

MILENE CRISTINA MENEZES DOS SANTOS

Estudo sobre a função dos domínios não catalíticos do HF3, uma metaloproteinase do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, na sua interação com alvos celulares e plasmáticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Solange Maria de Toledo Serrano

**São Paulo
2010**

RESUMO

MENEZES, M. C. **Estudo sobre a função dos domínios não catalíticos do HF3, uma metaloproteinase do veneno da serpente *Bothrops jararaca*, na sua interação com alvos celulares e plasmáticos.** 156 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Com o objetivo de melhor compreender a relação entre estrutura e função dos domínios não catalíticos de metaloproteinases da classe P-III de venenos de serpentes, realizamos um estudo comparativo sobre a função dos domínios não catalíticos do HF3 (fator hemorrágico 3), uma metaloproteinase da classe P-III do veneno da *Bothrops jararaca*, que apresenta atividades hemorrágica e pró-inflamatória. Os domínios tipo-disintegrina (D) e rico em cisteínas (C) foram expressos juntos (DC), e individualmente, em fusão com a glutathion S-transferase (GST), em sistema procarioto, e avaliados quanto à capacidade de induzir a resposta pró-inflamatória e de inibir a agregação plaquetária. Ainda, foi avaliado o efeito de peptídeos sintéticos correspondentes à região hiper variável (HVR) do domínio rico em cisteínas do HF3 nestas atividades. Para isso, as proteínas GST-DC, GST-D16 e GST-D18 (domínio tipo-disintegrina contendo 16 ou 18 resíduos de cisteínas, respectivamente) e GST-C, bem como a proteína GST-DC(D/A), onde o resíduo de Asp do *motif* E-C-D do domínio tipo-disintegrina foi substituído por Ala, foram avaliadas quanto à capacidade de promover o aumento do rolamento de leucócitos na microcirculação. O mesmo foi realizado com os peptídeos correspondentes à HVR do domínio C do HF3 e da berythreactivase, uma metaloproteinase pró-coagulante da classe P-III, do veneno da *B. erythromelas*. Construções obtidas para a expressão da proteína GST-DC contendo a mutação Glu/Ala no *motif* E-C-D ou substituições de três resíduos de Lys por Ala na HVR não geraram as proteínas esperadas. As proteínas que contêm o domínio rico em cisteínas (GST-DC e GST-C), bem como os peptídeos correspondentes à HVR e a regiões adjacentes à HVR, foram capazes de promover o aumento do rolamento de leucócitos em vênulas. O mesmo não foi observado com as proteínas correspondentes ao domínio tipo-disintegrina (GST-D16 e GST-D18), e com a proteína mutada GST-DC(D/A). O rolamento de leucócitos induzido pelas proteínas

GST-DC e GST-C e pelo peptídeo correspondente à HVR do HF3 foi inibido por anticorpos anti- α_M e anti- β_2 , sugerindo um papel para o domínio rico em cisteínas em promover efeitos pró-inflamatórios mediados pela integrina $\alpha_M\beta_2$. Ensaio de agregação plaquetária mostraram que as proteínas GST-DC e GST-C inibem a agregação induzida pelo colágeno, enquanto que as proteínas GST-D16, GST-D18 e a mutante GST-DC(D/A) não o fazem. A inibição da agregação plaquetária também foi observada com os peptídeos sintéticos derivados da HVR do HF3. Ainda, ensaios de ligação em fase sólida mostraram que a proteína DC mostrou ter maior afinidade pelas proteínas laminina e fibronectina do que as proteínas D e C individualmente. Em conjunto, esses resultados indicam que o domínio rico em cisteínas do HF3 e sua HVR desempenham um papel nas atividades pró-inflamatória e de inibição da agregação plaquetária. No entanto, a estrutura que o domínio D assume quando em conjunto com o domínio C, como é o caso da proteína GST-DC, pode conter exossítios que sejam importantes para estas funções já que a mutação do resíduo de Asp do *motif* E-C-D gerou uma proteína menos ativa, ainda que o domínio rico em cisteínas estivesse presente em sua estrutura.

Palavras-chave: Metaloproteinases de venenos de serpentes, domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas, região hiper variável (HVR), rolamento de leucócitos, inibição da agregação plaquetária.

ABSTRACT

MENEZES, M. C. **Study on the role of the non-catalytic domains of HF3, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, in the interaction with cell and plasma targets.** 156 f. PhD thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

With the aim of better understanding the relationship between structure and function of the non-catalytic domains of P-III class snake venom metalloproteinases, we carried out a comparative study on the function of the non-catalytic domains of HF3, a P-III class metalloproteinase of *Bothrops jararaca* venom with hemorrhagic and pro-inflammatory activities. The disintegrin-like (D) and cysteine-rich (C) domains were obtained in the recombinant form together (DC) and individually in fusion with glutathione S-transferase (GST) using a prokaryote expression system and tested for their ability to trigger the pro-inflammatory response and to inhibit collagen-induced platelet aggregation. Moreover, we evaluated the effect of synthetic peptides corresponding to the hyper-variable region (HVR) of the cysteine-rich domain of HF3 on the activities mentioned above. For this purpose, the proteins GST-DC, GST-D16 and GST-D18 (disintegrin-like domains containing 16 or 18 cysteine residues, respectively), GST-C, and GST-DC(D/A), a mutant protein where the Asp residue of the E-C-D motif of the disintegrin-like domain was replaced with Ala, were evaluated for their ability to increase leukocyte rolling in the microcirculation. Likewise, peptides derived from the HVR of the cysteine-rich domain of HF3 and of berythrin, a non-hemorrhagic, pro-coagulant metalloproteinase from *B. erythromelas* venom, were submitted to the same assay. Other constructs were obtained for the expression of the protein GST-DC carrying the substitution of other charged residues (Glu in the E-C-D motif, and three Lys residues in the HVR) by Ala, but these did not result in the expression of the desired proteins. The proteins containing the cysteine-rich domain of HF3 (GST-DC and GST-C) as well as the peptides corresponding to the HVR itself and peptides derived from sequences adjacent to the HVR were able to increase leukocyte rolling in venules, however, the proteins GST-D16, GST-D18 and GST-DC(D/A) failed to promote leukocyte rolling. Antibodies anti- α_M and anti- β_2 were able to inhibit the leukocyte rolling induced by GST-DC, GST-C and by the peptide derived from the HVR indicating that the cysteine-rich domain of HF3 plays a

role in the pro-inflammatory response mediated by this integrin. Platelet aggregation assays showed that the proteins GST-DC and GST-C, and peptides derived from the HVR of HF3 were able to inhibit collagen-induced aggregation, however, the proteins GST-D16, GST-D18 and GST-DC(D/A) failed to interfere with collagen-induced platelet aggregation. Moreover, in solid-phase binding assays the protein DC showed higher affinity for the proteins laminin and fibronectin compared to the individual D and C domains. Taken together, these results indicate that the cysteine-rich domain of HF3 and its HVR play a role in the pro-inflammatory response and in the platelet-aggregation inhibition. Nevertheless, the structure of disintegrin-like domain in tandem with the cysteine-rich domain, as is the case of the protein GST-DC, may contain exosites important for these functions of HF3 considering that the mutation of the Asp residue in the E-C-D motif caused loss of activity of the mutated GST-DC protein despite the presence of the cysteine-rich domain.

Key words: Snake venom metalloproteinase, disintegrin-like/cysteine-rich domains, hyper variable region (HVR), leukocyte rolling, inhibition platelet aggregation.

1 INTRODUÇÃO

O envenenamento ofídico é um problema de importância médica em vários países tropicais e subtropicais. Um estudo publicado recentemente sobre a incidência mundial de acidentes ofídicos revelou que pelo menos 421.000 casos de envenenamento e 20.000 mortes ocorrem anualmente (KASTURIRATNE et al., 2008). No Brasil, cerca de 20.000 casos são registrados anualmente, sendo 90% deles causados por serpentes do gênero *Bothrops* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A grande variedade de efeitos farmacológicos induzidos pelos venenos de serpentes nas presas desses animais e nas suas vítimas humanas é devida ao efeito isolado ou sinérgico de proteínas e peptídeos biologicamente ativos (ROCHA e SILVA et al., 1949; PORGES 1953; KARLSSON, 1979; BJARNASON e FOX, 1995). No caso de serpentes da família Viperidae, entre os vários fatores que contribuem para o quadro clínico do envenenamento, as enzimas proteolíticas desempenham um papel central. Os alvos dessas enzimas são proteínas teciduais como o colágeno e a laminina, e as proteínas plasmáticas dos sistemas hemostático, fibrinolítico e calicreína/cinina (STOCKER, 1990; MARSH, 1994; BJARNASON e FOX, 1995; MARKLAND, 1998;). Além do seu provável papel na digestão da presa, as enzimas proteolíticas induzem vários efeitos farmacológicos tais como coagulação intravascular, hemorragia, agregação plaquetária, edema e necrose tecidual (IWANAGA e SUZUKI, 1979; NIEWIAROWSKI et al., 1979; ROSING e TANS, 1992; BJARNASON e FOX, 1995).

As proteinases de venenos formam um grupo heterogêneo de proteínas, sendo muitas delas glicoproteínas, cujas massas moleculares em geral variam de 20 a 150 kDa, dependendo da classe, da estrutura, e do nível de glicosilação. Muitas dessas proteínas são formadas por uma única cadeia polipeptídica, porém também são descritas proteínas com mais de uma subunidade. Essas proteinases diferem em seus mecanismos de catálise, e são classificadas como serinoproteinases e metaloproteinases, e apresentam variações notáveis de especificidade de substrato. Algumas hidrolisam substratos específicos, enquanto outras degradam uma grande variedade de substratos de maneira inespecífica (BJARNASON e FOX, 1995;

MARKLAND, 1998; FOX e SERRANO, 2005; SERRANO e MAROUN, 2005; FOX e SERRANO, 2008a).

1.1 Metaloproteinases de venenos de serpentes

A intensa hemorragia local é uma das principais características do envenenamento por serpentes viperídeas, e que, em casos graves, pode chegar a ser sistêmica (OUYANG et al., 1992; BJARNASON e FOX, 1995; KAMIGUTI et al., 1996a). As toxinas responsáveis pela geração da hemorragia são identificadas como metaloproteinases e os venenos viperídeos são uma rica fonte dessas enzimas, caracterizadas como proteínas que contêm zinco no sítio ativo, e que são classificadas no clan MA, e na subfamília M12B das metaloproteinases. A subfamília M12B é composta por três grupos de enzimas: metaloproteinases de venenos de serpentes, ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) e ADAMTSs (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), sendo as ADAMs e as ADAMTSs expressas em mamíferos (BJARNASON e FOX, 1995; FOX e SERRANO, 2005; <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=M12B>).

Estruturalmente, essas subfamílias de proteinases são similares, entretanto, as ADAMs formam um grupo de proteínas transmembrânicas, enquanto que as ADAMTSs são solúveis, assim como as enzimas de venenos. A estrutura modular das ADAMs é composta pelos domínios: catalítico, disintegrina, rico em cisteínas, EGF (fator de crescimento epidérmico), transmembrânico e citoplasmático. Essas proteinases participam da regulação de processos fisiológicos como: inflamação, mitogênese, angiogênese, reprodução, proteólise, adesão, sinalização, além de modularem processos biológicos tais como migração e crescimento celular (BLACK e WHITE, 1998; WHITE, 2003). As ADAMTSs apresentam os domínios metaloproteinase, disintegrina, rico em cisteínas, e adicionalmente uma região espaçadora, um número variável de domínios tipo-trombospondina, além de alguns domínios únicos, particulares de algumas proteínas dessa subfamília (TANG e HONG, 1999; TANG, 2001; PORTER et al., 2005).

As metaloproteinases de venenos de serpentes, também conhecidas pela sigla em inglês SVMPs (*Snake Venom Metalloproteinases*), são proteínas

sintetizadas como pré-pró-enzimas e contêm, além do domínio metaloproteinase, domínios adicionais que estão envolvidos em seus mecanismos de interação com a matriz extracelular e com integrinas (BJARNASON e FOX, 1995).

Bjarnason e Fox (1995) organizaram as metaloproteinases de venenos de acordo com seus domínios estruturais em quatro classes distintas: P-I, P-II, P-III e P-IV, baseando-se na seqüência de seus cDNAs (*Complementary Deoxyribonucleic Acid*) e nas respectivas proteínas maduras. Proteinases maduras da classe P-I contêm somente o domínio metaloproteinase, enquanto que aquelas das classes P-II, P-III e P-IV contêm além do domínio metaloproteinase, respectivamente, domínios disintegrina ou tipo-disintegrina, rico em cisteínas, e tipo-lectina. Metaloproteinases da classe P-II podem sofrer processamento proteolítico gerando proteinases da classe P-I (domínio metaloproteinase) e disintegrinas. Com a identificação de um número maior de metaloproteinases ao longo dos anos, esta classificação foi ampliada considerando-se principalmente a estrutura das toxinas maduras isoladas dos venenos. À classe P-II foram acrescentadas as classes P-IIa e P-IIb, e à classe P-III as classes P-IIIa e P-IIIb (FOX e SERRANO, 2005).

Recentemente, uma nova classificação foi proposta baseando-se nas características dos precursores das metaloproteinases e nas modificações pós-traducionais que estes sofrem durante o processo de síntese. Esta classificação é composta por dez classes (P-Ia, P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId, P-IIe, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId) e nela, as proteinases da classe P-IV, contendo os domínios metaloproteinase, tipo-disintegrina, rico em cisteínas e tipo-lectina, foram incorporada à classe P-IIId, considerando-se que, até agora, nenhum cDNA ou precursor protéico específico contendo todos os domínios presentes nessas proteínas foi descrito, indicando que as proteinases que apresentam essa estrutura são geradas por modificações pós-traducionais de um precursor da classe P-III (Figura 1) (FOX e SERRANO, 2008b).

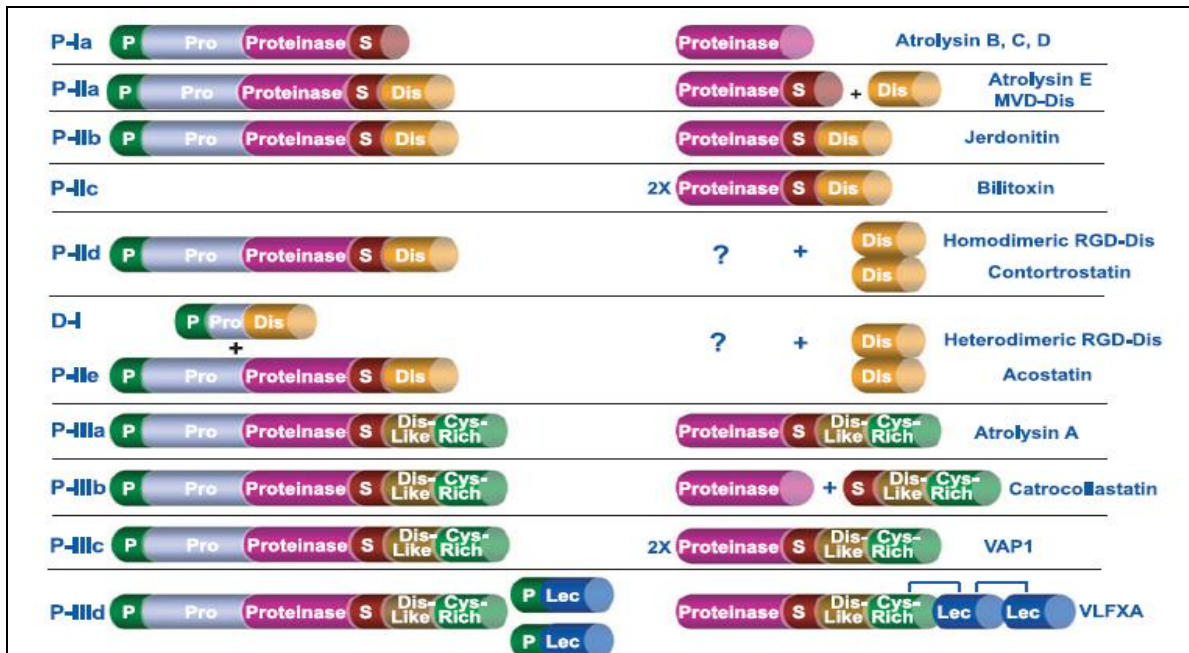


Figura 1. Esquema de classificação das metaloproteínas de venenos de serpentes.
 FONTE: Fox e Serrano, (2008b).

A biossíntese dos venenos de serpentes ocorre em glândulas especializadas, onde a maioria das proteínas secretadas é sintetizada no citoplasma de células secretoras. Estas proteínas são transferidas para o retículo endoplasmático rugoso, onde perdem o peptídeo sinal e assumem sua forma protéica através da formação de pontes de dissulfeto, glicosilações e multimerizações, como por exemplo, a dimerização de disintegrinas (P-IIId/P-IIe) e adição de domínios tipo-lectina (P-IIId) (FOX e SERRANO, 2008b). No complexo de Golgi estas proteínas são transportadas em vesículas até o lúmen das glândulas secretoras (WARSHAWSKY et al., 1973; FOX e SERRANO, 2008b), onde o caráter ácido do meio, a presença de citrato e de tripeptídeos (piroGlu-Lys-Trp; piroGlu-Asn-Trp; piroGlu-Gln-Trp) (ROBEVA et al., 1991; ODELL et al., 1998; HUANG et al., 1998; MARQUES-PORTO et al., 2008) provavelmente inibem a atividade proteolítica destas enzimas no lúmen glandular mantendo a integridade celular e das proteínas do veneno.

Como resultado da biossíntese e do controle de sua integridade na glândula, podemos encontrar no veneno de serpentes proteinases maduras resultantes da biossíntese de precursores da classe P-Ia, formadas pelo domínio catalítico contendo a seqüência consenso estendida para a ligação do átomo de zinco com massa molecular entre 20 kDa e 25 kDa (BJARNASON e FOX, 1995; BARRETT et

al., 1998). Em geral estas proteinases apresentam um número variado de cisteínas em suas seqüências, em torno de quatro a sete resíduos, formando de duas a três pontes de dissulfeto. Pertencem a esta classe as metaloproteinases atrolisina-C, HT-2, acutolisina-A, e BaP1, entre outras (FOX e SERRANO, 2005, 2008b). Enzimas desta classe são menos potentes em gerar hemorragia do que aquelas da classe P-III, sugerindo que domínios adicionais da classe P-III possam contribuir para o potencial hemorrágico da proteinase.

Os precursores das enzimas da classe P-II possuem, além do peptídeo sinal e do pró-domínio, o domínio disintegrina na porção carboxil do domínio catalítico. Estes precursores podem gerar proteínas maduras formadas somente pelo domínio catalítico ou somente o domínio tipo-disintegrina (classe P-IIa), como a atrolisina-E, e também proteínas que conservam o domínio disintegrina na proteína madura como as metaloproteinases jerdonitina (proteinase monomérica da classe P-IIb) e bilitoxina-1 (proteinase dimérica da classe P-IIc). Estes precursores ainda podem gerar disintegrinas clássicas, que contêm a seqüência RGD em sua estrutura, encontradas como proteínas únicas nos venenos, e ainda disintegrinas oligoméricas como a contortostatina e a acostatina, disintegrinas homo- e heterodiméricas, oriundas de precursores das classes P-IIId e P-IIe, respectivamente (Figura 1) (FOX e SERRANO, 2005, 2008b).

Proteinases da classe P-III são proteínas com massa molecular entre 50 kDa e 150 kDa aproximadamente e que apresentam na sua forma madura, além do domínio catalítico, o domínio tipo disintegrina seguido de um domínio rico em resíduos de cisteínas na região C-terminal (BJARNASON e FOX, 1995). A esta classe pertencem proteinases formadas pelos domínios citados, na forma monomérica (P-IIIa) como a atrolisina-A e HF3, e também na forma dimérica (P-IIId), como a VAP1 (FOX e SERRANO, 2005, 2008b). Proteinases da classe P-IIId (catrocollastatina, bothropasina e jararhagina, entre outras) são estruturalmente similares à classe P-IIIa, porém podem sofrer autólise gerando como produto uma proteína formada pelos domínios tipo disintegrina e rico em cisteínas (DC) (FOX e SERRANO, 2005, 2008b). Enzimas da classe P-IIId apresentam adicionalmente dois domínios tipo-lectina ligados por ponte de dissulfeto ao domínio rico em cisteínas (Figura 1). São representantes desta classe as proteinases RVV-X (*Russell's viper venom factor X activator*) da *Vipera russelli* e VLFXA (*Vipera lebetina venom factor X*

activator) da *Vipera lebetina*, ambas com atividade de ativação do fator X da coagulação (FOX e SERRANO, 2005, 2008b).

O pró-domínio das metaloproteinases possui estrutura altamente conservada, compreendendo cerca de 190 resíduos de aminoácidos. Apresenta uma seqüência consenso conservada, PKMCGVT, localizada cerca de 20 posições antes do resíduo N-terminal da proteína madura. A cisteína desta seqüência interage com o átomo de zinco, impedindo a ligação de uma molécula de água ou de um substrato ao sítio ativo, inibindo a função proteolítica da enzima; este mecanismo é conhecido como “*cysteine-switch*” (GRAMS et al., 1993; BODE, et al. 1993; BOTOS et al., 1995).

Tanto o peptídeo sinal quanto o pró-domínio, estão presentes apenas nos precursores das proteinases. É no domínio catalítico das metaloproteinases que encontramos a seqüência consenso estendida H-E-X-X-H-X-X-G-X-X-H onde ocorre a ligação do zinco, e também, a seqüência C-I-M, conhecida como *Met-turn*. Com a definição de estrutura cristalográfica da VAP1 (*Vascular Apoptosis-Inducing Protein 1*), uma metaloproteinase dimérica da classe P-IIIc do veneno de *Crotalus atrox*, foram determinados, além do sítio de ligação do átomo de zinco, três sítios de ligação para íons Ca^{2+} na molécula (TAKEDA et al., 2006).

O domínio catalítico das metaloproteinases com atividade hemorrágica atua primordialmente promovendo a degradação da membrana basal dos capilares sanguíneos, e do estroma local, permitindo o escape de sangue dos capilares (BARAMOVA et al., 1989; SHANNON et al., 1989; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). Essas enzimas também são capazes de digerir proteínas da cascata da coagulação sanguínea, tais como, fibrinogênio, fibrina, e fator de von Willebrand (KAMIGUTI et al., 1994; MARKLAND, 1998; HAMAKO et al., 1998; LAING e MOURA-DA-SILVA, 2005; SERRANO et al., 2007). Alguns trabalhos relatam que o domínio catalítico também pode estar envolvido na inibição da agregação plaquetária induzida pelo colágeno, através do peptídeo cíclico RKKH (Arg-Lys-Lys-His) derivado do domínio catalítico da jararhagina (IVASKA et al., 1999).

Os domínios disintegrina e tipo-disintegrina apresentam alto grau de similaridade nas seqüências de aminoácidos, incluindo o alinhamento de vários resíduos de cisteínas conservados, embora alguns ocupem posições diferentes entre estes dois tipos de domínio (CALVETE et al., 2005; FOX e SERRANO, 2008b). A seqüência R-G-D (Arg-Gly-Asp) presente nas disintegrinas é a principal responsável pela interação com integrinas. Na mesma posição ocupada por esta

seqüência também é encontrada a seqüência K-G-D (Lys-Gly-Asp) em algumas disintegrinas, como a barbourina, isolada de *Sistrurus barbouri* (USAMI et al., 1994; SCARBOROUGH et al., 1991). O domínio tipo-disintegrina apresenta em posição análoga àquela ocupada pela seqüência RGD, a seqüência E-C-D (Glu-Cys-Asp), à qual também foi atribuída a função de interagir com integrinas (JIA et al., 1997; CALVETE et al., 2005). A função para esses domínios está relacionada com a inibição da agregação plaquetária e com a modulação da atividade hemorrágica em conjunto com o domínio catalítico (JIA et al., 1997; YOU et al., 2003a; TANJONI et al., 2003).

Até recentemente pouca atenção foi dada ao possível papel funcional do domínio rico em cisteínas, que é altamente conservado nas metaloproteinases da classe P-III em termos de seqüência de aminoácidos. O domínio rico em cisteínas possui em geral doze resíduos de cisteína que estão engajados em pontes dissulfeto (FOX e SERRANO, 2008b).

1.2 Domínios não catalíticos das metaloproteinases

Diversos trabalhos sugerem que os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas das metaloproteinases de venenos, assim como aqueles das ADAMs e das ADAMTSs estejam envolvidos nas interações dessas enzimas com ligantes específicos (FOX e SERRANO, 2008ab; SEALS e COURTNEIDE, 2003; GERHARDT et al., 2007).

Com relação às ADAMs, sabe-se pouco sobre a função do domínio rico em cisteínas, e em geral acredita-se que este complemente a capacidade de ligação do domínio tipo-disintegrina e talvez confira especificidade às interações mediadas pelo domínio tipo-disintegrina (SEALS e COURTNEIDGE, 2003). Sabe-se, por exemplo, que o domínio rico em cisteínas da ADAM-12 promove a adesão de fibroblastos e de mioblastos (ZOLKIEWSKA, 1999). O mesmo domínio da ADAM-13 coopera com o domínio metaloproteinase para regular a função da enzima *in vivo* (SMITH et al., 2002a). Em outro estudo foi mostrado que os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas da ADAM-13 ligam-se à fibronectina e a integrinas que contêm subunidade β_1 , e esta ligação pode ser inibida por anticorpos contra o domínio rico em cisteínas,

ainda os mesmos domínios estão envolvidos na migração celular (ALFANDARI et al., 2001; GAULTIER et al., 2002). Em outro caso, demonstrou-se que o domínio rico em cisteínas da ADAM-12 participa da ligação *in vitro* de várias linhagens de células tumorais através da interação com sindecanos da superfície celular (IBA et al., 2000).

O domínio rico em cisteínas também parece importante para a interação das ADAMTSs com seus alvos. No caso da ADAMTS-4 (agrecanase 1), foi mostrado que o domínio rico em cisteínas e a região chamada de espaçador contêm sítios de ligação para glicosaminoglicanos e desempenham um papel importante na regulação da atividade proteolítica (FLANNERY et al., 2002; GENDRON et al., 2007). O domínio rico em cisteínas da ADAMTS-5 (agrecanase 2) tem um papel importante na sua ligação com a matriz extracelular (GENDRON et al., 2007). Ainda, os domínios tipo trombospondina-1 e o rico em cisteínas da ADAMTS-13 mostraram-se essenciais para sua atividade de clivagem do fator de von Willebrand plasmático (vWF) (SOEJIMA et al., 2003, GAO et al., 2008).

1.2.1 Domínios não catalíticos das metaloproteinases de venenos de serpentes e suas interações com plaquetas

Venenos de serpentes viperídeas e crotalídeas contêm potentes ativadores e inibidores da função plaquetária, cuja ação é desencadeada através de diferentes mecanismos (MARKLAND, 1997; KAMIGUTI, 2005; SERRANO e MAROUN, 2005).

Foi inicialmente mostrado por Zhou et al. (1995) que a catrocollastatina, uma metaloproteinase da classe P-IIIb do veneno de *C. atrox*, era capaz de inibir a adesão de plaquetas ao colágeno do tipo I. Da mesma forma, a crovidisina, da classe P-IIIa, isolada do veneno de *C. viridis*, foi capaz de inibir a interação plaqueta-colágeno (LIU e HUANG, 1997). Paralelamente, o fato de outras metaloproteinases da classe P-III, tais como a jararhagina, isolada do veneno de *Bothrops jararaca* e a kaouthiagina, isolada do veneno de *Naja kaouthia* serem capazes de clivar o vWF e assim causar a ruptura de sua estrutura, pode também contribuir para a geração da hemorragia (KAMIGUTI et al., 1996a; HAMAKO et al., 1998; SERRANO et al., 2007). Ainda, as disintegrinas clássicas atuam na inibição da agregação plaquetária por

meio do tripeptídeo R-G-D presentes em suas estruturas, capaz de se ligar à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ presente na superfície das plaquetas, bloqueando a ligação do fibrinogênio a este receptor (WIJEYEWICKREMA et al., 2005; CALVETE et al., 2005; KAMIGUTI, 2005).

Proteínas nativas e recombinantes, compostas pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas de metaloproteinases hemorrágicas de venenos, são potentes inibidores da agregação plaquetária por bloquearem a ligação do colágeno tipo I à integrina $\alpha_2\beta_1$ das plaquetas e ainda inibir a adesão de células da linhagem MG63 de osteosarcoma (JIA et al., 1997; SHIMOKAWA et al., 1997; SOUZA et al., 2000).

Uma proteína composta pelos domínios tipo disintegrina e rico em cisteínas das metaloproteinases da classe P-IIIb foi isolada pela primeira vez do veneno de *B. jararaca*, e chamada de jararhagina-C por Usami et al. (1994). Esta proteína é gerada pela autólise de proteinases como a jararhagina (MOURA-DA-SILVA et al., 2003), e a bothropasina (ASSAKURA et al., 2003), do veneno da *B. jararaca*, e a catrocollastatina, do veneno de *C. atrox* (SHIMOKAWA et al., 1997). Tanto a jararhagina-C, como a catrocollastatina C, inibem a agregação plaquetária induzida pelo colágeno (USAMI et al., 1994; SHIMOKAWA et al., 1997). A jaracetina, um dímero de 60 kDa, que representa uma forma diferentemente processada da jararhagina, interage com o domínio A1 do vWF e também bloqueia a adesão de plaquetas ao colágeno (DE LUCA et al., 1995).

A proteína leberagina-C composta pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas, isolada do veneno de *Macrovipera lebetina transmediterranea* apresenta atividade de inibição da agregação plaquetária induzida por trombina e pelo ácido araquidônico, mas não por colágeno e ADP. Além do efeito inibitório da agregação plaquetária, a leberagina-C foi capaz de inibir a adesão de células de melanoma IGR39 sobre o fibrinogênio e a fibronectina, e ainda, inibir a adesão das células mediadas pelas integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_6$ e $\alpha_5\beta_1$ (LIMAM et al., 2009).

Também foi observado que a halysase, uma metaloproteinase da classe P-IIIa isolada do veneno de *Gloydius halys*, a apohalysase, obtida pela incubação da halysase com EDTA, e ainda a proteína recombinante halydina, composta pelo domínio tipo-disintegrina da halysase, foram capazes de promover a apoptose de células endoteliais, e ainda a inibição da agregação plaquetária via colágeno (YOU et al., 2003ab; YOU et al., 2006).

Considerando-se a composição multidomínial das metaloproteinases da classe P-III, é possível que estas toxinas possam apresentar mais de um sítio de interação com as plaquetas promovendo a inibição da agregação, por isso acredita-se que a hemorragia causada pelas metaloproteinases de venenos resulte do efeito sinérgico da degradação proteolítica de componentes da membrana basal dos capilares e proteínas plasmáticas, e da inibição da agregação plaquetária (BJARNASON e FOX, 1988; FOX e LONG, 1998). Entre outros, um estudo corroborou essas observações, pela demonstração de que peptídios sintéticos com seqüências de aminoácidos derivadas do domínio rico em cisteínas de duas metaloproteinases de venenos, a atrolisina A, isolada do veneno de *C. atrox* e a jararhagina foram capazes de interferir na interação de plaquetas e células K562, que expressavam a integrina $\alpha_2\beta_1$, com o colágeno tipo I (KAMIGUTI et al., 2003).

Por outro lado, um estudo utilizando anticorpos monoclonais direcionados aos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas da jararhagina mostrou que a porção C-terminal do domínio tipo-disintegrina é essencial para a expressão da atividade hemorrágica da metaloproteinase (TANJONI et al., 2003). Recentemente, o mesmo grupo mostrou que a ligação da jararhagina ao colágeno e à integrina $\alpha_2\beta_1$ ocorre por dois *motifs* independentes, que estão localizados no domínio tipo-disintegrina e rico em cisteínas, respectivamente (TANJONI et al., 2010).

Serrano et al. (2005) demonstraram que o domínio rico em cisteínas recombinante da atrolisina A foi capaz de ligar-se ao colágeno tipo I e ao vWF, verificado por ensaios de ligação em fase sólida e por ressonância plasmônica de superfície utilizando o sistema BIACORE™. Ainda, esta proteína foi capaz de inibir a ligação do colágeno tipo I ao vWF e vice-versa.

O vWF é uma proteína multimérica que contém três domínios A (VWA1, VWA2 e VWA3) que mediam a adesão de plaquetas a locais onde ocorreu injúria vascular, além de participar na formação de trombos. O vWF funciona formando uma ponte entre o colágeno, presente no subendotélio, e o complexo receptor formado pelas glicoproteínas Ib-IX-V, nas plaquetas (RUGGERI, 2003). O domínio VWA3 do vWF contém sítios para a ligação dos colágenos tipo I e III (LANKHOF et al., 1996; ROMIJN et al., 2001). Estudos sobre a estrutura do domínio VWA3 do vWF mostraram que este assume a mesma conformação do domínio I da subunidade α_2 de integrinas, porém a ligação do domínio VWA3 ao colágeno não requer o íon metálico, como é o caso da integrina (HUIZINGA et al., 1997; ROMIJN et al., 2001;

WHITTAKER e HYNES, 2002). Entre as proteínas que apresentam domínios VWA estão os colágenos do tipo FACIT (*Fibril-Associated Collagens with interrupted Triple Helices*) e as matrinas. Estudos recentes mostraram que a catrocollastatina interage com colágeno XIV, enquanto que a jararhagina e o domínio rico em cisteínas recombinante da atrolisina A interagem com os colágenos XII e XIV e com as matrinas 1, 3 e 4 (SERRANO et al., 2006). A interação ao vWF é mediada pela interação do domínio rico em cisteínas aos sítios localizados no domínio VWA1 (SERRANO; 2007). Ainda, outro estudo corroborou essa observação demonstrando que peptídeos sintéticos derivados do domínio rico em cisteínas da jararhagina, denominados Jar 6 e Jar 7, foram capazes de interagir com o domínio VWA1 do vWF (PINTO et al., 2007).

Recentemente, Moura-da-Silva et al. (2008), mostraram que a jararhagina se liga aos colágenos tipo I e IV por meio de um *motif* localizado no subdomínio Da (*Disintegrin arm*) do domínio tipo-disintegrina. Por outro lado, a berythracivase, uma metaloproteinase com atividade pró-coagulante pela ativação de protrombina, e não hemorrágica, purificada do veneno da *B. erythromelas* (SILVA et al., 2003), não apresenta esse subdomínio Da, e conseqüentemente, não consegue se ligar aos colágenos do tipo I e IV.

Em conjunto, esses trabalhos evidenciam a participação das metaloproteinases de venenos de serpentes na interação com as plaquetas.

1.2.2 Domínios não catalíticos das metaloproteinases de venenos de serpentes e a resposta inflamatória

Além de induzir hemorragia e mionecrose, as metaloproteinases de venenos desempenham um papel relevante na resposta inflamatória observada no envenenamento. A destruição local do tecido envolve a ativação da resposta celular imune, na qual uma cascata de eventos é normalmente iniciada por macrófagos teciduais e monócitos circulantes (VORONOV et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2005). Estudos anteriores mostraram que anticorpos anti-TNF α , uma importante citocina secretada por macrófagos, reduziram o tamanho das lesões locais necróticas induzidas pela jararhagina e por metaloproteinases do veneno de *Echis pyramidum*

leakeyi (MOURA-DA-SILVA et al., 1996; LAING et al., 2003). Ainda, um estudo sobre a ação inflamatória da jararhagina, mostrou ser esta um potente agente inflamatório cuja atividade é dependente da ativação local de macrófagos (COSTA et al., 2002). A ativação de macrófagos pela jararhagina depende de sua atividade proteolítica e envolve a indução da expressão de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (CLISSA et al., 2001). Os domínios tipo-disintegrina/rico em cisteínas da jararhagina são suficientes para ativar localmente os eventos iniciais da resposta inflamatória aguda (CLISSA et al., 2006). Outra metaloproteinase hemorrágica isolada do veneno de *B. jararaca*, o HF3 (*Hemorrhagic Factor 3*), e seus domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas recombinantes foram capazes de induzir a fagocitose de partículas de zymosan opsonizadas por macrófagos (SILVA et al., 2004).

A resposta inflamatória também foi observada em alguns modelos experimentais celulares utilizando disintegrinas clássicas e os domínios tipo-disintegrina/rico em cisteínas. A ocellastusina, uma disintegrina clássica que contém a seqüência RGD em sua estrutura, isolada do veneno de *Echis ocellatus*, foi capaz de induzir a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* (SMITH et al., 2002b). Da mesma maneira, a jarastatina, isolada do veneno de *B. jararaca*, também foi capaz de induzir a atividade quimiotática sobre neutrófilos e ainda aumentar os níveis de RNA mensageiro codificante para a IL-8 (COELHO et al., 2004). Além disso, a alternagina-C, composta pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas, purificada do veneno de *B. alternatus*, induz a migração de neutrófilos (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003).

1.3 Estrutura tridimensional de metaloproteinases de venenos de serpentes

Estruturas tridimensionais de diversas metaloproteinases da classe P-I foram determinadas a partir de 1993 (GOMIS-RÜTH et al., 1993; FOX e SERRANO, 2005), no entanto, a primeira estrutura de uma metaloproteinase da classe P-III foi elucidada recentemente (TAKEDA et al., 2006). Trata-se da estrutura cristalográfica da VAP-1 isolada do veneno de *C. atrox*, uma metaloproteinase dimérica da classe P-IIIc com atividade de indução de apoptose celular (MASUDA et al., 1997). Em 2007, o mesmo grupo publicou a estrutura tridimensional de uma metaloproteinase

da classe P-IIIb monomérica, a catrocollastatina/VAP2B, isolada do mesmo veneno (IGARASHI et al., 2007) (Figura 2).

Os estudos cristalográficos das metaloproteinases VAP1 e catrocollastatina/VAP2B mostraram que o domínio tipo disintegrina divide-se em dois subdomínios, Ds (*Disintegrin shoulder*) e Da (*Disintegrin arm*), e é encoberto pelo domínio rico em cisteínas, ficando assim inacessível para a ligação a outras proteínas; já o domínio rico em cisteínas foi subdividido também em dois subdomínios, Cw (*Cysteine wrist*) e Ch (*Cysteine hand*). No subdomínio Ch foi identificada uma região denominada hiper variável (HVR - *Hyper Variable Region*), à qual foi atribuída a capacidade de interagir com alguns ligantes das metaloproteinases, já que esta região está exposta na molécula e espacialmente próxima ao domínio catalítico. Especialmente os domínios não catalíticos (D e C) juntamente com o domínio metaloproteinase (M), apresentam uma estrutura em formato de C (*C-shaped*), que implica numa interação entre o domínio catalítico e os domínios não catalíticos (adesivos), importante no mecanismo molecular de reconhecimento dos alvos dessas enzimas (TAKEDA et al., 2006; IGARASHI et al., 2007).

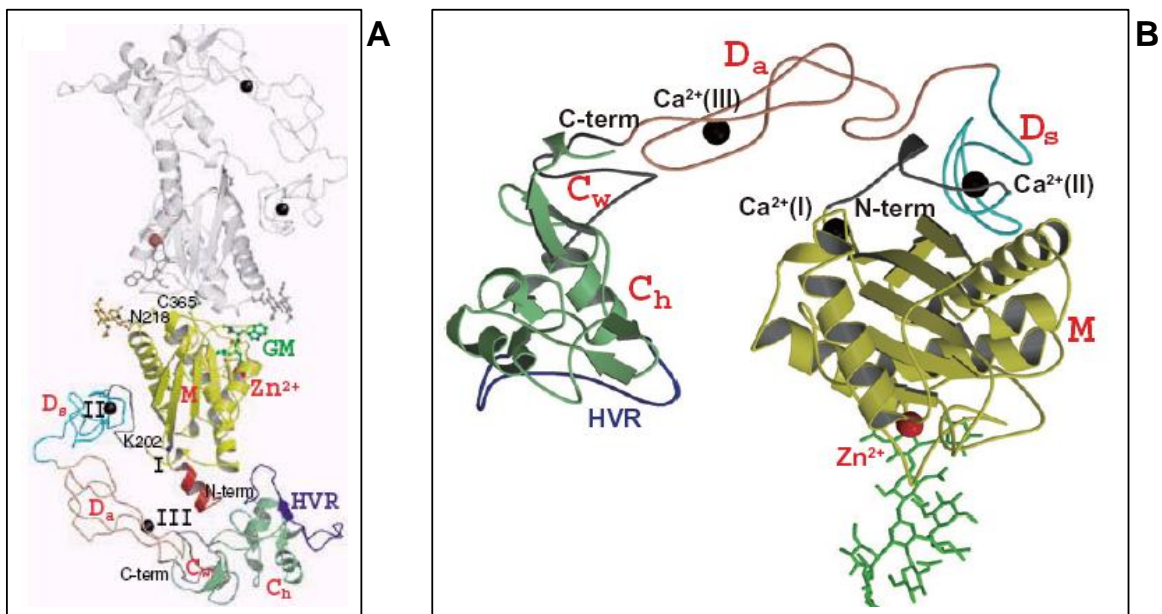


Figura 2. Estrutura cristalográfica da VAP1 (A) e catrocollastatina/VAP2 (B). As figuras apresentam os três domínios: catalítico (M) (ocre), tipo disintegrina (Ds e Da) (azul claro/lilás) e rico em cisteínas (Cw, Ch e HVR) (verde/azul escuro). A esfera vermelha representa o átomo de zinco. No caso da VAP1 (dimérica), um dos monômeros é representado em cinza. Na estrutura da catrocollastatina/VAP2B a cadeia de carboidratos ligada ao domínio metaloproteinase é representada em verde.

Fonte: TAKEDA et al., 2006; IGARASHI et al., 2007

Mais recentemente foi determinada por Muniz et al. (2008) a estrutura cristalográfica da bothropasina, uma metaloproteinase da classe P-IIIb, isolada do veneno de *B. jararaca*, determinando o sítio para ligação do átomo de Zn^{2+} no domínio catalítico e três sítios para ligação de Ca^{2+} , um no domínio catalítico e dois no domínio tipo disintegrina (Figura 3). Nesta estrutura, o domínio catalítico consiste em dois subdomínios, sendo que o principal apresenta uma estrutura α/β , formando uma folha β , composta por 5 fitas paralelas, uma fita anti-paralela e 4 hélices- α . O menor subdomínio consiste em uma hélice- α e diversos *loops*. Ainda, o domínio catalítico apresenta sete resíduos de cisteínas dos quais seis participam da formação de três pontes dissulfeto e um resíduo está livre e se localiza em uma região hidrofóbica e, portanto indisponível para formação de ponte de dissulfeto. O domínio tipo-disintegrina apresenta sete pontes dissulfeto, sendo a ponte Cys²⁷⁸-Cys³¹⁰ responsável pela ligação entre os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (MUNIZ et al., 2008). O resíduo de cisteína localizado na posição 278 pertence ao segundo *motif* E-C-D da estrutura da bothropasina, o qual tem sido apontando como envolvido na ligação à integrinas (JIA et al. 1997). O domínio tipo-disintegrina não apresenta estruturas secundárias bem definidas, sendo formado, basicamente por *loops*, que são estabilizados por pontes dissulfeto e também pela presença de dois íons de cálcio encontrados nos sítios de ligação II e III (Figura 3). O íon cálcio no sítio II, localizado no início do domínio tipo-disintegrina, é coordenado por átomos de oxigênio dos resíduos de Val²¹⁵, Gln²¹⁸, Leu²²⁰, Glu²²², Glu²²⁵ e Asp²²⁸. O resíduo Asp²²⁸ está incluído no primeiro *motif* E-C-D, altamente conservado nas classes P-III das metaloproteinases de venenos de serpentes. O domínio rico em cisteínas é composto por duas hélices- α , 4 pequenas fitas β e o restante da estrutura é formado por *loops*. A presença de pontes dissulfeto é importante para garantir a estabilização desses *loops* e esse domínio apresenta 6 pontes (MUNIZ et al., 2008).

Diferentemente das estruturas cristalográficas da VAP1 e da catrocollastatina/VAP2B, onde a região E-C-D, no domínio tipo disintegrina, não fica exposta na molécula, na estrutura da bothropasina o resíduo de ácido glutâmico desta seqüência encontra-se acessível para possíveis interações (MUNIZ et al., 2008). Os autores sugerem ainda que a HVR, identificada nas estruturas da VAP1 e da catrocollastatina/VAP2B, é altamente conservada na bothropasina, quando a seqüência desta é alinhada com as seqüências de outras proteinases da classe P-

III, propondo que as metaloproteínas da classe P-III sejam separadas em dois subgrupos: um grupo contendo uma região hiper variável (HVR) e outro contendo uma região hiper conservada HCR (*Highly Conserved Region*) (HCR) no domínio rico em cisteínas (MUNIZ et al., 2008).

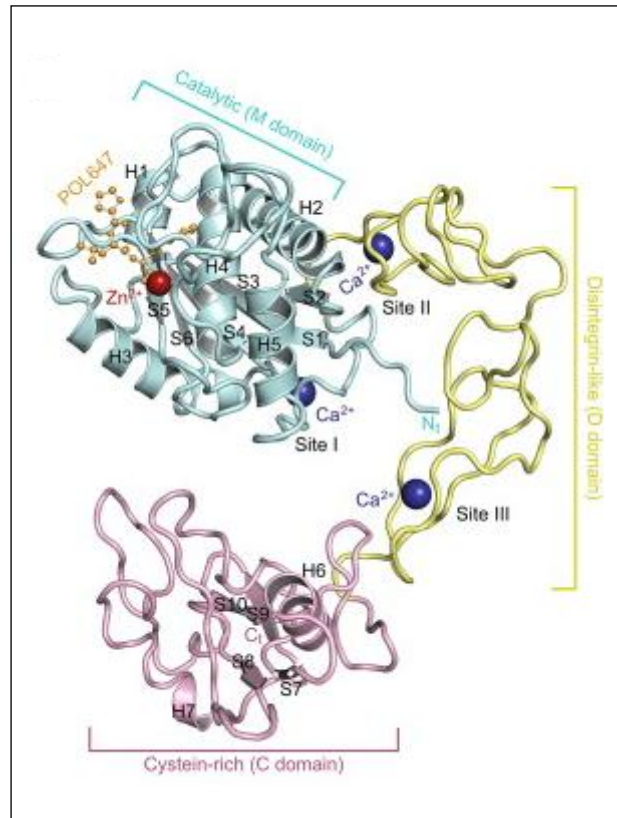


Figura 3 Estrutura cristalográfica (diagrama de fita) da bothropasina. A figura apresenta os três domínios: catalítico (azul), tipo-disintegrina (ocre) e rico em cisteínas (lilás). A esfera vermelha representa o átomo de zinco e as esferas azuis os sítios para ligação dos átomos de cálcio.

FONTE: Muniz et al., (2008).

O ativador de fator X isolado do veneno de *Vipera russelii*, chamado de RVV-X, é uma metaloproteínase heterotrimérica da classe P-IIIId. Sua estrutura cristalográfica mostrou que esta é constituída de um arcabouço estrutural no qual a região correspondente aos domínios metaloproteínase e tipo-disintegrina formam um “anzol ou gancho” e os domínios tipo-lectina funcionam como um “cabo ou maçaneta” (TAKEDA et al., 2007). A região hiper variável do domínio rico em cisteínas da RVV-X também foi considerada como importante para o

reconhecimento de alvos moleculares e como mediadora das interações proteína-proteína das quais esta proteinase participa (TAKEDA et al., 2007).

Ainda, recentemente foi publicado mais um trabalho mostrando dessa vez a estrutura tridimensional de uma metaloproteinase da classe P-IIIb que sofre autólise, a AaHIV do veneno de *Agkistrodon acutus*, na qual é liberada uma proteína composta pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas, chamada acucetina (ZHU et al., 2009). Neste trabalho os autores mostram a formação de dímeros da metaloproteinase submetida a condições em que a autólise é favorecida, sendo a formação do dímero dependente da concentração de um reagente de *cross-link* adicionado. Esta estrutura sugere que a região hiper variável do domínio rico em cisteínas participa na interação entre duas moléculas vizinhas de AaHIV. Os autores propõem um modelo de interação da AvHIV com outras proteínas, semelhante ao que havia sido proposto para a VAP1 e catrocollastatina/VAP2B, no qual o domínio rico em cisteínas medeia a interação e propicia a clivagem da proteína pelo domínio metaloproteinase. Adicionalmente, estes autores propuseram um segundo modelo para a interação de metaloproteinases da classe P-III com seus substratos, baseando-se em experimentos teóricos de *docking*. Segundo este, as metaloproteinases reconheceriam seus alvos por meio do domínio tipo-disintegrina de uma das moléculas do dímero (molécula A) e hidrolisaria o substrato com o domínio metaloproteinase da molécula B. Ainda, os autores sugerem a divisão da região hiper variável em HVR1 e HVR2, devido à presença de um resíduo de cisteína na região hiper variável que faz ligação com uma cisteína anterior à HVR (ZHU et al., 2009).

Outro estudo publicado recentemente apresentou as estruturas tridimensionais de duas metaloproteinases da classe P-IIIa do veneno de *Naja atra*, a atragina e a K-like (tipo-kaouthiagina). A atragina apresenta estrutura geral semelhante à VAP1, em formato de C, enquanto que a K-like, apresenta uma estrutura em formato de I (*I-shaped*), causada pelo padrão das ligações das pontes dissulfetos no domínio tipo-disintegrina (GUAN et al., 2010).

1.4 HF3 e suas atividades biológicas

O HF3 (fator hemorrágico 3) é uma metaloproteinase glicosilada, com pI de 3,9, e massa molecular de ~70 kDa avaliada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, isolada do veneno da *B. jararaca*. É uma metaloproteinase extremamente hemorrágica, cuja dose mínima hemorrágica (quantidade de proteína suficiente para produzir uma área hemorrágica de 10 mm² na derme de coelho) é de 15 ng, ou 214 fmol (ASSAKURA et al., 1986). A atividade hemorrágica do HF3 é dependente de sua atividade enzimática, já que esta metaloproteinase não é capaz de produzir hemorragia quando pré-tratada com agentes quelantes de metais como o EDTA e o EGTA. A estrutura primária do HF3 foi determinada por nosso grupo, por meio de clonagem molecular, mostrando que o precursor do HF3 é composto por peptídeo sinal, e domínios pró, metaloproteinase, tipo-disintegrina e rico em cisteínas (SILVA et al., 2004). Nesse trabalho também foi investigada a participação do HF3 em eventos inflamatórios, pela avaliação dos efeitos do HF3 nativo e de uma proteína recombinante composta pelos seus domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (DC-HF3), na fagocitose de partículas de zimosan opsonizado, mediada pela integrina $\alpha_M\beta_2$ em macrófagos. Tanto o HF3 como a proteína DC-HF3 aumentaram de forma significativa a fagocitose e esta atividade foi inibida por anticorpos anti- α_M e anti- β_2 . Ainda, o sítio catalítico do HF3 não pareceu importante para a ativação da fagocitose, já que o tratamento do HF3 com ortofenantrolina não aboliu essa atividade. Esse trabalho foi importante porque mostrou pela primeira vez a possibilidade de ativação da fagocitose mediada pela integrina $\alpha_M\beta_2$ por uma metaloproteinase com domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas (SILVA et al., 2004).

Recentemente, nosso grupo realizou um estudo comparativo com metaloproteinases das classes P-I e P-III do veneno da *B. jararaca* onde foram analisadas as funções dos elementos estruturais dessas proteínas importantes para suas interações com proteínas plasmáticas e da matriz extracelular. Neste trabalho, a comparação da atividade proteolítica das proteinases bothropasina (da classe P-IIIb, e cerca de 80 vezes menos hemorrágica que o HF3) e BJ-PI (da classe P-I, e não hemorrágica) sobre a caseína e sobre o fibrinogênio mostrou que a

bothropasina e a BJ-PI têm altas atividades específicas sobre esses substratos, enquanto que o HF3 é muito menos ativo (OLIVEIRA et al., 2009). Ainda, em um outro estudo, para avaliação do papel de carboidratos presentes nas estruturas das proteinases, estas foram submetidas à *N*-deglicosilação enzimática em condições não desnaturantes. O HF3 foi parcialmente deglicosilado, o que levou à perda parcial de suas atividades hemorrágica e fibrinogenolítica. Em ensaios de ressonância plasmônica de superfície, onde foram imobilizados em *chips* os colágenos I e VI, o HF3 parcialmente deglicosilado ligou-se com maior afinidade a esses substratos quando comparado com sua forma nativa. Em conjunto, estes resultados indicaram que as porções glicosídicas presentes no HF3 são importantes para manter sua integridade estrutural, além de estarem envolvidas nas interações com seus substratos (OLIVEIRA et al., 2010).

Diante do exposto fica claro que os domínios não catalíticos das metaloproteinases, desempenham papel importante na interação dessas enzimas com seus alvos plasmáticos e teciduais. Dessa forma, escolhemos o HF3 como modelo de estudo da relação entre estrutura e função de metaloproteínas da classe P-III. Dispomos do cDNA que codifica o HF3 e já obtivemos uma proteína recombinante composta pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas, o que facilita o trabalho de expressão dos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas em conjunto ou individualmente, e seu uso como ferramenta para atingir os objetivos relacionados abaixo.

6 CONCLUSÕES

Os domínios tipo-disintegrina/rico em cisteínas do HF3 foram expressos juntos e individualmente em fusão com a glutathiona S-transferase (GST) em sistema procarioto, e peptídeos derivados do domínio rico em cisteínas do HF3 foram sintetizados para ensaios funcionais. Foram também obtidas construções para a expressão da proteína correspondente aos domínios tipo-disintegrina/rico em cisteínas contendo mutações sítio-dirigidas no *motif* E-C-D do domínio tipo-disintegrina e na HVR do domínio rico em cisteínas.

As proteínas recombinantes GST-DC, GST-D16, GST-D18 e GST-C, bem como os peptídeos sintéticos, foram avaliados quanto à capacidade de induzir a resposta pró-inflamatória e de inibir a agregação plaquetária. Para avaliar o papel destas proteínas e peptídeos na atividade pró-inflamatória, foi observado o rolamento de leucócitos na microcirculação, vista por microscopia intravital, e os resultados mostraram que o domínio rico em cisteínas está envolvido nesta atividade do HF3, enquanto que o domínio tipo-disintegrina não. Os peptídeos derivados da HVR do domínio rico em cisteínas, também aumentaram o número de leucócitos em rolamento, e essa atividade foi inibida por anticorpos anti- α_M e anti- β_2 , confirmando assim o papel do domínio rico em cisteínas nos efeitos inflamatórios e o envolvimento desta integrina no rolamento de leucócitos promovido pelo HF3.

Das cinco construções obtidas para a expressão de mutantes da proteína GST-DC, apenas a proteína contendo a mutação do resíduo de ácido aspártico do *motif* E-C-D do domínio tipo-disintegrina resultou na expressão da proteína recombinante, a qual, quando testada quanto à indução do rolamento de leucócitos e inibição da agregação plaquetária, se mostrou muito menos ativa que a forma selvagem, sugerindo a participação desse resíduo nessas funções do HF3.

Em ensaios de agregação plaquetária, as proteínas GST-DC e GST-C, nas concentrações de 0,25 e 0,5 μM , inibiram de forma dose-resposta a agregação plaquetária induzida pelo colágeno. Ainda, os peptídeos derivados da HVR HF3-

HVR1, HF3-HVR2 e HF3-HVR3, também promoveram a inibição da agregação, ainda que em concentrações mais altas, na ordem de 0,25 a 1,0 mM.

Ensaio de ligação em fase sólida realizados para avaliar a participação dos domínios não catalíticos do HF3 na interação com as proteínas laminina e fibronectina mostraram que os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas expressos em conjunto (DC) têm maior afinidade por estas proteínas do que os domínios tipo-disintegrina (D16 e D18) e rico em cisteínas (C), individualmente.

Em conjunto, esses resultados indicam que o domínio rico em cisteínas do HF3, e sua região hiper variável, têm papel fundamental nas atividades pró-inflamatória e de inibição da agregação plaquetária. No entanto, o domínio tipo-disintegrina em conjunto com o domínio rico em cisteínas, como é o caso da proteína GST-DC, pode conter exsítios que sejam importantes para estas funções já que a mutação do resíduo D⁴⁶⁹ gerou uma proteína menos ativa ainda que contivesse o domínio rico em cisteínas.

REFERÊNCIAS*

ALFANDARI, D.; COUSIN, H.; GAULTIER, A.; SMITH, K.; WHITE, J. M.; DARRIBERE, T, *Xenopus* ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration, **Curr. Biol.**, v. 11(12), p. 918–930, 2001.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, p. 195-201, 2006.

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 24, p. 943-946, 1986.

ASSAKURA, M. T.; SILVA, C. A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 41, p. 217-227, 2003.

ATHERTON, E.; SHEPPARD, R. C. **Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach**. Oxford: ILR Press, 1989, p. 25-37.

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.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes.**, London: Academic Press, 1998. 1666 p.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Characterization and substrate site mapping of two hemorrhagic zinc protease from *Crotalus atrox*. In: PIRKLE, H. and MARKLAND, F. S., Jr. (Ed.) **Hematology and Animal Venoms**. New York: Marcel Dekker, p. 457-477. 1988.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprolysins. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 345-368, 1995.

BLACK, R. A.; WHITE, J. M. ADAMs: focus on the protease domain. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 10, p. 654-659, 1998.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralsins, 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 Lett.**, v. 331, p. 134-140, 1993.

BOTOS, I.; SCAPOZZA, J. D.; FOX, J. W.; MEYER, E. F. Structure – based analysis of inhibitor binding to Ht-d. **Acta. Cryst.**, v. 51, p. 597-604, 1995.

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. 248-54, 1976.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195-203, 1981.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, p. 1063-1074, 2005.

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. 1567-1573, 2001.

CLISSA, P. B.; LOPES-FERREIRA, M.; DELLA-CASA, M. S.; FARSKY, S. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. **Toxicon**, v. 47, p. 591-596, 2006.

COCUZZI, E. T.; WALTHER, S. E.; RAJAN, S.; DENHARDT, D. T. Expression and purification of mouse TIMP-1 from *E. coli*. **FEBS Lett.**, v. 307, p. 375-378, 1992.

COELHO, A. L.; DE FREITAS, M. S.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; RAPOZO, D. C.; PINTO, L. F.; NIEWIAROWSKI, S.; ZINGALI, R. B.; MARCINKIEWICZ, C.; BARJA-FIDALGO, C. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Exp. Cell. Res.**, v. 292(2), p. 371-384, 2004.

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

DE LUCA, M.; WARD, C. M.; OHMORI, K.; ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, alpha 2 beta 1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 206(2), p. 570-576, 1995.

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

FLANNERY, C. R.; ZENG, W.; CORCORAN, C.; COLLINS-RACIE, L. A.; CHOCKALINGAM, P. S.; HEBERT, T.; MACKIE, S. A.; MCDONAGH, T.; CRAWFORD, T. K.; TOMKINSON, K. N.; LAVALLIE, E. R.; MORRIS, E. A. Autocatalytic cleavage of ADAMTS-4 (Aggrecanase-1) reveals multiple glycosaminoglycan-binding sites. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 42775-42780, 2002.

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

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909-20, 2008a

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

GAO, W.; ANDERSON, P. J.; SADLER, J.E. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. **Blood**, v. 112(5), p. 1713-1719, 2008.

GAULTIER, A.; COUSIN, H.; DARRIBÈRE, T.; ALFANDARI, D. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 23336-23344, 2002.

GENDRON, C.; KASHIWAGI, M.; LIM, N. H.; ENGHILD, J. J.; THOGERSEN, I. B.; HUGHES, C.; CATERSON, B.; NAGASE H. Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. **J. Biol. Chem.**, v. 282(25), p. 18294-18306, 2007.

GERHARDT, S.; HASSALL, G.; HAWTIN, P.; MCCALL, E.; FLAVELL, L.; MINSHULL, C.; HARGREAVES, D.; TING, A.; PAUPTIT, R. A.; PARKER, A. E.; ABBOTT, W. M. Crystal structures of human ADAMTS-1 reveal a conserved catalytic domain and a disintegrin-like domain with a fold homologous to cysteine-rich domains. **J. Mol. Biol.**, v. 373, p. 891-902, 2007.

GOMIS-RÜTH, F. X.; KRESS, L. F.; BODE, W. First structure of a snake venom metalloproteinase: a prototype for matrix metalloproteinases/collagenases. **EMBO J.**, v. 12(11), p. 4151-4157, 1993

GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Lett.**, v. 335, p. 76-80, 1993.

GUAN, H. H.; GOH, K. S.; DAVAMANI, F.; WU, P. L.; HUANG, Y. W.; JEYAKANTHAN, J.; WU, W. G.; CHEN, C. J. Structures of two elapid snake venom metalloproteases with distinct activities highlight the disulfide patterns in the D domain of ADAMalysin family proteins. **J. Struct. Biol.**, 2009. In press.

GUEx, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

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

HAMAKO, J.; MATSUI, T.; NISHIDA, S.; NOMURA, S.; FUJIMURA, Y.; ITO, M.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Purification and characterization of kaouthiagin, a von Willebrand factor-binding and -cleaving metalloproteinase from *Naja kaouthia* cobra venom. **Thromb. Haemost.**, v. 80, p. 499-505, 1998.

HO, S. N.; HUNT, H. D.; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v. 77, p. 51-59, 1989.

HUANG, K. F.; HUNG, C. C.; WU, S. H.; CHIOU, S. H. Characterization of three endogenous peptide inhibitors for multiple metalloproteinases with fibrinogenolytic activity from the venom of *Taiwan habu* (*Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 248, p. 562-568, 1998.

HUIZINGA, E. G.; MARTIJN VAN DER PLAS, R.; KROON, J.; SIXMA, J. J.; GROS, P. Crystal structure of the A3 domain of human von Willebrand factor: implications for collagen binding. **Structure**, v. 5, p. 1147-1156, 1997.

HWANG, C.; SINSKEY, A. J.; LODISH, H. F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. **Science**, v. 257(5076), p. 1496-1502, 1992.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B.; FROHLICH, C.; LOECHEL, F.; ZOLKIEWSKA, A.; ISHIGURO, K.; KOJIMA, T.; LIU, W.; LANGFORD, J.K.; SANDERSON, R.D.; BRAKEBUSCH, C.; FASSLER, R.; WEWER, U.M. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. **J. Cell Biol.**, v. 149, p. 1143-1156, 2000.

IGARASHI, T.; ARAKI, S.; MORI, H.; TAKEDA, S. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/adamalysin/reprolysin family proteins. **FEBS Lett.**, v. 581, p. 2416-2422, 2007.

IVASKA, J.; KÄPYLÄ, J.; PENTIKÄINEN, O.; HOFFRÉN, A. M.; HERMONEN, J.; HUTTUNEN, P.; JOHNSON, M. S.; HEINO, J. A peptide inhibiting the collagen binding function of integrin alpha2I domain. **J. Biol. Chem.**, v. 274(6), p. 3513-3521, 1999.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: LEE, C. Y. **Handbook of experimental pharmacology**. New York: Springer Verlag, v. 52, p. 61-158, 1979.

JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 13094-13102, 1997.

JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 373(1), p. 281-286, 2000.

JIA, Y.; LUCENA, S.; CANTU, E. J.R., SÁNCHEZ, E. E.; PÉREZ, J. C. cDNA cloning, expression and fibrin(ogen)olytic activity of two low-molecular weight snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 54(3), p. 233-243, 2009.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45(8), p. 1041-1049, 2005.

KAMIGUTI, A. S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M.; FOX, J. W. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Lett.**, v. 549, p. 129-134, 2003.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; THEAKSTON, R. D.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627-642, 1996a.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996b.

KAMIGUTI, A. S.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; KNAPP, T.; ZUZEL, M.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1335(1-2), p. 209-217, 1997.

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

KARLSSON, E. Chemistry of protein toxins in snake venom. In: LEE, C. Y. (Ed). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. p. 159-212.

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(11), p. 1591-1604, 2008.

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

LAING, G. D.; CLISSA, P. B.; THEAKSTON, R. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TAYLOR, M. J. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 3458-3463, 2003.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45:987-996, 2005.

LANKHOF, H.; VAN HOEIJ, M.; SCHIPHORST, M. E.; BRACKE, M.; WU, Y. P.; IJSSELDIJK, M. J.; VINK, T.; DE GROOT, P. G.; SIXMA, J. J. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. **Thromb. Haemost.**, v. 75, p. 950-958, 1996.

LAVALLE, E. R.; DIBLASIO, E. A; KOVACIC, S.; GRANT, K. L.; SCHENDEL, P. F.; MCCOY, J. M. A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the *E. coli* Cytoplasm. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 187-193, 1993

LIMAM, I.; BAZAA, A.; SRAIRI-ABID, N.; TABOUBI, S.; JEBALI, J.; ZOUARI-KESSENTINI, R.; KALLECH-ZIRI, O.; MEJDOUB, H.; HAMMAMI, A.; EL AYEB, M.; LUIS, J.; MARRAKCHI, N. Leberagin-C, A disintegrin-like/cysteine-rich protein from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits $\alpha v \beta 3$ integrin-mediated cell adhesion. **Matrix Biol.**, 2009. In press.

LIU, C. Z.; HUANG, T. F. Crovidisin, a collagen-binding protein isolated from snake venom of *Crotalus viridis*, prevents platelet-collagen interaction. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 337, p. 291-299, 1997.

LOMONTE, B.; LUNDGREN, J.; JOHANSSON, B.; BAGGE, U. L. F. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. **Toxicon**, v. 32, p. 41–55, 1994.

LU, Z.; DIBLASIO-SMITH, E. A.; GRANT, K. L.; WARNE, N. W.; LAVALLIE, E. R.; COLLINS-RACIE, L. A.; FOLLETTIE, M. T.; WILLIAMSON, M. J.; MCCOY, J. M. Histidine patch thioredoxins. Mutant forms of thioredoxin with metal chelating affinity that provide for convenient purifications of thioredoxin fusion proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 271(9), p. 5059-5065, 1996.

MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L.; TERRUGGI, C. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M. S. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p. 4799-4808, 2003.

MARKLAND, F. S. Snake venoms. **Drugs**, v. 54, p. 1-10, 1997. Suppl 3.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-800, 1998.

MARQUES-PORTO, R.; LEBRUN, I.; PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: the metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 147, p. 424-433, 2008.

MARSH, N. A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism—a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, v. 5, p. 399–410, 1994.

MASUDA, S.; ARAKI, S.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, p. 59-63, 1997.

MENEZES, M. C.; PAES LEME, A. F.; MELO, R. L.; SILVA, C. A.; DELLA CASA, M.; BRUNI, F. M.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; CAMARGO, A. C.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Activation of leukocyte rolling by the cysteine-rich domain and the hyper-variable region of HF3, a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. **FEBS Lett.**, v. 582, p. 3915-3921, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2.ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 112 p.

MITRAKI, A.; KING, J. Protein folding intermediates and inclusion body formation. **Bio/Technology**, v. 7, p. 690-697, 1989.

MORTZ, E.; KROGH, T. N.; VORUM, H.; GORG, A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. **Proteomics**, v. 1, p. 1359 -1363, 2001.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; DELLA-CASA, M. S.; DAVID, A. S.; ASSAKURA, M. T.; BUTERA, D.; LEBRUN, I.; SHANNON, J. D.; SERRANO, S. M.; FOX, J. W. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.409, p. 395-401, 2003.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; PAINE, M. J.; DENNISON, J. M.; POLITI, V.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R.D. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, p. 2000-2005, 1996.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LÍNICA, A., DELLA-CASA, M. S.; KAMIGUTI, A. S.; HO, P. L.; CRAMPTON, J. M., THEAKSTON, R. D. Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in escherichia coli and inhibition of the platelet-collagen interaction. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 369, p. 295-301, 1999.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; MARCINKIEWICZ, C.; MARCINKIEWICZ, M.; NIEWIAROWSKI, S. Selective recognition of alpha2beta1 integrin by jararhagin, a Metalloproteinase/disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Thromb. Res.**, v. 102(2), p. 153-159, 2001.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; RAMOS, O. H.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J. S.; FURLAN, S.; BUTERA, D.; DELLA-CASA, M. S.; TANJONI, I.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; EBLE, J. A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90, p.484-492, 2008.

MUNIZ, J. R.; AMBROSIO, A. L.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; COMINETTI, M. R.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; OLIVA, G.; GARRATT, R. C.; SOUZA, D. H. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. **Toxicon**, v. 52, p.807-816, 2008.

NIEWIAROWSKI, S.; KIRBY, E. P.; BRUDZYNSKI, T. M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry**, v. 18, p. 3570-3577, 1979.

ODELL, G. V.; FERRY, P. C.; VICK, L. M.; FENTON, A. W.; DECKER, L. S.; COWELL, R. L.; OWNBY, C. L.; GUTIÉRREZ, J. M. Citrate inhibition of snake venom proteases. **Toxicon**, v. 36, p. 1801-1806, 1998.

OKUDA, D.; MORITA, T. Purification and characterization of a new RGD/KGD-containing dimeric disintegrin, piscivostatin, from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*: the unique effect of piscivostatin on platelet aggregation. **J. Biochem.**, v. 130, p. 407-415, 2001.

OLIVEIRA, A. K.; PAES LEME, A. F.; ASSAKURA, M. T.; MENEZES, M. C.; ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C., CAMARGO, A. C.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 53, p. 797-801, 2009.

OLIVEIRA, A. K.; PAES LEME, A.F.; ASEGA, A. F.; CAMARGO, A. C. M.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. New insights into the structural elements involved in the skin hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. **Thrombosis & Haemostasis**, 2010 submetido.

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

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

PENTIKÄINEN, O.; HOFFRÉN, A. M.; IVASKA, J.; KÄPYLÄ, J.; NYRÖNEN, T.; HEINO, J.; JOHNSON, M. S. "RKKH" peptides from the snake venom metalloproteinase of *Bothrops jararaca* bind near the metal ion-dependent adhesion site of the human integrin alpha(2) I-domain. **J. Biol. Chem.**, v. 274(44), p. 31493-31505, 1999.

PINTO, A. F.; TERRA, R. M.; GUIMARÃES, J. A.; FOX, J. W. Mapping von Willebrand factor A domain binding sites on a snake venom metalloproteinase cysteine-rich domain. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 457, p. 41-46, 2007.

PORGES N. Snake venoms, their biochemistry and mode of action. **Science**, v. 117(3029), p. 47-51, 1953.

PORTER, S.; CLARK, I. M.; KEVORKIAN, L.; EDWARDS, D. R. The ADAMTS metalloproteinases. **Biochem. J.**, v. 386, p. 15-27. 2005.

RAHMAN, S.; FLYNN, G.; AITKEN, A.; PATEL, Y.; HUSSAIN, F.; LU, X.; LOFTUS, J.C.; FRENCH, D.; WIJELATH, E.; STRAND, K.; SAVIDGE, G.F.; Differential recognition of snake venom proteins expressing specific Arg-Gly-Asp (RGD) sequence motifs by wild-type and variant integrin α IIb β 3: further evidence for distinct sites of RGD ligand recognition exhibiting negative allostery. **Biochem. J.**, v. 345, p. 701–709. 2000.

ROBEVA, A.; POLITI, V.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Synthetic and endogenous inhibitors of snake venom metalloproteinases. **Biomed. Biochim. Acta.**, v. 50; 769-773, 1991.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, v. 156, p. 261– 273, 1949.

ROMIJN, R. A.; BOUMA, B.; WUYSTER, W.; GROS, P.; KROON, J.; SIXMA, J. J.; HUIZINGA, E. G. Identification of the collagen-binding site of the von Willebrand factor A3-domain. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 9985-9991, 2001.

ROSING, J.; TANS, G. Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. **Toxicon**, v. 30, p.1515-1527, 1992.

RUGGERI, Z. M. Von Willebrand factor. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 10, p. 142-149, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J. W.; HSU, M. A.; PHILLIPS, D. R.; FRIED, V. A.; CAMPBELL, A. M.; NANNIZZI, L.; CHARO, I.F. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 9359-9362, 1991.

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3381-3385, 2003.

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

SERRANO, S. M. T.; JIA, L. G.; WANG, D.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W. Function of the cysteine-rich domain of the hemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **Biochem. J.**, v. 391, p. 69-76, 2005.

SERRANO, S. M.; KIM, J.; WANG, D.; DRAGULEV, B.; SHANNON, J. D.; MANN, H. H.; VEIT, G.; WAGENER, R.; KOCH, M.; FOX, J. W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 39746-39756, 2006.

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.

SERRANO, S. M.; WANG, D.; SHANNON, J. D.; PINTO, A. F.; POLANOWSKA-GRABOWSKA, R. K.; FOX, J. W. Interaction of the cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases with the A1 domain of von Willebrand factor promotes site-specific proteolysis of von Willebrand factor and inhibition of von Willebrand factor-mediated platelet aggregation. **FEBS J.**, v. 274, p. 3611-3621, 2007.

SHANNON, J. D.; BARAMOVA, E. N.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. **J Biol Chem.**, v. 264, p. 11575-11583, 1989.

SHIMOKAWA, K. I.; SHANNON, J. D.; JIA, L. G.; FOX, J. W. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrin-like/cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 343, p. 35-43, 1997.

SILVA, C. A.; ZULIANI, J. P.; ASSAKURA, M. T.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; TEIXEIRA, C. F.; SERRANO, S. M. Activation of $\alpha_M\beta_2$ -mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 322, p. 950-956, 2004.

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

SMITH, D. B.; JOHNSON, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. **Gene**, v. 67(1), p. 31-40, 1988.

SMITH, J. B.; THEAKSTON, R. D.; COELHO, A. L.; BARJA-FIDALGO, C.; CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C. Characterization of a monomeric disintegrin, ocellatusin, present in the venom of the Nigerian carpet viper, *Echis ocellatus*. **FEBS Lett.**, v. 512(1-3), p. 111-115, 2002b.

SMITH, M.; GAULTIER, A.; COUSIN, H.; ALFANDARI, D.; WHITE, J. M.; DESIMONE, D.W. The cysteine-rich domain regulates ADAM protease function in vivo, **J. Cell Biol.**, v. 159(5), p. 893–902, 2002a.

SOEJIMA, K.; MATSUMOTO, M.; KOKAME, K.; YAGI, H.; ISHIZASHI, H.; MAEDA, H.; NOZAKI, C.; MIYATA, T.; FUJIMURA, Y.; NAKAGAKI, T. ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. **Blood**, v. 102, p. 3232-3237, 2003.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits $\alpha_2\beta_1$ integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 341-350, 2000.

STOCKER, K. F. Composition of snake venoms. In: **Medical use of snake venom proteins**. Boston: Press Boca Raton, Ann Arbor, p. 33-56, 1990.

TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI, H. Crystal structure of RVV-X: an example of evolutionary gain of specificity by ADAM proteinases. **FEBS Lett.**, v. 581, p. 5859-5864, 2007.

TAKEDA, S.; IGARASHI, T.; MORI, H.; ARAKI, S. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. **EMBO J.**, v. 25, p. 2388-2396, 2006.

TANG, B. L. ADAMTS: a novel family of extracellular matrix proteases. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 33, p. 33-44, 2001.

TANG, B. L.; HONG, W. ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. **FEBS Lett.**, v. 445, p. 223-225, 1999.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; SPENCER, P. J.; TAKEHARA, H. A.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 42, p. 809-816, 2003.

TANJONI, I.; EVANGELISTA, K.; DELLA-CASA, M. S.; BUTERA, D.; MAGALHÃES, G. S.; BALDO, C.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; EBLE, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Different regions of the class P-III snake venom metalloproteinase jararhagin are involved in binding to $\alpha(2)\beta(1)$ integrin and collagen. **Toxicon**, 2010. In press.

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

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; SHIMA, H.; YOSHIDA, E.; YOSHIOKA, A.; HIRANO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 201, p. 331-339, 1994.

VORONOV, E.; APTE, R. N.; SOFER, S. The systematic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. **J. Venom. Anim. Toxins**, v. 5, p. 5-33, 1999.

WARSHAWSKY, H.; HADDAD, A.; GONCALVES, R. P.; VALERI, V.; DE LUCCA, F. L. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. **Am. J. Anat.**, v. 138, p. 79-119, 1973.

WHITE, J. M., ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 15, p. 598-606, 2003.

WHITTAKER, C. A.; HYNES, R. O. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 3369-3387, 2002.

WIJEYEWICKREMA, L. C.; BERNDT, M. C.; ANDREWS, R. K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 45(8), p. 1051-1061, 2005.

XIONG, S.; WANG, Y. F.; REN, X. R.; LI B.; ZHANG, M. Y.; LUO, Y.; ZHANG, L.; XIE, Q. L.; SU, K. Y. Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its "oxidizing" mutant. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, p. 1077-1082, 2005.

YAHALOM, D.; WITTELSBERGER, A.; MIERKE, D. F.; ROSENBLATT, M.; ALEXANDER, J.M.; CHOREV, M. Identification of the principal binding site for RGD containing ligands in the alpha(V)beta(3) integrin: a photoaffinity crosslinking study. **Biochemistry**, v. 41, p. 8321-8331, 2002.

YOU, W. K.; JANG, Y. J.; CHUNG, K. H.; JEON, O. H.; KIM, D. S. Functional roles of the two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 339, p. 964-970, 2006.

YOU, W. K.; JANG, Y. J.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. A novel disintegrin-like domain of a high molecular weight metalloprotease inhibits platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 637-642, 2003a.

YOU, W. K.; SEO, H. J.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. **J. Biochem.**, v. 134, p. 739-749, 2003b.

ZHANG, X. P.; KAMATA, T.; YOKOYAMA, K.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; TAKADA, Y. Specific interaction of the recombinant disintegrin-like domain of MDC-15 (metargidin, ADAM-15) with integrin $\alpha\beta 3$. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 7345-7350, 1998.

ZHOU, Q.; SMITH, J. B.; GROSSMAN, M. H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem. J.**, v. 307, p. 411-417, 1995.

ZHU, Z.; GAO, Y.; ZHU, Z.; YU, Y.; ZHANG, X.; ZANG, J.; TENG, M.; NIU, L. Structural basis of the autolysis of AaHIV suggests a novel target recognizing model for ADAM/reprolysin family proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 386, p. 159-164, 2009.

ZOLKIEWSKA, A. Disintegrin-like/Cysteine-Rich Region of ADAM 12 Is an Active Cell Adhesion Domain. **Exp. Cell Res.**, v. 252, p. 423-431, 1999.