UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos bioquímicos e estruturais de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*

Carolina Petri Bernardes

Ribeirão Preto 2012

RESUMO

BERNARDES, C.P. Estudos bioquímicos e estruturais de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pirajai*. 2012. 127 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de moléculas bioativas resultando em um produto biológico eficiente que tem como principais objetivos a promoção de imobilização, morte e digestão inicial de presas. As metaloproteases e as serinoproteases estão entre as principais enzimas responsáveis por afetar o sistema hemostático por diferentes mecanismos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização bioquímica, funcional e estrutural de uma metaloprotease da classe P-I a partir da peçonha de Bothrops pirajai. A metaloprotease foi isolada utilizando três passos cromatográficos: exclusão molecular em Sephacryl S-200, troca iônica em CM-Sepharose e afinidade em Blue Sepharose, resultando na metaloprotease denominada BpirMP. A massa molecular da enzima foi determinada por espectrometria de massas (23,15 kDa), e conforme visualizado por SDS-PAGE, a molécula apresentou cadeia polipeptídica única. A determinação da sequência parcial de aminoácidos e o alinhamento múltiplo com sequências depositadas em bancos de dados mostrou alta identidade (70-90%) com outras metaloproteases da classe P-I de peconhas de serpentes. A molécula possui a sequência de consenso HELGHNLGMEH, bem como a sequência de CVM, que caracterizam a superfamília das metaloproteases "metzincinas". A enzima mostrou ação sobre o fibrinogênio, degradando as cadeias Aa e BB, sendo capaz também de degradar coágulos de fibrina e de sangue *in vitro*, dissolvendo completamente o coágulo de sangue na maior dose testada. A enzima não apresentou atividade coagulante sobre plasma sanguíneo. A atividade proteolítica da metaloprotease sobre a azocaseína foi avaliada em diferentes condições de pH e temperatura, mostrando que a enzima tem a sua atividade reduzida em pHs ácidos e em temperaturas superiores a 60 °C. A atividade proteolítica foi inibida por agentes quelantes como EDTA, EGTA e 1,10fenantrolina e por agentes redutores como β-mercaptoetanol e DTT. Inibidores específicos de serinoproteases (benzamidina, leupeptina e aprotinina) não apresentaram efeito sobre a atividade proteolítica da BpirMP. A enzima mostrou-se hemorrágica, apresentando dose hemorrágica mínima (DHM) de 50 µg. BpirMP hidrolisou componentes da membrana basal tanto *in vitro* como *in vivo*, degradando preferencialmente laminina e nidogênio. A metaloprotease apresentou efeitos sobre processos inflamatórios como a indução de edema e dor, promovendo um pronunciado recrutamento de neutrófilos e aumento significativo na quantidade total de leucócitos no exsudato inflamatório. A avaliação da participação de diferentes mediadores inflamatórios na indução do edema e hiperalgesia indicaram o envolvimento de metabólitos do ácido araquidônico e histamina. O efeito citotóxico induzido pela metaloprotease foi avaliado sobre o músculo gastrocnêmico de camundongos e também nos tecidos cardíaco, renal, pulmonar e esplênico, apresentando degeneração das fibras musculares e infiltrado leucocitário. Os resultados demonstram que a BpirMP é uma metaloprotease de baixa massa molecular, com baixa atividade hemorrágica, pertencente à classe P-I, descrita pela primeira vez para a espécie B. pirajai. A caracterização da peçonha de Bothrops pirajai foi realizada por meio de técnicas proteômicas para determinar a sua composição proteica. As proteínas foram separadas por RP-HPLC, seguido por SDS-PAGE, digestão tríptica "in-gel" e identificação por espectrometria de massa por MALDI-TOF/TOF, e atribuição de famílias de proteínas conhecidas por homologia. Proteínas pertencentes a sete famílias foram encontradas na peçonha de B. pirajai, incluindo grande abundância de fosfolipases A_2 (~40%) e metaloproteases (~20%).

Palavras-chave: *Bothrops pirajai*. Enzimas proteolíticas. Metaloprotease. Membrana Basal. Hemorragia. Hemostasia. Inflamação. Proteoma.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Quadro clínico e epidemiologia dos acidentes ofídicos

As serpentes compõem um dos grupos mais bem sucedidos dos vertebrados, exibindo grande riqueza de espécies e habitando uma enorme variedade de ambientes (LEE; SCANLON, 2002). Estima-se que no mundo existam aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, classificadas em quatro famílias Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae e Colubridae. No Brasil as espécies de serpentes peçonhentas pertencem às famílias Elapidae e Viperidae (CARDOSO, 2003). Na família Viperidae, destaca-se a subfamília Crotalinae, à qual pertencem os gêneros *Crotalus* (cascavéis), *Bothrops* (jararacas) e *Lachesis* (surucucus) e a família Elapidae, que engloba o gênero *Micrurus* (corais verdadeiras) (MELGAREJO, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no mundo, ocorrem em média 1.665.000 acidentes por ano, envolvendo serpentes peçonhentas, com 30.000 a 40.000 mortes. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, em 2010 ocorreram aproximadamente 30.000 mil acidentes ofídicos, sendo a maioria destes acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, sendo raros os causados por *Lachesis* e *Micrurus* (MINISTERIO DA SAÚDE, 2012). A incidência real de envenenamento por picadas de serpentes em todo o mundo e a mortalidade associada são difíceis de estimar, já que há muitos países onde esta doença não é adequadamente relatada e os dados epidemiológicos são fragmentados. No entanto, um estudo publicado em 2008 estima que, pelo menos, 421.000 casos de envenenamento e 20.000 mortes ocorram anualmente, ainda que estes valores largamente baseados em hospitais possam estar subestimados, sendo superior a 1.841.000 resultando em 94.000 mortes (KASTURIRATNE et al., 2008).

Os acidentes humanos provocados por picadas de serpentes constituem um problema de saúde pública global por ser uma patologia que afeta principalmente jovens trabalhadores que vivem em áreas rurais, distante de centros médicos em regiões pobres economicamente (GUTIÉRREZ, 2012). Muitas das vítimas conseguem sobreviver ao acidente ofídico, porém com sequelas físicas permanentes, e como a maioria dos acidentes ocorre com jovens trabalhadores o impacto econômico é considerável (GUTIERREZ et al., 2007).

As serpentes do gênero *Bothrops* são as mais comuns no Brasil sendo responsáveis por mais de 80% dos acidentes peçonhentos, seguidos pelo gênero *Crotalus* (9,2%), *Lachesis* (2,7%) e em menor frequência os gêneros *Micrurus* (0,6%) (QUEIROZ et al., 2008; MINISTERIO DA SAÚDE, 2012). O gênero *Bothrops* é formado por cerca de 30 espécies distribuídas por todo o território nacional (RIBEIRO; JORGE 1997). As espécies mais comuns são: jararaca (*B. jararaca*), jararaca ilhoa (*B. insularis*), jararaca pintada (*B. neuwiedi*), cotiara (*B. fonsecai*), jararacussu (*B. jararacussu*) e caiçaca (*B. moojeni*). A classificação das serpentes é essencial para a produção de soro apropriado e eficiente no tratamento dos pacientes de acidentes ofídicos. Com o avanço dos estudos sobre o conhecimento das relações filogenéticas entre as serpentes ocorreram mudanças na classificação das serpentes das famílias Elapidae e Viperidae, no qual novas espécies foram descritas e outras revalidadas ou elevadas de categoria passando de subespécie para espécie (BERNARDE, 2011). Na classificação atual, as espécies de serpentes que pertenciam ao gênero *Bothrops* foram redistribuídas em cinco gêneros: *Bothriopsis (Bothriopsis bilineata), Bothrocophias (Bothrocophias hyoprora), Bothropoides (Bothropoides pauloensis), Bothrops (Botrops moojeni*) e *Rhinocerophis (Rhinocerophis alternatus*) (FENWICK et al., 2009). A espécie foco deste trabalho, *Bothrops pirajai*, não sofreu alterações permanecendo no gênero *Bothrops* na atual classificação.

Os sinais clínicos e a patologia decorrente dos envenenamentos ofidicos estão relacionados à composição das peçonhas e consequentemente apresenta variações tanto entre gêneros distintos, como entre as diferentes espécies que compõem um mesmo gênero. O envenenamento botrópico, por exemplo, as manifestações clínicas observadas são devido a intensa atividade proteolítica, causando vários distúrbios fisiopatológicos, incluindo transtornos sistêmicos da hemostasia relacionados com a ativação dos fatores X e II da cascata de coagulação, o consumo de fibrinogênio, inibição da agregação plaquetária (ZELANIS et al., 2007), hemorragia e lesões locais resultando em sequelas permanentes ou amputação do membro afetado (VITAL BRASIL, 1982; DU et al., 2006).

No caso do envenenamento por serpentes do gênero *Lachesis*, o quadro clínico se assemelha ao do envenenamento bothrópico, com manifestações locais devido à ação proteolítica da peçonha, distúrbios de coagulação e hemorragia, porém usualmente mais severos. A composição das peçonhas de serpentes do gênero *Micrurus* é caracterizada pelo conteúdo de neurotoxinas de baixa massa molecular, sendo absorvidas e difundidas rapidamente pelo organismo induzindo os efeitos na presa, de forma muito rápida (PINHO; PEREIRA, 2001).

No caso do acidente crotálico, a peçonha apresenta uma ação sistêmica mais acentuada causando paralisia flácida do músculo esquelético que leva a problemas respiratórios, além de uma ação coagulante e intensa atividade miotóxica sistêmica podendo evoluir para

insuficiência renal aguda, não apresentando nenhum sinal clínico local pronunciado como lesão tecidual, bolhas e edema (PINHO; PEREIRA, 2001).

1.2. Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes são caracterizadas por uma mistura complexa de substâncias (LU et al., 2005) resultando em um produto biológico eficiente e complexo que tem como principais objetivos a imobilização, morte e a promoção da digestão inicial de presas (TAKEDA et al., 2011).

A composição das peçonhas de serpentes inclui compostos inorgânicos como os íons zinco e cálcio, e componentes orgânicos como aminoácidos, nucleosídeos, aminas biogênicas e proteínas que correspondem a mais de 90% da massa seca da peçonha (MATSUI et al., 2000; JUNQUEIRA DE AZEVEDO; HO, 2002). Dentre os componentes proteicos estão as L-aminoácido oxidases (LAAOs), fosfolipases A₂ (PLA₂s) e as enzimas proteolíticas como metaloproteases e serinoproteases (CASTRO et al., 1998; FRANCO, 2003; GAY et al., 2005). Entre os componentes da peçonha também podemos encontrar hialuronidases, nucleotidases, fatores de crescimento neural (NGFs), lectinas tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) e desintegrinas (MARKLAND 1998; RAMOS et al., 2006).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são enzimas que atuam sobre o sistema hemostático pela ativação dos fatores de coagulação e indução de agregação plaquetária (SERRANO; MAROUN, 2005). As SVSPs também podem apresentar outras atividades biológicas como a ativação do sistema complemento, participar do processo de diferenciação celular e atuar sobre o sistema nervoso (WU et al., 2001). Isoladamente, as serinoproteases não são consideradas letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando associadas com outras proteínas da peçonha (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

As PLA₂s compreendem uma grande família de proteínas e demonstram uma considerável homologia quanto à sequência de aminoácidos (PONCE-SOTO et al., 2007a). As PLA₂s catalisam a hidrólise de fosfolipídeos da membrana de células liberando precursores importantes relacionados com importantes atividades farmacológicas, tais como efeitos sobre plaquetas, neurotoxicidade, atividade anticoagulante, cardiotoxicidade, edema, miotoxicidade e inflamação (OHNO et al., 2003; GUTIERREZ; OWNBY, 2003). São encontradas em vários fluidos biológicos e também em venenos de moluscos e artrópodes.

As L-aminoácido oxidases (LAAOs, E.C. 1.4.3.2) são flavoenzimas, com efeitos tóxicos atribuídos à formação de peróxido de hidrogênio, no processo de deaminação oxidativa de substratos de L-aminoácidos (DU; CLEMETSON, 2002). São amplamente

encontradas em diferentes organismos como bactérias, fungos e algas verdes (STÁBELI et al., 2004). Suas ações tóxicas mais estudadas incluem os efeitos sobre plaquetas, indução de apoptose, ação antibacteriana e antiparasitária (DU; CLEMETSON, 2002).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) são enzimas dependentes de Zn⁺⁺, capazes de degradar proteínas da membrana dos vasos, permitindo o extravasamento de sangue sendo assim as principais responsáveis pelo efeito hemorrágico característico de envenenamentos por serpentes da família Viperidae (FOX; SERRANO, 2005). Os efeitos tóxicos destas enzimas também estão relacionados à patogenia da mionecrose local e dano tecidual (GUTIÉRREZ et al., 1995a; RUCAVADO et al., 1999) e às reações inflamatórias (TEIXEIRA et al., 2005; ZYCHAR et al., 2010).

A partir deste ponto, as metaloproteases de peçonhas de serpentes serão abordadas mais especificamente, já que o foco do presente trabalho está no estudo dessa classe de enzimas.

1.3. Metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs)

SVMPs são enzimas cuja atividade catalítica é dependente de zinco (MASKOS; BODE, 2003). As SVMPs são filogeneticamente relacionadas à família de proteínas ADAM (<u>A</u> <u>D</u>esintegrin and <u>M</u>etalloproteinase) e compõem a família das Adamalysin/Reprolysin/ADAM. Adamalisinas em conjunto com outras famílias de proteínas como Serralisinas, Astacinas e Matrixinas (MMPs) compõem o clã das Metzincinas. As famílias de proteínas que compõem o clã das metzincinas compartilham atributos estruturais característicos como a sequência consenso estendida HEXXHXXGXXH e o resíduo de metionina conservado adjacente ao sítio catalítico.

Nos últimos anos, diferentes metaloproteases foram isoladas de peçonhas de serpentes, tais como: BmooMP- α (BERNARDES et al., 2008), BleucMP (GOMES et al., 2011), Neuwiedase (RODRIGUES et al., 2000), LHmF, Batx-1, Atroxlisina-1 (SANCHEZ et al., 2010), leucurolisina-a (BELLO et al., 2006), BaP1 (GUTIERREZ et al., 1995), jararagina (PAINE et al., 2008) e jerdonitina (CHEN et al., 2003) e caracterizadas quanto às suas atividades biológicas (Tabela 1). A maioria das SVMPs foram classificadas como hemorrágicas, devido à capacidade de induzir hemorragia na pele de animais (FOX; SERRANO, 2009), entretanto atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica, apoptótica, ativação de protrombina, ativação de fator X e inibição da agregação plaquetária também são atribuídas a família das SVMPs (FOX; SERRANO, 2009; KAMIGUTI, 2005; JIA et al., 1996; BJARNASSON; FOX, 1994).

	SVMP	Serpente	Atividade	Referência
	Batroxase	B. atrox	Hemorrágica,	Cintra et al.; 2012
P-I	BmooMP-a	B. moojeni	Fibrino(geno)lítica	Bernardes et al.; 2008
	BjussuMP-II	B. jararacussu	Fibrino(geno)lítica	Marcussi et al.; 2007
	BaP1	B. asper	Hemorrágica, Inflamação	Gutierrez et al.; 2005
	Gramelisina - I	T. gramineus	Apoptose	Wu et al.; 2001
Р-Ш —	Jerdonitina	T. jedonii	Inibe agregação plaquetária,	Chen et al.; 2003
	Bilitoxina	A. bilineatus	Hemorrágica	Nikai et al.; 2000
Р-Ш	Atrolisina A	C. atrox	Hemorragia,	Fox; Bjamason 1995
	Jararagina	B. jararaca	Hemorrágica, inibe agregação plaquetária	Paine et al.; 2008
	Ecarin	E. carinatus	Ativação da protrombina	Nishida et al.; 1995
	VAP1	C. atrox	Apoptose	Masuda et al.; 1998
	RVV-X	D. russelli	Ativação do fator X	Takeya et al.; 1992
	Carinactivase	E. carinatus	Ativador de protrombina	Yamada et al.; 1996

Tabela-1. Metaloproteases isoladas de peçonhas de serpentes (Adaptado de: Takeda; Takeya; Iwanaga, 2012).

As metaloproteases da classe P-III são consideradas mais hemorrágicas que as metaloproteases da classe P-I (ESCALANTE et al., 2006) provavelmente (i) pela presença dos domínios adicionais, (ii) por um arranjo estrutural que facilita o acesso a alvos mais relevantes e (iii) por serem capazes de inibir a agregação plaquetária potencializando o efeito hemorrágico (KANG et al., 2011; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

Em 2005, Fox e Serrano propuseram a classificação das SVMPs em quatro diferentes grupos baseada na organização dos domínios estruturais: classe P-I de baixa massa molecular, apresentando apenas o domínio metaloprotease (M); classe P-II metaloproteases que apresentam o domínio metaloprotease (M) e o domínio desintegrina (D); classe P-III de metaloproteases de alta massa molecular contendo o domínio semelhante à desintegrina (D), o domínio rico em cisteína (C) além do domínio metaloprotease (M); e a classe P-IV, cujas SVMPs possuem o domínio lectina do tipo C, ligado por pontes dissulfeto além dos domínios presentes nas proteases da classe P-III (FOX; SERRANO, 2005).

Uma nova classificação foi proposta em 2008 por Fox e Serrano (Fig. 1), baseada nas características dos precursores das metaloproteases, bem como nos produtos gerados após processamento e modificação pós-traducional durante o processo de síntese. As classes P-II e

P-III foram divididas em subclasses baseado nas distintas modificações pós-traducionais, como a homodimerização (P-IIc e P-IIIc) ou a proteólise entre os domínios metaloprotease M e desintegrina D (P - IIb) (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2011), e a classe P-IV foi reclassificada como uma subclasse da classe P-III (P-IIId) uma vez que nenhum precursor específico contendo todos os domínios presentes na classe P-IV (domínios catalíticos, tipo desintegrina, rico em cisteína e tipo-lectina) foi descrito, indicando que essas proteases que apresentam essa estrutura são geradas por modificações pós-traducionais da estrutura P-III (FOX; SERRANO, 2008).



Figura 1. Classificação esquemática das metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs) proposta por Fox e Serrano (2008). Cada domínio está representado por uma cor diferente. M: domínio metaloprotease; D: domínio desintegrina; C: domínio rico em cisteína; CLP: lectina do tipo C (C-type lectin-like). As classes P-II e P-III estão subdivididas em subclasses baseadas em suas modificações pós-traducionais.

Estudos avaliando a capacidade de metaloproteases da classe P-I em induzir hemorragia demonstraram uma variação no potencial hemorrágico dentro da classe. A comparação entre estruturas de metaloproteases da classe P-I consideradas hemorrágicas e não hemorrágicas demonstraram pequenas variações em regiões de loops sugerindo que a variação do potencial hemorrágico possa ser explicada por tais variações (LINGOTT et al., 2009).

Atualmente, nove estruturas cristalográficas de metaloproteases da classe P-I e sete da classe P-III estão disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank*. As SVMPs da classe P-I compartilham uma estrutura terciária topologicamente equivalente de forma que podem ser sobrepostas, constituída por cinco α hélices e cinco folhas β apresentando diferenças nas regiões dos loops que conectam as estruturas secundárias (KANG et al., 2011; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

A estrutura do domínio metaloprotease é dividida em dois subdomínios: (i) subdomínio superior constituído de cinco folhas β e quatro α hélices e (ii) subdomínio inferior relativo à porção C-terminal da molécula e formado por loops e uma α hélice. Os dois subdomínios são separados por uma fenda de ligação do substrato (RAMOS; SELISTRE DE ARAUJO, 2004; LINGOTT et al., 2009).

1.4. SVMPs, Matriz Extracelular e Hemostasia

A matriz extracelular (MEC) é formada por um polímero de fibras (colágeno e elastina) incorporado em uma mistura amorfa de componentes não fibrosos (proteoglicanas) fornecendo suporte mecânico às células e funcionando como uma barreira bioquímica (TANZER, 1985; 2006). A MEC é secretada localmente preenchendo o espaço intercelular e a proporção dos componentes fibrosos e não fibrosos determinam suas características físicas e funcionais em particular dependendo do local e tecido que ela circunda (TANZER, 2006; SUKI; BATES 2008).

A membrana basal (MB) é uma estrutura especializada da matriz extracelular e é encontrada envolvendo a maioria dos tecidos e órgãos do organismo. A membrana basal desempenha papéis fundamentais na diferenciação, proliferação, sobrevivência e migração de células durante o desenvolvimento embrionário, mas também atua como barreira seletiva e suporte para o tecido (SCHWARZBAUER, 1999). A sua composição, juntamente com o repertório de receptores de matriz define a especificidade das reações celulares (PÖSCHL et al., 2003).

A MB é basicamente formada por laminina e colágeno tipo IV, que são os componentes majoritários, além de fibronectina, perlecan e nidogênio (YURCHENCO; AMENTA; PATTON, 2004; TANZER, 2005). A principal característica da membrana basal é a sua estrutura básica formada por uma rede de colágeno tipo IV na qual glicoproteínas como

laminina se aderem e promovem a interação com as células contidas na matriz (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

A laminina é uma glicoproteína, com mais de 15 isoformas descritas, formada pela combinação de três cadeias polipeptídicas diferentes: 5 cadeias α (α 1- α 5), 3 β (β 1- β 3) e 3 γ (γ 1- γ 3) (MINER; YURCHENCO, 2004). A laminina - 1 foi a primeira a ser identificada, e é uma molécula formada pelas cadeias α (400 kDa), β 1 (300 kDa) e γ 1 (250 kDa) intercruzadas em que a polimerização age como um suporte para o recrutamento dos outros componentes que formaram a MB (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003; SASAKI; FÄSSLER; HOHENESTER, 2004).

A fibronectina é uma glicoproteína de alta massa molecular constituída de duas cadeias unidas por uma ligação dissulfeto. Cada cadeia é formada por módulos funcionais que se ligam a integrinas, colágeno, heparina e fibrina (MATSUDA; YAMANAKA; MATSUDA, 1982; PETERSEN et al., 1983). A fibronectina está presente no plasma nas formas solúvel, que ao se ligar à fibrina forma uma matriz provisória que será responsável pela adesão celular e migração durante o processo de cicatrização de feridas, e polimérica atuando na manutenção da hemostasia (ASTROF; HYNES 2009). Além disso, a fibronectina é capaz de se ligar a sítios na fibrina que não são acessíveis no fibrinogênio (MAKOGONENKO, 2002).

O colágeno é a molécula responsável por garantir a estabilidade estrutural da MB e consequentemente dar suporte ao tecido. Até o momento mais de 20 tipos diferentes de colágenos foram descritos. Em tecidos cuja função é resistir às tensões como tendões, pele e ossos, o colágeno (tipo I, II, III, V e XI) se organiza formando fibrilas conferindo resistência a esses tecidos. Outras variações de colágeno como o tipo IV se organizam formando redes que atuam dando suporte e integridade ao tecido. O colágeno IV é o componente estrutural mais abundante na MB (BOSMAN; STAMENKOVIC 2003).

Nidogênio -1 ou entactina é uma proteína de aproximadamente 150 kDa, com três domínios globulares (G1, G2 e G3) conectados por segmentos em forma de haste (FOX et al.; 1991). Tais proteínas são responsáveis por mediar à formação de complexos entre laminina e colágeno IV *in vitro* (FOX et al., 1991; KOHFELDT et al., 1998). Entretanto o seu significado *in vivo* ainda não está completamente definido (SCHYMEINSKY et al., 2002).

A hidrólise de componentes da membrana basal de capilares por SVMPs têm sido proposta como o mecanismo pelo qual estas enzimas induzem hemorragia (ESCALANTE et al., 2006). *In vitro*, as metaloproteases são capazes de degradar o matrigel, uma preparação formada pelas proteínas da MB, além de proteínas isoladas como laminina, fibronectina e colágeno tipo IV. A maioria dessas análises é realizada observando o padrão de degradação

dessas proteínas por SDS-PAGE tanto para metaloproteases hemorrágicas como não hemorrágicas (ESCALANTE et al., 2006; RUCAVADO et al., 1995).

Estudos comparando a capacidade de hidrolisar componentes de MB de diferentes metaloproteases demonstraram que diferentes SVMPs atuam de maneiras diferentes sobre os componentes da MB, variando a especificidade, intensidade e o padrão de degradação afetando a estabilidade mecânica da MB em diferentes graus dependendo do efeito que esta degradação em particular exerce nas propriedades mecânicas da matriz. Escalante e colaboradores (2006) compararam a atividade proteolítica sobre componentes da MB de duas metaloproteases: a metaloprotease BaP1 da classe P-I, e a metaloprotease da classe P-III jararagina. Nestes estudos, os pesquisadores demonstraram que a BaP1 degradou preferencialmente as cadeias α e γ da laminina enquanto que a Jararagina degradou preferencialmente o nidogênio (ESCALANTE et al., 2006).

Os vasos sanguíneos são formados por três camadas denominadas túnicas e sua composição varia de acordo com o tipo de vaso, mas em sua maioria é composto por colágeno, fibronectina e elastina (BOU-GHARIOS et al., 2004). Capilares e vasos sanguíneos são mais susceptíveis aos efeitos das peçonhas de serpentes, que agem alterando a permeabilidade vascular e desestabilizando as junções intercelulares permitindo o extravasamento de plasma e hemácias (BJARNASON; FOX, 1995). Vítimas de acidentes ofídicos apresentam sinais clínicos como hipoagregação e consumo intenso de fibrinogênio. Segundo Gutierrez e colaboradores (2005) o fluxo sanguíneo exercendo pressão mecânica sobre a parede dos vasos, associado à degradação dos componentes da MB, desempenham um papel importante na indução do processo hemorrágico *in vivo* (GUTIÉRREZ et al., 2005).

Para manter a integridade vascular, o organismo desenvolveu mecanismos de defesas como a formação do coágulo de fibrina no local da lesão, evitando a perda excessiva de sangue. A conversão do fibrinogênio em fibrina é um dos passos chaves na formação e estabilização do coágulo, e fundamental na regulação do sistema hemostático. A polimerização da fibrina se dá após a clivagem do fibrinogênio em dois fibrinopeptídeos pela trombina (SCHERAGA, 2004).

Sempre que um vaso sofre uma lesão, diferentes mecanismos são ativados para impedir a perda de sangue. Após uma lesão, a matriz extracelular é exposta, desencadeando o processo de formação de trombos pela ligação entre as fibras de colágeno exposto e as plaquetas circulantes. As plaquetas irão liberar potentes medidores, como ADP e tromboxano, que irão recrutar mais plaquetas para a formação do tampão plaquetário. Em uma etapa seguinte, o fibrinogênio é clivado pela trombina formando fibrina que é depositada no local da lesão fortalecendo o tampão plaquetário (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

Muitas metaloproteases de serpentes são capazes de afetar a hemostasia degradando componentes da cascata de coagulação, degradando componentes da MB ou ativando fatores específicos da cascata de coagulação (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

1.5. SVMPs e a resposta inflamatória

A resposta inflamatória é um conjunto complexo de interações entre fatores solúveis e células que podem migrar para qualquer tecido em resposta a um evento traumático, infecções ou ferimentos (NATHAN, 2002). Esta resposta engloba uma sequência de eventos vasculares caracterizados pela vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular local com consequente extravasamento plasmático e efeitos celulares, com ativação de células fagocitárias residentes nos tecidos. (ROCHA; SILVA, 1978).

O reconhecimento inicial da infecção é mediado por macrófagos e mastócitos residentes no tecido, conduzindo à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo as quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas e eicosanoídes (MEDZHITOV, 2008). O principal efeito destes mediadores é de permitir a formação de um exsudato inflamatório no local, no qual proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos) que são normalmente limitados aos vasos sanguíneos migram para o local da infecção (ou lesão), através das vénulas pós-capilares. Ao atingir o tecido afetado, os neutrófilos são ativados, sejam pelo contato direto com agentes patogênicos ou através da ação de citocinas secretadas pelas células residentes. Os neutrófilos tentam combater os agentes invasores liberando os conteúdos tóxicos de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio. O conteúdo tóxico dos grânulos são efetores potentes que não discriminam entre os agentes infecciosos e o tecido residente, de forma que danos colaterais aos tecidos circundantes são inevitáveis (BARTON, 2008).

Um processo inflamatório bem sucedido é resultado da eliminação dos agentes infecciosos seguidos por uma resolução e fase de reparação (NATHAN, 2002; BARTON, 2008), caracterizada pela diminuição de agentes pró-inflamatórios, aumento de mediadores anti-inflamatórios e subsequente remoção de fluidos e detritos celulares pelo sistema linfático (SERHAN; SAVILL, 2005). Caso alguma etapa da resposta inflamatória não seja capaz de executar a sua função ou o progresso para a próxima etapa seja bloqueado, o processo inflamatório persiste e adquire um novo padrão, desenvolvendo uma inflamação crônica, com a formação de granuloma e fibroses (NATHAN, 2002).

A liberação dos mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação de fosfolipases A₂ e liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos (**Fig. 2**) além de enzimas lisossômicas. Essas enzimas têm potente atividade citotóxica e destroem células vizinhas, liberando assim novas enzimas. O metabolismo do ácido araquidônico dá origem a inúmeras substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), lipoxinas (LXs) e ácidos epoxieicosatetraenóicos (EETs).



Figura 2. Geração de metabólitos do ácido araquidônico e sua influência na inflamação. Fonte: http://www.javeriana.edu.co/

A injeção de peçonha da família Viperidae em mamíferos dispara dois processos no organismo: (i) o desenvolvimento dos efeitos tóxicos causados pelos componentes da peçonha, caracterizado por edema proeminente, infiltrado leucocitário e dor, e (ii) estímulo da resposta imune inata e adaptativa com o objetivo de neutralizar e remover os componentes da peçonha (LÉON et al., 2011).

Diversos mediadores já foram relacionados à inflamação promovida por peçonhas de serpentes, incluindo serotonina, histamina, fatores derivados do sistema complemento, citocinas e metabólitos do ácido araquidônico: ciclooxigenases e lipooxigenases (TREBIEN;

CALIXTO, 1989; CHAVES; BARBOZA; GUTIÉRREZ, 1995; FARSKY et al., 1997; ZAMUNER et al., 2001; ZAMUNER; TEIXEIRA, 2002; OLIVO et al., 2007).

Clissa e colaboradores (2001) demonstraram que a metaloprotease jararagina induz a produção de IL-1 β e TNF- α . A IL-1 β atua na ativação de linfócitos e adesão de leucócitos, além de regular a síntese de prostaglandinas, e o TNF- α (fator de necrose tumoral) atua induzindo a morte celular por apoptose, proliferação celular, diferenciação, inflamação, combate a tumores e replicação viral.

Zychar e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição de metaloproteases presentes na peçonha de *B. jararaca* previne o desenvolvimento da inflamação e dor em modelos murinos. Fernandes e colaboradores (2006) verificaram um aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α na cavidade peritoneal de camundongos induzido pela metaloprotease BaP1 isolada da peçonha de *B.asper*.

Estudos realizados demonstraram que o edema induzido pelo envenenamento por serpentes da espécie *B. jararaca* tem origem inflamatória, mediada por metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), sendo as metaloproteases responsáveis pela indução desses efeitos (TEIXEIRA et al., 2005). Fernandes e colaboradores (2006) demonstraram que a injeção da metaloprotease BaP1 na cavidade peritoneal de camundongos induziu uma reação inflamatória local caracterizada pelo acúmulo de leucócitos e liberação de citocinas inflamatórias (FERNANDES et al. 2006).

1.6. SVMPs: potencial terapêutico e aplicações

As peçonhas de serpentes Viperidae e Crotalidae contêm uma grande variedade de proteínas e peptídeos que afetam o sistema hemostático. Tais proteínas induzem seus efeitos ativando ou inativando etapas do sistema hemostático, como por exemplo, as nucleotidases, que são potentes inibidores da agregação plaquetária (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

As metaloproteases têm sido descritas como ativas sobre a hemostasia, degradando fatores da coagulação ou proteínas de células endoteliais, e em outros casos, ativando fatores específicos da cascata de coagulação ou da fibrinólise. SVMPs que afetam a função hemostática provaram serem ferramentas úteis na elucidação de mecanismos fisiológicos, em diagnósticos clínicos e têm sido utilizados como agentes antitrombóticos (HUTTON; WARRELL, 1993).

Quando as metaloproteases fibrinolíticas foram primeiramente isoladas a partir de peçonhas, foi sugerida uma aplicação clínica para estas enzimas no tratamento de trombos devido à baixa susceptibilidade a inibidores de proteases presentes no soro humano. No decorrer dos anos, inúmeras SVMPs fibrinolíticas foram isoladas e caracterizadas a partir de

diferentes peçonhas de serpentes. A atividade hemorrágica das enzimas fibrin(ogen)olíticas é um fator relevante no que diz respeito à potencial utilização clínica destas enzimas, de forma que SVMPs fibrin(ogen)olíticas que exibem baixa ou nenhuma atividade hemorrágica apresentam maior potencial para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de pacientes com doenças vasculares (DEITCHER; TOOMBS, 2006; SAJEVIC et al., 2011).

Fibrolase, uma metaloprotease fibrinolítica isolada da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix*, demonstrou atividade proteolítica direta sobre o fibrinogênio (DEITCHER; TOOMBS, 2006), e ao contrário do ativador de plasminogênio e da estreptoquinase que ativam plasmina para degradar coágulos de fibrina, a fibrolase atua diretamente sobre os coágulos de fibrina. O potencial clínico desta enzima está sendo explorado na sua forma recombinante, que avançou para a Fase III do ensaio clínico sob o nome alfimeprase. Os estudos *in vivo* demonstraram que a lise do coágulo pela alfimeprase é até 6 vezes mais rápida do que a lise observada com ativadores de plasminogênio (MARKLAND; SWENSON, 2012).

Outra função importante das SVMPs é a ativação de protrombina. Os ativadores de protrombina de peçonha podem ser subdivididos em quatro classes: A, B, C e D (JOSEPH; KINI, 2001; KINI, 2005). Os grupos A e B são metaloproteases, enquanto os grupos C e D são serinoproteases (KINI, 2005). Os representantes do grupo A não requerem cofatores, tais como cálcio, fosfolipídios ou outras proteínas, para a ativação de protrombina. O ativador de protrombina melhor caracterizado é ecarina, isolado da peçonha de *Echis carinatus*. A enzima é uma SVMP da classe P-III, que cliva seletivamente a ligação Arg322-Ile323 da protrombina liberando meizotrombina. A meizotrombina por autocatálise produz então trombina (MARKLAND; SWENSON, 2012). Em laboratórios, a ecarin tem sido usada para medir níveis de protrombina no plasma (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

Outra importante atividade biológica das SVMPs é a sua capacidade de coagulação do sangue por meio da ativação do Fator X (FX). De forma similar às SVMPs ativadoras de protrombina, metaloproteases conversoras do fator X, têm sido utilizadas para medir a concentração de FX no plasma e também para distinguir deficiências de fator VII e FX (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

As SVMPs parecem ser ferramentas úteis para investigar os mecanismos da coagulação sanguínea e têm sido extensivamente usadas no desenvolvimento de testes e diagnóstico. Além disso, estas enzimas parecem ser interessantes modelos moleculares para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e medicamentos (MARKLAND; SWENSON, 2012; BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

1.7. Proteômica de peçonhas de serpentes

Proteômica é o estudo sistemático das propriedades de diversas proteínas paralelamente, com o objetivo de proporcionar uma descrição detalhada da estrutura, função e do controle de sistemas biológicos (PATTERSON; AEBERSOLD, 2003).

A caracterização de peçonhas por meio de técnicas proteômicas é útil na análise de isoformas de toxinas, bem como os efeitos de regulação do gene de expressão de proteínas por meio da comparação da abundância relativa de proteínas na peçonha de diferentes indivíduos da população de uma mesma espécie (CALVETE et al., 2007). Proteomas de peconhas também podem ser empregados para a identificação de espécies independentemente da origem geográfica e características morfológicas (SERRANO et al., 2005; Furtado et al., 2006). A aplicação de técnicas proteômicas para caracterizar a grande variabilidade molecular dentro das famílias de toxina pode contribuir para uma compreensão mais profunda dos efeitos biológicos decorrentes do envenenamento, além de auxiliar na elaboração de protocolos de imunização mais eficientes, resultando em tratamentos e soros antiofídicos com maior especificidade e mais eficazes do que os sistemas convencionais (GUTIÉRREZ et al., 2009). A abordagem utilizada por diferentes pesquisadores inicia com o fracionamento da peconha bruta por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa, seguindo da caracterização inicial de cada fração proteica por combinação de técnicas de sequenciamento do N-terminal, SDS-PAGE, determinação das massas moleculares e por espectrometria de massas. As proteínas são separadas, submetidas à digestão tríptica in-gel, e os peptídeos trípticos resultantes são então analisados por MALDI-TOF/TOF, seguido por determinação da sequência de aminoácidos (FOX; SERRANO, 2008; CALVETE et al., 2007). Kohlhoff e colegas (2012) utilizaram o fracionamento por RP-HPLC seguido pela caracterização das frações por SDS-PAGE e identificação das proteínas por MALDI-TOF para realizarem o proteoma da peçonha das serpentes Bothrops atrox, B. barnetti and B. pictus (KOHLHOFF et al., 2012). De forma similar, Rey-Suárez e colaboradores (2011) reportaram o proteoma da peconha da serpente Micrurus mipartitus. Os autores iniciaram a caracterização da peçonha com o fracionamento em RP-HPLC, seguida por SDS-PAGE, digestão tríptica em gel e identificação por espectrometria de massas por MALDI ou ESI, e atribuição das famílias de proteínas conhecidas por similaridade (REY-SUÁREZ et al., 2011).

A caracterização detalhada das peçonhas de serpentes fornece um catálogo abrangente das toxinas secretadas nas peçonhas, que representam uma ferramenta biotecnológica valiosa para o estudo de processos fisiológicos (SERRANO et al., 2005; FOX; SERRANO, 2005; CALVETE et al., 2009), além de inúmeras aplicações potenciais para a pesquisa básica, diagnóstico clínico e desenvolvimento de novas ferramentas de pesquisa e drogas de potencial uso clínico (BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

Até o momento, foram descritos a partir do gênero *Bothrops* os proteomas para as espécies *B. asper* (ALAPE-GIRÓN et a., 2008), *B. cotiara* e *B. fonsecai* (TAKASHIMA et al., 2008), *B. colombiensis* (CALVETE et al., 2009), *B. insularis* (VALENTE et al., 2009) e *B. jararaca* (ZELANIS et al., 2011). No presente trabalho, apresentamos a caracterização proteômica da peçonha bruta da espécie *Bothrops pirajai*.

A serpente *B. pirajai* é uma espécie noturna e terrícola de 1 m de comprimento. Habita floresta ombrófila densa, em altitudes de até 600 m. Sua área de ocorrência abrange a zona cacaueira do sudeste da Bahia (MACHADO et al., 2008) e nordeste de Minas Gerais (HOGE; ROMANO, 1979). Essa espécie foi descrita por Amaral (1926) e sua espécie mais próxima filogeneticamente é a *B. jararacussu*.



Figura 3. Foto da serpente Bothrops pirajai.

Fonte: http://www.arkive.org/pirajas-lancehead/bothrops-pirajai/

Atualmente, a espécie *Bothrops pirajai* se encontra na "Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção" na categoria em perigo (EN) (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2008) e na lista da "União Internacional para Conservação da Natureza" (IUCN, The International Union for Conservation of Nature) na categoria vulnerável (VU) (ARGOLO, 2000). A principal ameaça à espécie é a perda ou redução de seu hábitat, que se encontra em uma região de intensa exploração agrícola.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou resultados importantes relacionados às características bioquímicas, estruturais e funcionais de uma metaloprotease da classe P-I isolada da peçonha de *Botrops pirajai*. Os resultados apresentados acrescentam informações relevantes que poderão melhorar a compreensão da relação entre estrutura e efeitos biológicos para essa classe de toxina considerada uma das principais responsáveis pelos efeitos locais decorrentes do acidente ofídico. Os resultados obtidos demonstram que:

• A BpirMP é uma metaloprotease da classe P-I com massa molecular de 23,0 kDa, de cadeia única como apresentado na SDS-PAGE.

• É uma enzima capaz de degradar as cadeias A α e B β do fibrinogênio não apresentando atividade sobre a cadeia γ .

• A metaloprotease degradou coágulos de fibrina e trombos *in vitro*, além de ser incapaz de coagular o plasma.

• A BpirMP é uma enzima relativamente estável frente a variações de temperatura e pH, apresentando redução significativa da sua atividade proteolítica em temperaturas superiores a 60 °C e pHs ácidos (pHs 3,0 e 4,5).

• A atividade proteolítica da metaloprotease foi significativamente reduzida na presença de agentes quelantes como EDTA, EGTA e 1,10-Fenantrolina e também na presença de agentes redutores (β -mercaptoetanol e DTT) confirmando a importância da estrutura tridimensional para a atividade catalítica da molécula. Na presença de inibidores específicos para serinoproteases (benzamidina, leupeptina e aprotina) não ocorreu alterações na atividade proteolítica da enzima.

• A BpirMP é uma metaloprotease fracamente hemorrágica com DHM de 50 µg.

• A metaloprotease BpirMP é capaz de degradar componentes da MB tanto *in vitro* como *in vivo*, com diferente especificidade em relação aos diferentes componentes da MB. A atividade da enzima mostrou-se mais evidente sobre a laminina, fibronectina e nidogênio em relação ao colágeno tipo IV, principalmente quando comparada à atividade da metaloprotease BaP1. Dessa forma, o baixo potencial hemorrágico da toxina deve estar relacionado à sua baixa atividade proteolítica sobre o colágeno tipo IV.

• Os resultados obtidos sugerem que a BpirMP participa ativamente da resposta inflamatória decorrente do envenenamento, induzindo a formação de edema de pata em ratos

mediado principalmente por metabólitos do ácido araquidônico via ciclooxigenases e aminas biogênicas, como a histamina.

• Além do edema, a BpirMP reduziu significativamente o limiar nociceptivo dos animais.

• Ademais, a BpirMP induziu a migração de leucóticos para a cavidade peritoneal de camundongos.

• BpirMP é capaz de induzir lesão moderada em diferentes tecidos (muscular, renal, cardíaco, esplênico e pulmonar) visualisados pela análise histológica.

• O mecanismo pelo qual a BpirMP induz os efeitos patológicos locais não está totalmente esclarecido, sugerindo um mecanismo indireto, talvez pela ação sobre os componentes da membrana basal dificultando a regeneração tecidual após a lesão decorrente do envenenamento.

• A sequência parcial de aminoácidos e a estrutura tridimensional da BpirMP apresentou alta identidade com outras metaloproteases do gênero *Bothrops*. A molécula possui os resíduos de histidina do sítio ativo, altamente conservados, além da sequência consenso HELGHNLGMEH e o Met-turn (CVM) adjacente ao sítio catalítico.

O conhecimento da composição proteica das peçonhas, assim como o papel de seus diversos componentes durante o envenenamento, auxilia no desenvolvimento de tratamentos mais específicos e eficazes de vítimas de acidentes ofídicos. A metaloprotease BpirMP mostrou-se fracamente hemorrágica porém ativa sobre fatores da coagulação sanguínea como a fibrina, degradando coágulos de sangue *in vitro*, sugerindo uma potencial aplicação desta toxina para o tratamento de desordens da coagulação e como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos trombolíticos. Assim, o isolamento e a ampla caracterização funcional e estrutural de metaloproteases tornam-se importantes ferramentas para novos estudos sobre as SVMPs e suas possíveis aplicações terapêuticas e biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS^{*}

AKAO, P.K.; TONOLI, C.C.C.; NAVARRO, M.S.; CINTRA, A.C.O.; NETO, J.R.; ARNI, R.K.; MURAKAMI, M.T. Structural studies of BmooMPa-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon** v. 55, p. 361–368, 2010.

ALAPE-GIRÓN. A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J.J. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. J. Proteome Res. v. 7, p. 3556-71, 2008.

AMARAL, A. New genera and species of snakes. Proc. New Engl. Zool. Club. v. 8, p. 85-105, 1923.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie** v. 82(8), p. 755-763, 2000.

ARGOLO, A.J.S. 2000. *Bothrops pirajai*. In: IUCN 2011. **IUCN Red List of Threatened Species.** Disponível em: ">http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/39902/0>. Acesso em: 10 out. 2012.

ASTROF, S.; HYNES, R.O.; Fibronectins in vascular morphogenesis. Angiogenesis v. 12, p. 165-75, 2009.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I.R.; BATISTA, I.F.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G.P.; RODRIGUES, V.M.; PERALES, J.; VALENTE, R.H.; MOURA-DA-SILVA, A.M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon** v. 51, p. 54-65, 2008.

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

BARBOSA, A.M.; DO AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon** v. 42, p. 515-523, 2003.

BARTON, G.M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J Clin Invest**. v. 118, p. 413-20, 2008.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell v. 139, p. 267-84, 2009.

BAZAA, A.; MARRAKCHI, N.; EL AYEB, M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Snake venomics: comparative analysis of the venom proteomes of the tunisian snakes *Cerastes cerastes, Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. **Proteomics**. v. 5, p. 4223-35, 2005.

^{*} De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023/2002.

BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, L.H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie** v. 88, p. 189-200, 2006.

BERGER, M.; PINTO, A.F.; GUIMARÃES, J.A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. v. 51, P. 488-501, 2008.

BERNARDE, P.S. Changes in the Brazilian poisonous snake classification and their implications in the medical literature. **Gaz. Méd.** v. 81, p. 55-63, 2011.

BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; COSTA, T.R.; GOMES, M.S.R.; TORRES, F.S.; COSTA, J.; BORGES, M.H.; RICHARDESON, M.; SANTOS, D.M.; PIMENTA, A.M.C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOARES, A.M.; OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)oliytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon** v. 51, p.574-584, 2008.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. Methods Enzymol. v. 248, p.345-68, 1995.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W., Characterization of two hemorrhagic zinc proteinases, toxin c and toxin d, from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Biochim. Biophys. Acta** v.911, p.356–363, 1987.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics** v. 62, p. 325-372, 1994.

BJARNASON, J.B.; HAMILTON, D.; FOX, J.W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol. Chem. Hoppe Seyler.** v. 369 Suppl. 121-9, 1988.

BJARNASON, J.B.; TU, A.T. Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin e. **Biochemistry** v. 17, p. 3395-404, 1978.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F.X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins' **FEBS** v. 331. p. 134-140, 1993.

BODE, W.; KRESS, L.F.; MEYER, E.F.; GOMIS-RÜTH, F.X. The crystal structure of adamalysin II, a zincendopeptidase from the snake venom of the eastern diamondback rattlesnake *Crotalus adamanteus*. **Braz J Med Biol Res**. v. 27, p. 2049-68, 1994b.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; OVADIA, M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake Bothrops asper. **Toxicon** v. 31, p. 1137-50, 1993.

BOSMAN, F.T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol. v. 200(4), p. 423-428, 2003.

BOU-GHARIOS, G.; PONTICOS, M.; RAJKUMAR, V.; ABRAHAM, D. Extra-cellular matrix in vascular networks. Cell Prolif. v. 37, p. 207-220, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom acting on hemostasis. Biochimie v. 82, p. 851-859, 2000a.

BREEN, E.C. Mechanical strain increases type I collagen expression in pulmonary fibroblasts in vitro. J Appl Physiol. v. 88, p. 203-9, 2000.

CALIL-ELIAS, S.; MARTINEZ, A.M.; MELO, P.A. Effect of heparin and antivenom on skeletal muscle damage produced by Bothrops jararacussu venom. **Histol. Histopathol**. v. 17, p. 463-470, 2002.

CALIXTO, M.C.; TRICHÊS, K.M.; CALIXTO, J.B. Analysis of the inflammatory response in the rat paw caused by the venom of *Apis melifera* bee. **Inflamm. Res**. v.2, p. 132-9, 2003.

CALVETE, J.J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake Venomics. Strategy and applications. J. Mass Spectrom. v. 42, p. 1405-14, 2007.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters** v. 583, p. 1736–1743, 2009.

CARDOSO, J. L. C. Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo-SP: Sarvier, 2003. 468 p.

CASTRO, H.C.; DUTRA, D.L.S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; ZINGALI, R.B. Bothroalternin, A thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon** v. 36, p. 1903-1912, 1998.

CHACUR, M.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Pharmacological modulation of hyperalgesia induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon** v. 39(8), p. 1173-81, 2001.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake Bothrops asper (terciopelo) in mice. **Toxicon** v. 33, p. 31-9, 1995.

CHAVIRA, R. JR.; BURNETT, T.J.; HAGEMAN, J.H. Assaying proteinases with azocoll. Anal. Biochem. v. 136, p. 446-50, 1984.

CINTRA, A.C.; DE TONI, L.G.; SARTIM, M.A.; FRANCO, J.J.; CAETANO, R.C.; MURAKAMI, M.T.; SAMPAIO, S.V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon** v. 60, p. 70-82, 2012.

CIVELLO, D.J.; MORAN, J.B.; GEREN, C.R. Substrate specificity of a hemorrhagic proteinase from timber rattlesnake venom. **Biochem.** v. 22, p. 755-62. 1983.

CLISSA, P.B.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R.D.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DA-SILVA, A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon** v. 39, p. 1567-73. 2001

COSTA, P.; TOYAMA, M.H.; MARANGONI, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; CRUZ-HÖFLING, M.A. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse *extensor digitorum longus* (edl) muscle preparation. **Toxicon** v. 37, p. 1143-1153, 1999.

DALE, C.S.; GONÇALVES, L.R.; JULIANO, L.; JULIANO, M.A.; DA SILVA, A.M.; GIORGI, R. The C-terminus of murine s100a9 inhibits hyperalgesia and edema induced by jararhagin. **Peptides** v. 25, P. 81-9, 2004.

DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. Nature v. 379, p. 537-540, 1996.

DAVIS, G.E.; SENGER, D.R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. **Circ. Res.** v. 97, p. 1093-107, 2005.

DE AZEVEDO, W.F. JR.; WARD, R.J.; CANDURI, F.; SOARES, A.; GIGLIO, J.R.; ARNI, R.K.; Crystal structure of piratoxin-I: a calcium-independent, myotoxic phospholipase A₂-homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Toxicon** v. 36, 1395-406, 1998.

DE FARIA, L.; ANTUNES, E.; BON, C.; DE ARAÚJO, A.L. Pharmacological characterization of the rat paw edema induced by *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom. **Toxicon** v. 39, p. 825-30, 2001.

DEITCHER, S.R.; TOOMBS, C.F. Non-clinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: alfimeprase. **Pathophysiol Haemost. Thromb.** v. 34, p. 215-20, 2005.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA, 2002.

DENNIS, E.A. Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. Am. J. Respir. Crit. Care Med. v. 161, p. 32-5, 2000.

DOOLITTLE, R.F. Fibrinogen and fibrin. Annu Rev Biochem. v. 53, p. 195-229, 1984.

DOOLITTLE, R.F. Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. Adv. Protein. Chem. V. 27, p. 1-109, 1973.

DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. Toxicon v. 40(6), p. 659-665, 2002.

DU, X.Y.; SIM, D.S.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood Cells Mol. Dis**. v. 36, p. 414-421, 2006.

EDGAR, W.; PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.** v. 2, p. 85-95. 1973.

ESCALANTE, T., RUCAVADO, A., FOX, J.W., GUTIÉRREZ, J.M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. J. Proteomics v. 74, p. 1781-1794, 2011.

ESCALANTE, T.; ORTIZ, N.; RUCAVADO, A.; SANCHEZ, E.F.; RICHARDSON, M.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M. Role of Collagens and Perlecan in Microvascular Stability: Exploring the Mechanism of Capillary Vessel Damage by Snake Venom Metalloproteinases. **PLoS ONE**, v. 6(12), 2011.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; FOX, J.W. Novel insights into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. **Arch Biochem Biophys**, v. 455, p. 144-53, 2006.

FARSKY, S.H.; GONÇALVES, L.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; CORREA, A.P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P.; TAMBOURGI, D.V. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement system. Role in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm**. v. 9, p. 213-21, 2000.

FARSKY, S.H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. **Toxicon** v. 35, p. 185-93, 1997.

FENWICK, A.M.; GUTBERLET, R.L.; EVANS, J.A.; PARKINSON, C.L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops, Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool. J. Linn. Soc.** v. 156, p. 617–640, 2009.

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-a and PGE₂-dependent mechanisms. **Brit. J. Pharm.** v. 151, p. 1254–1261, 2007.

FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; ZULIANI, J.P.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F. Inflammatory effects of BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon** v. 47, p. 549-559, 2006.

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

FOX, J.W.; MAYER, U.; NISCHT, R.; AUMAILLEY, M.; REINHARDT, D.; WIEDEMANN, H.; MANN, K.; TIMPL, R.; KRIEG, T.; ENGEL, J. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. **Embo J**. v. 10, p. 3137-46, 1991.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon** v. 45, p. 969-85, 2005.

FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. J. Proteomics v. 72, p. 200-9, 2009

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal** v. 275 p. 3016–3030, 2008.

FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J.M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. Toxicon v. 38, p. 63-77, 2000.

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo, Editora Sarvier, p.13-32, 2003.

FREITAS, M.A. Serpentes da Bahia e do Brasil. FEIRA DE SANTANA: DALL. p. 79, 1999.

FURTADO, M.F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S.R.; ROCHA, M.M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon** v. 8, p. 401-10, 2006.

GALVÃO NASCIMENTO, N.; SAMPAIO, M.C.; AMARAL OLIVO, R.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. **Toxicon**, v. 55, p. 343-52.

GAY, C.C.; LEIVA, L.C.; MARUÑAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA de PERÉZ, O. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 546–554, 2005.

GOMES, M.S.; DE QUEIROZ, M.R.; MAMEDE, C.C.; MENDES, M.M.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; SOUSA, M.V.; AQUINO, E.N.; CASTRO, M.S.; DE OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V.M. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from Bothrops leucurus snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.** v. 153, p. 290-300, 2011.

GOMES, M.S.; MENDES, M.M.; DE OLIVEIRA, F.; DE ANDRADE, R.M.; BERNARDES, C.P.; HAMAGUCHI, A.; DE ALCÂNTARA, T.M.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon** v. 53, p. 24-32, 2009.

GOMIS-RÜTH, F.X.; KRESS, L.F.; KELLERMANN, J.; MAYR, I.; LEE, X.; HUBER, R.; BODE, W. Refined 2.0 A X-ray crystal structure of the snake venom zinc-endopeptidase adamalysin II. Primary and tertiary structure determination, refinement, molecular structure and comparison with astacin, collagenase and thermolysin. J. Mol. Biol. v. 239, p. 513-44, 1994a.

GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. J. Mol. Biol. v. 283, p. 657-68, 1998.

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** v. 50, p. 120-34, 2007.

GUAN, A.L.; RETZIOS, A.D.; HENDERSON, G.N.; MARKLAND, F.S. Jr. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). Arch. Biochem. Biophys. v. 289, p. 197-207, 1991.

GUTIÉRREZ, J.M. Snakebite envenoming: A public health perspective. In: Maddock, J. (Ed.), Public Health-Methodology, Environmental and Systems Issues. InTech, Rojeka, Croatia, pp. 131-162, 2012. GUTIÉRREZ, J.M., THEAKSTON, R.D.G. AND WARRELL, D.A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med.** v. 3, p.150, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev. Biol. Trop.** v. 34, p. 209-214, 1986.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Memorias Instituto Butantan** v. 51, p. 211–223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon** v. 42, p. 915-31, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M.; 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** v. 33, p. 19-29, 1995.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A; ESCARLANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon** v. 45, p. 997-1077, 2005a.

GUZZO, M.L.; FARSKY, S.H.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E.; SILVA, M.A.; MELLO, S.B. Role of kinins and nitric oxide on the rabbit arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon** v. 38, p. 1535-46, 2000.

HAMZA, L.; GARGIOLI, C.; CASTELLI, S.; RUFINI, S.; LARABA-DJEBARI, F. Purification and characterization of a fibrinogenolytic and hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Vipera lebetina* venom. **Biochimie** v. 92, p. 797-805, 2010.

HAVT, A.; TOYAMA, M.H.; NASCIMENTO, N.R.F.N.; TOYAMA, D.O.; NOBRE, A.C.L.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.F.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.C.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 37, p. 130-141, 2005.

HOFSTRA, C.L.; DESAI, P.J.; THURMOND, R.L.; FUNG-LEUNG, W.P. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. v. 305, p. 1212-21, 2003.

HUANG, J.F.; THURMOND, R.L. The new biology of histamine receptors. **Curr. Allergy Asthma Rep**. v. 8, p. 21-7, 2008.

IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.L.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, p. 7034-7043, 2006. JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the adams family of proteins. **Toxicon** v. 34, p. 1269-76, 1996.

JIANG, W.; MA, T.; SU, X.; QIU, P.; YAN, G. Enzymatic activities and functional characterization of a novel recombinant snake venom proteinase from *Agkistrodon acutus*. **Biochimie** v. 91 p. 277-287, 2008.

JOSEPH, J.S.; KINI, R.M. Snake venom prothrombin activators homologous to blood coagulation factor Xa. **Haemostasis** v. 31, p. 234–240, 2001

JUNQUEIRA, L.C.; E CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7^a edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P.L. A survey of gene expression. And diversity in the venom glands of the pitviper snake Bothrops insularis through the generation of expressed sequence tags (ESTs). Gene v. 299, p. 279-291, 2002.

KAMIGUTI, A.S.; Platelets as targets of snake venom metalloproteinases Toxicon v. 45, p. 1041–1049 2005.

KANAOKA, Y.; URADE, Y. Hematopoietic prostaglandin D synthase. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. v. 69, p. 163-7, 2003.

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R.P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R.M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS** J. v. 278, p. 4544-76, 2012.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D.G.; DE SILVA, H.J. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Med.** v. 5, p. 218, 2008.

KINI, R.M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. **Toxicon** v. 45, p. 1133–1145, 2005.

KOH, D.C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. Cell Mol Life Sci. v. 63, p. 3030-41, 2006.

KOHFELDT, E.; SASAKI, T.; GÖHRING, W.; TIMPL, R. Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. J Mol Biol. v. 282, p. 99-109, 1998.

KOHLHOFF, M.; BORGES, M.H.; YARLEQUE, A.; CABEZAS, C.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Exploring the proteomes of the venoms of the peruvian pit vipers *Bothrops atrox, B. barnetti* and *B. pictus.* J. **Proteomics** v. 75, p. 2181-95, 2012.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. Jpn. J. Med. Sci. Biol. v.13, p.43-52, 1960.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature v. 227, p. 680–685, 1970.

LASKOWSKI R, A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D.; THORNTON, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Cryst. v. 26, p. 283-291, 1993.

LEE, M.S.Y.; SCANLON J.D. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biol. Rev**. v. 77, p. 333-401, 2002.

LEITÃO, D.P.; POLIZELLO, A.C.; ROTHSCHILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (Hydrochaeris hydrocaeris), a close relative of the guinea-pig (Cavia porcellus). **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v. 125, p. 113-120, 2000.

LEÓN, G.; SÁNCHEZ, L.; HERNÁNDEZ, A.; VILLALTA, M.; HERRERA, M.; SEGURA, A.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J.M. Immune response towards snake venoms. **Inflamm. allergy drug targets** v. 10, p. 381-98, 2011.

LINGOTT, T.; SCHLEBERGER, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; MERFORT, I. High-Resolution Crystal Structure of the Snake Venom Metalloproteinase BaP1Complexed with a Peptidomimetic: Insight into Inhibitor Binding. **Biochemistry** v. 48, p. 6166–6174, 2009.

LÔBO de ARAÚJO, A.; SOUZA, A.O.; CRUZ-HÖFLING, M.A.; FLORES, C.A.; BON, C. *Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom induces oedema formation and increases vascular permeability in the mouse hind paw. **Toxicon** v. 38, p. 209-21, 2000.

LOMONTE, B.; TSAI, W.C.; BONILLA, F.; SOLÓRZANO, A.; SOLANO, G.; ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomics and toxicological profiling of the arboreal pitviper *Bothriechis supraciliaris* from Costa Rica. **Toxicon** v. 59, p. 592-599, 2012.

LU, Q.; CLEMETSON, J.M.; CLEMETSON, K.J. Snake venoms and hemostasis. J. Thromb. Haemost. v. 3, p. 1791-9, 2005.

MAKOGONENKO, E.; TSURUPA, G.; INGHAM, K.; MEDVED, L. Interaction of fibrin(ogen) with fibronectin: further characterization and localization of the fibronectin-binding site. **Biochemistry** v. 41, p. 7907-13, 2002.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.; LACHAT, J.J.; DE ARAUJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon** v. 5, p. 615-26, 1995.

MANNING, M.C. Sequence analysis of fibrolase, a fibrinolytic metalloproteinase from *Agkistrodon contortrix* contortrix. **Toxicon.** v. 33, p. 1189-200, 1995.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FINHO, N.A.; MAZZI, M.V.; OLIVEIRA, C.Z; IZIDORO, L.F.M.; FULY, A.L.; MAGNO, A.J.; BRAZ, A.S.K.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R.; SOARES, A.M. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. **Peptides** v. 28, 2328-2339, 2007.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system Toxicon v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MARKLAND, F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon** (in press), 2012. doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. **Toxicon** v. 30, p. 1387-97, 1992.

MASKOS, K.; BODE, W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Mol. Biotechnol.** v. 25, p. 241-66, 2003.

MATSUDA, M.; YAMANAKA, T.; MATSUDA, A. Distribution of fibronectin in plasma and liver in liver diseases. Clin. Chim. Acta v. 118, p. 191-9, 1982.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1477, p. 146-156, 2000.

MAZZI, M.V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; STÁBELI, R.G.; FRANCO, J.J.; TICLI, F.K. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon** v.44, p.215–23, 2004.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. v. 454, p. 428-35, 2008.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. São Paulo: Editora Sarvier, 2003, p. 33-61.

MENALDO, D.L.; BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; MOURA, L.D.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from Bothrops pirajai snake venom. **Biochimie** (in press), 2012. doi: 10.1016/j.biochi.2012.07.007.

MINER, J.H.; YURCHENCO, P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. v. 20, p. 255-84, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim eletrônico epidemiológico, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov. br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf> Acesso em: 15 set. 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção, 2008. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/vol_ii_reptis.pdf> Acesso em: 15 set. 2012.

MISE, Y.F.; LIRA-DA-SILVA, R.M.; CARVALHO, F. M. Envenomation by *Bothrops* in the State of Bahia: epidemiological and clinical aspects **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 40, p. 569-573, 2007.

MOREIRA, V.; DOS-SANTOS, M.C.; NASCIMENTO, N.G.; DA SILVA, H.B.; FERNANDES, C.M.; D'IMPÉRIO LIMA, M.R.; TEIXEIRA, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. **Toxicon** v. 60, p. 12-20, 2012.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat. Rev. Immunol. v. 6, p. 173-82, 2006.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. Nature v. 420, p. 846-52, 2002.

NAVES DE SOUZA, D.L.; GOMES, M.S.; FERREIRA, F.B.; RODRIGUES, R.S.; ACHÊ, D.C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comp.** Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. v. 161, p. 102-9, 2012

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A.T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). Arch. Biochem. Biophys. v. 231, p. 309-319, 1984.

OHLER, M.; GEORGIEVA, D.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, R.K.; GENOV, N.; BETZEL, C. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **J. Proteome. Res.** v. 9, p. 2422-37, 2010.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A₂ from snake venom. **Toxicon** v. 42, p. 841-54, 2003.

OLIVO R,A.; TEIXEIRA, C.F.; WALLACE, J.L.; GUTIERREZ, J.M.; ZAMUNER, S.R. Role of cyclooxygenases in oedema-forming activity of *Bothropic* venoms. **Toxicon** v. 49(5), p. 670-7, 2007.

OWNBY, C.L.; NIKA, T.; IMAI, K.; SUGIHARA, H. Pathogenesis of hemorrhage induced by bilitoxin, a hemorrhagic toxin isolated from the venom of the common cantil (*Agkistrodon bilineatus bilineatus*). **Toxicon** v. 28, p. 837-46, 1990.

PATIÑO, A.C.; PEREAÑEZ, J.A.; NÚÑEZ, V.; BENJUMEA, D.M.; FERNANDEZ, M.; RUCAVADO, A.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic P-I metalloproteinase from colombian *Bothrops atrox* venom. **Toxicon** v. 56, p. 936-43, 2010.

PATTERSON, S.D.; AEBERSOLD, R.H. Proteomics: the first decade and beyond. **Nature gen. supplement** v. 33, p. 311-323, 2003.

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

PERKINS, M.N.; KELLY, D. Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiationinduced thermal hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.** v. 110, p. 1441-4, 1993. PETERSEN, T.E.; THOGERSEN, H.C.; SKORSTENGAARD, K.; VIBE-PEDERSEN, K.; SAHL, P.; SOTTRUP-JENSEN, L.; MAGNUSSON, S. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 80, p. 137-41, 1983.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo Ass. Med. Bras. v. 47, p. 24 - 29, 2001.

PONCE-SOTO, L.A.; BONFIM, V.L.; NOVELLO, J.C.; NAVARRO OVIEDO, R.; YARLEQUÉ CHOCAS, A.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a serine protease, BaIII-4, from Peruvian *Bothrops atrox* venom. **Protein J**. v. 26, p. 387-394, 2007.

POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol**. v. 126, p. 649-56, 1999.

PRETZER, D.; SCHULTEIS, B.; VANDER VELDE, D.G.; SMITH, C.D.; MITCHELL, J.W.; MANNING, M.C. Effect of zinc binding on the structure and stability of fibrolase, a fibrinolytic protein from snake venom. **Pharm. Res.** v. 9, p. 870-7, 1992.

RAMACHANDRAN, G.N. Protein Structure and Crystallography. Science v. 141, p. 288-291, 1963.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. - Snake venom metaloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 142, p. 328–346, 2006.

RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metallopeptidases using bioinformatic tools. **Toxicon** v. 44, p. 529-38, 2004.

RANDOLPH, A.; CHAMBERLAIN, S.H.; CHU, H.L.; RETZIOS, A.D.; MARKLAND FS, J.R.; MASIARZ, F.R. Amino acid sequence of fibrolase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **Protein Sci.** v. 1, p. 590-600, 1992.

REY-SUÁREZ, P.; NÚÑEZ, V.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Proteomic and biological characterization of the venom of the redtail coral snake, *Micrurus mipartitus* (Elapidae), from Colombia and Costa Rica. J. **Proteomics v.** 75, p. 655-67, 2011.

RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Bites by snakes in the genus *Bothrops*: a series of 3,139 cases. **Rev. Soc. Bras.** Med. Trop. v. 30, p. 475-80, 1997.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. Agents Actions v. 8, p. 45-49, 1978.

ROCHA, P.N.; PLUMB, T.J.; COFFMAN, T.M. Eicosanoids: lipid mediators of inflammation in transplantation **Springer. Semin. Immunopathol.** v. 25, p. 215-27, 2003.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; FRANCESCHI, A.M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; Giglio, J.R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie** v. 83, p. 471-9, 2001.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; ROGRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 38, p. 213-24, 2000.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.** v. 63, p. 186-99, 1995.

RUCAVADO, A.; NÚÑEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. Int. J. Exp. Pathol. v. 79, p. 245-54, 1998.

RUCAVADO, A.; SÁNCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHAES, A.; GUTIÉRREZ, J.M.; Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from Lachesis muta muta snake venom. **Toxicon** v. 37, p. 1297-1312, 1999.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon** v. 57, p. 627-45, 2011.

SALI, A.; POTTERTON, L.; YUAN, F.; VAN VLIJMEN, H.; KARPLUS, M. Evaluation of comparative protein modelling by MODELLER. **Proteins** v. 23, p. 318-326, 1995.

SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from peruvian *Bothrops atrox* (jergón) snake venom acts both on blood vessel ecm and platelets. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 496, p. 9-20, 2010.

SANCHEZ, R.; SALI, A. Advances in comparative protein-structure modeling. Current. Opinion in Structural Biology v. 7, p. 206-214, 1997.

SASAKI, T.; FÄSSLER, R.; HOHENESTER, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. J. Cell. Biol. v. 164, p. 959-63, 2004.

SCHERAGA, H.A. The thrombin-fibrinogen interaction. Biophys. Chem. v. 112, p. 117-30, 2004.

SCHWARZBAUER, J. Basement membranes: Putting up the barriers. Curr. Biol. v. 9, p. 242-4, 1999.

SCHYMEINSKY, J.; NEDBAL, S.; MIOSGE, N.; PÖSCHL, E.; RAO, C.; BEIER, D.R.; SKARNES, W.C.; TIMPL, R.; BADER, B.L. Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. **Mol. Cell. Biol**. v. 22, p. 6820-30, 2002.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat Immunol**. v. 6, p. 1191-7, 2005.

SERRANO, S.M.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon** v. 45, p. 1115-1132, 2005.

SHIVELY, J.E.; PAXTON, RJ.; LEE, T.D. Highlights of protein structural analysis. Trends Biochem. Sci. v. 14, p. 246-52, 1989.

SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; TRUMMAL, K.; TONISMAGI, K.; TAMMISTE, I.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, J. Factor X activator from *Vipera lebetina* venom is synthesized from different genes. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1702, p. 41–51, 2004.

SIIGUR, E.; SIIGUR, J. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1074, p. 223-9, 1991.

SOARES, S.G.; OLIVEIRA, L.L. Venom-sweet-venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein Pept. Lett.** v. 16, p. 913-919, 2009.

STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 2881-6, 2004.

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins **Current Opinion in Structural Biology** v. 5, p. 383-390, 1995

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

SUKI, B.; BATES, J.H. Extracellular matrix mechanics in lung parenchymal diseases. **Respir Physiol** Neurobiol. v. 163, p. 33-43, 2008.

SWENSON, S.; MARKLAND, F.S.Jr. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon v. 45, p. 1021-39, 2005.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian adam/adamts family proteins. **Biochim. Biophys. acta**. v. 1824, p. 164-76, 2012.

TAKEYA, H.; ARAKAWA, M.; MIYATA, T.; IWANAGA, S.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of h2proteinase, a non-hemorrhagic metalloproteinase, isolated from the venom of the habu snake, *Trimeresurus flavoviridis*. J. Biochem. v. 106, P. 151-7, 1989.

TANZER, M.L. Current concepts of extracellular matrix. J. Orthop. Sci. v. 11, p. 326-31, 2006.

TANZER, M.L. Extracellular matrix: extracellular matrix biochemty. Science v. 227, p. 289-90, 1985.

TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y.; OGA, S.; JANCAR, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops Jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (paf). **Toxicon** v. 32, p. 419-26, 1994.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops* asper venom. **Toxicon** v. 154, p. 988-997, 2009.

TEIXEIRA, C.F.; CHAVES, F.; ZAMUNÉR, 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. Pathol**. v. 86(2), p. 107-15, 2005.

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

TORRES-HUACO, F.D.; PONCE-SOTO, L.A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Purification and characterization of a new weak hemorrhagic metalloproteinase BmHF-1 from *Bothrops marajoensis* snake venom. **Protein J** v. 29, p. 407-16. 2010

TOYAMA, M.H.; SOARES, A.M.; VIEIRA, C.A.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-I, a myotoxin from *Bothrops pirajai* snake venom, and its biological activity after alkylation with p-bromophenacyl bromide. J. Protein Chem. v.17, p.713-8, 1998.

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

TU, A.T.; BAKER, B.; WONGVIBULSIN, S.; WILLIS, T. Biochemical characterization of atroxase and nucleotide sequence encoding the fibrinolytic enzyme. **Toxicon** v. 34, p. 1295-300, 1996.

VÁCHOVÁ, L.; MORAVCOVÁ, J. Two microassays for determination of a wide range of proteolytic activities using Azocoll as substrate. **Biochem. Mol. Biol. Int**. v. 30, p. 311-8, 1993.

VALENTE, R.H.; GUIMARÃES, P.R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A.G.; SOARES, M.R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M.R.; LEÓN, I.R.; ROCHA, S.L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; WERMELINGER, L.S.; DUTRA, D.L.; LEÃO, L.I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; HO, P.L.; ZINGALI, R.B.; PERALES, J.; DOMONT, G.B. *Bothrops insularis* venomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J Proteomics** v. 72, p. 241-55, 2009.

VITAL BRAZIL, O. Peçonhas. In: Farmacodinâmica. (CORBETT, C.E.). Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. p. 679-697, 1982.

WAHBY, A.F.; ABDEL-ATY, A.M.; EL-KADY, E.M. Purification of hemorrhagic SVMPs from venoms of three vipers of Egypt. **Toxicon** v. 59, p. 329–337, 2012.

WALLNOEFER, H.G.; LINGOTT, T.; GUTIÉRREZ, J.M.; MERFORT, I.; LIEDL, K.R. Backbone flexibility controls the activity and specificity of a protein-protein interface: specificity in snake venom metalloproteases. J. Am. Chem. Soc. v. 132, p. 10330-7, 2010.

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 Sci.** v. 12, p. 2273-81, 2003.

WU, W.B.; CHANG, S.C.; LIAU, M.Y.; HUANG, T.F. Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. **Biochem. J**. v. 357, p. 719-28, 2001.

XU, X.; LIU, X.; ZHANG, L.; CHEN, J.; LIU, W.; LIU, Q. Effects of metal ions on the conformation and activity of acutolysin d from agkistrodon acutus venom. **Protein J**. v. 25, p. 423-30, 2006.

YU, S.; SHER, B.; KUDRYK, B.; REDMAN, C.M. fibrinogen precursors. Order of assembly of fibrinogen chains. J. Biol. Chem. v. 259, p. 10574-81, 1984.

YURCHENCO, P.D.; AMENTA, P.S.; PATTON, B.L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. **Matrix Biol**. v. 22, p. 521-38, 2004.

ZAMUNER, S.R.; TEIXEIRA, C.F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Mediators Inflamm**. v. 11, p. 351-7, 2002.

ZELANIS, A.; VENTURA, J.S.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; FURTADO, M.F.D. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: An ontogenetic approach. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 145, p. 601–609, 2007.

ZHANG, D.; BOTOS, I.; GOMIS-RÜTH, F.X.; DOLL, R.; BLOOD, C.; NJOROGE, F.G.; FOX, J.W.; BODE, W.; MEYER, E.F. Structural interaction of natural and synthetic inhibitors with the venom metalloproteinase, atrolysin c (form d). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 91, p. 8447-51, 1994.

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