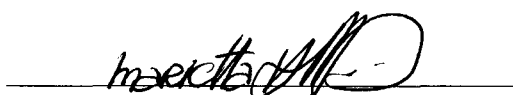
Directora de Tesis

  
Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez

Asesor

  
M.Sc. Teresa Escalante Muñoz

Asesora



Dra. Marieta Flores Díaz

Representante del Director

Programa de Posgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica



Natalia Jiménez Álvarez

Candidata

# INDICE

Portada.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	v
Índice.....	vi
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de cuadros.....	x
Lista de figuras.....	xi
Lista de Ilustraciones.....	xii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Publicación.....	xiv
Introducción.....	1

## Capítulo 1. Antecedentes

1.1 El accidente ofídico.....	3
1.1.1 Cuadro clínico inducido por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae.....	4
1.1.2 Composición de los venenos de serpientes de la familia Viperidae.....	5
1.2 Metaloproteinasas de los venenos de vipéridos.....	6
1.2.1 BaP1: una metaloproteinasa hemorrágica del veneno de <i>Bothrops asper</i> .....	7
1.3 Estructura de capilares sanguíneos.....	9
1.4 Efecto de los componentes del veneno de serpiente sobre la microvasculatura.....	11
1.4.1 Apoptosis.....	12
1.4.2 Angiogénesis: Definición y descripción del proceso.....	14
1.5 Estructura de la piel.....	16
1.5.1 Microvasculatura de la piel.....	19
1.5.2 Modelo murino para el estudio de la microvasculatura en piel.....	19

## Capítulo 2. Objetivos

2.1 Objetivo general.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
2.3 Justificación.....	22

## Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1 Metaloproteinasa.....	24
3.2 Animales de experimentación.....	24
3.3 Preparación y preservación del tejido.....	24

3.4	Análisis Morfométrico.....	25
3.5	Cuantificación de Hemorragia.....	26
3.6	Efecto de la depleción de neutrófilos sobre los eventos patológicos inducidos por la BaP1.....	26
3.7	Inhibición de la actividad metaloproteinasa.....	27
3.8	Inmunohistoquímica.....	27
3.8.1	Detección por inmunofluorescencia del Receptor del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFR-2 o Flk-1).....	27
3.8.2	Tinción de la lámina basal de vasos sanguíneos y de la epidermis.....	28
3.8.3	Determinación <i>in situ</i> de apoptosis en cortes de oreja de ratón.....	29
3.9	Análisis estadístico.....	30
 <b>Capítulo 4. Resultados</b>		
4.1	Histología.....	31
4.1.1	Análisis Cualitativo.....	31
4.1.2	Análisis Morfométrico.....	33
4.1.3	Cuantificación de Hemorragia.....	35
4.1.4	Efecto de la depleción de neutrófilos sobre los eventos patológicos inducidos por la BaP1.....	35
4.1.5	Inhibición de la actividad metaloproteinasa.....	36
4.2	Inmunohistoquímica.....	37
4.2.1	Detección por inmunofluorescencia del receptor del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGFR-2 o Flk-1).....	37
4.2.2	Tinción de la lámina basal de vasos sanguíneos y de la epidermis.....	38
4.2.3	Determinación <i>in situ</i> de apoptosis en cortes de oreja de ratón.....	39
 <b>Capítulo 5. Discusión</b>		
	Conclusiones.....	50
	Perspectivas futuras.....	52
	Bibliografía.....	53
	Apéndice.....	63

## RESUMEN

Se estudió cuantitativamente la capacidad de la metaloproteinasa BaP1, del veneno de *Bothrops asper*, para inducir alteraciones locales en la microvasculatura y la piel en un modelo de oreja de ratón.

Esta metaloproteinasa provoca una rápida hemorragia, edema y formación de ampollas, y su rol en estas manifestaciones patológicas fue confirmado usando el inhibidor de metaloproteinasas, batimastat. Cuando la BaP1 fue preincubada con el batimastat, la hemorragia y la formación de ampollas fueron inhibidas.

Los efectos de la BaP1 mencionados anteriormente, se observaron rápidamente, a una hora de la inyección intradérmica de la metaloproteinasa en la oreja de los ratones. El grosor de la oreja y la concentración de hemoglobina incrementaron, mientras que la densidad de microvasculatura (DMV) disminuyó drásticamente, alcanzando los valores más bajos a las 6 horas de inyectada la BaP1. Sorprendentemente la DMV recuperó los niveles de los controles a las 72 horas después de la inyección intradérmica de la BaP1, indicando que el proceso angiogénico y la regeneración de este tejido ocurren rápidamente. Esta conclusión se vio reforzada por la observación de las muestras de tejido teñidas con hematoxilina y eosina, en las cuales la apariencia normal del tejido fue recobrada a los 14 días de la inyección de la toxina.

La exploración histológica del tejido mostró el desarrollo de un proceso inflamatorio después de las alteraciones patológicas mencionadas, evidenciado por un abundante infiltrado de leucocitos, compuesto principalmente por neutrófilos. No obstante, la depleción de neutrófilos usando un anticuerpo, mostró que estas células no juegan ningún papel en la patología inducida por BaP1. Posterior al infiltrado inflamatorio se observó la formación de tejido de granulación y de un exudado de fibrina en áreas que perdieron la epidermis, a las 24 y 72 horas.

La formación de ampollas y la pérdida de algunas porciones de la epidermis fueron estudiadas también por inmunohistoquímica, para detectar algunos de los componentes de la membrana basal de la unión dermis-epidermis, como laminina y colágeno IV. Se observó que estas proteínas no son degradadas y la inmunotinción para ambas proteínas se observó principalmente en la base de la ampolla.

La inmunotinción de TUNEL mostró que no había células endoteliales muriendo por apoptosis, al menos en las condiciones en que se realizó este estudio. Sin embargo se descubrió la generalizada apoptosis de queratinocitos a lo largo de la epidermis, tanto en áreas de ampollas como en áreas carentes de ampollas, lo que indica que no hay correlación entre la apoptosis de estas células y la formación de ampollas.

Palabras Clave: *Bothrops asper*, veneno de serpiente, metaloproteinasas, densidad microvascular, modelo de oreja de ratón, daño epidérmico, ampollas.



## ABSTRACT

The ability of the P-I metalloproteinase BaP1, from the *Bothrops asper* venom, to induce local alterations on the microvasculature and the skin was studied and quantified in a mouse ear model.

This metalloproteinase induced rapid hemorrhage, edema and blistering, and its role in these pathogenic manifestations was verified using the metalloproteinase inhibitor, batimastat. When the BaP1 was pre-incubated with batimastat the hemorrhage and blistering were abrogated.

BaP1 effects mentioned above were seen as soon as one hour after the metalloproteinase intradermal injection on mouse ear. The ear thickness and the hemoglobin concentration increased; meanwhile the microvascular density (MVD) drastically decreased, reaching the lowest value at 6 hours. Surprisingly, the MVD showed a rapid recovery, reaching control levels at 72 hours after injection of BaP1, indicating that the angiogenic process and the regeneration of this tissue occurs rapidly. This conclusion was reinforced by the observation of the tissue samples stained with hematoxylin and eosin, in which the normal appearance of the tissue was achieved at 14 days after the toxin injection.

The histological exploration of the tissue showed the development of an inflammatory process, after the initial pathological alterations mentioned, evidenced by an abundant leukocyte infiltrate, composed mainly by neutrophils. Nevertheless the depletion of neutrophils with an antibody showed that these cells do not play any role in the pathology induced by BaP1. Following the inflammatory infiltrate, the formation of the granulation tissue was observed and a proteinaceous fibrinoid exudate occurred in denuded areas of the skin at 24 and 72 hours.

The formation of blisters and the loss of some portions of the epidermis were studied also by immunohistochemistry, to detect some components of the basement membrane at the dermal-epidermal junction, like laminin and type IV collagen. It was observed that these proteins were not completely degraded, the immunostaining for both of them was observed predominantly at the base of the blisters.

The TUNEL immunostaining did not detect endothelial cells apoptosis in capillaries, at least at the conditions of this experiment. However, abundant apoptotic keratinocytes were observed in the epidermis, both in areas of blisters and in areas without blisters, thus indicating that there was no correlation between apoptosis of these cells and blister formation.

**Key words:** *Bothrops asper*, snake venom, BaP1, metalloproteinases, microvascular density, ear mouse model, epidermal damage, blisters.

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Factores endógenos involucrados en la modulación de la angiogénesis	15
--	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diagrama de la estructura terciaria de la metaloproteinasa hemorrágica BaP1 .....	8
<b>Figura 2.</b> Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.....	13
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de las regiones que componen la membrana basal de la piel.....	18
<b>Figura 4.</b> Micrografías de luz de secciones de piel de la oreja de ratones embebidas en parafina y teñidas con H&E.....	33
<b>Figura 5.</b> Grosor de las orejas de ratones.....	34
<b>Figura 6.</b> Efecto hemorrágico de la BaP1 en la piel de orejas de ratones.....	35
<b>Figura 7.</b> Densidad de microvasculatura en la oreja de ratones.....	38
<b>Figura 8.</b> Inmunotinción de laminina y colágeno IV para detección de la lámina basal de epidermis.....	39
<b>Figura 9.</b> Tinción de TUNEL en secciones de oreja de ratón.....	40

## LISTA DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1.</b> Organización de la microvasculatura.....	9
<b>Ilustración 2.</b> a) Esquema de la estructura de capilares sanguíneos b) Micrografía electrónica de un capilar sanguíneo.....	10
<b>Ilustración 3.</b> Desarrollo de la red de arterias, venas y capilares.....	14
<b>Ilustración 4.</b> Estructura de la piel.....	17
<b>Ilustración 5.</b> Efectos de la depleción de neutrófilos en las manifestaciones patológicas producidas por la BaP1 Tinción con hematoxilina y eosina.....	36
<b>Ilustración 6.</b> Inhibición de los efectos patológicos inducidos por la BaP1, por parte del inhibidor de metaloproteinasas batimastat.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADAMs:** proteínas disintegrina y metaloproteinasas

**DMV:** Densidad de microvasculatura

**EGF:** Factor de crecimiento epidermal

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

**IL-8:** Interleucina-8

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PIGF:** Factor de crecimiento tipo placentario

**SVMPs:** Metaloproteinasas del veneno de serpiente

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TIMP's:** Inhibidores de metaloproteinasas

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

**TSP-1:** Trombospondina-1

**TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling

**VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial

**VEGFR-2:** Receptor del factor del crecimiento vascular endotelial

**vWF:** Factor de vonWillebrand

Con base en esta tesis se elaboró el artículo:

Jiménez N, Escante T, Gutiérrez JM, Rucavado A. Skin pathology induced by snake venom metalloproteinase: Acute damage, revascularization, and re-epithelization in a mouse ear model. *J. Invest. Dermatol.* 2008, in press.

## INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es un problema de salud que afecta regiones en todo el mundo, especialmente en zonas rurales. Cerca de 2.5 millones de personas al año sufren un envenenamiento por mordedura de serpiente, la mitad de estos requieren tratamiento médico y 125.000 mueren cada año (Chippaux, 1998).

Este es un tema de especial relevancia en regiones del mundo como Asia, África y América, particularmente Centro y Suramérica (Chippaux, 1998). En Centroamérica se estima que ocurren unos 5000 casos y 80 muertes por año (Gutiérrez *et al*, 2006b, asimismo se ha visto que en América Latina la gran mayoría de los envenenamientos son causados por especies de la familia Viperidae (Gutiérrez, 2002).

En 1979, en Costa Rica se reportó una incidencia de 22.4 mordeduras por cada 100.000 habitantes y una mortalidad de 0.75 por 100.000 habitantes (Sasa y Vazquez, 2003) y para 1998 se registró una morbilidad de 20 por 100.000 y una mortalidad de 0.4 por cada 100.000 habitantes (Chippaux, 1998). Aunque se evidencia un descenso en las muertes por causa de mordeduras de serpiente, este sigue siendo un tema preocupante en cuestión de salud.

En el caso de Costa Rica la mayoría de casos reportados pertenecen a mordeduras causadas por la especie *Bothrops asper* (Sasa y Vazquez, 2003). Esta especie pertenece a la familia Viperidae y su veneno se caracteriza por inducir, a nivel local, efectos como edema, dolor, sangrado, necrosis, los cuales se desarrollan rápidamente. Posteriormente se presentan alteraciones sistémicas, tales como sangrado, coagulopatía, choque cardiovascular e insuficiencia renal aguda (Gutiérrez, 1995a; Gutiérrez, 2002).

El veneno de los vipéridos está compuesto por diferentes sustancias que son las responsables de los efectos mencionados. Entre las cuales están proteínas que afectan la coagulación sanguínea, proteínas que causan mionecrosis y aquellas que provocan hemorragia, como son las metaloproteinasas (Gutiérrez, 2002).

Las metaloproteinasas son enzimas dependientes de zinc, que poseen un dominio característico en el sitio catalítico. Dependiendo de la composición de dominios de estas enzimas, se les puede clasificar en cuatro grupos: P-I, son proteínas de bajo peso molecular que contienen solo el dominio metaloproteinasas; P-II, tienen el dominio metaloproteinasas y el tipo disintegrina; P-III, poseen un dominio rico en cisteínas además de los dos dominios anteriores y P-IV, contienen los dominios mencionados y poseen una subunidad tipo lectina C unida por un puente disulfuro al resto de la proteína (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Watanabe et al, 2003).

Una metaloproteinasas muy abundante en el veneno de *B. asper* es la BaP1. Esta es una pequeña metaloproteinasas hemorrágica, de solo 22.7 kDa, que pertenece al grupo de las P-I (Watanabe et al, 2003), posee una sola cadena e induce un daño local prominente asociado con hemorragia, mionecrosis, edema y formación de ampollas (Rucavado et al, 1995; Escalante et al, 2004).

Se ha especulado que el efecto hemorrágico local de esta enzima se puede deber a la destrucción de la lámina basal de los capilares sanguíneos. También se ha planteado la posibilidad de que induzca la muerte por apoptosis de las células endoteliales de los vasos capilares (Rucavado *et al*, 1995). Previamente se han estudiado los efectos de la BaP1 a nivel local y sistémico (Rucavado et al, 1995; Escalante et al, 2004), así como el papel que juega en la piel cuando ocurre envenenamiento (Rucavado et al, 1998); sin embargo aún no se tienen datos cuantitativos del fenómeno, que proporcionen una idea de qué tanto peso tiene esta proteína en el desarrollo de la patología cuando ocurre la mordedura de una serpiente, además faltan aún muchas piezas para tener una visión completa de lo que sucede a nivel molecular. De ahí el interés por realizar un trabajo de este tipo, que contribuye a darnos una idea de cuáles son los actores más importantes y cuál es el escenario en que se desenvuelven cuando sucede un accidente ofídico por *Bothrops asper*.



# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1 El accidente ofídico

Se estima que cerca de 125.000 personas mueren anualmente debido a mordeduras de serpientes, las cuales se reportan principalmente en países tropicales de Asia, África y América (Gutiérrez, 1997; Chippaux, 1998). En Centro y Suramérica la prevalencia de mordeduras de serpiente es significativamente más alta que en Norteamérica; a pesar de estas cifras debe recordarse que los accidentes ofídicos no son sistemáticamente reportados y en ocasiones no hay un registro confiable de su epidemiología. La incidencia en estas zonas es de al menos 300.000 casos al año y el número de muertes provocadas por esta razón puede exceder los 5000 decesos anuales (Chippaux, 1998).

En América Central no hay un registro completo de estos incidentes debido a que muy pocos países poseen sistemas confiables para reportar esta patología. En Costa Rica un número estimado de entre 500 y 600 pacientes son atendidos en centros de salud cada año debido a mordeduras de serpientes, con una incidencia de 20 por cada 100.000 habitantes por año (Gutiérrez, 1995a). Más recientemente, se ha reportado que durante el periodo de 1990-2000, un total de 5550 accidentes ofídicos se registraron en hospitales y otros centros de salud del país (Sasa y Vázquez, 2003) y se ha observado que ocurren principalmente en zonas rurales, afectando generalmente a personas involucradas en actividades agrícolas y a amas de casa, con edades entre los 10 y los 29 años (Sasa y Vázquez, 2003).

Es evidente después de observar estos datos que el accidente ofídico debe ser considerado como un problema importante de salud pública, por lo que es fundamental el estudio del mismo, a fin de mejorar el tratamiento que se les da a los pacientes.

En Costa Rica existen dos familias de serpientes que agrupan especies venenosas, Elapidae y Viperidae (Solórzano, 2004). Esta última familia incluye la especie que provoca más de

la mitad de los envenenamientos en el país, *Bothrops asper*. Es importante destacar que esta especie es capaz de inocular mayor cantidad de veneno que otras serpientes de Centroamérica, por lo que las víctimas, generalmente, presentan efectos más severos (Gutiérrez, 1995 a).

### **1.1.1 Cuadro clínico inducido por mordeduras de serpientes de la familia Viperidae**

El cuadro clínico que se desarrolla a partir de la mordedura de vipéridos se caracteriza inicialmente por efectos locales, como edema, sangrado, necrosis, dolor severo, equimosis, flictenas, entre otros, que ocurren pocos minutos después de que ha sido inoculado el veneno (Pereira *et al*, 2005). Sistémicamente se describe: incoagulabilidad de la sangre, sangrado y síntomas generales como náuseas y vómito, también se observa hipotensión y en ocasiones pérdida del conocimiento. El paciente sufre el daño local del tejido inmediatamente después de la mordedura, mientras que el efecto sistémico del veneno ocurre más tarde, entre 1 y 6 horas después de ocurrido el accidente (Gutiérrez, 1995a).

Los efectos del veneno a nivel sistémico incluyen desfibrin(ogen)ación, choque cardiovascular (producto de la hipovolemia provocada por la hemorragia sistémica) e insuficiencia renal aguda (Gutiérrez, 2002; Gutiérrez y Rucavado, 2000). Las manifestaciones hemorrágicas incluyen sangrado nasal, sangrado de encías, expectoración de sangre, emisión de sangre en orina y hematomas. (Gutiérrez, 1997). Existen diversos factores que afectan la severidad del envenenamiento y el tiempo en que se desarrollan los signos y síntomas, como por ejemplo el tamaño de la serpiente, la especie y la cantidad de veneno que inocule el animal. También la vía por la que se inocula el veneno y el número de mordeduras son importantes en el pronóstico del paciente. La mayoría de mordeduras ocurren una sola vez y a nivel intramuscular o subcutáneo, raras veces el veneno es depositado en una vena, lo cual aumentaría el riesgo para la víctima. Además las características propias de la persona que ha sufrido el accidente, como son peso, estatura y su estado fisiológico, van a jugar un papel importante en el desarrollo de la patología del envenenamiento (Gutiérrez, 1995a)

### 1.1.2 Composición de los venenos de serpientes

Los venenos de serpiente se caracterizan, en general, por ser una mezcla compleja de componentes orgánicos e inorgánicos. Los constituyentes inorgánicos incluyen  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^{1+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{P}^{4+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , y  $\text{Zn}^{2+}$ . Sin embargo, es común que no se encuentren todos ellos en los venenos y también las cantidades de cada uno varían de una especie a otra. Se cree que estos componentes son importantes en la estabilización de la estructura de algunas proteínas del veneno y pueden estar involucrados en mecanismos de catálisis de algunas enzimas (Bjarnason y Fox, 1989).

Los componentes orgánicos se subdividen en proteicos y no proteicos, siendo los primeros los más abundantes en el veneno. Las glándulas de veneno sintetizan y secretan de 50 a 60 proteínas y péptidos (Matsui *et al*, 2000). Dentro de los componentes no proteicos se encuentran carbohidratos, lípidos, aminas biogénicas, nucleótidos y aminoácidos. (Bjarnason y Fox, 1989).

Dentro de los constituyentes proteicos del veneno se incluyen neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, factores de crecimiento, lectinas, disintegrinas, varias enzimas (e.g. proteinasas, fosfolipasas, aminotransferasas), proteínas que se unen al factor de von Willebrand e inhibidores enzimáticos, entre otros (Matsui *et al*, 2000). Los venenos de vipéridos además presentan enzimas coagulantes y procoagulantes, como las serina-proteinasas “tipo trombina” y metaloproteinasas que activan los factores X y II de la cascada de la coagulación. También se han identificado componentes inhibidores de trombina e inductores de agregación plaquetaria como la “botrocetina” y la “aspercetina” (Gutiérrez, 2002).

La mayoría de las enzimas presentes en los venenos de serpiente son hidrolasas, que están asociadas con la degradación de sustratos en el animal envenenado, donde contribuyen a la inmovilización y digestión de la presa (der Rechtsmedizin, 1998). Los venenos de la familia Viperidae contienen además un grupo de moléculas llamadas “disintegrinas”, que

contienen la secuencia RGD que se une a la integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  de las plaquetas, inhibiendo la agregación plaquetaria y afectando el proceso hemostático. Estos venenos poseen también proteinasas fibrinolíticas, de la familia de las metaloproteinasas, que pueden hidrolizar la fibrina que forma los trombos (Gutiérrez, 2002).

## 1.2 Metaloproteinasas de los venenos de serpientes

Las metaloproteinasas constituyen uno de los principales componentes de los venenos de serpientes. Estas enzimas son metalopeptidasas, que contienen en su molécula un catión divalente, usualmente zinc, pero también puede ser cobalto o manganeso y el ataque nucleofílico de estas hidrolasas es mediado por una molécula de agua (Barrett et al, 1998).

Las metalopeptidasas, en general, se subdividen en clanes, de los cuales el Clan MB contiene a las metaloproteinasas características de los venenos de serpientes, entre otras. Este clan incluye a las metaloendopeptidasas dependientes de zinc que contienen la secuencia consenso His-Glu-X-X-His-X-X-Gly-X-X-His/Asp, como por ejemplo las metaloproteinasas que se ubican en la familia M12 (Barrett et al.1998).

La familia M12 incluye las enzimas de la subfamilia de las Reprolisinas, a las cuales pertenecen las metaloproteinasas de veneno y las ADAMs (“a disintegrin and metalloproteinase proteins”). Ambos tipos de enzimas comparten una organización de dominios similar, presentan los dominios metaloproteinasas, tipo disintegrina y uno rico en cisteína; las ADAMs además poseen un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), una región transmembrana y una cola citoplasmática (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Fox y Serrano, 2005).

Con base en la estructura de sus dominios las metaloproteinasas se han clasificado en cuatro grupos principales: P-I, compuestas solo por el dominio metaloproteinasas, con una masa molecular entre 20-30 kDa; P-II, poseen el dominio metaloproteinasas seguido por un tipo disintegrina, su masa molecular oscila entre 30- 50 kDa; P-III, comprende los dominios

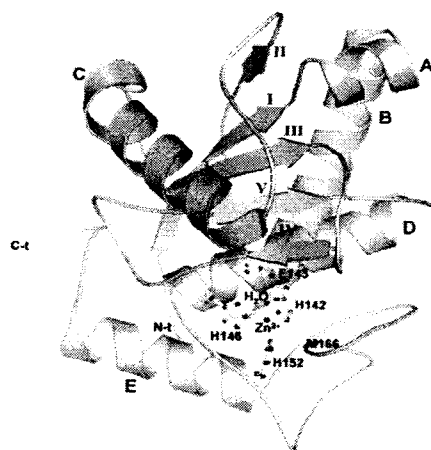
anteriores y uno rico en cisteínas, su masa varía entre 50-80 kDa; finalmente la clase PIV, con una masa molecular de 80-100 kDa, incluye un dominio tipo lectina unido por un puente disulfuro a la cadena polipeptídica de la metaloproteinasas, que contiene las regiones ya mencionadas (Barrett *et al.* 1998; Gutiérrez y Rucavado, 2000). Se cree que la presencia de estos dominios adicionales es la responsable de una mayor actividad hemorrágica al comparar estas enzimas con las de la clase P-I (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Gutiérrez, 2002).

Las metaloproteinasas presentes en el veneno de serpientes son sintetizadas y almacenadas en la glándula de veneno como zimógenos, con un grupo tiol conservado en la pro-secuencia PKMCGV bloqueando el sitio activo por unión al ión  $Zn^{2+}$ . Después de la secreción de la glándula, el zimógeno es procesado proteolíticamente cortando el grupo tiol, para producir la forma activa de la enzima (Matsui *et al.*, 2000).

La actividad hemorrágica ha sido asociada con la actividad proteolítica, ya que la quelación del átomo de zinc inhibe los efectos proteolítico y hemorrágico (Gutiérrez y Rucavado, 2000). Relacionado con lo anterior se ha probado que agentes quelantes, como el  $CaNa_2EDTA$  y el batimastat, un inhibidor sintético peptidomimético de metaloproteinasas, disminuyen la hemorragia y la dermonecrosis inducidas por el veneno de *B. asper* después de ser aplicadas localmente. Se cree que este efecto se debe a la inhibición de la actividad proteolítica de las metaloproteinasas presentes en el veneno (Rucavado *et al.*, 2000).

### **1.2.1 BaP1: una metaloproteinasas hemorrágica del veneno de *Bothrops asper***

El veneno de los vipéridos posee toxinas que incrementan la permeabilidad vascular e inducen el daño al endotelio produciendo hemorragia (White, 2005). Como se indicó previamente, las toxinas hemorrágicas son metaloproteinasas dependientes de zinc, tal es el caso de la BaP1. Esta es una proteína básica de 22.7 kDa que pertenece a la clase P-I de toxinas hemorrágicas (figura 1).



**Figura 1.** Diagrama de la estructura terciaria de la metaloproteínasa hemorrágica BaP1 (Watanabe *et al*, 2003).

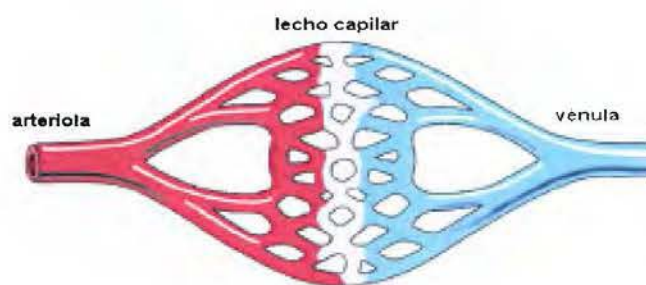
BaP1 induce daño local en el tejido, asociado con hemorragia, mionecrosis, edema y formación de ampollas (Rucavado *et al*, 1995,1998). También posee actividad pro-inflamatoria (Escalante *et al*, 2004). Su actividad hemorrágica es débil, sin embargo se encuentra en altas cantidades en el veneno de *Bothrops asper*, lo que hace pensar que esta proteína cumple un papel fundamental en el daño local provocado por el veneno, no sólo en su efecto hemorrágico pero también como un mediador de necrosis en músculo y de la degradación de la matriz extracelular (Rucavado *et al*, 1995). Se ha observado que en cultivos celulares la BaP1 no es citotóxica para células endoteliales, pero provoca que estas células se despeguen de su sustrato. Se ha propuesto que la degradación proteolítica de los componentes de la lámina basal de capilares es un elemento importante en la patogénesis de la hemorragia inducida por la BaP1, y que el daño a las células endoteliales observado *in vivo* se debe a que se interrumpe la interacción entre la lámina basal y estas células (Rucavado *et al*, 1995).

En músculo se ha mostrado que a raíz de la inyección de BaP1 ocurre una ruptura de capilares, no así de arteriolas y vasos más grandes. Para explicar este efecto, inducido por las metaloproteínasas hemorrágicas en general, se postuló que el daño en la microvasculatura dependía de la degradación proteolítica de la lámina basal (Bjarnason y Fox, 1989). Se propone que la falta de una adecuada irrigación sanguínea del tejido, debido

al daño en vasos sanguíneos es la causante de una pobre regeneración después del daño provocado por el veneno de *B. asper* y por metaloproteinasas purificadas. (Rucavado *et al*, 1995).

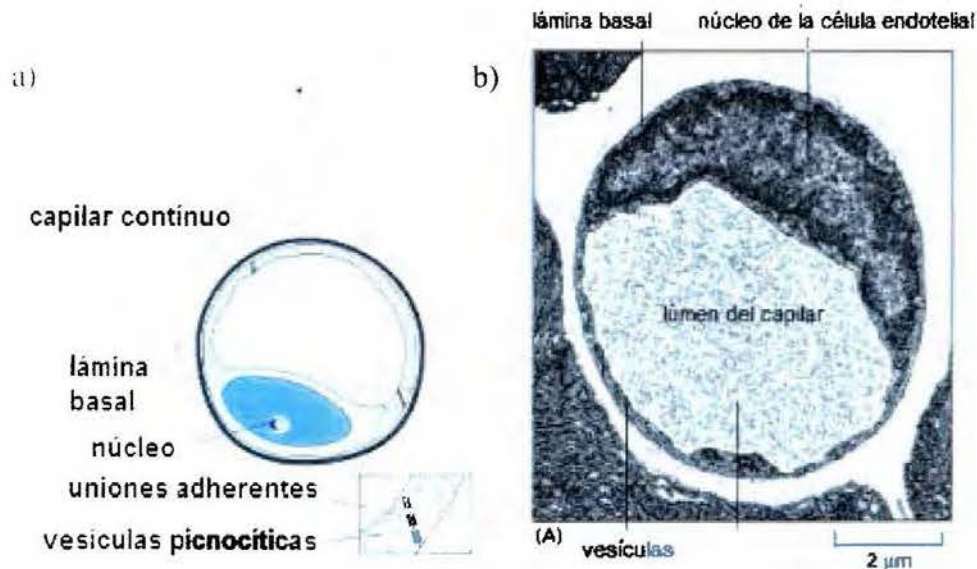
### 1.3 Estructura de los capilares sanguíneos

Los capilares se consideran como parte de la microvasculatura, que conecta la vasculatura arterial y venosa. Las pequeñas arterias se ramifican en arteriolas, que a su vez se subdividen en los capilares, a partir de los cuales la sangre fluye hacia las vénulas (figura 2).



**Ilustración 1.** Organización de la microvasculatura.

El término de “capilar” está restringido a vasos constituidos solamente por endotelio, lámina basal y unos pocos pericitos (figura 3). El diámetro interno de los capilares sanguíneos oscila entre los 5-10  $\mu\text{m}$  y poseen una longitud promedio de 20 a 100  $\mu\text{m}$  (Aird, 2005).



**Ilustración 2.** a) Esquema de la estructura de capilares sanguíneos. b) Micrografía electrónica de un capilar sanguíneo (modificado de Alberts *et al*, 2002).

La estructura detallada de cada una de las capas de los capilares depende del tejido en que se encuentre; con base en las variaciones en la apariencia y continuidad del endotelio y su lámina basal, se pueden distinguir tres tipos principales de capilares sanguíneos: continuos, fenestrados y discontinuos o sinusoides (Aird, 2005; Weiss, 1983).

La lámina basal es un importante componente de la microvasculatura, ya que constituye una barrera y provee soporte para cada capilar. La lámina basal está compuesta por varias proteínas, hasta el momento se conocen cerca de 50, pero alrededor de la mitad de estas son algún tipo de colágeno, especialmente el colágeno IV. También la laminina, nidogen/entactina, entre otros, forman parte de esta red proteica, además de estar presentes proteoglicanos como el perlecan (Kalluri, 2003).

La laminina se une a moléculas de superficie de las células, en este caso endoteliales, como lo son las integrinas, por ejemplo la integrina  $\beta 1$  y el distroglican. Estas proteínas facilitan la deposición de los polímeros de laminina, por medio de interacciones sitio-específicas, luego los polímeros de colágeno IV se asocian con la laminina por medio de nidogen/entactina (Kalluri, 2003).



#### 1.4 Efecto de los componentes del veneno de serpiente sobre la microvasculatura

Como se explicó previamente, la hemorragia local y sistémica es distintiva del cuadro clínico descrito en pacientes que han sufrido una mordedura de serpiente de la familia Viperidae, la cual se ha asociado con la acción de las metaloproteinasas en la vasculatura. Se ha visto que los capilares son el principal blanco de las toxinas hemorrágicas, lo que va a afectar la permeabilidad vascular (Borkow *et al*, 1995).

Se ha sugerido un mecanismo en el cual las células endoteliales de los vasos sanguíneos son rápidamente afectadas, desprendiéndose de la lámina basal; también se ha observado el desarrollo de un tipo de ruptura en las uniones intercelulares de estas células, por medio de las cuales los eritrocitos y otros componentes sanguíneos salen al espacio intersticial. Estos hallazgos han llevado a la teoría de que el daño a estas células ocurre posterior a las alteraciones en la membrana basal (Borkow *et al*, 1994).

Existen resultados contradictorios relacionados con la citotoxicidad inducida por las metaloproteinasas en las células endoteliales (Gutiérrez y Rucavado, 2000). *In vitro* se ha observado que el único efecto en las células endoteliales es el desprendimiento de la monocapa en que han sido cultivadas al entrar en contacto con las metaloproteinasas de veneno *B. asper*, BaH1 y BaP1, pero curiosamente las células permanecen viables, ya que no liberan la lactato deshidrogenasa y son capaces de excluir el azul de tripán, además logran formar una monocapa si son cultivadas nuevamente (Borkow *et al*, 1995; Lomonte *et al*, 1994). Sin embargo si las células se exponen a la toxina por 24 horas, las que se han despegado sufren apoptosis por anoikis y posteriormente se da una necrosis secundaria (Díaz *et al*, 2005).

En contraste, se ha descrito una citotoxicidad directa en células endoteliales *in vitro* cuando se les expone a metaloproteinasas hemorrágicas de los venenos de *Crotalus ruber*, *C. atrox* y *Bitis gabonica* (Gallagher *et al*, 2003). *In vivo*, las células endoteliales presentan una morfología alterada y se observa un daño evidente, lo cual se puede deber a una acción directa de las metaloproteinasas del veneno o a efectos secundarios desencadenados por la

acción de las mismas en la membrana basal (Lomonte *et al*, 1994; Gutiérrez y Rucavado, 2000). Se ha propuesto que estas alteraciones son las que podrían llevar a desarrollar las rupturas del endotelio y con ello a la extravasación (Lomonte *et al*, 1994).

Se ha discutido que esta discrepancia entre los efectos observados *in vitro* e *in vivo* se debe a factores hemodinámicos, como por ejemplo la presión hidrostática y las fuerzas de cizalla generados por el flujo sanguíneo en microvasos. Después de la hidrólisis de la membrana basal por metaloproteinasas, estos factores biofísicos pueden mediar las alteraciones en células endoteliales (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al*, 2005).

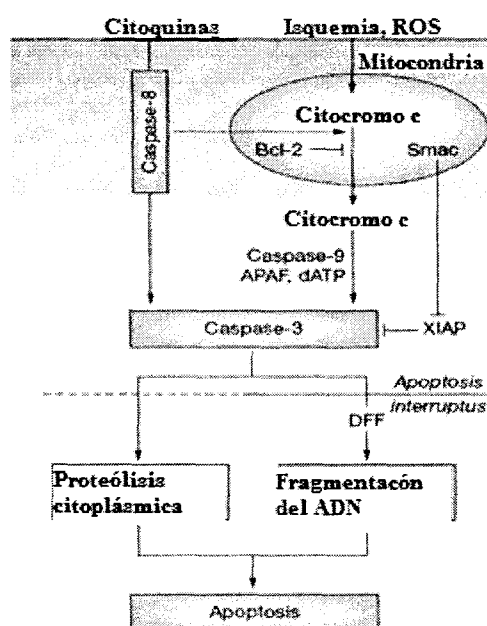
El mecanismo de acción de las metaloproteinasas hemorrágicas de veneno se ha investigado de diferentes maneras y se ha llegado al consenso en que hay hidrólisis de la membrana basal en microvasculatura, el cual es un paso clave en este proceso, aunque todavía no se conocen los detalles del mismo (Gutiérrez *et al*, 2005).

#### **1.4.1 Apoptosis**

Este es un proceso de muerte celular programada, una forma de remodelar el entorno celular; ésta ocurre en condiciones fisiológicas para mantener el equilibrio entre división y muerte celular, pero también como mecanismo de defensa contra patógenos intracelulares y como consecuencia de diversos procesos patológicos. A diferencia de la necrosis, en la cual el contenido celular se libera de forma descontrolada, provocando daño a las células vecinas e inflamación, cuando una célula entra en apoptosis no afecta a otras células, ya que este proceso ocurre dentro de una membrana celular intacta y es fagocitada antes de que su contenido sea liberado, de tal manera que sus diferentes componentes pueden ser reciclados (Melino *et al*, 2005; Alberts *et al*, 2002).

Existen dos vías por las que puede darse la apoptosis: la vía extrínseca, en la cual el estímulo apoptótico proviene del exterior de la célula, por medio de receptores de la muerte, como el Fas y la vía intrínseca, en la cual la señal para la activación proviene del interior de la célula, con la permeabilización de la membrana mitocondrial y la salida del citocromo c (figura 4). En ambos casos participan las caspasas, un grupo de proteasas que

se sintetizan como zimógenos, de modo que actúan en cascada cuando deben activarse (Narula *et al*, 2006).



**Figura 2.** Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis (modificado de Narula *et al*, 2006)

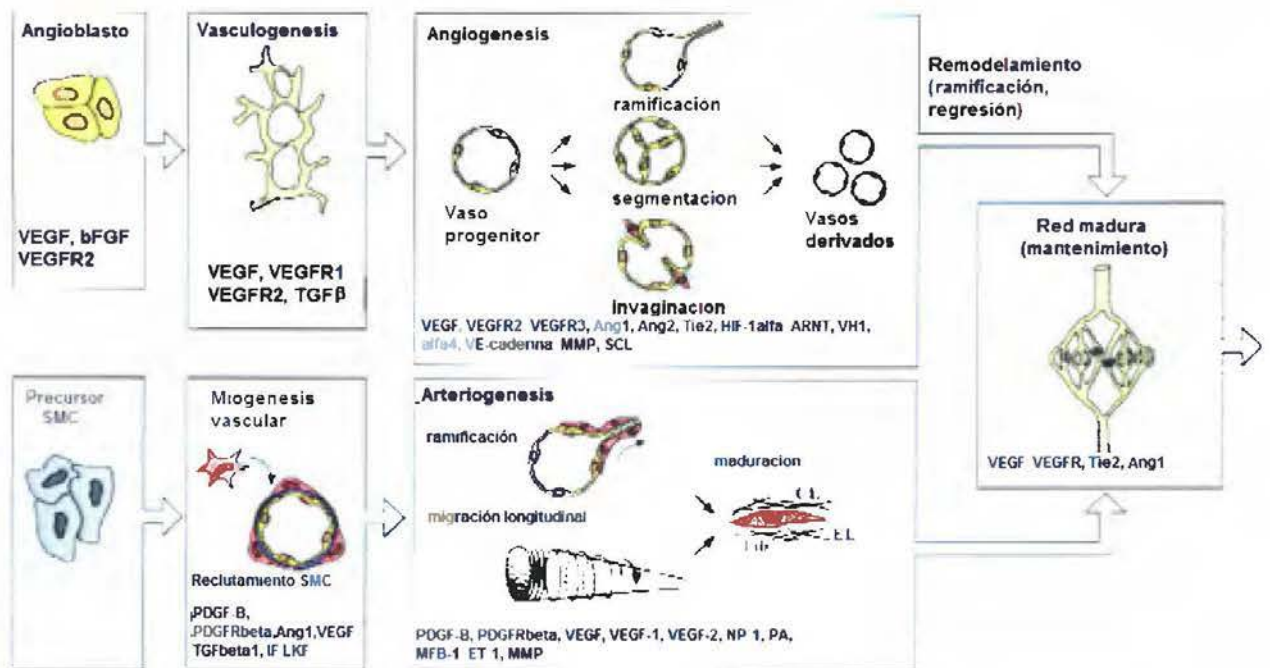
La apoptosis posee diferentes manifestaciones, entre las características clásicas están la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la formación de cuerpos apoptóticos y la externalización de fosfatidilserina en la membrana celular, entre otros (Kroemer *et al*, 2005). Otra de las evidencias de este proceso es la liberación de citocromo c al citoplasma y la activación de la caspasa-3 (Jäättelä, 2004).

Dentro de la definición de apoptosis se ha incluido un tipo de muerte celular programada, llamada anoikis, que ocurre en respuesta a la pérdida de adhesión o a la adhesión inapropiada. Durante la anoikis se observan todos los rasgos característicos de la apoptosis (Valentijn *et al*, 2004). En todo organismo multicelular las células no están aisladas, sino que se encuentran en contacto con las células vecinas y con el ambiente extracelular. La matriz extracelular es parte de ese entorno y ésta establece relaciones con las células por medio de las integrinas, las cuales se asocian también con otras moléculas, formando complejos y participando en la transducción de señales. Es por eso que al perderse o

alterarse esta relación se desencadenan eventos que llevan a la muerte de las células afectadas (Valentijn *et al*, 2004; Gilmore, 2005).

### 1.4.2 Angiogénesis: definición y descripción del proceso.

El desarrollo del sistema circulatorio ocurre a través de dos mecanismos principales: la vasculogénesis, que es la formación de una red de vasos sanguíneos *de novo* y ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario, pero en ocasiones también se observa en el adulto, y la angiogénesis (ver figura 5), la cual constituye el mecanismo por el que emergen vasos más pequeños o ramificaciones (capilares) a partir de la vasculatura previamente formada y ocurre tanto en el embrión como en el adulto (Fryer y Field, 2005).



**Ilustración 3.** Desarrollo de la red de arterias, venas y capilares. A partir de los angioblastos, el precursor endotelial, se forma una red primitiva (vasculogénesis), luego se modela y expande (angiogénesis), finalmente las células endoteliales son cubiertas por células de músculo liso y los vasos se estabilizan durante la arteriogénesis (modificada de Carmeliet, 2000).

La angiogénesis es un proceso invasivo que requiere proteólisis de la matriz extracelular, proliferación y migración de las células endoteliales presentes en vasos pre-existentes, pero

también de algunas células circulantes provenientes de la médula ósea, esto en respuesta a diversos factores pro-angiogénicos, liberados por las mismas células endoteliales; un ejemplo es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Benouchan y Colombo, 2005).

El anclaje de las células endoteliales a la matriz se da por medio de moléculas de adhesión como las integrinas; las uniones intercelulares también están mediadas por este tipo de moléculas, como la molécula de adhesión PECAM-1 y la caderina vascular endotelial, las cuales se ven afectadas durante el proceso angiogénico (Cines *et al*, 1998).

La angiogénesis está fuertemente regulada por una variedad de inhibidores que suprimen la proliferación del endotelio vascular, aunque también participan moléculas que promueven este proceso (Kalluri, 2003). Algunos de los principales factores involucrados en la angiogénesis se presentan en el cuadro 1. Una alteración del balance entre estos dos grupos de moléculas es lo que va a desencadenar la respuesta angiogénica (Benouchan y Colombo, 2005).

**Cuadro 1.** Factores endógenos involucrados en la modulación de la angiogénesis (modificado de Benouchan y Colombo, 2005).

Factores pro-angiogénicos	Factores anti-angiogénicos
Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	Angiostatina
Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF)	Endostatina
Factor de crecimiento tipo placentario (PlGF)	Interferón $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	IL-1, -4, -12 y -18
Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF- $\beta$ )	Trombospondina-1(TSP-1)
Interleucina-8 (IL-8)	Inhibidores de metaloproteinasas
Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	(TIMPs)

En el adulto, la angiogénesis se inicia principalmente en respuesta a una condición patológica, como ocurre durante la inflamación o hipoxia, donde contribuye en la

reparación de heridas y regeneración de órganos; además es un proceso importante durante la metástasis tumoral (Stetler-Stevenson, 1999; Cines *et al*, 1998).

El proceso de angiogénesis inicia con la estimulación de las células endoteliales por los factores de crecimiento y la degradación de la membrana vascular y la matriz extracelular que rodea a los vasos; esta degradación es provocada por colagenasas, serina proteinasas y metaloproteinasa secretadas por las células endoteliales. La degradación de la matriz extracelular también permite la liberación de algunos factores pro-angiogénicos que se encuentran almacenados en la misma (Carmeliet, 2000; Benouchan y Colombo, 2005).

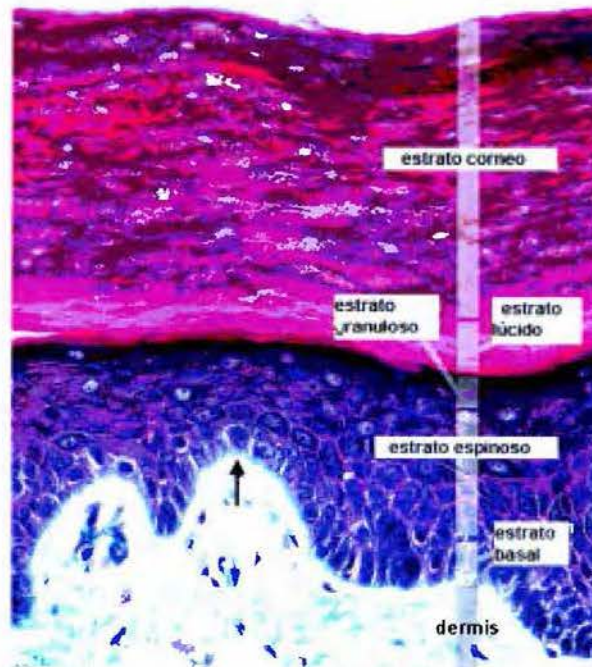
La proteólisis de los componentes de la lámina basal y la matriz extracelular es necesaria para promover la invasión de las células endoteliales en la matriz intersticial circundante, conforme van proliferando (Egginton *et al*, 2001). La proliferación de las células endoteliales es un proceso temprano en la angiogénesis y continúa conforme los nuevos capilares se van elongando. La formación del lumen ocurre conforme el nuevo vaso forma una estructura multicelular; el nuevo capilar luego forma una conexión con otro pre-existente, creando la red vascular (Benouchan y Colombo, 2005).

El paso final requiere de la estabilización de los capilares, a través de la construcción de la lámina basal y uniones adherentes; esta estabilización ocurre también cuando los pericitos, que rodean el vaso, se unen a células de músculo liso (Benouchan y Colombo, 2005; Milkiewicz *et al*, 2006).

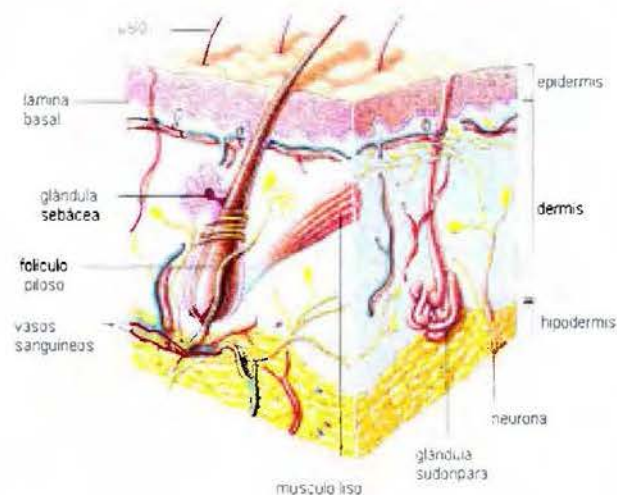
## **1.5 Estructura de la piel**

La piel está constituida, en general, por tres capas: la epidermis, la dermis o corion y el tejido subcutáneo o hipodermis (figura 6). La epidermis es una capa muy delgada, con un espesor aproximado de 120  $\mu\text{m}$  (Forslind *et al*, 1997) y está compuesta por queratinocitos y melanocitos; estas células poseen características muy diferentes y se mantienen como unidades separadas, limitándose al contacto entre células vecinas (Domonkos, 1975).

a)



b)



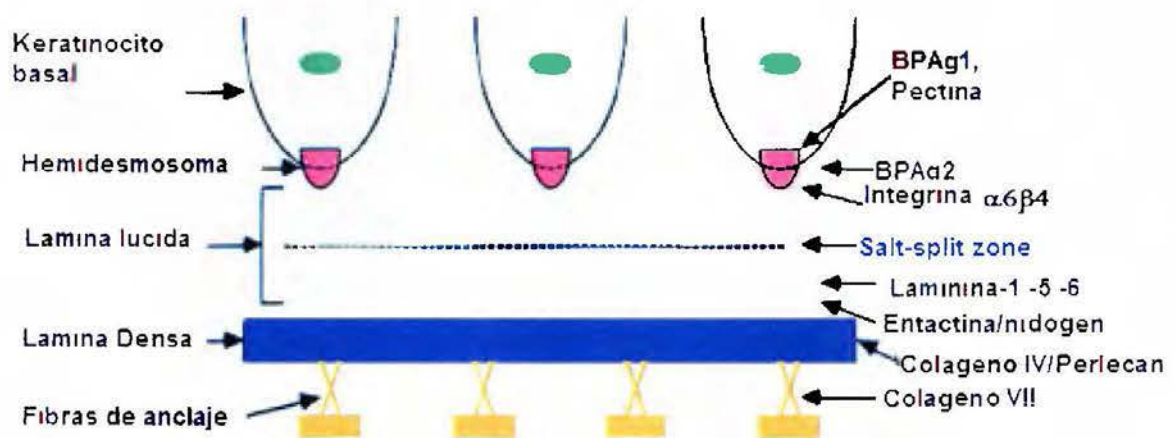
**Ilustración 4.** Estructura de la piel. a) Sección transversal en parafina de la piel. La lámina basal es señalada (flecha). b) Esquema de la estructura de la piel.

La epidermis (también conocida como capa epitelial) es el área más superficial de la piel y está constituida por epitelio plano estratificado. La epidermis consta de varias capas, algunas de las más características son: el estrato córneo, la más externa, compuesto por



células epiteliales muertas que se han queratinizado; el estrato granuloso, las células que lo componen poseen gránulos que contienen una sustancia semisólida llamada queratohialina; el estrato de Malpigio, constituido por un número variable de queratinocitos poligonales y finalmente una capa de células basales, que son las que originan inicialmente al resto de capas (Domonkos, 1975).

Entre la epidermis y la dermis se ubica la lámina basal, su función principal es la de servir como una conexión para adherencia entre estas dos capas de la piel. La lámina basal de la piel se puede dividir en cuatro áreas: la lámina lucida superior/zona de hemidesmosomas, lámina lucida inferior, lámina densa y sub-lámina densa. En cada capa se pueden distinguir diferentes componentes, como hemidesmosomas, antígenos de la enfermedad penfigoides bulosa (BP180 y BP230), la integrina  $\alpha 4\beta 6$  y plectina en la **Zona de separación por sales** lámina lucida inferior está la laminina-1, -5, -6, p105 y entactina/nidogen; la lámina densa está compuesta por colágeno IV y perlecan; finalmente en la sub-lámina densa se encuentra colágeno VII (Chan L.S, 1997) (figura 7).



**Figura 3.** Representación esquemática de las regiones que componen la membrana basal en la piel. **BP:** penfigoides bulosa, **Ag:** antígeno, **Zona de separación por sales:** indica la localización aproximada de separación cuando una sección de piel intacta es tratada químicamente con NaCl/Na-EDTA. (Modificado de Chan L.S, 1997)

La dermis, también llamada corion, constituye una capa elástica o fibrosa densa, que está bajo la epidermis; su función principal es dar soporte y elasticidad a la piel. Está formada por tejido conectivo compuesto por dos tipos de fibras: las de colágeno y las fibras



elásticas. Es en esta capa que encontramos gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, estructuras glandulares y folículos pilosos, entre otros. El tejido subcutáneo o hipodermis, es una capa especializada donde los adipocitos forman y almacenan la grasa (Domonkos, 1975).

### **1.5.1 Microvasculatura de la piel**

La red sanguínea en la piel cumple dos funciones principales: la de llevar nutrientes a este tejido y la de mantener la temperatura corporal, el aparato circulatorio cutáneo comprende dos tipos de vasos: el sistema convencional (arterias, venas y capilares) y los que están dedicados a mantener la temperatura corporal estable (plexo venoso subcutáneo) (Drugge y Dunn, 2001).

En la piel existen tres redes de vasos sanguíneos; la más profunda está formada por vasos ramificados gruesos y se encuentra en la profundidad del tejido subcutáneo o hipodermis; esta red se ramifica hacia arriba, donde encontramos la trama media situada a un nivel profundo de la dermis. Sobre esta última se localiza la red más superficial, que se localiza en la confluencia de la capa papilar (en la dermis) y reticular. Este tipo de vasos sanguíneos son finos, pequeños y ramificados, y a partir de la red que estos forman salen grupos de capilares que penetran en cada uno de los cuerpos papilares (Drugge y Dunn, 2001).

### **1.5.2 Modelo murino para el estudio de la microvasculatura en piel.**

En ratones se ha trabajado con un modelo de oreja para estudiar la microvasculatura en piel; este tipo de análisis es recomendado debido a la facilidad para distinguir con claridad los capilares sanguíneos, al ser un tejido bastante simple. La oreja de los ratones está constituida por una porción central cartilaginosa rodeada por dos capas de dermis y una región epidérmica externa (Carmeliet *et al*, 1998). La irrigación sanguínea se lleva a cabo por medio de tres o cuatro grupos de microvasculatura, lo que hace que este tejido sea una buena opción para obtener un panorama más claro, tanto del estado de la microvasculatura

después de que ha sufrido algún tipo de lesión, como del proceso de regeneración de dicho tejido (Carmeliet *et al*, 1998).

En estudios previos se ha analizado el proceso de regeneración muscular *in vivo*, utilizando el veneno completo de *B. asper* (Gutiérrez JM *et al*, 1984; Arce V *et al*, 1991) sin embargo estos trabajos se han realizado en músculo esquelético. El músculo es un tejido que posee un mayor número de células relacionadas entre sí y con el medio circundante, lo que significa una mayor complejidad a la hora de trabajar con este, si se le compara con la oreja de ratón.

El modelo en oreja de ratón se ha utilizado en repetidas ocasiones para el estudio del proceso de angiogénesis, con algunas variaciones según el interés de la investigación. Un ejemplo de sus aplicaciones es el desarrollado por Pourtier-Manzanedo y colegas (2003), los cuales utilizan un modelo en oreja de ratón, en el cual insertan una pequeña porción de esponja de polivinil impregnada con diferentes compuestos, como factores de crecimiento y retrovirus, entre otros, con el fin de probar sus capacidades pro- y anti-angiogénicas. Se menciona que este modelo presenta la ventaja de que es menos doloroso para los ratones, además es fácil de realizar, con un bajo costo y permite estudiar el efecto a largo plazo del tratamiento aplicado.

Otra de las aplicaciones del modelo es, por ejemplo, el estudio del proceso de recuperación y revascularización de individuos diabéticos después de sufrir algún tipo de lesión. En este caso se creó una proteína recombinante que involucra a la angiopoyetina-1 y un dominio de una proteína de matriz, que se creía favorecía un mayor restablecimiento del flujo sanguíneo en el área afectada (Chung-Hyun *et al*, 2006).

Pero no sólo en temas relacionados con angiogénesis se ha utilizado este modelo murino, Gerberick y Ryan (1990) lo utilizaron para analizar el efecto de una fotoalergia inducida sobre el tejido de la oreja de ratones, así como el estudio del potencial fotoalergénico de varios agentes.

De esta manera se evidencia la versatilidad del modelo de oreja murino, dado que se ha utilizado en una amplia variedad de ensayos; así como su novedoso uso para el estudio del efecto de metaloproteinasas hemorrágicas sobre microvasculatura.

## CAPITULO 2

### 2.1 Objetivo General

Determinar los efectos de la metaloproteinasa BaP1 del veneno de *Bothrops asper* sobre la epidermis y la microvasculatura de la dermis, en un modelo de oreja de ratón.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Proporcionar una descripción a través del tiempo, del proceso patológico y de regeneración desencadenados por la BaP1 en la piel
2. Determinar cuantitativamente el efecto agudo de la BaP1 sobre la densidad de vasos capilares en la piel después de la inyección local de la toxina.
3. Estudiar cuantitativamente el proceso de revascularización de la piel después del daño agudo causado por la toxina BaP1.
4. Estudiar si la metaloproteinasa BaP1 induce apoptosis en las células del endotelio de la microvasculatura o en otros tipos celulares presentes en la piel *in vivo*.
5. Caracterizar las alteraciones inducidas por la metaloproteinasa BaP1 sobre la lámina basal de la unión dermis-epidermis.

### 2.3 Justificación

Como se ha descrito, el modelo de oreja murino, ha sido utilizado en una amplia variedad de ensayos de angiogénesis y otras aplicaciones relacionadas al estudio de la vasculatura de piel. El uso de este modelo en el estudio del efecto de metaloproteinasas hemorrágicas sobre microvasculatura y la patogénesis de esta toxina en la piel es novedoso y útil.

Los efectos fisiopatológicos inducidos por la metaloproteinasa BaP1 han sido estudiados ampliamente, sin embargo hasta el momento no se ha realizado un análisis cuantitativo del daño inducido por esta metaloproteinasa sobre la microvasculatura, ni se ha estudiado cuantitativamente el proceso de revascularización de este tejido después del daño producido por la BaP1.

Por otra parte, el daño en la piel inducido por la metaloproteinasa BaP1 es una secuela común en personas que han sufrido un accidente ofídico, por tanto es importante su caracterización detallada. Dos de los aspectos más novedosos abordados por este estudio son: el papel *in vivo* de la apoptosis en la patología de piel inducida por la toxina BaP1 y el papel de la degradación proteolítica de la lámina basal de la epidermis en la formación de ampollas características de los envenenamientos por vipéridos.

## CAPÍTULO 3

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Metaloproteinasa

Para los diferentes experimentos realizados se empleó la toxina BaP1, una metaloproteinasa hemorrágica de 22.7 kDa aislada del veneno de especímenes adultos de *B. asper* de la zona del Pacífico de Costa Rica, el cual fue suministrado por el serpentario del Instituto Clodomiro Picado. La purificación de la metaloproteinasa BaP1 se llevó a cabo usando una combinación de intercambio iónico en Carboximetil Sephadex y una cromatografía de afinidad en Affi-gel Blue, según lo describe Gutiérrez *et al* (1995b), con algunas modificaciones de Rucavado *et al* (1998).

#### 3.2 Animales de experimentación

Para todos los experimentos se utilizaron ratones de la cepa CD-1, con un peso entre 18-20g, que fueron proporcionados por el bioterio del Instituto Clodomiro Picado. Todos los ensayos con animales fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado de Animales de la Universidad de Costa Rica (CICUA) (Anexo 1).

#### 3.3 Preparación y preservación del tejido

Se inyectaron ratones intraperitonealmente con 0,3 mL de anestésico (una mezcla de 80 mg/Kg ketamina y 12 mg/Kg xilacina). Una vez anestesiados se inyectaron intradérmicamente (id) en la oreja con 15 µg de BaP1 en 20µL de un buffer de NaCl 0,12 M y fosfato de sodio 0.04M, pH 7.2 (PBS). Grupos de tres ratones fueron sacrificados, por dislocación cervical, a diferentes tiempos después de aplicado el tratamiento (1, 6, 24 y 72 horas, 1 y 2 semanas). Los animales control fueron inyectados con PBS, en condiciones

idénticas a las descritas anteriormente y se sacrificaron a 1 y 72 horas después de inyectados. Las orejas de animales tratados y control se disecaron y se colocaron en medio de criopreservación (ThermoShandon, Pittsburgh). Luego se congelaron rápidamente en CO<sub>2</sub> (hielo seco), los bloques de las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su utilización. En otros casos los tejidos se fijaron en formalina al 10% en PBS y se siguió el procedimiento de rutina para incluirlos en parafina.

A partir de los bloques con las muestras congeladas se hicieron cortes transversales de un grosor de 5 µm en un criostato Leica (Wetzlar, Alemania). Se utilizaron portaobjetos positivamente cargados (Erie Scientific Company, Portsmouth, N.H), en los cuales se colocaron tres cortes por portaobjeto y de cada bloque se prepararon cuatro portaobjetos. Las láminas con los cortes se colocaron en etanol al 100% para fijar el tejido, al menos por 20 minutos y se congelaron nuevamente a -70°C.

Se tiñeron las láminas preparadas con los tejidos incluidos en parafina, de todos los tiempos mencionados, con Hematoxilina de Gill 1X (Fisher Scientific Company Milwaukee) y Eosina Y alcohólica (Thermo Electron Corporation; Pittsburg, PA) para realizar análisis cualitativos y morfométricos de cada tejido.

### **3.4 Análisis Morfométricos**

Se analizaron las imágenes para los siguientes parámetros morfológicos: a) Grosor de la oreja; este se midió en tres regiones, de cada corte, entre las que no había ninguna clase de traslape. b) Porcentaje de la presencia de ampollas; el cual se obtuvo dividiendo el total de epidermis que presentaba ampollas entre el total de epidermis y se multiplicó por 100. c) Porcentaje de denudación epidérmica; que consistía en dividir la longitud de dermis que aparecía sin epidermis entre la longitud total de epidermis, multiplicado por 100. Todos los análisis morfométricos se llevaron a cabo usando el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, MD).

### 3.5 Cuantificación de Hemorragia

Grupos de tres ratones fueron inyectados con 15  $\mu\text{g}$  de la metaloproteinasa BaP1, en 20  $\mu\text{L}$  de PBS, los animales control recibieron 20  $\mu\text{L}$  de PBS. Los animales fueron sacrificados a una, 6 y 24 horas, y se disecaron las orejas. En cada oreja se midió el área de hemorragia en  $\text{mm}^2$ , con este dato se calculó el diámetro de la lesión. Las orejas se cortaron en pequeños trozos con ayuda de una hoja de bisturí, se colocaron en 5 mL de Drabkin, y se dejaron en reposo por 24 horas a 4 °C. Luego se centrifugaron a 600g por 5 minutos y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 540 nm, la concentración de hemoglobina fue calculada a partir de una curva estándar, tomándose esta como un indicador de la hemorragia que se produjo en el tejido después de transcurridos los tiempos indicados. (Escalante *et al*, 2000).

### 3.6 Efecto de la depleción de neutrófilos sobre los eventos patológicos inducidos por la BaP1.

Se siguió el protocolo descrito por Texeira *et al* (2003). En breve, seis ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 0,25 mg de un anticuerpo IgG monoclonal de rata anti-granulocitos de ratón (MAb RB6-8C5), que reconoce un marcador de superficie presente en granulocitos maduros (Hestdal *et al*, 1991). Los tres ratones control fueron tratados con un IgG MAb (LO-HoGa-31) que reconoce IgG de caballo (Fernandes *et al*, 1994). Los anticuerpos se administraron 36 horas antes de la inyección de la toxina. La depleción de los neutrófilos fue demostrada por medio de conteos de leucocitos en sangre. Animales control y neutropénicos fueron inyectados en la oreja con 20  $\mu\text{L}$  de PBS o con 15  $\mu\text{g}$  de BaP1, disueltos en 20  $\mu\text{L}$  PBS respectivamente. Se sacrificaron tres de los animales una hora después de aplicada la toxina y los otros tres a las seis horas después de la inyección, las orejas se procesaron de rutina para realizar cortes histológicos en parafina. Las secciones se prepararon usando un micrótopo (Microm HM335E; Walldorf, Alemania), se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizó la presencia de edema, hemorragia y ampollas.



### **3.7 Inhibición de la actividad metaloproteínasa.**

La toxina BaP1 se incubó durante 1 hora con batimastat (80  $\mu$ M), un hidroxamato peptidomimético inhibidor de metaloproteinasas, como lo describieron previamente Escalante y colegas (2000) y luego se inyectaron 6 ratones con esta metaloproteínasa inhibida. Los animales control fueron inyectados con BaP1 sin batimastat o solo con batimastat (3 para cada tratamiento). Alícuotas de 20  $\mu$ L de cada una de estas combinaciones se inyectaron id en cada oreja, tal y como se describió previamente.

A la hora o 6 horas después de la inyección se sacrificaron los animales (3 para cada tiempo) y las orejas completas se procesaron utilizando métodos de rutina para realizar cortes histológicos en parafina. Los cortes se realizaron utilizando un micrótomo (Microm HM335E; Walldorf, Alemania) y posteriormente se tiñeron con hematoxilina y eosina para su estudio. Los parámetros histológicos analizados fueron: la formación de ampollas, edema y hemorragia.

### **3.8 Inmunohistoquímica**

#### **3.8.1 Detección por inmunofluorescencia del receptor del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (Flk-1 o VEGFR-2)**

Para identificar las células endoteliales en los cortes congelados se realizó una tinción utilizando un anticuerpo monoclonal producido en rata anti-VEGF-R2 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) y se utilizó el kit comercial TSA Biotin System (Perkin Elmer; Boston, MA) para mejorar la sensibilidad de la inmunotinción. En breve, se hicieron bloqueos con peróxido de hidrógeno, avidina y biotina, entre cada bloqueo se realizaron tres lavados con PBS de tres minutos cada uno. Luego se aplicaron 30 $\mu$ L del anticuerpo primario por corte, a una concentración 1:20 en el amortiguador TNB, incubando por dos horas. Después de lavar tres veces con PBS de la manera descrita anteriormente, se cubrió cada corte con 30  $\mu$ L de anticuerpos policlonales de conejo anti-

rata biotinilados (DAKOCytomation; Glostrup, Dinamarca) diluidos 1:200 en TNB y se incubó por una hora. Se lavó nuevamente por triplicado con PBS y se agregó estreptavidina peroxidasa a una dilución de 1:100 en un amortiguador TNB incubando por treinta minutos. Se lavó nuevamente y se incubó durante diez minutos con una solución de tiramida a una concentración 1:50 en una solución amplificadora, después se realizaron los tres lavados de rutina con PBS.

Finalmente se aplicó el fluorocromo Cy3- streptavidina. También se aplicó una co-tinción de núcleo con Hoescht 33258 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) diluido 1:100 partiendo de una solución con una concentración de 1mg/mL con el fin de observar el total de células presentes en el tejido. La incubación con estos anticuerpos conjugados con sus respectivos fluorocromos se realizó protegiendo los tejidos de la exposición a la luz y finalmente se lavaron con PBS. Se aplicó una gota de medio de montaje para fluorescencia (DAKOCytomation; Glostrup, Dinamarca) para proteger las muestras de la desecación y se colocó el cubreobjetos.

Los cortes teñidos se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus; Tokyo, Japón) y se capturaron imágenes en magnificación de 20X, utilizando una cámara Cool SNAP-Pro (Media Cybernetics) integrada al microscopio. De cada corte se capturaron tres campos ópticos, de manera que no se traslaparan entre sí.

Se determinó el área total en  $\text{mm}^2$  de cada campo y se determinó el número de capilares teñidos con el anti-VEGFR2 utilizando el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics). Se consideraron vasos capilares aquellos con un diámetro menor a 10  $\mu\text{m}$ . Una vez que se obtuvieron estos datos se calculó la densidad de microvasculatura (DMV) (Vermeulen *et al*, 2002), la cual se define como el número de capilares por  $\text{mm}^2$  de tejido.

### **3.8.2 Tinción de la lámina basal de la epidermis**

Para estudiar la integridad de la lámina basal de los vasos sanguíneos y de la epidermis se utilizaron los cortes preparados en criostato, que se habían mantenido guardados a  $-80^\circ\text{C}$ .

Previa a la tinción se colocaron las láminas con los cortes de tejido por 10 minutos en PBS y se realizó un bloqueo con suero normal de carnero al 10% en PBS, incubando por 10 minutos, se quitó el exceso de líquido escurriendo cuidadosamente la lámina y se aplicaron 30  $\mu$ L de un anticuerpo policlonal anti-colágeno IV humano producido en conejo (Fitzgerald Industries International; MA) diluido 1:100 en una solución al 3% de suero normal de carnero en PBS, incubando durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó el tejido tres veces con PBS y se pusieron 30  $\mu$ L de un anticuerpo anti-conejo policlonal biotinilado hecho en carnero (DAKOCytomation; Glostrup, Dinamarca) diluido 1:400 con suero normal de carnero al 3% en PBS, con el cual se incubó por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS tres veces y finalmente se aplicó el conjugado estreptavidina-Cy3 (Zymed Laboratories, San Francisco, CA).

Para la inmunodetección de laminina se empleó un anticuerpo policlonal anti-laminina  $\gamma$ 1 humana hecho en carnero (Santa Cruz Biotechnology, CA) diluido 1:100 y con un anticuerpo secundario policlonal de conejo anti-carnero biotinilado, se utilizó el kit comercial TSA Biotin System (Perkin Elmer; Boston, MA), siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la inmunodetección del marcador VEGFR-2, según las indicaciones del fabricante.

.Para ambas tinciones se realizó una co-tinción con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) para detección de los núcleos en general en la totalidad del corte.

### **3.8.3 Determinación *in situ* de apoptosis en cortes de oreja de ratón.**

Con el fin de determinar si la metaloproteinasa BaP1 provoca la muerte por apoptosis de las células endoteliales en los vasos capilares u otros tipos celulares, se usó el kit ApoTag (Chemicon; Temecula, CA), el cual utiliza el método del TUNEL para detectar la fragmentación del ADN. Se tiñeron seis cortes de tejido tratado con la BaP1 (15  $\mu$ g/20 $\mu$ L) y tres sin tratar para cada tiempo, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante ([www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com)).

En los cortes se hizo, simultáneamente, una co-tinción para el VEGF-R2, siguiendo el protocolo previamente mencionado, así como con el Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Posteriormente se tomaron imágenes de tres campos de cada corte, para las tres tinciones. Se superpusieron las imágenes de las tinciones con kit ApoTag (Chemicon; Temecula, CA), con la tinción anti-VEGF-R2 y con el Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), usando el programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics) para determinar si las células que estaban sufriendo apoptosis eran endoteliales o si pertenecían a otras poblaciones celulares.

### **3.9 Análisis estadístico**

La significancia de las diferencias entre los promedios de los diferentes análisis cuantitativos se obtuvo por medio de análisis de variancia (ANOVA) utilizando el programa Statistica 6.0, donde un valor de  $p < 0.05$  se tomó como significativo. La significancia de las diferencias entre pares de promedios se analizó usando el test de Tukey.

## **CAPÍTULO 4**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Histología**

##### **4.1.1 Análisis Cualitativo**

Con el fin de caracterizar el desarrollo de los efectos provocados por la toxina BaP1 en el tejido de la oreja de ratón, se observaron al microscopio de luz y se describieron secciones de tejido en los diferentes tiempos seleccionados.

En las secciones control no se observó ningún tipo de alteración patológica, sino que presentaron los rasgos histológicos típicos de piel normal (Figura 8A). Una hora después de inyectada la toxina se produjo hemorragia, con abundantes eritrocitos en la dermis (Figura 8B), también se observó que el desarrollo de la misma fue heterogéneo en las dos caras separadas por el cartilago. La hemorragia fue mucho más intensa en el lado donde se inyectó la BaP1, mientras que la otra cara presentó sólo pequeños focos hemorrágicos. Un edema prominente también se observó a este tiempo, evidenciado por el aumento en el grosor de la oreja (Figura 8 B y C).

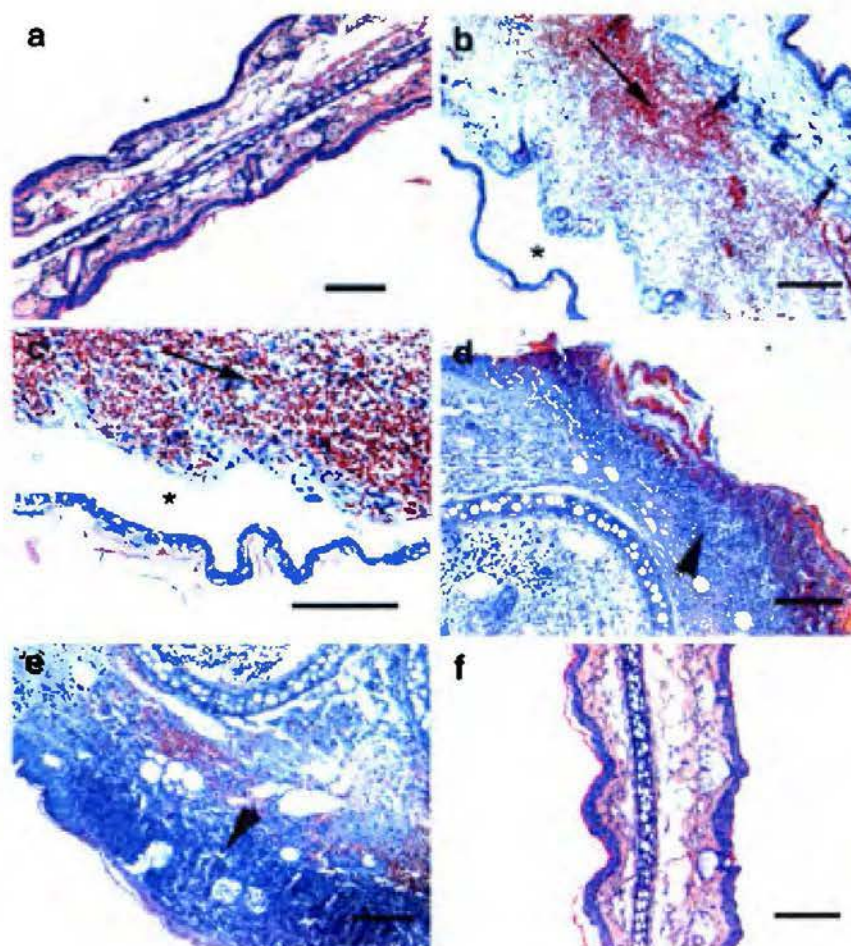
Otro importante fenómeno es la formación de ampollas, en las cuales se observó la separación de epidermis y dermis, que ocurrió entre 1 hora y 6 horas después de inyectada la BaP1 (Figura 8 G y H). Los eritrocitos extravasados permanecieron en la dermis y no se observaron en el espacio dejado por la separación de la unión dermis-epidermis, al formarse la ampolla (Figura 8 H e I).

Ciertas áreas perdieron la epidermis y se observó la deposición de un exudado proteico en la superficie de estas regiones desnudas, particularmente a las 24 y 72 horas luego del tratamiento con la metaloproteinasa BaP1 (Figura 8 D y E).

Después de las alteraciones patológicas iniciales se desarrolló una respuesta inflamatoria, a las 6 horas de inyectada la BaP1 (Figura 8C), la cual se evidenció por la presencia de edema y un abundante infiltrado de leucocitos, en el que los neutrófilos resultaron ser el tipo celular más abundante. Los leucocitos estaban en la dermis, inicialmente alrededor de las vénulas y luego distribuidos por toda la dermis, sólo muy pocas de estas células se observaron en la epidermis (Figura 8E).

El área superficial del exudado de fibrina se secó, formando un grano y en la zona más interna del exudado se formó una matriz de fibrina, en la cual se observaron células inflamatorias acumuladas, a las 24 horas (Figura 8) y se mantiene aún 7 días después.

La formación del tejido de granulación se observó a las 72 horas (Figura 8 E), finalmente fue evidente un proceso de re-epitelización, caracterizado por un incremento en el número de queratinocitos en los bordes de las zonas que habían perdido la epidermis, seguido por la migración de estas células bajo el grano, transcurridas 72 horas de ser aplicada la BaP1 (Figura 8E). La recuperación del tejido fue completa a los 14 días, el grosor de la oreja disminuyó, no se formó tejido de cicatrización y la apariencia de la misma llegó a ser muy similar a la de los animales control (Figura 8F).

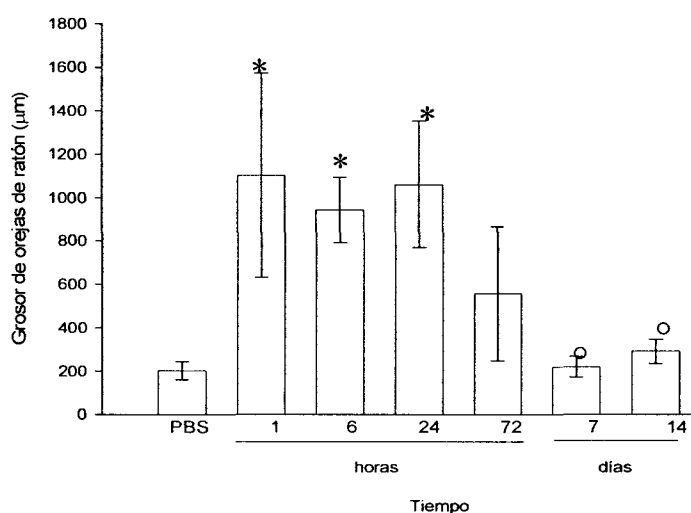


**Figura 4.** Micrografías de luz de secciones de piel de la oreja de ratones embebidas en parafina, inyectados i.d con (a) 20  $\mu$ L de PBS o (b-f) 6  $\mu$ g de BaP1 en 20  $\mu$ L de PBS. Tinción con hematoxilina y eosina. (a) Control, PBS 1 hora después de la inyección. (b) 1 y (c) 6 horas post-inyección. Adviértase el edema, la hemorragia (flecha) y la formación de ampollas (\*). (d) Después de 24 horas. Nótese el infiltrado inflamatorio (punta de flecha), exudado proteico, pérdida de epidermis. (e) Después de 72 horas, con tejido de granulación (punta de flecha) y proliferación de células epiteliales en los bordes de la epidermis desnuda (\*). (f) Después de 14 días, con apariencia histológica normal, incluyendo glándulas sebáceas y re-epitelización. Barras: 250 $\mu$ m (a, b, d-f) y 50  $\mu$ m en (c).

#### 4.1.2 Análisis Morfométrico

Una vez observado el desarrollo de la lesión provocada por la metaloproteinasa BaP1, se analizaron de forma cuantitativa diferentes aspectos del daño provocado por esta toxina.

En cuanto al edema, se encontró que hay un aumento significativo, en el grosor de las orejas de ratones, una hora después de inyectada la BaP1. Este incremento se mantiene hasta las 24 horas y ya a las 72 horas se registró una disminución importante en el edema, pero es hasta los 7 días cuando el grosor vuelve a ser muy similar al de los controles (Figura 9).



**Figura 5.** Grosor de las orejas de ratones ( $\mu\text{m}$ ) después de la inyección i.d, ya sea de 20  $\mu\text{L}$  de PBS o 15 $\mu\text{g}$  de BaP1 disueltos en 20  $\mu\text{L}$  de PBS. Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  DE ( $n=3$ ). (\*)  $P < 0,05$  cuando se compara con los animales inyectados con PBS; (°)  $P < 0,05$  cuando se compara con los resultados a 1, 6 y 24 horas.

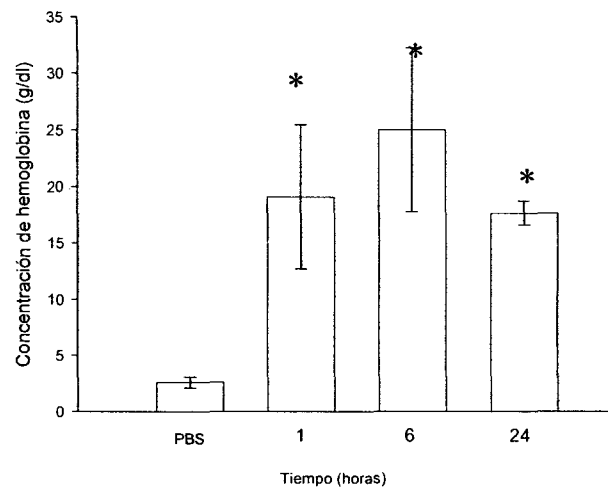
Otro efecto que se cuantificó fue la aparición de ampollas en la superficie del tejido, lo cual es especialmente evidente a la hora de aplicado el tratamiento, ya que se reporta un  $44 \pm 18\%$  del total de la interfase dermis-epidermis en el que se presentan ampollas. A las 6 y 24 horas el porcentaje de epidermis que presenta estas ampollas disminuye drásticamente, debido a que a estos tiempos se observó una pérdida de la epidermis en ciertas zonas, probablemente en regiones donde se habían formado ampollas. Por esto se midió también el porcentaje de superficie de dermis que no presentaba epidermis, es decir el porcentaje de denudación del tejido. Se observó que a las 6 horas es cuando hay una mayor tendencia al aumento en el porcentaje de denudación, sin embargo no hay una diferencia significativa con respecto a los animales control.



### 4.1.3 Cuantificación de Hemorragia

Como se mencionó anteriormente, a raíz de la inyección con la metaloproteinasa BaP1, se desarrolla hemorragia, que se evidenció por la aparición de una lesión, cuando se midió el área de dicha zona y se obtuvieron los diámetros respectivos se encontró que no hay diferencia significativa en el tamaño promedio de la lesión entre los diferentes tiempos.

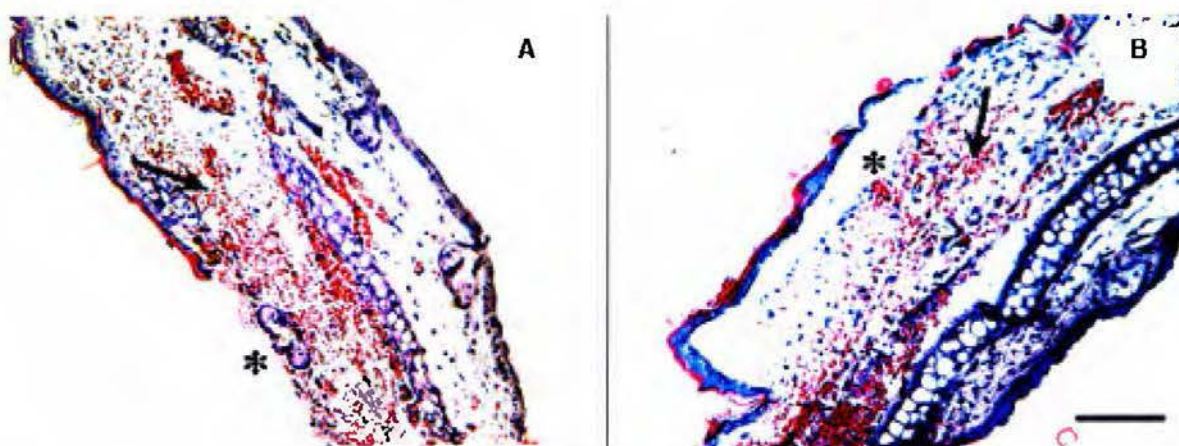
En cuanto a la concentración de hemoglobina se detectó un aumento, a partir de una hora después del tratamiento, manteniéndose hasta las 24 horas ( $p < 0.05$ ) (Figura 10).



**Figura 6.** Efecto hemorrágico de la BaP1 en la piel de orejas de ratones. Se inyectaron ratones i.d ya sea con 20  $\mu$ L de PBS o con 15 $\mu$ g de BaP1 en 20  $\mu$ L de PBS. Los resultados son expresados como promedio  $\pm$  DE (n=3). (\*)  $P < 0,05$  cuando se compara con ratones inyectados sólo con PBS.

### 4.1.4 Efecto de la depleción de neutrófilos sobre los eventos patológicos inducidos por la BaP1.

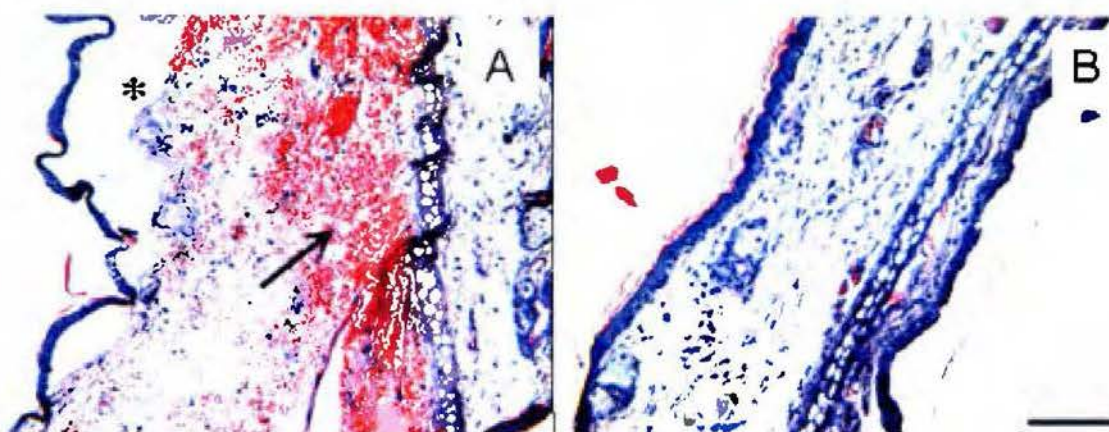
La depleción de neutrófilos, por la inyección de un anticuerpo monoclonal anti-granulocito, no modificó los efectos patológicos inducidos por la toxina. El único efecto observado fue la pérdida de los neutrófilos en el infiltrado inflamatorio en la dermis, pero la hemorragia y la formación de ampollas fueron similares en los ratones no neutropénicos y neutropénicos (Figura 11 A y B, respectivamente).



**Ilustración 5.** Efectos de la depleción de neutrófilos en las manifestaciones patológicas producidas por la BaP1. Tinción con hematoxilina y eosina. (A) Animales tratados con un anticuerpo monoclonal control (B) Animales tratados con un anticuerpo monoclonal anti-granulocitos, para inducir neutropenia, 6 horas después de la inyección de BaP1. Todos los ratones fueron inyectados después con 15  $\mu\text{g}$  de BaP1. Ambos grupos desarrollaron hemorragia local (flechas) y separación de dermis y epidermis (\*). Barra: 250 $\mu\text{m}$

#### 4.1.5 Inhibición de la actividad metaloproteínasa.

Los principales rasgos patológicos descritos, el edema, hemorragia y formación de ampollas, fueron totalmente inhibidos cuando la metaloproteínasa BaP1 fue incubada con el inhibidor de metaloproteínasas batimastast, demostrando así que estos efectos dependen de la actividad proteolítica de la enzima (Figura 12 A y B).

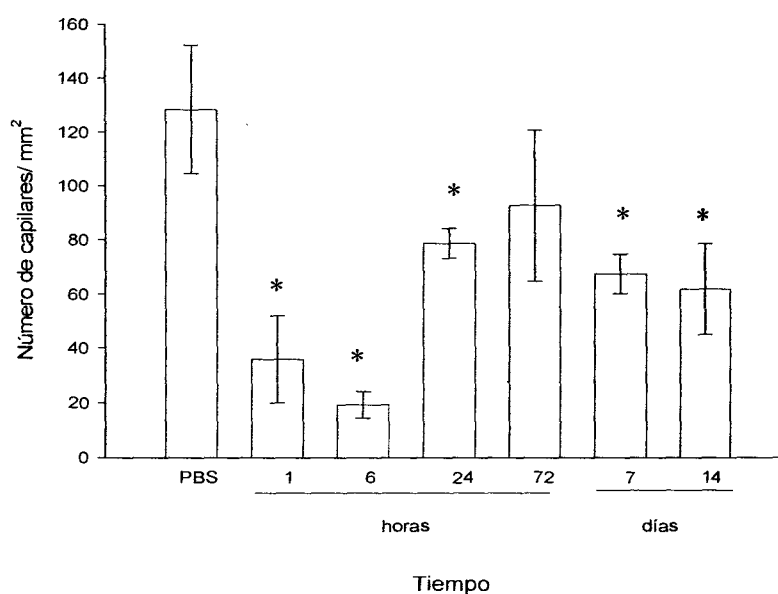


**Ilustración 6.** Inhibición de los efectos patológicos inducidos por la BaPI, por parte del inhibidor de metaloproteinasas batimastat. (A) Micrografía de luz de una sección del tejido de la oreja de un ratón inyectado con 15 µg de BaPI sin inhibidor. Obsérvese la hemorragia prominente (flecha) y la formación de ampollas (\*). (B) Sección de oreja de ratón inyectada con 15 µg de BaPI previamente incubada con 80 µM de batimastat. La hemorragia y formación de ampollas están ausentes. Barra: 250 µm.

## 4.2 Inmunohistoquímica

### 4.2.1 Detección por inmunofluorescencia del receptor del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (Flk-1 o VEGFR-2).

La inmunotinción con el anticuerpo anti-VEGFR-2 permitió determinar la densidad de capilares, siendo este un marcador de superficie de células endoteliales. Se encontraron diferencias en la densidad de microvasculatura entre los tiempos considerados ( $p < 0,05$ ). Se observó una drástica disminución en la densidad de capilares una hora después del tratamiento con la toxina, la cual se mantiene hasta las 6 horas. Inesperadamente se detectó un aumento prominente en la densidad de capilares a las veinticuatro horas, sin embargo aún no se alcanzó a recuperar la densidad observada en los controles. A las 72 horas la densidad aumenta a niveles similares a los controles, pero luego vuelve a descender, siendo significativamente diferente a la reportada para los controles. A la semana y dos semanas se llega a una estabilidad en la densidad de capilares, sin embargo no se recuperan los niveles observados en los animales control (Figura 1



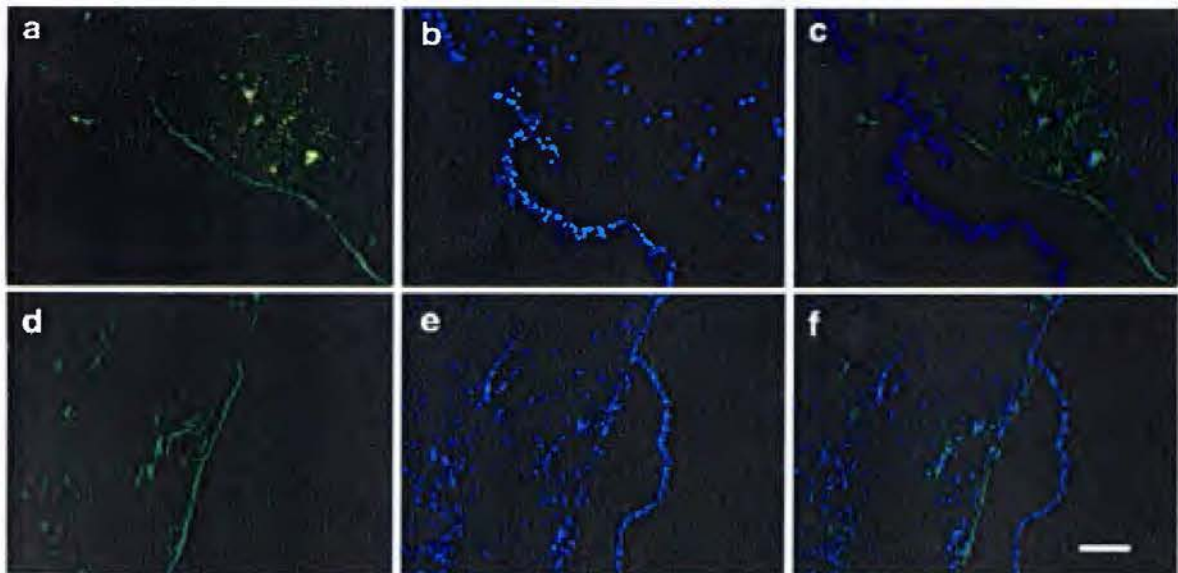
**Figura 7.** Densidad de microvasculatura en la oreja de ratones inyectados i.d con 20  $\mu$ L de PBS o con 15  $\mu$ g de BaP1 en 20  $\mu$ L de PBS. Las células endoteliales se visualizaron por medio de una inmunotinción con un anticuerpo anti-VEGFR2. Se consideraron como capilares aquellas estructuras con un diámetro menor a 10  $\mu$ m. La Densidad de Microvasculatura (DMV) se estimó como el número de capilares por mm<sup>2</sup>. Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  DE (n=3). \* P < 0,05 cuando se compara con valores de los ratones inyectados sólo con PBS.

#### 4. 2.2 Tinción de la lámina basal de la epidermis

Esta tinción se realizó con el fin de determinar si la lámina basal del tejido se veía afectada por la metaloproteinasa, BaP1. Se tiñó con dos anticuerpos dirigidos contra dos de los principales componentes de la lámina basal, el colágeno IV y la laminina.

Como se observa en la figura 14, en una zona de la epidermis donde hay formación de una ampolla, la tinción se observa principalmente en la región basal la ampolla, tanto en el caso del colágeno como en el de la laminina (Figura 14 B y E, flechas).

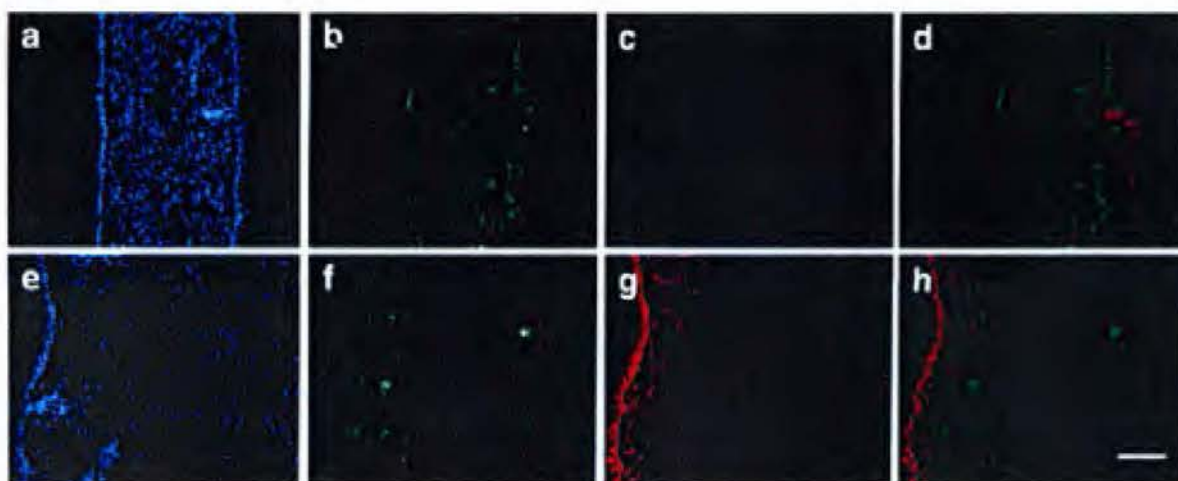




**Figura 8.** Inmunotinción de laminina y colágeno IV para detección de la lámina basal de epidermis. Criosecciones preparadas de orejas de ratones inyectados con 15  $\mu\text{g}$  de BaP1 en 20  $\mu\text{L}$  de PBS, 6 horas después de inyectada la BaP1. (a) Inmunotinción con anti-laminina  $\gamma$ -1 (d) Inmunotinción con anti-colágeno IV (b y e) Tinción de núcleos con Hoescht 33258. (b) Tinción con anti laminina. (e) Tinción con anti-colágeno IV. (c y f) Imágenes superpuestas de la tinción con Hoescht y (c) anti-laminina y (f) anti- colágeno IV. Barra: 250  $\mu\text{m}$

#### 4.2.3 Determinación *in situ* de apoptosis en cortes de oreja de ratón.

En el caso de la inmunotinción por la técnica de TUNEL, sorpresivamente no se encontró que las células endoteliales estuvieran muriendo por apoptosis; esto se distinguió claramente al realizar una superposición entre las imágenes de la tinción con anti-VEGFR2 y la del TUNEL, en un mismo segmento de tejido (Figura 15C). Sin embargo sí se observó muerte celular, en los bordes del tejido, probablemente en células epiteliales en la epidermis (queratinocitos) (Figura 15 B).



**Figura 9.** Tinción de TUNEL en secciones de oreja de ratón inyectadas con 20  $\mu$ L de PBS o con 15  $\mu$ g de BaPI disueltos en 20  $\mu$ L de PBS. Las secciones de tejido fueron simultáneamente teñidas con anticuerpos anti-VEGFR2, para visualizar células endoteliales y una tinción de núcleos con Hoechst 33258. (A-D) corresponden a una sección de tejido control, inyectados con PBS. (E-H) corresponden a cortes obtenidos 6 horas después de la inyección i.d de la BaPI. (A y E) tinción de Hoechst. (B y F) tinción con anti VEGFR-2. (C y G) tinción de TUNEL. (D y H) superposiciones de las tinciones para VEGFR-2 y de TUNEL. Barra: 250  $\mu$ m

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

Anteriormente se había observado que la aplicación de la metaloproteinasa hemorrágica, BaP1, originaba una serie de fenómenos a nivel local (Rucavado et al., 1995, 1998), los cuales se reprodujeron claramente en el modelo utilizado en este estudio y por lo tanto se lograron cuantificar.

Una hora después de inyectada la BaP1, se observó una hemorragia prominente, la cual es un efecto típico de esta metaloproteinasa, como se ha descrito anteriormente por Gutiérrez y colaboradores (1995a) y por Rucavado y colaboradores (1995). Sin embargo es importante destacar que la BaP1 pertenece al grupo P-I de las metaloproteinasas de veneno de serpiente (SVMPs por sus siglas en inglés) (Barrett *et al.* 1998; Gutiérrez y Rucavado, 2000), que se caracterizan por una débil actividad hemorrágica, tanto es así que se ha reportado para estas toxinas una dosis hemorrágica mínima diez veces mayor a la del veneno completo (Gutiérrez et al, 1995b).

Se observó que la intensidad de la hemorragia fue diferente en las caras anterior y posterior de la oreja, separadas por el cartílago. La hemorragia fue mucho más intensa en el lado donde se inyectó la BaP1, mientras que la otra mitad presentaba sólo pequeños focos hemorrágicos. Esto parece estar de acuerdo con la estructura y características propias del tejido de la oreja, pues el cartílago posee una pobre vascularización, por lo tanto el paso de moléculas se da principalmente por difusión (<http://wberesford.hsc.wvu.edu/histol.htm>), por ello el daño causado por la BaP1 sería menor en la cara opuesta de donde se aplicó la metaloproteinasa.

El aumento significativo en la concentración de hemoglobina indica que hay una extravasación prominente al poco tiempo de inyectada la metaloproteinasa, ya a la hora se encuentran diferencias importantes con respecto al control. La extravasación se produce a

nivel de capilares y vénulas; en estudios previos se han descrito alteraciones morfológicas de células endoteliales de capilares inducidas por esta enzima (Gutiérrez et al., 2006). Entre los cambios típicos descritos está la disminución en el número de vacuolas pinocíticas y el grosor de la célula disminuye, produciendo interrupciones en su continuidad, a través de las cuales ocurre hemorragia o extravasación *per rhexis* (Gutiérrez et al., 2005). No obstante el diámetro del área afectada no mostró variaciones significativas a los diferentes tiempos analizados, posiblemente porque con el pasar del tiempo el transporte de la toxina es empobrecido por el daño a capilares. Al carecer de un sistema de transporte de la toxina el efecto se concentra en el área donde fue inyectada la BaP1 y zonas inmediatas a ésta.

En este estudio se comprobó que existe una disminución significativa en el número de capilares a raíz de la inyección de la BaP1, lo que coincide con la hemorragia que se observa en el área afectada y que es a su vez un rasgo característico en animales tratados con BaP1, como se mencionó anteriormente.

Rucavado y colegas (2002) sugieren que la hemorragia que se presenta rápidamente, una vez que se ha aplicado la metaloproteinasa, se debe a su acción sobre la lámina basal de los vasos capilares. Existen pruebas de que ocurre hidrólisis de componentes de la membrana basal *in vitro* (Rucavado et al. 1995; Franceschi et al. 2000), sin embargo esto podría no reflejar lo que ocurre *in vivo*, ya que se ha detectado la degradación de componentes de la membrana basal *in vitro* sólo después de varias horas de incubación y no a los pocos minutos como ocurre la hemorragia *in vivo* (Gutiérrez et al., 2005).

Respecto a este tema, Gutiérrez y colegas (2005) proponen que la hemorragia puede deberse, ya sea a un efecto citotóxico directo de la metaloproteinasa en el endotelio o a mecanismos indirectos, secundarios a la acción de las SVMs en la membrana basal.

Al analizar la citotoxicidad en células endoteliales, se encontró que estas no estaban experimentando apoptosis, al menos a los tiempos analizados, sin embargo sí se detectó una señal apoptótica por parte de células en la epidermis, probablemente queratinocitos.



Una posible explicación para este hallazgo es que quizás algunas células endoteliales se despegan de su sustrato, al ser inyectada la BaP1, van a la circulación, permaneciendo viables por algunas horas, sin embargo después de un tiempo, es probable que mueran por anoikis o por razones relacionadas con la disrupción de la membrana plasmática, ya que se ha visto que ocurren alteraciones en la forma y grosor de las células endoteliales al ser expuestas a SVMPs (Gutiérrez *et al*, 2005). Estas células ya no serían detectadas en los cortes de tejido, sin embargo es posible que las células endoteliales que quedan unidas al sustrato, permanezcan viables y por lo tanto sean detectadas en la tinción con el anticuerpo anti-VEGFR2 aún después de la acción de la BaP1. Esto sería consistente con observaciones *in vitro*, en algunos casos no se observó citotoxicidad durante las primeras horas de incubación con las SVMPs, las células se despegan y permanecen viables por varias horas, inclusive si se lavan y se ponen con medio fresco se adhieren nuevamente al sustrato (Borkow *et al*. 1995). Algunas de las células permanecieron unidas al sustrato y viables (Borkow *et al*. 1995; Gutiérrez *et al*. 2005). Otra posibilidad para explicar la ausencia de apoptosis en endotelio podría ser que la acción de la BaP1 induce rápidamente necrosis de las células endoteliales, por lo que predomina este tipo de muerte celular y no la apoptosis.

En el caso de la apoptosis de queratinocitos se podría especular que esta se da por la pérdida de contacto de las células con su sustrato, ya que la adhesión parece ser uno de los principales rasgos que controlan la supervivencia de estas células (Gniadecki *et al*, 1998). Es fundamental recalcar que la apoptosis de queratinocitos se observó a lo largo de toda la epidermis, no sólo en las zonas en que se formaron ampollas. Consistentemente, en enfermedades que se caracterizan por presentar la formación de ampollas, conocidas como enfermedades acantolíticas, como es el caso de *Pemphigus vulgaris*, al realizar la tinción de TUNEL en cortes de tejido de individuos que padecen la enfermedad, se encontró que las células TUNEL positivas se encontraron no sólo en áreas de acantolisis sino incluso en epidermis que tenía una apariencia normal. Los autores sugieren que esto puede deberse a que el comienzo de la apoptosis es temprano en *Pemphigus* y que la fragmentación de ADN ocurre antes del desarrollo de la acantolisis (Gniadecki *et al*, 1998). También se menciona

el rol de las uniones adherentes y caderinas, señalándolas como posibles blancos en estas enfermedades. Se menciona que las uniones adherentes se pierden tardíamente, incluso después de la interrupción de los desmosomas (Gniadecki *et al*, 1998).

Otra posible explicación a la apoptosis sufrida por queratinocitos proviene del estudio de dos enfermedades que surgen como reacciones cutáneas al uso de ciertas drogas y en las que se produce desprendimiento de la epidermis y aparición de ampollas. Estas son la necrólisis tóxica epidermal (TEN) y el síndrome de Steven Johnson (SJS). French (2006) explica que la apoptosis de queratinocitos en la piel de pacientes con TEN está asociada con una alta expresión de FasL en la membrana de queratinocitos, como resultado ocurre la interacción entre el FasL y el Fas de células vecinas, desencadenando el proceso apoptótico.

Un fenómeno relacionado con la muerte de células en la epidermis, es la formación de ampollas, haciéndose evidentes una hora después de inyectada la BaP1 y manteniendo su aparición hasta las 6 horas. Rucavado y colegas (1998) habían descrito la formación de ampollas en la piel de ratones inyectados intramuscularmente con una dosis de 80µg de BaP1. En estos se observaron ampollas a partir de la hora de aplicación de la toxina y hasta las 12 horas. Aparentemente la membrana basal permanece unida a la dermis y se sugiere que la BaP1 afecta proteínas que participan en uniones intercelulares, como la integrina  $\alpha 6\beta 4$ , que forma parte de los hemidesmosomas, también que esta metaloproteinasa podría afectar filamentos de anclaje.

El hecho de que el porcentaje de piel que presentaba ampollas disminuyera drásticamente a las 6 horas se explica con la observación de que es a este mismo tiempo que el porcentaje de denudación aumenta, lo que significa que la epidermis que se había separado de la dermis formando la ampolla se pierde a este tiempo.

En consistencia con estas observaciones, no se encontró evidencia de que la laminina y el colágeno fueran degradados completamente por la BaP1; esto apoya la tesis de que la metaloproteinasa actúa principalmente en las uniones intercelulares y provoca con ello el

desprendimiento de la epidermis. Este hecho se refleja en observaciones realizadas en los cortes histológicos, en los que se ve claramente que a las 24 horas hay pérdida de la epidermis en algunas secciones del tejido donde se inyectó la toxina. No obstante existen estudios en los cuales se ha observado que la BaP1 degrada el colágeno IV y la laminina de la membrana basal de capilares *in vitro*. *In vivo* esta posibilidad es apoyada por el hallazgo de productos de degradación tanto de laminina como de colágeno (Rucavado *et al*, 1998) y por evidencia inmunohistoquímica de pérdida de estos antígenos de membrana basal (Escalante *et al.*, 2006), por lo tanto este es un tema que requiere atención y en el que se debe profundizar aún más.

Según Gremski y colegas (2007) las mordeduras de serpientes pertenecientes al género *Bothrops* están caracterizadas por un edema local prominente, lo cual coincide con lo observado en este estudio. A la hora de inyectada la BaP1 se da la aparición de edema, es decir un aumento de grosor de la oreja afectada, que según lo observado, se mantiene hasta las 24 horas y se da una disminución drástica a las 72 horas. Asimismo se había observado un efecto similar de la BaP1 en músculo (Gutiérrez *et al*, 1995c). Esto concuerda también con los resultados de Olivo y colegas (2007), que reportan una rápida aparición del edema, posterior a la inyección del veneno completo de *B. asper*, entre 30 minutos y 1 hora. Con base en estos resultados y los obtenidos en este estudio se podría formular la hipótesis de que la BaP1 es uno de los principales compuestos del veneno involucrados en el desarrollo del edema, ya que aparentemente el efecto edematizante del veneno completo se mantiene aún inyectando sólo la BaP1.

En cuanto al mecanismo de formación del edema se sabe que hay mediadores de inflamación como histamina, serotonina, factores derivados del complemento, metabolitos de lipo y ciclooxigenasas y citoquinas (Chaves *et al*, 1995; Olivo *et al*, 2007) que afectan la estabilidad de la microvasculatura, aumentando la permeabilidad vascular e induciendo extravasación (Gremski *et al*, 2007). La ciclooxigenasa (COX) es la enzima encargada de catalizar la biosíntesis de las prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La prostaglandina E<sub>2</sub> es uno de los principales productos de la ciclooxigenasa, que contribuye a incrementar localmente el flujo sanguíneo, la formación del edema y la sensación de

dolor (Olivo *et al*, 2007). Se ha observado que la interferencia en el metabolismo del ácido araquidónico utilizando diferentes drogas reduce significativamente el edema, demostrando así que la formación de este es mediada, al menos en parte, por productos de COX (Olivo *et al*, 2007; Dias Araújo *et al*, 2007).

Fernandes y colegas (2007) demostraron que la inyección de BaP1 en las articulaciones de ratones provoca un aumento en la expresión de COX-2 y posteriormente de PGE2, produciendo a su vez un incremento en el flujo de células polimorfonucleares, especialmente neutrófilos.

También el óxido nítrico (NO) parece jugar un papel importante en el desarrollo del edema. Chaves y colegas (2006) pre-trataron las patas de ratones con un L-NAME y con aminoguanidina, ambos inhibidores de la óxido nítrico sintasa y estudiaron el efecto de tal inhibición en el edema inducido por el veneno de *B. asper*. Se encontró que el tratamiento con L-NAME redujo significativamente el edema, indicando esto no sólo que el óxido nítrico juega parte importante en este fenómeno, sino también que eNOS es la que está relacionada con este proceso, en vista de que no hubo cambio en el porcentaje de edema al utilizar la aminoguanidina, un inhibidor selectivo de la NOS inducible.

Como parte del análisis de la respuesta inflamatoria, que se desarrolla a partir de la inyección de la metaloproteinasa BaP1, se observó la aparición de un infiltrado inflamatorio, inicialmente de neutrófilos, a las 6 horas post-inyección de la toxina, este es un rasgo que coincide con observaciones previas (Zamuner *et al*, 2005), lo cual resulta lógico dado que es bien conocido que una de las funciones más importantes de los neutrófilos es la eliminación de agentes injuriantes en el sitio de la inflamación (Janeway *et al*, 1999).

Se estudió si los neutrófilos juegan un papel en el desarrollo de los eventos patológicos desencadenados por la BaP1 mencionados anteriormente, como son la formación de ampollas y la hemorragia. En el presente estudio no se encontraron diferencias entre ratones neutropénicos y ratones control, se presenta igualmente hemorragia y formación de

ampollas en ambos grupos de ratones. Estos resultados concuerdan con lo observado por Texeira *et al* (2003), en este caso se provocó la depleción de los neutrófilos y luego se inyectó el veneno completo de *B. asper* y tampoco se encontró evidencia de que estas células estén involucradas en la hemorragia o formación de ampollas. Lo mismo se observó al inyectar el veneno completo de *B. jararaca*; después de la depleción de neutrófilos, no se dieron cambios aparentes en el desarrollo del daño a nivel local (Texeira *et al*, 2005). Con base en los resultados obtenidos y apoyándose en los trabajos ya discutidos se puede decir que los neutrófilos no parecen tener un rol determinante en el desarrollo de los efectos a nivel local en el caso de *B. asper* y *B. jararaca* y posiblemente en el resto de envenenamientos por *Bothrops sp.*

La pre-incubación de la metaloproteinasa BaP1 con el inhibidor peptidomimético de metaloproteinasas, batimastat, demostró que los efectos observados localmente en el tejido, como hemorragia, edema y formación de ampollas, sí son producto de la acción proteolítica de esta toxina, ya que al inhibir la BaP1 con el batimastat se eliminaron estos efectos que son característicos del envenenamiento por *B. asper*. Previamente ya se había probado que al inyectar el batimastat en el mismo sitio donde se aplicó una dosis del veneno de *B. asper*, se da una inhibición de la dermonecrosis, el edema y la hemorragia (Rucavado *et al*, 2000) y que este inhibidor también elimina por completo los efectos patológicos inducidos por BaP1 en tejido muscular (Escalante *et al.*, 2000).

El batimastat y otros inhibidores de metaloproteinasas pueden prevenir el desarrollo del daño local en el tejido, no sólo por acción directa sobre estas enzimas, sino también por modulación de la producción de citoquinas y degradación de la matriz extracelular por MMPs sintetizadas como parte de la respuesta inflamatoria (Escalante *et al*, 2000).

Es importante señalar que los efectos de la inhibición por parte del batimastat no se limitan únicamente al aspecto local pero también a nivel sistémico, Rucavado y colegas (2004) describen la inhibición de la hemorragia pulmonar en ratones, indicando que anula la acción de metaloproteinasas hemorrágicas que actúan sistémicamente. También se demostró en dicho estudio que este inhibidor bloquea el efecto de las metaloproteinasas

pro-coagulantes. Sin embargo, *in vitro*, no toda la actividad coagulante desaparece, por lo que se sugiere que los fenómenos que no son abrogados por este inhibidor se deben a serinoproteinasas, probablemente a la asperasa, una enzima ‘tipo-trombina’ (Pérez *et al.*, 2008).

Dentro de la serie de observaciones histológicas que surgieron a raíz de la inyección de la BaP1 en las orejas de ratones, se destaca que a las 72 horas se formó tejido de granulación y el inicio de un aparente proceso de re-epitelización, lo cual curiosamente coincide con el momento en que se observa que la densidad de microvasculatura retorna a los valores registrados en los animales control. Esto es interesante al compararlo con datos de estudios previos en los que se ha comprobado que la buena regeneración del músculo está directamente relacionada a una buena irrigación sanguínea en la zona afectada (Gutiérrez *et al.*, 1986; Neto y Marques, 2005). Gutiérrez y colegas (1995c) compararon la regeneración después de la inyección intramuscular de la BaH1, una metaloproteinasa hemorrágica del veneno de *B. asper* y la miotoxina II, la cual afecta directamente la fibra muscular, sin interrumpir la adecuada irrigación sanguínea. Se encontró que con la miotoxina a los 7 días se desarrolla un proceso de regeneración normal y exitoso, a diferencia de lo ocurrido con la BaH1, en donde a los 7 días se observa tejido de granulación y no hay una regeneración completa del músculo. Con base en estas observaciones se podría especular que al restablecerse el flujo sanguíneo en el tejido, en este caso la oreja de ratón, se inicia un proceso de regeneración que al cabo de 14 días aparenta ser completo.

También relacionado al proceso regenerativo, Texeira y colegas (2003) mencionan la importancia de los neutrófilos en la renovación del músculo después de ser inyectado con el veneno completo de *B. asper*. En este caso se observó que en ratones neutropénicos se desarrolló un proceso regenerativo incompleto, según los autores esto se debe a que estas células cumplen dos importantes funciones en la regeneración de los tejidos, primero la fagocitosis del material necrótico y segundo el reclutamiento y activación de macrófagos; asimismo se sabe que los neutrófilos proveen señales para iniciar la quimiotaxis de células inflamatorias adicionales, como monocitos, células T y más neutrófilos. A la luz de estos resultados es muy probable que el reclutamiento de neutrófilos a la zona afectada por la

metaloproteinasa BaP1, observado en el presente estudio, también explique en parte la buena regeneración que se desarrolló este modelo.

En conclusión, el presente estudio demuestra que en el modelo utilizado los efectos reportados previamente se reproducen de la misma forma. La densidad de microvaculatura disminuye rápidamente, lo cual explicaría en parte la hemorragia producida, además se observó que el proceso de recuperación del tejido se da a los 14 días después del daño provocado por la metaloproteinasa. Al realizar la tinción de TUNEL, se determinó que las células endoteliales no experimentaron apoptosis, sin embargo los queratinocitos a lo largo de la epidermis sí, lo cual no fue un fenómeno exclusivo de áreas donde aparecieron las ampollas. Las tinciones con anticuerpos anti-colágeno IV y anti-laminina revelaron que estos componentes no son completamente degradados por la BaP1 y que a la vez parecen permanecer en el área basal de la ampolla.

## CONCLUSIONES

La inyección intradérmica de la metaloproteinasa BaP1 en las orejas de ratones produce una serie de alteraciones en el tejido, que coinciden con los efectos causados en un envenenamiento por *Bothrops asper*, por lo tanto se puede concluir que este es un buen modelo experimental para el estudio de la patología inducida por venenos de serpiente en la piel.

Pocas horas después de la inyección de la BaP1 se observa una disminución significativa en la densidad de microvasculatura de la piel. Sin embargo, después del daño agudo inducido por la toxina en los vasos sanguíneos, se aprecia una rápida recuperación en el número de capilares en la piel. A los 14 días de inyectada la metaloproteinasa se observa la regeneración total del tejido, alcanzándose densidades de capilares similares a las de los controles.

La presencia o ausencia de neutrófilos en el tejido no afecta el desarrollo de ninguno de los efectos locales desencadenados por la aplicación de la metaloproteinasa, como son hemorragia, edema y formación de ampollas.

La metaloproteinasa BaP1 induce apoptosis de células epiteliales de la epidermis, lo cual se podría especular ocurre por la pérdida de contacto de las células con su sustrato, ya que la adhesión es uno de los principales rasgos que controlan la supervivencia de estas células.

La BaP1 no provoca apoptosis *in vivo* de las células endoteliales en los vasos capilares de la piel, por lo menos en las condiciones experimentales de este trabajo. Se puede especular entonces que la apoptosis de células endoteliales no es un mecanismo que contribuye en el desarrollo de la hemorragia producida por la BaP1.



Se encontró evidencia de que la BaP1 posiblemente degrada componentes de la unión dermis-epidermis a nivel de la lámina lúcida, lo que provocaría la separación de la epidermis de los componentes de la lámina basal en la lámina densa, esto a su vez señala que la lámina densa y la lúcida podrían presentar diferentes susceptibilidades a la BaP1.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

La metaloproteinasa BaP1, presente en el veneno de *Bothrops asper*, ha demostrado ser uno de los principales componentes del mismo, ya que su sola presencia desencadena algunos de los rasgos característicos del envenenamiento inducido por el veneno de esta serpiente.

Es necesario un estudio más profundo en cuanto a la degradación de la lámina basal de la epidermis por parte de la BaP1 y las implicaciones que esto puede tener en el proceso normal de regeneración que se observa en este modelo. Además, relacionado con el punto anterior sería importante ahondar en los mecanismos celulares los mediadores solubles que median este rápido proceso de recuperación del tejido.

Asimismo se puede ahondar en el tema de la apoptosis observada en queratinocitos, para determinar con exactitud qué evento desencadena este efecto y su relación con la formación de ampollas, es decir con el desprendimiento de la epidermis, ya que la apoptosis de los queratinocitos no se vio exclusivamente en las zonas donde aparecieron las ampollas.

## BIBLIOGRAFÍA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4<sup>th</sup> ed. Garland Science, New York, 2002. 1462 pp.

Aird WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J. Throm. Haemost.* 2005; 3 (7): 1392-406.

Arce V, Brenes F, Gutiérrez J.M. Degenerative and regenerative changes in murine skeletal muscle after injection of venom from the snake *Bothrops asper*: a histochemical and immunocytochemical study. *Int. J. Exp. Pathol.* 1991; 72 (2): 211-26.

Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF., Eds. Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press. San Diego, California. 1998. 1666p.

Benouchan M, Colombo B.M. Anti-angiogenic strategies for cancer (Review). *Int. J. Oncol.* 2005; 27: 563-71.

Beresford W. A. Histology. Anatomy Department, School of Medicine, West Virginia University, Morgantown, WV 26506-9128, USA.

<http://wberesford.hsc.wvu.edu/histol.htm>.

Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic Toxins from Snake Venoms. *J. Toxicol.* 1989; 7(2): 121-209.

Borkow G, Lomonte B, Gutiérrez JM, Ovadia M. Effect of various viperidae and crotalidae snake venoms on endothelial cells *in vitro*. *Toxicon.* 1994; 32(12): 1689-95.

Borkow G, Gutiérrez JM, Ovadia M. *In vitro* activity of BaH1, the main hemorrhagic toxin of *Bothrops asper* snake venom on bovine endothelial cells. *Toxicon*. 1995; 33(10): 1387-91.

Carmeliet P, Moons L, Collen D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc. Res*. 1998; 39: 8–33.

Carmeliet P. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med*. 2000; 6(3):389-95.

Chan L.S. Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Frontiers in Bioscience* 2, 1997: 343-52.

Chaves F, Barbosa M, Gutiérrez J.M. Pharmacological study of oedema induced by venom of the snake *Bothrops asper* in mice. *Toxicon*. 1995; 33:31-9.

Chaves F, Texeira C.F.P, Gutiérrez J.M. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. *Inflamm. Res*. 2006; 55: 245-53.

Chippaux J-P. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Health Organization*. 1998; 76 (5): 515- 24.

Chung-Hyun C, Hoon-Ki S, Kyung-Tae K, Hye Gyeong C, Goo Taeg O, Hyo Jeong H, Ook-Joon Y, and Gou Young K. COMP-angiopoietin-1 promotes wound healing through enhanced angiogenesis, lymphangiogenesis, and blood flow in a diabetic mouse model. *PNAS*. 2006; 103 (13): 4946-51.

Cines D.B, Pollak E.S, Buck C.A, Loscalzo J, Zimmerman G.A, McEver R.P, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; 91 (10): 3527-61.

Der Rechtsmedizin Z. Enzymes in snake venoms: An Overview. En: Enzymes from snake venom (Bailey GS Ed). Alaken, Inc. Colorado. 1998. 735pp.

Dias Araújo S, Souza A, Nunes F.P, Gonçalves L.R. Effect of dexamethasone associated with serum therapy on treatment of *B. jararaca* venom-induced paw edema im mice. *Inflamm. Res.* 2007; 56: 409-13.

Díaz C, Valverde L, Brenes O, Rucavado A, Gutiérrez JM. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endotelial cells. *J. Cell. Biochem.* 2005; 94: 520-8.

Domonkos A.N. Andrews. Tratado de dermatología 2<sup>nd</sup> ed. Salvat Editores. New York, E.U.A. 1975. 1078pp.

Drugge R, Dunn H. The electronic textbook of dermatology. The Internet Dermatology Society.

Egginton S, Zhou A.L, Brown M.D, Hudlicka O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc. Res.* 2001; 49: 634-46.

Escalante T, Franceschi A, Rucavado A, Gutiérrez J.M. Effectiveness of batimastat , synthetic inhibitor of matrix metalloproteinase, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochemical Pharmacology.* 2000; 60:269-74.

Escalante T, Rucavado A, Kamiguti A S, Theakston RD, Gutiérrez J M. *Bothrops asper* metalloproteinase BaP1 is inhibited by  $\alpha$ -2 macroglobulin and mouse serum and does not induce systemic hemorrhage or coagulopathy. *Toxicon.* 2004; 43: 213- 7.

Escalante T, Shannon J, Moura-da-Sila A.M, Gutiérrez J.M, Fox J. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. Arch. Biochem. Biophysics. 2006; 455 (2): 144-153.

Fernandes C.M, Teixeira C.F.P, Leite A.C.R.M, Gutiérrez J.M, Rocha F.A.C. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF- $\alpha$  and PGE2-dependent mechanisms. British Journal of Pharmacology. 2007; 151: 1254-61.

Fernandes I, Cormont F, Latinne D, Bazin H, Takehara HA, Mota I. A rapid and efficient purification method for horse IgG(T) using a rat monoclonal antibody. Braz. J. Med. Biol. Res. 1991; 27 (11): 2599-606.

Forslind B, Lindberg M, Roomans G.M, Pallon J, Werner-Linde Y. Aspects on the physiology of human skin: studies using particle probe analysis. Microscopy Research Technique. 1997; 38: 373-86.

Fox J W, Serrano S M T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. Toxicon. 2005; 45: 969-85.

Francisci 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. 2000; 38: 63-77.

French L.E. Toxic epidermal necrolysis and Steven Johnson syndrome: our current understanding. Allergol Internat. 2006; 55: 9-16.

Fryer B.H, Field J. Rho, Rac, Pak and angiogenesis: old roles and newly identified responsibilities in endothelial cells. Can. Lett. 2005; 229: 13-23.

Gallagher P, Baoa Y, Serrano S. M.T, Kamiguti, Theakston D, Fox J. W. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of the snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicon*. 2003. 41: 429-4.

Gerberick G.F, Ryan C.A. A predictive mouse ear-swelling model for investigating topical photoallergy. *Food Chem. Toxicol*. 1990; 28 (5): 361-8.

Gilmore A.P. Anoikis. *Cell Death Differ*. 2005; 12: 1473-7.

Gniadechi R, Jemec G, Thomsen B. M, Hansen M. Relationship between keratinocyte adhesion and death: anoikis in acantholytic diseases. *Arch Dermatol Res*. 1998. 290: 528-32.

Gremski L.H, Chaim O.M, Paludo K.S, Sade Y.B, Otuki M.F, Richardson M, Gremski W, Sanchez E.F, Veiga S.S. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon*. 2007; 50: 120-34.

Gutiérrez J.M. Clinical toxicology of snakes bites in Central America. En: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons* (Meier J, White J., Eds). CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1995; pp 645-65. (1)<sup>(a)</sup>

Gutiérrez JM, Romero M, Díaz C, Borkow G, Ovadia M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 1995; 33:19-29.(2)<sup>(b)</sup>

Gutiérrez J.M, Romero M, Núñez J, Chaves F, Borkow G, Ovadia M. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Exp. Mol. Pathol*. 1995; 62: 28-41.<sup>(c)</sup>

Gutiérrez JM. Envenenamiento ofídico. En: Pediatría. Tomo I. 5ta ed. (Menenghello J, Fanta E, Paris E, Puga T). Editorial Panamericana, 1997)

Gutiérrez J.M. Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigación en América Latina. Rev. Biol. Trop. 2002; 50(2): 377-94.

Gutiérrez J.M, Chaves F, Mata E, Cerdas L. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom. Toxicon. 1986; 34 (3): 223-31.

Gutiérrez J.M, Ownbny C.L, Odell G.V. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). Toxicon. 1984; 22(5): 719-31.

Gutiérrez J.M, Rucavado A. Snake venoms metalloproteinases: Their role in the patogénesis of local tissue damage. Biochimie. 2000; 82: 841-50.

Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venoms metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon. 2005; 45: 997- 1011.

Gutiérrez J.M, Núñez J, Escalante T, Rucavado A. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. Microvasc. Res. 2006; 71: 55-63. (a)

Gutiérrez J.M, Rojas G, Aymerich R. El envenenamiento por mordedura de serpiente en Centroamérica. Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado. 2006. (b)

Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, Jacobsen SE, Dubois CM, Kopp WC, Longo DL, Keller JR. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. J. Immunol. 1991; 147 (1): 22-8.



Jäättelä M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*. 2004; 23: 2746- 56.

Janeway C.A, Travers P, Walport M, Capra J.D. Immunobiology. The immune system in health and disease. 4<sup>th</sup> ed. Garland Editorial. 1999. 635pp.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature Rev*. 2003; 3: 422-33.

Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P *et al*. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death Differ*. 2005; 12: 1463-7.

Lomonte B, Gutiérrez JM, Borkow G, Ovadia M, Tarkowski A, Hanson L. Activity of hemorrhagic metalloproteinase BaH-1 and myotoxin II from *Bothrops asper* snake venom on capillary endothelial cells *in vitro*. *Toxicon*. 1994; 32(4): 505-10.

Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1477: 146-56.

Melino G, Knight R.A, Nicotera P. How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ*. 2005; 12: 1457-62.

Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle J.L, Haas T. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 2006; 38: 333-42.

Narula J, Haider N, Arbustini E, Chandrashekhar Y. Mechanisms of disease: apoptosis in heart failure- seeing hope in death. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med*. 2006; 3(12): 681- 8.

Neto H.S, Marques M.J. Microvessel damage by *B. jaracussu* snake venom: pathogenesis and influence on muscle regeneration. *Toxicon*. 2005; 46: 814-9.

Olivo R.A, Texeira C.F.P, Wallace J.L, Gutiérrez J.M, Zamuner S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of bothropic venoms. *Toxicon*. 2007; 49: 670-7.

Pereira CF, Fernandez CM, Pavan J, Zamuner SF. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2005; 100 (1): 181- 4.

Pérez A.V, Rucavado A, Sanz L, Calvete J.J, Gutiérrez JM. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Baz. J. Med. Biol. Res*. 2008; 41(1): 12-7.

Pourtier-Manzanedo A, Vercamer C, Van Belle E, Mattot V, Mouquet F, Vandebunder B. Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model. *Oncogene*. 2003; 22:1795-806.

Rucavado A, Escalante T, Franceschi A, Chaves F, León G, Cury Y, Ovadia M, Gutiérrez JM. Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor Batimastat and the chelating agent CaNa<sub>2</sub>EDTA. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2000. 63 (5,6): 313-9.

Rucavado A, Escalante T, Gutiérrez J.M. Effect of the metalloproteinase inhibitor batimastat in the systemic toxicity induced by *Bothrops asper* snake venom : understanding the role of metalloproteinases in envenomation. *Toxicon*. 2004; 43: 417-34.

Rucavado A, Escalante T, Texeira C, Fernández C. M, Díaz C, Gutiérrez J.M. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators of Inflammation*. 2002. 11: 121-8.

Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Experim. Mol. Pathol.* 1995. 63: 186-99.

Rucavado A, Núñez J, Gutiérrez JM. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp. Path.* 1998. 79: 245- 54.

Sasa M, Vazquez S. Snakebite envenomation in Costa Rica: a revision of incidence in the decade 1990-2000. *Toxicon.* 2003; 41: 19-22.

Schimming B.C, Vicentini C.A. Estudio histoquímico del epidídimo en el perro (*Canis familiaris, L*). *Rev. Chil. Anat.* 2000; 18 (1): 69-74.

Solórzano A. Serpientes de Costa Rica. Distribución, taxonomía e historia natural. Editorial Instituto Nacional de Biodiversidad. Costa Rica. 2004. 791pp.

Steller-Stevenson W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J. Clin. Inv.* 1999; 103 (9): 1237-41.

Texeira C.F.P, Zamuner S.R, Zuliani J.P. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops aspersnake* venom. *Muscle Nerve.* 2003; 28: 449-59.

Texeira C.F.P, Chaves F, Zamuner S.R, Fernandes C.M, Zuliani J.P, Cruz-Hofling M.A, Fernandes I, Gutiérrez J.M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int. J. Exp. Path.* 2005; 86:107-15.

Valentijn A, Zouq N, Gilmore A.P. Anoikis. *Biochem. Soc. Transac.* 2004; 32: 421-4.

Vermeulen P.B, Gasparini G, Fox S.B, Colpaert C, Marson L.P, Gion M, Belie J.A.M, Waal R.M, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris A.L, Dirix L.Y. Second International consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur. J. Cancer.* 2002; 38: 1564-79.

Watanabe L, Shannon J.D, Valente R.H, Rucavado A, Alape-Girón A, Kamiguti A.S, Theakston R.D, Fox J.W, Gutiérrez J.M, Arni R.K. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Science.* 2003; 12:2273–81.

Weiss L. *Histology. Cell and Tissue Biology.* 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Publishing Co, Inc. New York. 1983.1219 pp.

White J. Snake venom and coagulopathy. *Toxicon.* 2005; 45: 951- 67.

Zamuner S.R, Zuliani J.P, Fernandes C. M, Gutiérrez J.M, Texeira C.F.P. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon.* 2005; 46: 806-13.

## **APÉNDICE**

# Skin Pathology Induced by Snake Venom Metalloproteinase: Acute Damage, Revascularization, and Re-epithelization in a Mouse Ear Model

Natalia Jiménez<sup>1</sup>, Teresa Escalante<sup>1</sup>, José María Gutiérrez<sup>1</sup> and Alexandra Rucavado<sup>1</sup>

Viperid snakebite envenomation induces blistering and dermonecrosis. The pathological alterations induced by a snake venom metalloproteinase in the skin were investigated in a mouse ear model. Metalloproteinase BaP1, from *Bothrops asper*, induced rapid edema, hemorrhage, and blistering; the latter two effects were abrogated by preincubation with the metalloproteinase inhibitor batimastat. Neutrophils did not play a role in the pathology, as depletion of these cells resulted in a similar histological picture. Blisters are likely to result from the direct proteolytic activity of BaP1 of proteins at the dermal-epidermal junction, probably at the lamina lucida, as revealed by immunostaining for type IV collagen and laminin. Widespread apoptosis of keratinocytes was detected by the TUNEL assay, whereas no apoptosis of capillary endothelial cells was observed. BaP1 induced a drastic reduction in the microvessel density, revealed by immunostaining for the endothelial marker vascular endothelial growth factor receptor-2. This was followed by a rapid angiogenic response, leading to a partial revascularization. Skin damage was followed by inflammation and granulation tissue formation. Then, a successful re-epithelization process occurred, and the skin of the ear regained its normal structure by 2 weeks. Venom metalloproteinase-induced skin damage reproduces the pathological changes described in snakebitten patients.

*Journal of Investigative Dermatology* advance online publication, 1 May 2008; doi:10.1038/jid.2008.118

## INTRODUCTION

Envenomations by snakes of the family Viperidae, comprising true vipers and pit vipers, are characterized by a prominent and complex series of pathological alterations at the site of venom injection. These include edema, hemorrhage, necrosis of skeletal muscle, and diverse alterations in the skin, including blistering and dermonecrosis (Warrell, 1996, 2004; Gutiérrez and Lomonte, 2003). Important advances have been made toward understanding the pathogenesis of hemorrhage and myonecrosis in viperid snakebite envenomation (see reviews by Gutiérrez and Ownby (2003), Fox and Serrano (2005), and Gutiérrez *et al.* (2005)). However, the study of the pathological alterations induced by these venoms in the skin has received little attention, despite its clinical relevance.

Many snake venoms induce dermonecrosis when injected intradermally (i.d.), (Theakston and Reid, 1983). The histological features of dermonecrosis after injection of the venom of the spitting cobra, *Naja nigricollis* (family Elapidae), were described (Iddón *et al.*, 1987). On the other hand, the main pathological manifestations of skin pathology in viperid snakebite envenomation, that is, dermonecrosis and blistering, were reproduced in a mouse model after the intramuscular injection of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops asper* (Rucavado *et al.*, 1998). However, the characterization of the pathological events was performed on a qualitative basis only, and a more detailed understanding of these effects induced by venom components is pending.

The study of snake venom-induced skin pathology is relevant from another perspective, that is, as a model to understand dermonecrosis and blister formation from a broader perspective. A variety of diseases, including inherited deficiencies of proteins involved in the dermal-epidermal junctions (Uitto *et al.*, 1997), autoimmune diseases (Schmidt and Zillikens, 2000), and toxicity by natural and synthetic compounds (for example, brown recluse spider venom, sulfur mustard, and lewisite) (King *et al.*, 1994; Tambourgi *et al.*, 2005; Greenberg *et al.*, 2006), affect the skin, causing vesication, blistering, and necrosis. Owing to the

<sup>1</sup>Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

Correspondence: Dr Alexandra Rucavado, Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. E-mail: arucavad@cariari.ucr.ac.cr

Abbreviations: MMP, matrix metalloproteinase; MVD, microvascular density; PBS, phosphate-buffered saline; VEGFR-2, vascular endothelial growth factor receptor-2

Received 30 December 2007; revised 19 February 2008; accepted 29 February 2008

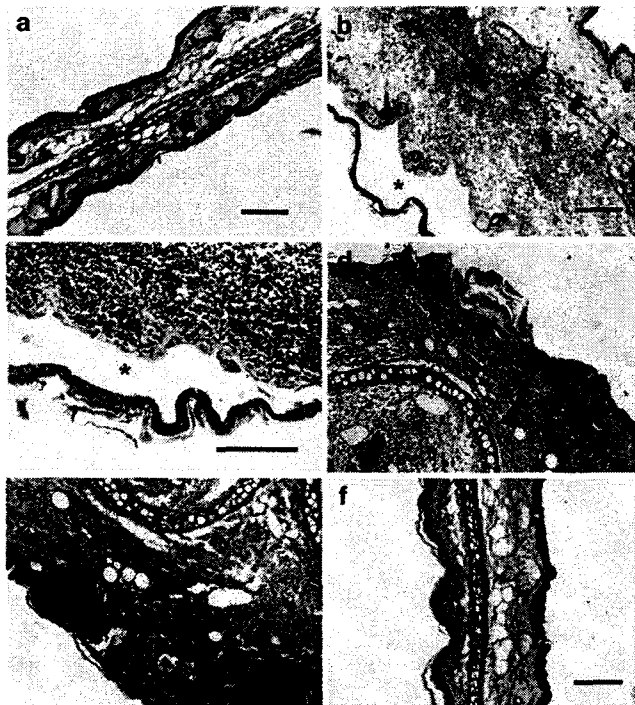
well-characterized biochemical and toxicological profiles of snake venom components, they may become useful experimental tools to investigate the pathogenic mechanisms involved in a variety of skin pathologies. In this study, we performed a qualitative and quantitative characterization of the degenerative and reparative/regenerative events occurring in the ear of mice after injection of the hemorrhagic metalloproteinase BaP1 from the venom *B. asper*.

**RESULTS**  
**Development of hemorrhage and histological assessment of skin damage**

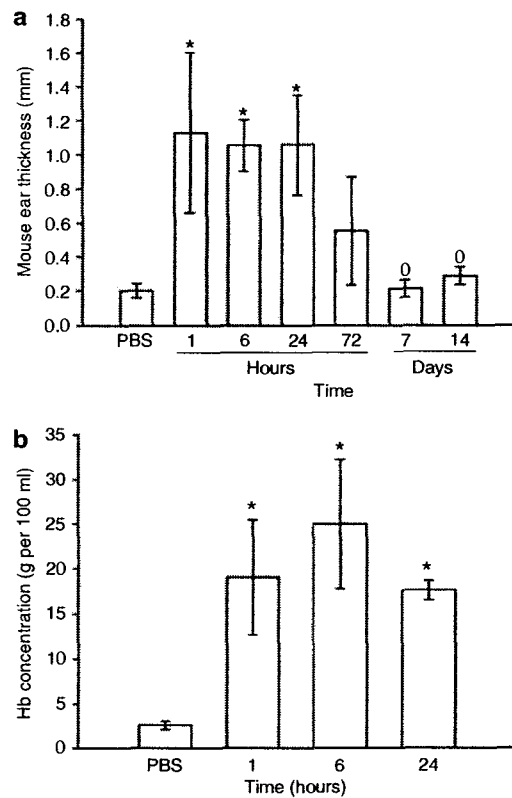
Tissue samples from control mice injected with phosphate-buffered saline (PBS) showed histological features typical of normal skin (Figure 1a). BaP1, at doses of 6 and 15 µg, induced a limited hemorrhagic lesion and histological alterations that reproduced what has been described in the clinical setting of pit viper envenomations, that is, hemorrhage, formation of blisters, and dermonecrosis. A conspicuous edema of rapid onset occurred, evidenced by a significant increment in the thickness of the ear (Figure 2a). Concomitantly, a rapid and prominent hemorrhagic

effect developed, as demonstrated by histological analysis (Figure 1b and c) and by the increment in the hemoglobin concentration in ear homogenates (Figure 2b). Qualitatively similar findings were observed with the two toxin doses used.

The extent of edema and hemorrhage was heterogeneous in the two sides of the ear separated by the central cartilage structure, being more intense in the side that was injected with the toxin, thus evidencing that the cartilage layer constitutes a diffusion barrier for the toxin. Formation of blisters was observed as early as 1 hour after injection (Figure 1b and c). They were characterized by a clear separation of dermis and epidermis. The percentage of the length of dermal-epidermal interface that became vesicated showed a maximum at 1 hour, corresponding to  $44 \pm 18\%$  of the total epidermal-dermal interface. At later time intervals, some vesicated areas became denuded of epidermis (not



**Figure 1. Histological alterations induced by BaP1 in the skin.** Light micrographs of paraffin-embedded sections of the skin of ears of mice injected i.d. with either (a) 20 µl PBS or (b-f) 6 µg BaP1 in 20 µl PBS. (a) PBS 1 hour after injection, with normal histological pattern. (b) After 1 hour and (c) 6 hours: notice prominent swelling, hemorrhage (arrows), and blister formation (\*). (d) After 24 hours, with loss of epidermis, inflammatory infiltrate (arrow head), proteinaceous exudate, and eschar formation. (e) After 72 hours, with granulation tissue (arrow head) and proliferation of epithelial cells in the borders of denuded epidermis (\*). (f) After 14 days, with normal histological appearance, including sebaceous glands, and a successful re-epithelization. hematoxylin-and-eosin staining. Bars = 250 µm in (a, b, d-f) and 50 µm in (c).



**Figure 2. Edema and hemorrhage induced by BaP1 in the ears.** (a) Thickness of the ears of mice injected intradermally with either 20 µl PBS or with 15 µg BaP1 dissolved in 20 µl PBS. At various time intervals, groups of three mice were killed, and the injected ears dissected out and processed for histological observation. The thickness of the ear was determined as described in Materials and Methods. Results are presented as mean ± SD (n = 3). \*P < 0.05 when compared with PBS-injected mice; <sup>0</sup>P < 0.05 when compared with results at 1, 6, and 24 hours. (b) Hemorrhagic effect of BaP1 in the mouse ear skin. Mice were injected intradermally, in the ear, with either 20 µl PBS or 15 µg BaP1, in 20 µl PBS. At various time intervals, animals were killed and ear tissue cut into small pieces and added to Drabkin solution. After centrifugation, absorbance at 540 nm was recorded and hemoglobin concentration was determined. Results are presented as mean ± SD (n = 3). \*P < 0.05 when compared with mice injected with PBS alone.

shown). Extravasated erythrocytes were not located in the space left after the separation of epidermis, that is, in the blister fluid, but instead remained confined to the dermis (Figure 1b and c). No overt morphological alterations were observed in the keratinocytes of regions showing blistering at 1 and 6 hours (Figure 1b and c). Some areas were devoid of epidermis, and a proteinaceous fibrinoid exudate was observed at the denuded skin surface at 24 and 72 hours (Figure 1d and e).

An inflammatory reaction occurred after the initial pathological alterations described. It was evidenced by the presence of an abundant leukocyte infiltrate in which neutrophils were the predominant cell type. Leukocytes were present in the dermis, initially around venules and later on throughout the dermis. Inflammatory infiltrate was followed by the formation of granulation tissue. No evident alterations were noticed in the structure of cartilage. Afterward, a re-epithelialization process was evident, characterized by increments in the numbers of keratinocytes at the borders of the denuded lesions (Figure 1e), followed by the migration of these cells underneath the eschar. Re-epithelialization was complete at 7 days, and the skin regained its normal appearance at 14 days (Figure 1f), including the presence of skin appendages, that is, sebaceous glands. Scar tissue with collagen was absent after the reparative response, and the thickness of the ear returned to control values at 7 and 14 days (Figure 2a).

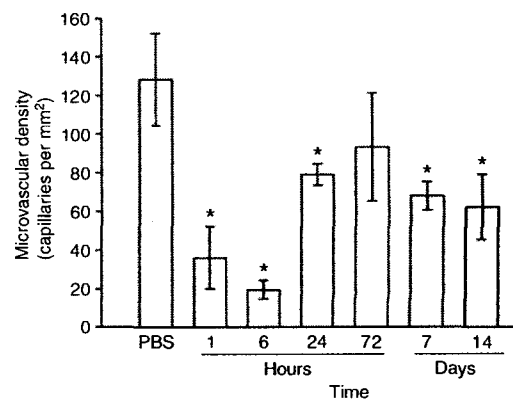
The main pathological features described, that is, hemorrhage and blistering, were completely abolished when BaP1 was incubated with the metalloproteinase inhibitor batimastat, demonstrating that these effects depend on the proteolytic activity of the enzyme. Batimastat alone did not induce any pathological effect in the ear. Injection of 10 µg of a serine proteinase isolated from *B. asper* venom did not induce any of the pathological effects described. On the other hand, depletion of neutrophils did not modify the pathological effects induced by BaP1. The extent of hemorrhage and blistering was similar in neutropenic and non-neutropenic mice.

#### Alterations in the microvascular density

Immunostaining of the endothelial cell marker vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) allowed the assessment of the changes occurring in the microvasculature. A reduction in the MVD was observed as early as 1 hour after injection (Figure 3) evidencing early damage to endothelial cells. A rapid process of endothelial cell replication and revascularization occurred, as revealed by the increase in the MVD within the first 72 hours after BaP1 injection (Figure 3). Then, at 7 and 14 days, there was a slight but significant reduction in MVD (Figure 3).

#### Immunohistochemical analysis of basement membrane at the dermal-epidermal junction

Immunostaining for type IV collagen and laminin, key components of the dermal-epidermal junction, was analyzed. Control samples from mice injected with PBS had a continuous staining for these antigens along the



**Figure 3. Microvascular density in the ear tissue of mice injected intradermally with either 20 µl PBS or 15 µg BaP1 dissolved in 20 µl PBS.** Groups of three mice were killed at various time intervals, and the ears were dissected out, embedded in cryopreservation medium, and frozen. 5 µm sections were prepared and fixed in 100% ethanol. Endothelial cells were visualized by immunostaining with anti-mouse VEGFR-2, as described in Materials and Methods. Capillary vessels were identified as immunostained structures having less than 10 µm diameter. Microvascular density (MVD) was estimated as the number of capillaries per mm<sup>2</sup>. Results are presented as mean ± SD (n = 3). \*P < 0.05 when compared with values of mice injected with PBS alone.

dermal-epidermal junction (not shown). In samples of tissue injected with BaP1, the immunostaining for type IV collagen and laminin was conserved in most of the areas observed, suggesting that a widespread degradation of these proteins did not occur. In areas where blisters were present, immunostaining for these proteins was observed predominantly at the base, that is, at the dermal side, of the blisters (Figure 4). In the case of type IV collagen, there was also some staining in the roof of some areas of blisters (Figure 4).

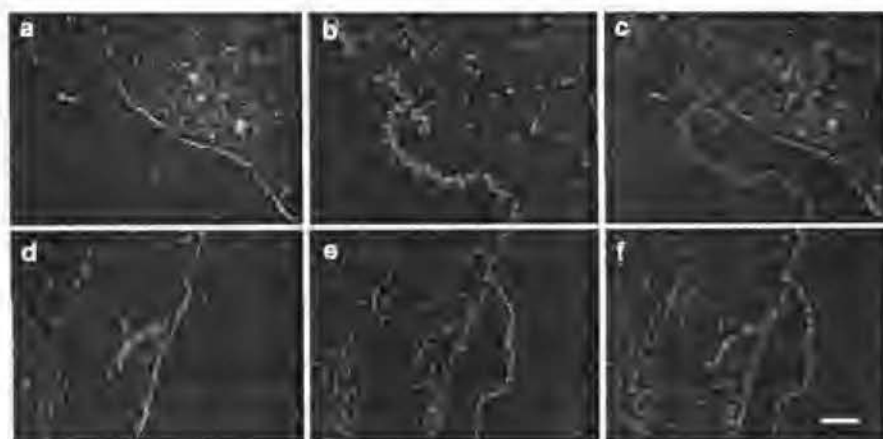
#### TUNEL analysis

Tissue from control mice injected with PBS did not present TUNEL-positive cells in the dermis and epidermis (Figure 5). No positive TUNEL cells were observed in capillary vessels in mice injected with BaP1 at 6 and 24 hours (Figure 5), suggesting that endothelial cells were not affected by apoptosis in this model. In contrast, a prominent staining occurred in many keratinocytes at the epidermis in tissue injected with BaP1 (Figure 5). There was no correlation between apoptosis and the formation of blisters, as TUNEL-positive cells were observed in areas with blisters and in areas devoid of blisters.

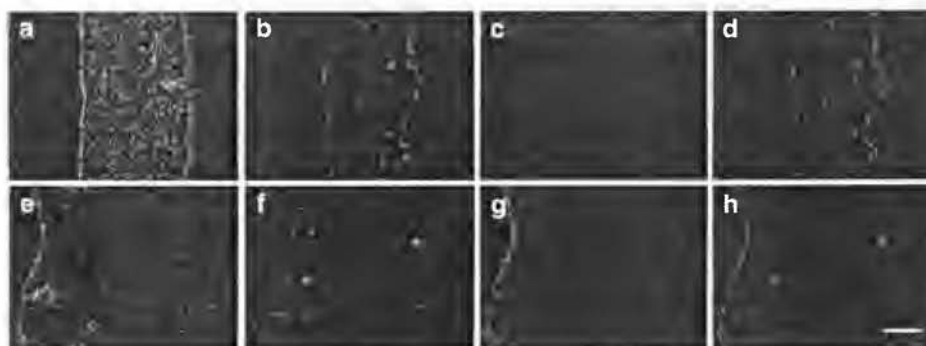
#### DISCUSSION

The mouse ear model used in this study constitutes a useful experimental approach to investigate degenerative and reparative/regenerative processes in the skin (Metcalf et al., 2006). Our observations demonstrate that metalloproteinase BaP1 induces a series of effects that closely mimic what has been described in the skin of patients envenomated by viperid snakebites, that is, edema, inflammation, hemorrhage, blistering, and dermonecrosis (Otero et al., 2002; Gutiérrez and Lomonte, 2003; Warrell, 2004). In contrast, no





**Figure 4.** Immunostaining for laminin and type IV collagen. Cryosections were prepared from the ears of mice injected with 15  $\mu$ g BaP1 in 20  $\mu$ l PBS and killed 6 hours after injection. Sections were stained with anti-laminin  $\gamma$ -1 chain or anti-type IV collagen; all sections were also stained with Hoechst 33258 for the detection of nuclei. Panels (a–c) and (d–f) correspond to two separate sections. (a) Immunostaining for laminin. (d) Immunostaining for type IV collagen. (b and e) Hoechst staining. (c and f) Merged images of Hoechst and either (c) anti-laminin or (f) anti-type IV collagen. Notice that the immunostaining for both basement membrane components predominate in the base of the blisters, whereas the nuclei of keratinocytes are located in the roof of the blisters. Bar = 250  $\mu$ m.



**Figure 5.** TUNEL staining in sections of mouse ears injected with either 20  $\mu$ l PBS or 15  $\mu$ g BaP1, dissolved in 20  $\mu$ l PBS. Samples were collected 6 hours after injection. Cryosections were prepared and DNA fragmentation was assessed by TUNEL, as described in Materials and Methods. In parallel, sections were stained with anti-VEGFR-2 and Hoechst 33258 for staining of endothelial cells in capillaries and nuclei, respectively. (a–d) Control samples injected with PBS. (e–h) Samples injected with BaP1. (a and e) Hoechst staining. (b and f) Immunostaining for VEGFR-2. (c and g) TUNEL staining. (d and h) Merged images of the three fluorochromes. Notice the predominance of TUNEL-positive cells in the epidermis, and the lack of TUNEL staining in endothelial cells. Bar = 250  $\mu$ m.

pathological effects occurred after injection of a serine proteinase isolated from the same venom.

The major pathological findings observed had a very rapid onset and were completely abrogated by preincubation of the enzyme with the metalloproteinase inhibitor batimastat, thus evidencing that the proteolytic activity of BaP1 is critical for its effects. These findings strongly suggest that BaP1-induced pathology is due to the direct hydrolysis of proteins in the dermis and at the dermal-epidermal junctions. As widely demonstrated for other snake venom metalloproteinases (Bjarnason and Fox, 1994), BaP1 is able to digest *in vitro* various extracellular matrix proteins, including those forming basement membranes, that is, laminin, nidogen, and type IV collagen (Rucavado *et al.*, 1995; Escalante *et al.*, 2006). Such degradative activity has also been described in mouse muscle tissue *in vivo* (Escalante *et al.*, 2006). It is therefore suggested that the

rapid pathological effects on capillary vessels and dermal-epidermal junction hereby described are due to the direct proteolytic activity of BaP1 on the basement membranes of these structures.

Endogenous tissue proteinases are involved in the pathogenesis of skin damage in other toxic models, such as after administration of the alkylating agent sulfur mustard (Chakrabarti *et al.*, 1998; Ray *et al.*, 2002), and in dermonecrosis induced by the sphingomyelinase from the venom of the spider *Loxosceles* sp., where matrix metalloproteinase (MMP)-9 plays a role in skin damage (Tambourgi *et al.*, 2005; Paixão-Cavalcante *et al.*, 2006, 2007). The possible involvement of inflammatory proteinases in the onset of endothelial cell damage and blistering induced by BaP1 is unlikely on the basis of three experimental observations: (a) Local lesions are of very rapid onset after BaP1 injection, whereas there is a delay in the appearance of these

effects in sulfur mustard and *Loxosceles*-induced damage, which are mediated by endogenous proteinases. (b) Despite the increment in MMP-9 in the skin of mice injected with BaP1, zymographic analysis evidenced only the presence of the latent forms of these MMPs (Rucavado *et al.*, 1998), thus suggesting that at early time intervals, MMPs are not engaged in active proteolysis. (c) Depletion of neutrophils, which contain abundant proteinases including MMPs (Tambourgi *et al.*, 2005), did not modify the extent of hemorrhage and blister formation after BaP1 injection. Previous studies have demonstrated that neutrophils do not participate in the local tissue damage induced by *Bothrops* sp. venoms in mice (Teixeira *et al.*, 2003, 2005). Therefore, the role of MMPs and other inflammatory proteinases in our model is likely to be related to the processes of tissue remodeling and regeneration, and not to the rapid pathological effects induced by BaP1 in the skin.

Acute capillary vessel damage is one of the most relevant effects induced by snake venom metalloproteinases, an action that leads to hemorrhage and has implications in tissue reparative and regenerative events (Gutiérrez and Rucavado, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005). The mechanism of capillary damage leading to hemorrhage depends on a proteolytic cleavage of structurally relevant components at the basement membrane of capillaries (Bjarnason and Fox, 1994), with the consequent weakening of the capillary stability, followed by the distention of the capillary due to the action of biophysical forces normally operating in the circulation (Gutiérrez *et al.*, 2005), a process that leads to endothelial cell damage, capillary wall disruption, and extravasation (Escalante *et al.*, 2006; this work). By studying samples collected at 24 and 72 hours, and 1 and 2 weeks, we were able to follow the revascularization in the skin. To our knowledge, this is the first quantitative analysis of the process of revascularization in tissue affected by snake venom metalloproteinases. Interestingly, in our model, there was a very rapid restitution of immunostaining to the endothelial marker VEGFR-2, as MVD reached high values at 72 hours, although MVD at 7 and 14 days were still lower than those of control mice. Such early increment in endothelial cell density, followed by a drop, has been described in other experimental models (Schirmer *et al.*, 2004) and is likely to reflect an early endothelial replication phase, stimulated by the release of angiogenic factors by resident as well as inflammatory cells (Lokmic *et al.*, 2006), followed by a regulation of MVD at later time intervals.

Various snake venom metalloproteinases, including BaP1, have been shown to induce apoptosis on endothelial cells in culture (Masuda *et al.*, 2000, 2001; Wu *et al.*, 2001; You *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2005; Tanjoni *et al.*, 2005); however, the actual role of endothelial cell apoptosis in snakebite envenomation *in vivo* has not been investigated previously. Our findings in the skin clearly evidence that apoptosis does not occur in endothelial cells after injection of BaP1, as judged by the TUNEL assay. Capillary endothelial cells are rapidly affected after metalloproteinase injection (Ownby *et al.*, 1978; Moreira *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2006); hence, it is proposed that endothelial cells die

predominantly by necrosis (Moreira *et al.*, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2006).

The formation of blisters, described in human snakebite envenomations, was reproduced in this experimental model. The rapid appearance of blisters, and their abrogation when BaP1 was incubated with batimastat, suggests that they occur through the direct cleavage of BaP1 of proteins at the dermal-epidermal junction. This complex structure is formed by various proteins and layers, including the hemidesmosomes, the connection between integrin  $\alpha 4 \beta 6$  and laminin 5 at the lamina lucida, the lamina densa, with various basement membrane components, and the connection between type VII collagen and fibrillar collagens at the anchoring fibrils (Woodley and Chen, 2001). In the case of BaP1-induced blisters, the presence of immunostaining for type IV collagen and laminin predominantly at the base of the blister strongly suggests that the main site of cleavage is at the lamina lucida, with the consequent separation of epidermis from components of the basement membrane at the lamina densa. This is likely to reflect a different susceptibility of lamina lucida and lamina densa to the action of this metalloproteinase.

A large number of keratinocytes were TUNEL positive, thus suggesting widespread apoptosis in these epithelial cells. Other experimental models of blistering, such as damage induced by sulfur mustard, also concur with epithelial cell apoptosis (Greenberg *et al.*, 2006). In both cases, apoptosis occurred not only in areas of blistering, but also in regions where epidermis was not separated from the dermis. The mechanisms behind such widespread apoptotic process are unknown, but a proteolytic cleavage of epithelial cell integrins or laminin 5 at the lamina lucida may be involved. Such limited proteolysis may occur without an overt separation of dermis and epidermis, but may affect survival signal pathways that depend on the interaction of cell integrins with extracellular matrix components (Grossmann, 2002).

Dermonecrosis is followed by two possible reparative scenarios that follow the inflammatory reaction. In some cases, a regenerative process ensues, with re-epithelization and revascularization of the damaged skin associated with lack of fibrotic scar formation. Alternatively, dermonecrosis might be followed by a deficient regenerative process and by the formation of a permanent fibrotic scar associated with loss of function (Ferguson and O'Kane, 2004; Metcalfe *et al.*, 2006). The predominant outcome depends on the balance between profibrotic and proregenerative inflammatory cytokines and growth factors and may vary with the anatomical site of skin damage and the genetic makeup of the animal strain (Metcalfe *et al.*, 2006). In the case of dermonecrosis due to BaP1, adequate re-epithelization occurred in the ear model and in a study of skin damage in the lower limb of mice (Rucavado *et al.*, 1998; this work), with complete restoration of epidermis and dermis and with a lack of scar formation.

In conclusion, metalloproteinase BaP1 induces a series of pathological events in the mouse ear that closely resemble the pathological alterations described in human viperid

snakebite envenomations. The rapid disruptive effects are likely to depend on the direct proteolytic activity of this enzyme on extracellular matrix components. Such drastic pathologic scenario is followed by inflammation, granulation tissue formation, and a successful and complete re-epithelization of the skin. Our observations corroborate the relevance of metalloproteinases in the skin pathology associated with viperid snakebite envenomation and stress the potential usefulness of metalloproteinase inhibitors in the treatment of snake venom-induced local tissue damage (Escalante et al., 2000; Rucavado et al., 2000).

## MATERIALS AND METHODS

### Metalloproteinase

BaP1, a 23 kDa hemorrhagic metalloproteinase, was isolated from the venom of adult specimens of *Bothrops asper* collected at the Pacific region of Costa Rica, as described previously (Gutiérrez et al., 1995; Rucavado et al., 1998). Homogeneity of the preparation was demonstrated by SDS-PAGE run under reducing conditions (Laemmli, 1970). A serine proteinase was isolated from this venom as described by Pérez et al. (2008).

### Animals

CD-1 mice (18–20 g body weight) were used throughout the study. Animals were maintained at 12:12 hours light/dark cycle and received water and food *ad libitum*. The experimental protocols used were approved by the Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of Universidad de Costa Rica.

### Histological assessment of tissue alterations

Mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine. Animals were then injected i.d. in the ear with either 6 or 15 µg BaP1, dissolved in 20 µl of 0.12 M NaCl, 0.04 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 (PBS). In some experiments, mice were injected with 10 µg of a serine proteinase isolated from the same venom. Control animals were injected with PBS, under otherwise identical conditions. Groups of three mice were killed at various time intervals (1, 6, 24, and 72 hours, and 7 and 14 days). The ears of both controls and treated animals were dissected out and embedded in cryopreservation medium (ThermoShandon, Pittsburgh, PA) on dry ice; samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until used. Frozen sections of 5 µm thickness were prepared with a cryostat (Leica CM1850, Wetzlar, Germany). Three sections were placed onto positively charged slides (Erie Scientific Company, Portsmouth, NH), followed by fixation in 100% ethanol, for at least 20 minutes at room temperature, and then they were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . In some experiments, injected ears were dissected out and fixed in 10% formalin solution, prepared using PBS as diluent, and processed routinely for embedding in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin for histological observation.

### Morphometric analyses

Tissue sections were analyzed for the following parameters: (a) thickness of the ear, determined with the Image Pro-Plus program (Media Cybernetics, Silver Spring, MD); in each section, thickness in mm was determined in three different regions of the ear for each sample analyzed. (b) Percentage of blistering, corresponding to the length of the dermal-epidermal interface presenting blisters, divided

by the total length of dermal-epidermal interface analyzed, and multiplied by 100.

### Quantification of hemorrhage

Groups of three mice were injected with 15 µg BaP1, dissolved in 20 µl PBS, as described. Controls received 20 µl PBS. At 1, 6, and 24 hours, mice were killed and the injected ears were dissected out and cut into small pieces with a razor blade. All tissue sections were then added to 5 ml of Drabkin reagent and left undisturbed for 24 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ . Then, samples were centrifuged at  $600 \times g$  for 5 minutes, the absorbance of the supernatants at 540 nm was recorded, and hemoglobin concentration was calculated from a standard curve as a quantitative index of hemorrhage (Escalante et al., 2000).

### Inhibition of metalloproteinase activity

BaP1 was incubated with the peptidomimetic hydroxamate metalloproteinase inhibitor batimastat (80 µM), as described previously (Escalante et al., 2000). Controls included BaP1 without batimastat, and batimastat alone. Aliquots of 20 µl of the mixtures, containing 15 µg of BaP1, were injected i.d. in the ears of mice, as described. Animals were killed at 1 and 6 hours, and tissues processed routinely for paraffin embedding and hematoxylin-and-eosin staining, as described. Sections were observed for the appearance of pathological alterations (hemorrhage, edema, and blistering).

### Effect of neutrophil depletion on pathological changes

The protocol described by Teixeira et al. (2003) for neutrophil depletion, based on the administration of a mAb that recognizes a surface marker in mature granulocytes, was followed. Neutrophil depletion was demonstrated by performing differential leukocyte blood counts. Control and neutropenic mice were injected i.d. in the ear with either 15 µg BaP1, dissolved in 20 µl PBS, or with 20 µl PBS alone. Animals were killed at 1 and 6 hours, and tissues routinely processed for paraffin embedding. Sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed for the presence of edema, hemorrhage, and blistering.

### Immunostaining for endothelial cell markers

To identify endothelial cells in capillaries, frozen cross sections were immunostained with a rat mAb anti-mouse VEGFR-2 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), at a 1:20 dilution in TNB buffer, using the TSA Biotin System commercial kit (Perkin Elmer, Boston, MA). Afterward, a biotinylated rabbit anti-rat polyclonal antibody, diluted 1:200 in TNB buffer, was applied. This step was followed by the application of streptavidin peroxidase (1:100 in TNB) and tyramide (1:50 in amplification solution). Finally, sections were incubated with the fluorochrome Cy3-streptavidin and the tissue was co-stained with Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) to identify cell nuclei. The immunostained sections were observed in a fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and the images were captured at a magnification of  $\times 20$ , using a camera Cool SNAP-Pro (Media Cybernetics, Bethesda, MD). For morphometric analysis, three non-overlapping optic fields were captured in each section. The total area of each optic field was determined in  $\text{mm}^2$  and the number of capillaries immunostained for VEGFR-2 was counted using the Image Pro-Plus program (Media Cybernetics). Vessels with a diameter less than 10 µm were considered as

capillaries. The MVD was calculated according to the definition of Vermeulen *et al.* (2002), in which the MVD corresponds to the number of capillaries per mm<sup>2</sup> of tissue.

#### Immunostaining for basement membrane components

To evaluate the effects of BaP1 on basement membrane proteins, cryosections of injected mouse ears were incubated with a rabbit anti-human collagen IV polyclonal antibody (Fitzgerald Industries International, Concord, MA) and a goat anti-rabbit biotinylated polyclonal antibody (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). For the immunodetection of laminin, cryosections were incubated with goat anti-human laminin  $\gamma$ -1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and a rabbit anti-goat biotinylated polyclonal antibody (DakoCytomation). Afterward, sections were incubated with streptavidin-Cy3 (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA). In addition, all sections were also stained with Hoechst 33258 for the location of nuclei.

#### Determination of apoptosis by TUNEL staining

DNA fragmentation, as determined by the TUNEL assay, was assessed in cryosections of injected mouse ears, using the Apotag kit (Chemicon, Temecula, CA). For each time interval, nine tissue sections were stained, following the protocol provided by the manufacturer ([www.chemicon.com](http://www.chemicon.com)). To identify TUNEL-positive cells, sections were co-stained with anti-VEGFR-2 and Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Images of three different, nonoverlapping fields were obtained in each section and images of each fluorochrome were merged using the Image Pro-Plus program.

#### Statistical analysis

The significance of the differences between the mean values of various quantitative analyses was determined by analysis of variance using the program Statistica 6.0, considering  $P < 0.05$  as significant. The significance of differences between pairs of means was analyzed by the Tukey test.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Catarina F.P. Teixeira (Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil) for providing the antigranulocyte mAbs, as well as the collaboration of Carmen Corella (Instituto Clodomiro Picado) in other aspects of the work. This study was supported by Vicerrectoría de Investigación (projects 741-A7-604 and 741-A7-502) and by the International Foundation for Science (IFS) (project F/4096-1). This work was presented by N. Jiménez in partial fulfillment of the requirements for the M.Sc. degree at Universidad de Costa Rica.

#### REFERENCES

- Bjarnason JB, Fox JW (1994) Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther* 62:325-72
- Chakrabarti AK, Ray P, Broomfield CA, Ray R (1998) Purification and characterization of protease activated by sulfur mustard in normal human epidermal keratinocytes. *Biochem Pharmacol* 56: 467-472
- Díaz C, Valverde L, Brenes O, Rucavado A, Gutiérrez JM (2005) Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *J Cell Biochem* 94:520-8
- Escalante T, Franceschi A, Rucavado A, Gutiérrez JM (2000) Effectiveness of batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, in neutralizing local tissue damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Biochem Pharmacol* 60:269-74
- Escalante T, Shannon J, Moura-da-Silva AM, Gutiérrez JM, Fox JW (2006) Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: a biochemical and immunohistochemical study. *Arch Biochem Biophys* 455:144-53
- Ferguson MW, O'Kane S (2004) Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:839-50
- Fox JW, Serrano SMT (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45:969-85
- Greenberg S, Kamath P, Petrali J, Hamilton T, Garfield J, Garlick JA (2006) Characterization of the initial response of engineered human skin to sulfur mustard. *Toxicol Sci* 90:549-57
- Grossmann J (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis". *Apoptosis* 7:247-60
- Gutiérrez JM, Lomonte B (2003) Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes* (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málague CM, Haddad V, eds), São Paulo: Sarvier, 310-23
- Gutiérrez JM, Núñez J, Escalante T, Rucavado A (2006) Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. *Microw Res* 71:55-63
- Gutiérrez JM, Ownby CL (2003) Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 42:915-31
- Gutiérrez JM, Romero M, Díaz C, Borkow G, Ovadia M (1995) Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon* 33:19-29
- Gutiérrez JM, Rucavado A (2000) Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82:841-50
- Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C (2005) Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45:997-1011
- Iddon D, Theakston RDG, Ownby CL (1987) A study of the pathogenesis of local skin necrosis induced by *Naja nigricollis* (spitting cobra) venom using simple histological staining techniques. *Toxicon* 25:665-72
- King JR, Peters BP, Monteiro-Riviere NA (1994) Laminin in the cutaneous basement membrane as a potential target in lewisite vesication. *Toxicol Appl Pharmacol* 126:164-73
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
- Lokmic Z, Darby IA, Thomson EW, Mitchel GM (2006) Time course analysis of hypoxia, granulation tissue and blood vessel growth, and remodeling in healing rat cutaneous incisional primary intention wounds. *Wound Rep Reg* 14:277-88
- Masuda S, Ohta T, Kaji K, Fox JW, Hayashi H, Araki S (2000) cDNA cloning and characterization of vascular apoptosis-inducing protein 1. *Biochem Biophys Res Comm* 278:197-204
- Masuda S, Hayashi H, Atoda H, Morita T, Araki S (2001) Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur J Biochem* 268: 3339-45
- Metcalfe AD, Willis H, Beare A, Ferguson MW (2006) Characterizing regeneration in the mammalian external ear. *J Anat* 209:439-46
- Moreira L, Borkow G, Ovadia M, Gutiérrez JM (1994) Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. *Toxicon* 32:977-87
- Otero R, Gutiérrez J, Mesa MB, Duque E, Rodríguez O, Arango JL *et al.* (2002) Complications of *Bothrops*, *Porthidium* and *Bothriechis* snakebites in

- Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. *Toxicon* 40:1107-14
- Ownby CL, Bjarnason JB, Tu AT (1978) Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *Am J Pathol* 93:201-18
- Paixão-Cavalcante D, van den Berg CW, Fernandes-Pedrosa MF, Gonçalves de Andrade RM, Tambourgi DV (2006) Role of matrix metalloproteinases in HaCaT keratinocytes apoptosis induced by *Loxosceles* venom sphingomyelinase D. *J Invest Dermatol* 126:61-8
- Paixão-Cavalcante D, van den Berg CW, Gonçalves de Andrade RM, Fernandes-Pedrosa MF, Okamoto CK, Tambourgi DV (2007) Tetracycline protects against dermonecrosis induced by *Loxosceles* spider venom. *J Invest Dermatol* 127:1410-8
- Pérez AV, Rucavado A, Sanz L, Calvete JJ, Gutiérrez JM (2008) Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Braz J Med Biol Res* 41:12-7
- Ray P, Chakrabarti AK, Broomfield CA, Ray R (2002) Sulfur mustard-stimulated protease: a target for antivenesicant drugs. *J Appl Toxicol* 22:139-40
- Rucavado A, Escalante T, Franceschi A, Chaves F, León G, Cury Y et al. (2000) Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early *in situ* administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa<sub>2</sub>EDTA. *Am J Trop Med Hyg* 63:313-9
- Rucavado A, Lomonte B, Ovadia M, Gutiérrez JM (1995) Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Exp Mol Pathol* 63:186-99
- Rucavado A, Núñez J, Gutiérrez JM (1998) Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int J Exp Pathol* 79:245-54
- Schmidt E, Zillikens D (2000) Autoimmune and inherited subepidermal blistering diseases: advances in the clinic and the laboratory. *Adv Dermatol* 16:113-57
- Schirmer S, Hoefler I, Buschmann I (2004) Peripheral hind limb ischemia models. In: *Methods in Endothelial Cell Biology* (Augustin HG, ed), Berlin: Springer-Verlag, 197-206
- Tambourgi DV, Paixão-Cavalcante D, Gonçalves de Andrade RM, Fernandes-Pedrosa MF, Magnoli FC, Morgan P et al. (2005) *Loxosceles* sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression. *J Invest Dermatol* 124:725-31
- Tanjoni I, Weinlich R, Della Casa MS, Clissa PB, Saldanha-Gama RF, de Freitas MS et al. (2005) Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis* 10:851-61
- Teixeira CFP, Chaves F, Zamunér SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz-Hofling MA et al. (2005) Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int J Exp Pathol* 86:107-15
- Teixeira CFP, Zamunér SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I et al. (2003) Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve* 28:449-59
- Theakston RDG, Reid HA (1983) Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull World Health Org* 61:949-56
- Uitto J, Pulkkinen L, McLean WH (1997) Epidermolysis bullosa: a spectrum of clinical phenotypes explained by molecular heterogeneity. *Mol Med Today* 3:457-65
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M et al. (2002) Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* 38:1564-79
- Warrell DA (1996) Clinical features of envenoming by snake bites. In: *Envenomings and Their Treatments* (Bon C, Goyffon M, eds), Lyon: Fondation Marcel Mérieux, 63-76
- Warrell DA (2004) Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere* (Campbell JA, Lamar WW, eds), vol II. Ithaca: Comstock, 709-61
- Woodley DT, Chen M (2001) The basement membrane zone. In: *The Biology of the Skin* (Freinkel RK, Woodley DT, eds), New York: The Parthenon Publishing Group, 133-52
- Wu WB, Chang SC, Liao MY, Huang TF (2001) Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis in human endothelial cells. *Biochem J* 357:719-28
- You WK, Seo HJ, Chung KH, Kim DS (2003) A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J Biochem* 134:739-49