

MARIA STELLA FURLAN

**Caracterização do precursor e da atividade de inibição
da agregação plaquetária da BnP1 e de disintegrinas do
veneno de *Bothrops neuwiedi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Ana Maria Moura da Silva

São Paulo
2010

RESUMO

FURLAN, M. S. **Caracterização do precursor e da atividade de inibição da agregação plaquetária da BnP1 e de disintegrinas do veneno de *Bothrops neuwiedi***. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2010.

As metaloproteinases de venenos de serpentes (SVMPs) são enzimas proteolíticas dependentes de zinco, envolvidas nos efeitos locais e sistêmicos do envenenamento ofídico. De acordo com a organização dos múltiplos domínios de seus precursores, as SVMPs são classificadas em três grupos, P-I, P-II e P-III. Dentre as três classes, as P-II são as mais complexas, apresentando diferentes produtos de processamento. Duas novas proteínas do veneno de *B. neuwiedi*, a BnP1 e BnP2, foram isoladas em nosso laboratório. Essas toxinas apresentaram características de SVMPs de classe P-I, como massa molecular de aproximadamente 25 kDa, atividade fibrinolítica e fraca atividade hemorrágica; porém o seqüenciamento parcial indicou maior similaridade com SVMPs da classe P-II. A fim de melhor explorar o processamento e função dessas proteínas, o objetivo desse trabalho foi otimizar o isolamento da BnP1 e isolar as disintegrinas do veneno, ambas originadas de precursores tipo P-II, analisando as seqüências de cDNA e a atividade sobre a agregação plaquetária. A purificação da BnP1 foi feita em FPLC, por cromatografia de exclusão molecular seguida de troca iônica. Duas novas disintegrinas, a D2 e a D4, foram isoladas do veneno de *B. neuwiedi* por cromatografia de fase reversa em HPLC; e outra disintegrina foi isolada de gel de poliacrilamida, e denominada MS. Essas proteínas foram parcialmente seqüenciadas por espectrometria de massas. Para o seqüenciamento completo dos precursores, o mRNA foi isolado da glândula e foram amplificadas diferentes seqüências relacionadas a biossíntese de SVMPs das classes P-I, P-II e P-III. As seqüências de proteínas preditas foram então comparadas às seqüências de BnP1 e das disintegrinas obtidas. Diante dessa análise, foi possível observar a semelhança entre SVMPs de classes P-I e P-II paralelamente a divergência entre SVMPs de classe P-II, indicando a alta complexidade dessa classe de SVMPs. Esse estudo indicou ainda a existência de seqüências gênicas comuns para precursores de SVMPs das classes P-I e P-II codificando a região N-terminal do domínio catalítico. Este grupo particular de precursores (P-I/P-II) inclui as seqüências de BnP1 e de MS com identidades de 93,3 e 100%, respectivamente. A disintegrina D4 apresentou identidade de 81,1% com um precursor tipicamente de SVMP classe P-II. Os ensaios de inibição da agregação plaquetária indicaram que a BnP1, como a maioria das P-I descritas, não foi capaz de inibir de forma significativa a agregação plaquetária, enquanto as disintegrinas inibiram a agregação induzida por todos os agonistas. Este trabalho indica que a biossíntese de SVMPs da classe P-II pode ser ainda mais complexa que o conhecido, apontando para novas possibilidades no estudo dos mecanismos geradores de diversidade nos venenos.

Palavras-chave: Veneno de serpente. Biossíntese. Metaloproteinases. Disintegrinas. Agregação plaquetária. cDNA.

ABSTRACT

FURLAN, M. S. **Characterization of the precursor and the inhibitory activity on platelet aggregation of BnP1 and disintegrins from *Bothrops neuwiedi* venom.** 2010. 85 p. Master thesis (Biotechnology) - Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2010.

Snake venom metalloproteinases (SVMPs) are zinc-dependent proteolytic enzymes, involved in local and systemic effects of snake bite. According to their domain organization, SVMPs are classified into 3 major classes: P-I, P-II and P-III. The P-II class is the most complex, with different processing products. Two new toxins from *B. neuwiedi* venom, BnP1 and BnP2, were isolated in our laboratory. These proteins presented typical characteristics of P-I class SVMPs, as molecular weight of 25 kDa, fibrinolytic activity and weak hemorrhagic activity; however, the partial sequencing of these proteins indicated more similarity to P-II class SVMPs. In order to better investigate the processing and function of this class of SVMPs, the aim of this study was to optimize BnP1 purification and isolate disintegrins from the same venom, both originated from P-II class precursors, and analyze their cDNA sequences and their activity on platelet aggregation. BnP1 was purified on FPLC system, by size exclusion followed by ion exchange chromatography. Two new disintegrins, D2 and D4, were isolated from *B. neuwiedi* venom by reversed phase chromatography on HPLC system, and another disintegrin was isolated from SDS-PAGE and named MS. These proteins were partially sequenced by mass spectrometry. For the precursors complete sequencing, the mRNA was isolated from a venom gland, and several sequences related to P-I, P-II and P-III class SVMPs biosynthesis were amplified. The predicted protein sequences were compared to BnP1 and the isolated disintegrins. It could be observed strong similarity between P-I and P-II classes of SVMPs, as well as notorious differences between class P-II SVMP precursors; which indicates the high complexity of P-II SVMPs. This study also demonstrates that precursors of P-I and P-II classes share common DNA sequences coding for the N-terminal region of catalytic domain. This particular group of P-I/P-II SVMPs encloses the precursors of BnP1 and MS sequences with identities of 93,3 and 100%, respectively. The disintegrin D4 presented identity of 81,1% with a typical P-II class SVMP precursor. The platelet aggregation assay indicated that BnP1, like most of P-I class SVMPs, was not able to inhibit platelet aggregation; while the disintegrins were able to inhibit platelet aggregation induced by all agonists tested. This work suggests that the biosynthesis of metalloproteinases can be more complex than expected, pointing to new possibilities in the study of mechanisms of generation of venoms diversity.

Keywords: Snake venom. Biosynthesis. Metalloproteinases. Disintegrins. Platelet aggregation. cDNA.

1 INTRODUÇÃO

Os envenenamentos ofídicos constituem um grande problema de saúde pública no mundo, ocorrendo com elevada frequência e acometendo severamente as vítimas em alguns casos. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde – OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), ocorrem em torno de 1.841.000 acidentes com serpentes peçonhentas ao ano. No Brasil, dados do Ministério da Saúde (Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN, 2010) indicaram 21.446 casos em 2009, sendo que cerca de 74% (15.827) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*. Em menores proporções, outros acidentes são causados por serpentes dos gêneros *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*. Os acidentes botrópicos não apresentam alto índice de letalidade, porém apresentam grande importância médica uma vez que as seqüelas podem incluir perda da função ou amputação do membro afetado devido aos severos efeitos locais da picada (GUTIÉRREZ et al., 2007).

Os venenos ofídicos são misturas complexas de diferentes compostos em que predominam proteínas com ação enzimática, como serinoproteinases, metaloproteinases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases A₂; ou não enzimática, como disintegrinas, lectinas tipo-C, peptídeos miotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos, potencializadores de bradicinina, entre outros (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007). As diferentes composições dos venenos determinam os efeitos sobre as vítimas de acidentes ofídicos. No caso de envenenamentos por *Bothrops* e *Lachesis*, os efeitos locais em geral incluem mionecrose, dermonecrose, hemorragia, e inflamação; enquanto as alterações sistêmicas incluem coagulopatia, sangramento, choque e insuficiência renal aguda. No caso dos acidentes com o gênero *Crotalus*, as reações locais não são muito evidentes, e as principais características do envenenamento se dão pela ação neurotóxica e miotóxica sistêmicas, além de alterações renais e na coagulação sanguínea. Os acidentes com o gênero *Micrurus*, por outro lado, induzem principalmente um efeito neurotóxico. (CARDOSO et al., 2003)

Diversos componentes dos venenos ofídicos são capazes de afetar o sistema hemostático. As toxinas envolvidas nesse processo podem ter ação coagulante, por apresentarem atividade trombina-símile, ou por ativar os fatores II (protrombina) ou X da

casca de coagulação (KINI; RAO; JOSEPH, 2001). Outras podem ter ação anticoagulante, pela ativação da proteína C, que inibe alguns fatores de coagulação, ou pela inibição direta da trombina ou de alguns fatores da casca de coagulação, como os fatores IX e X (KINI, 2006). Além disso, as toxinas podem apresentar atividade fibrinogênica, que dissolve rede de fibrina ou impede sua formação pelo consumo do fibrinogênio, ocasionando a incoagulabilidade sangüínea freqüente em acidentes ofídicos (SWENSON; MARKLAND, 2005). Existem também toxinas com ação no endotélio vascular, gerando o quadro hemorrágico freqüente nesses acidentes (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000); e com ação direta sobre as plaquetas, interferindo na sua agregação (KAMIGUTI, 2005).

As plaquetas ocupam um papel fundamental no controle da hemostasia e dessa forma são um importante alvo de ação dos venenos. Diante de uma lesão na parede vascular, há exposição do tecido subendotelial, e conseqüentemente dos ligantes fibronectina, laminina, colágeno e fator de Von Willenbrand (vWf), que entram em contato com o sangue. Imediatamente, as plaquetas circulantes aderem-se ao vWf através do complexo de glicoproteínas presente na superfície plaquetária, o GPIb/V/IX. Outra glicoproteína de superfície, a GPIV, bem como a integrina $\alpha_2\beta_1$, interagem com o colágeno exposto, participando também da adesão plaquetária ao tecido subendotelial. Em seguida as plaquetas aderidas se tornam ativadas e liberam agonistas secundários, como ADP, TXA_2 e serotonina, e proteínas envolvidas na adesão, como fibrinogênio e P-selectina (JACKSON; MISTRY; YUAN, 2001). Ocorre então a ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que permite a interação plaqueta-plaqueta pela ligação do fibrinogênio com as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ ativadas, sinalizando para a formação de agregados mais estáveis que formam o tampão plaquetário no local da ruptura do vaso. A ação das plaquetas, juntamente com a ativação da casca de coagulação e conseqüente formação da malha de fibrina, é responsável por cessar a hemorragia (KAMIGUTI, 2005).

As toxinas de venenos de serpentes agem nas glicoproteínas presentes na superfície das plaquetas, impedindo a ação dos ligantes naturais e interferindo na adesão, ativação ou agregação plaquetária. O complexo GPIb-IX-V é alvo de lectinas tipo-C e de metaloproteinases. As metaloproteinases se ligam ou clivam a sua

subunidade GPIb α , e impedem a ligação desse complexo ao vWf, inibindo a agregação plaquetária; enquanto as lectinas tipo-C podem se ligar a subunidade GPIb e ativar as plaquetas pela sinalização a outros receptores, induzindo neste caso a agregação plaquetária. Os receptores de colágeno, GPVI e $\alpha_2\beta_1$, também são alvos de lectinas tipo C e metaloproteinases, que podem se ligar ou clivar esses receptores (DU et al., 2006; LU; CLEMETSON; CLEMETSON, 2005). As integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ são bloqueadas pelas disintegrinas de venenos, que apresentam alta afinidade para esses receptores, sendo potentes inibidores da agregação plaquetária (CALVETE et al., 2005). A interferência das toxinas de veneno na agregação plaquetária pode ocorrer ainda pela ação direta sobre ligantes naturais, como vWf e colágeno (KAMIGUTI et al., 1996a). A Tabela 1 mostra esses exemplos de toxinas de venenos de serpentes e suas ações sobre a agregação plaquetária.

Tabela 1 - Exemplos de toxinas de venenos de serpentes e suas ações sobre a agregação plaquetária.

	Toxinas de venenos de serpente	Alvo	Ação sobre plaquetas	Referências
Lectinas tipo C	Flavocetina A (<i>Trimeresurus flavoviridis</i>)	Ligação a GPIb	Inibição	TANIUSHI et al., 1995
	Mucetina (<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>)	Ligação a GPIb	Ativação	LU et al., 2004; TAI et al., 2004)
	Convulxina (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	Ligação a GPVI	Ativação	JANDROT-PERRUS et al., 1997
	Rodocetina (<i>Calloselasma rhodostoma</i>)	Ligação a $\alpha_2\beta_1$	Inibição	WANG; KINI; CHUNG, 1999
Metaloproteinases	Mocaragina (<i>Naja Mocambique Mocambique</i>)	Clivagem de GPIb	Inibição	WARD et al., 1996
	Jararagina (<i>Bothrops jararaca</i>)	Clivagem e ligação a $\alpha_2\beta_1$; ligação ao colágeno	Inibição	KAMIGUTI et al., 1996b; TANJONI et al., 2003
	Acuragina (<i>Agkistrodon acutus</i>)	Hidrólise do vWf	Inibição	WANG, HUANG, 2002
	Catrocolastina (<i>Crotalus atrox</i>)	Ligação ao colágeno	Inibição	ZHOU; SMITH; GROSSMAN, 1995
Disintegrinas RGD	Trigramina (<i>Trimeresurus gramineus</i>)	Ligação a $\alpha_{11b}\beta_3$	Inibição	HUANG et al., 1989

Devido à importante ação dessas toxinas sobre plaquetas e outros pontos reguladores da hemostasia, e a fim de se melhor compreender a dinâmica do envenenamento, as metaloproteinases e disintegrinas são amplamente estudadas e consistem no objeto de estudo deste trabalho.

1.1 Metaloproteínas de Venenos de Serpentes (SVMPs)

As metaloproteínas de venenos de serpentes (SVMPs—*Snake Venom Metalloproteinases*), conjuntamente com as ADAMs (*A Disintegrin and Metalloproteinase*) e ADAMTs (*A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*), se incluem na subfamília M12b das metaloproteínas dependentes de zinco, também conhecidas como reprotinas. O grupo das reprotinas faz parte da super família das metzincinas, a qual inclui também as astacinas, metaloproteínas de matriz extracelular (MMPs) e serralinas (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKLER, 1993; STÖCKER et al., 1995). As análises dos cDNAs e das seqüências protéicas das SVMPs demonstraram a relação entre as SVMPs, MMPs e as ADAMs, indicando uma origem comum entre elas (MOURA-DA-SILVA; THEAKSTON; CRAMPTON, 1996), com a conservação do pró-domínio e do domínio metaloproteínase. Uma primeira divergência ocorreu com o surgimento dos novos domínios disintegrina, tipo disintegrina e rico em cisteína nas ADAMs e SVMPs, em substituição ao domínio hemopexina mantido nas MMPs.

As SVMPs são enzimas capazes de hidrolisar componentes da matriz extracelular como colágeno tipo IV e fibronectina (GUTIÉRREZ et al., 2005), proteínas plasmáticas como fibrinogênio, fibrina, fator de Von Willenbrand, protrombina (KAMIGUTI et al., 1994; SILVA et al., 2004; WANG; SHIH; HUANG, 2004) e proteínas de superfície celular como algumas integrinas e caderinas (KAMIGUTI et al., 1996a; YOU et al., 2006). As metaloproteínas também interagem com receptores de plaquetas, células endoteliais e fibroblastos, promovendo diretamente ou participando dos principais efeitos dos envenenamentos, como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose e resposta inflamatória. (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007).

As SVMPs são classificadas de acordo com a organização de seus múltiplos domínios em classes de I a III (P-I a P-III). Originalmente, considerava-se a existência da classe P-IV, que seria similar a classe P-III, contendo uma seqüência adicional que codificaria um domínio tipo lectina (BJARNASON; FOX, 1994; FOX; SERRANO, 2005); no entanto, até o momento, não foram encontrados transcritos dessa classe no mRNA,

indicando a possibilidade dessas proteínas representarem apenas uma modificação pós traducional de P-III, sendo a classe P-IV atualmente incluída na classe P-III.

As metaloproteinases da classe P-I apresentam o pré-domínio (seqüência sinal), pró-domínio (domínio de latência), e domínio metaloproteinase. As toxinas da classe P-II contêm os mesmos domínios das SVMPs da classe P-I mais o domínio disintegrina. As SVMPs pertencentes à classe P-III apresentam os mesmos domínios das P-II, com a substituição do domínio disintegrina por um domínio tipo-disintegrina, além do rico em cisteína. O peptídeo sinal é responsável pelo direcionamento da proteína nascente para o interior do retículo endoplasmático, onde ocorre o processamento e secreção das proteínas. O pró-domínio apresenta a seqüência conservada PKMCGV, responsável pelo mecanismo de *cystein-switch*, que controla o estado de ativação ou não das enzimas através do bloqueio do sítio catalítico. O domínio metaloproteinase conserva a seqüência de ligação ao átomo de zinco (HEXXHXXGXXH) e a estrutura *Met-Turn* (CI/VM), que estabiliza os três resíduos de histidina envolvidos na catálise (BODE; GOMIS-RÜTH; STÖCKLER, 1993; STÖCKER et al., 1995). O domínio disintegrina apresenta a seqüência Arg-Gly-Asp (RGD) na sua estrutura, presente também no fibrinogênio, ligante natural das integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$, o que explica sua alta afinidade por esse receptor e a inibição da agregação plaquetária (HUANG et al., 1987). O domínio tipo-disintegrina apresenta, no lugar da seqüência RGD das disintegrinas, a seqüência XXCD, e é sempre expresso juntamente com o domínio rico em cisteína, permitindo uma interação com receptores de plaquetas, bloqueando seus ligantes naturais (KAMIGUTI; ZUZEL; THEAKSTON, 1998; KAMIGUTI et al., 2003) ou componentes de matriz extra-celular, o que provavelmente facilita a proteólise e hemorragia (MOURA-DASILVA et al., 2009).

Na biossíntese das SVMPs, as proteínas nascentes passam por diferentes estágios de maturação, desde sua produção no retículo endoplasmático rugoso das células secretórias e transferência para o complexo de Golgi, até o transporte via vesículas secretórias para o lúmen da glândula de veneno. No retículo endoplasmático rugoso, os polipeptídeos sofrem a formação de pontes dissulfeto, enovelamento, glicosilações, processamentos proteolíticos e, em alguns casos, a formação de estruturas multiméricas. Posteriormente, ocorrem processamentos pós traducionais via

clivagem proteolítica. Conforme o local desse processamento ocorre a remoção do pró-domínio com a conseqüente ativação enzimática ou a clivagem entre os domínios catalítico e disintegrina, responsável pela existência dos diferentes produtos encontrados no veneno. Assim, após o processo de maturação, as metaloproteinases são divididas em subclasses como P-Ia, IIa, IIb, IIc, IId, IIe, IIIa, IIIb, IIIc, e IIId e D-I (FOX; SERRANO, 2008), conforme mostra a Figura 1.

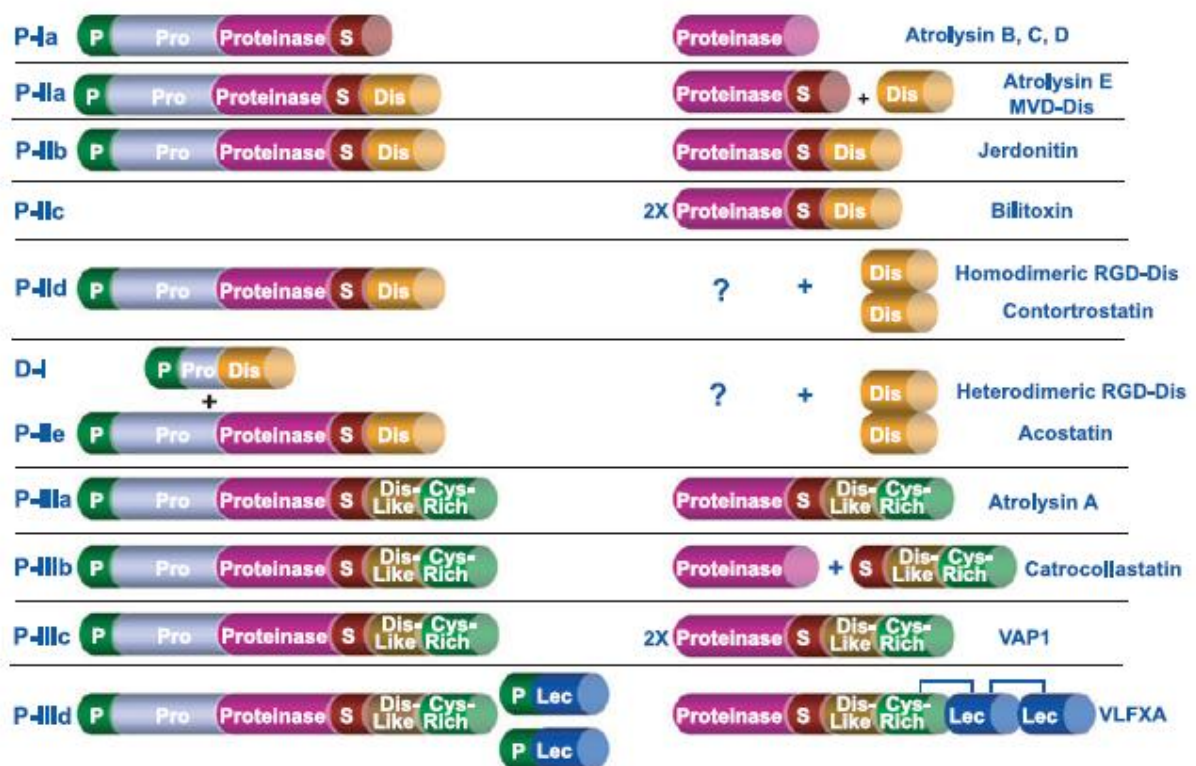


Figura 1 – Classificação estrutural das SVMPs. P: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio; Proteinase: domínio metaloproteinase; S: espaçador; Dis: domínio disintegrina; Dis-Like: domínio tipo-disintegrina; Cys-Rich: domínio rico em cisteína, Lec: domínio ligante de lectina. FONTE: Fox, Serrano, 2008.

As metaloproteinases de classe I (P-I) apresentam na forma madura massa molecular entre 20 e 30 kDa, e podem ter diversas atividades biológicas. Dentre as atividades biológicas descritas para SVMPs da classe P-I estão as atividades fibrino(geno)lítica, hemorrágica, mionecrótica, inflamatória, pró-apoptótica, ativadora de

protrombina, além de inibição da agregação plaquetária (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007). Em geral, essas toxinas são fracamente ou não hemorrágicas, e a inibição da agregação plaquetária se dá geralmente por interferência com o complexo GPIb/V/IX e o vWf.

A atividade biológica das SVMPs da classe P-II depende do resultado do processamento pós-traducional, ou seja, se apresentam o domínio catalítico ligado ao domínio disintegrina, com a seqüência de aminoácidos RGD, ou se estão na forma processada, gerando os domínios catalítico e disintegrina de forma independente. A massa molecular das P-II com atividade catalítica varia entre 30 e 60 kDa. As dsintegrinas livres monoméricas podem apresentar de 40 a 84 de aminoácidos; e as diméricas, em torno de 67 resíduos em cada subunidade (CALVETE et al., 2005). O principal alvo das disintegrinas tipo RGD é a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que tem papel fundamental na agregação plaquetária, por ser a via final de ativação. Assim, sua inibição faz com que a agregação plaquetária não ocorra, mesmo que ativadas por diferentes agonistas. (ANDREWS et al., 2001). O estudo dessas disintegrinas resultou no desenho e síntese de novos fármacos como o Eptifibatide (PHILIPS; SCARBOROUGH, 1997) e Tirofiban[®] (Merck & Co), usadas no tratamento de doenças coronárias. Outras atividades de disintegrinas são inibição da angiogênese e do crescimento e metástase tumoral, presentes em toxinas como a Contortrostatina (GOLUBKOV et al., 2003) e Trigramina (YANG et al., 2005), respectivamente.

As SVMPs da classe P-III possuem o domínio catalítico mais os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína. Essas proteases são normalmente encontradas na forma catalítica, contendo os três domínios e apresentando massa molecular entre 60 e 110 kDa. São em geral altamente hemorrágicas, e podem ter ação sobre diversos substratos, tipos celulares e processos fisiológicos. Dentre as atividades biológicas descritas para metaloproteinases da classe P-III estão a ação sobre células endoteliais, atividade pró-inflamatória e inibição da agregação plaquetária por interferência com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e com o colágeno (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007). Além da forma catalítica, as toxinas da classe P-III também podem ser liberadas na forma processada, contendo apenas os domínios tipo disintegrina e rico em cisteína. Essas toxinas processadas apresentam ações semelhantes às das toxinas contendo o

domínio metaloproteinases, exceto aquelas dependentes de catálise. Assim, elas também são capazes de inibir a agregação plaquetária e ativar a resposta inflamatória (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007). A Tabela 2 exemplifica as SVMPs e suas atividades biológicas.

Tabela 2 - Exemplos de toxinas de venenos de serpentes e suas atividades biológicas.

Toxinas	Efeitos
Classe P-I (domínio metaloproteinase)	
Atoxase - <i>Crotalus atrox</i>	Atividade fibrinolítica (WILLIS; TU, 1988),
BaP1 – <i>Bothrops asper</i>	Atividade hemorrágica, mionecrótica, inflamatória, pró-apoptótica (DÍAZ et al., 2005) (GUTIERREZ et al., 1995; RUCAVADO et al., 1995)
BthMP – <i>Bothrops moojeni</i>	Atividade hemorrágica, mionecrótica, inflamatória (GOMES et al., 2009)
Graminelisina I – <i>Trimeresurus gramineus</i>	Atividade pró-apoptótica (WU et al., 2001)
Bothrojaractivase – <i>Bothrops jararaca</i>	Atividade ativadora de protrombina (BERGER et al., 2008)
Crotalina – <i>Crotalus atrox</i>	Inibição da agregação plaquetária via hidrólise do vWf (WU; PENG; HUANG, 2001)
Triflamp – <i>Trimeresurus flavoviridis</i>	Hidrólise do vWf - inibição da agregação plaquetária (TSENG; LEE; HUANG, 2004)
Classe P-II (domínio disintegrina livre)	
Trigramina - <i>Trimeresurus gramineus</i>	Inibição da agregação plaquetária via ligação com $\alpha_{IIb}\beta_3$ (HUANG et al., 1989), inibição do crescimento e metástase tumoral (YANG et al., 2005)
Echistatina – <i>Echis carinatus</i>	Inibição da agregação plaquetária Ligação com $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GAN et al., 1988)
Contortrostatina – <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Inibição da angiogênese (GOLUBKOV; HAWES; MARKLAND, 2003)
Accutina - <i>Agkistrodon acutus</i>	Inibição da angiogênese (YEH ; PENG; HUANG, 1998)
Rhodostomina - <i>Calloselasma rhodostoma</i>	Inibição do crescimento e metástase tumoral (YANG et al., 2005)
Classe P-II (domínio metaloproteinase e domínio disintegrina)	
Jerdonitina – <i>Trimeresurus jerdonii</i>	Inibição da agregação plaquetária (CHEN et al., 2003)
Stejnitina – <i>Trimeresurus stejnegeri</i>	Atividade fibrinogenolítica, inibição da agregação plaquetária e indução da apoptose de células ECV304 (HAN et al., 2007).

Continua

Conclusão

Classe P-III (domínios metaloproteinase, tipo disintegrina e rico em cisteína)

Jararagina – <i>Bothrops jararaca</i>	Atividade hemorrágica (PAINE et al., 1992); ação sobre a membrana basal e células endoteliais (TANJONI et al., 2005), inibição da agregação plaquetária via ligação com $\alpha_2\beta_1$ (KAMIGUTI et al., 1996b) atividade pró-inflamatória (CLISSA et al., 2001)
HF3 - <i>Bothrops jararaca</i>	Atividade hemorrágica (ASSAKURA; REICHL; MANDELBAUM, 1986); Ativação de macrófagos (SILVA et al., 2003)
Berythactivase – <i>Bothrops erythromelas</i>	Ativação de protrombina e de células endoteliais (SCHATTNER et al., 2005)

Classe P-III (domínios tipo disintegrina e rico em cisteína)

Jararagina-C - <i>Bothrops jararaca</i>	Inibição da agregação plaquetária (USAMI et al., 1994), ativação da resposta inflamatória (CLISSA et al., 2006)
Halydina – <i>Gloydius halys</i>	Inibição da agregação plaquetária (YOU et al., 2003)
Alternagina-C – <i>Bothrops alternatus</i>	Ativação da resposta inflamatória (MARIANO-OLIVEIRA et al., 2003)

Dentre as três classes de metaloproteinases descritas, as P-I e P-III são as mais estudadas. As do tipo P-II têm poucos representantes na forma não processada, e são mais comumente encontradas na forma de disintegrina livre. Em alguns casos pode ocorrer o isolamento e a caracterização de uma metaloproteinase sintetizada a partir de um precursor de P-II que, após processamento, acaba sendo descrita como P-I por ausência da seqüência do precursor através do mRNA. Isso permite sugerir que algumas das metaloproteinases atualmente conhecidas como P-I sejam derivadas do processamento de P-II. Esta diferença na origem das toxinas poderia explicar alguns dados da literatura nos quais atividades biológicas não comumente relacionadas às SVMPs da classe P-I são descritas para membros deste grupo, como é o caso da inibição da agregação plaquetária induzida pela BjussuMP-II, isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* (MARCUSI et al., 2007). Esta toxina apresenta características de P-I, como massa molecular de 24 kDa, atividade fibrino(geno)lítica, caseinolítica e ausência de atividade hemorrágica e miotóxica; no entanto, a inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP não é típica dessa classe de metaloproteinases. As toxinas Insularinase A do veneno de *Bothrops insularis* (MODESTO et al., 2005) e HR2a do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (YAMADA; SHIN; MORITA, 1999) são exemplos de metaloproteinases de aproximadamente 25 kDa, originadas do processamento de suas precursoras da classe P-II.

O estudo de SVMPs em nosso laboratório se iniciou através da Jararagina, P-III do veneno de *B. jararaca*, e os resultados obtidos despertaram o interesse pelo estudo de outras metaloproteínases provenientes de outros venenos de serpentes. Assim, durante o fracionamento cromatográfico do veneno da serpente *Bohtrops neuwiedi*, duas novas proteínas foram isoladas, a BnP1 e BnP2 (BALDO et al., 2008). Essas proteínas foram parcialmente seqüenciadas e testadas quanto à atividade biológica. Os seqüenciamentos feitos por espectrometria de massas e N-terminal por degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), cobriram aproximadamente 37% dos aminoácidos da BnP1 e 31% da BnP2. Os dados obtidos foram confrontados com as seqüências disponíveis no banco de dados do *Blastp* (ALTSCHUL et al., 1997), que indicou alta similaridade com a insularinase (gi 52426579, 91%), seguida da metaloproteínase tipo II de *B. asper* (gi 82466485, 82%), ambas originadas a partir de precursores do tipo P-II. A Figura 2 mostra o alinhamento entre a BnP1 e outras toxinas de veneno, e a porcentagem de identidade com cada uma delas.

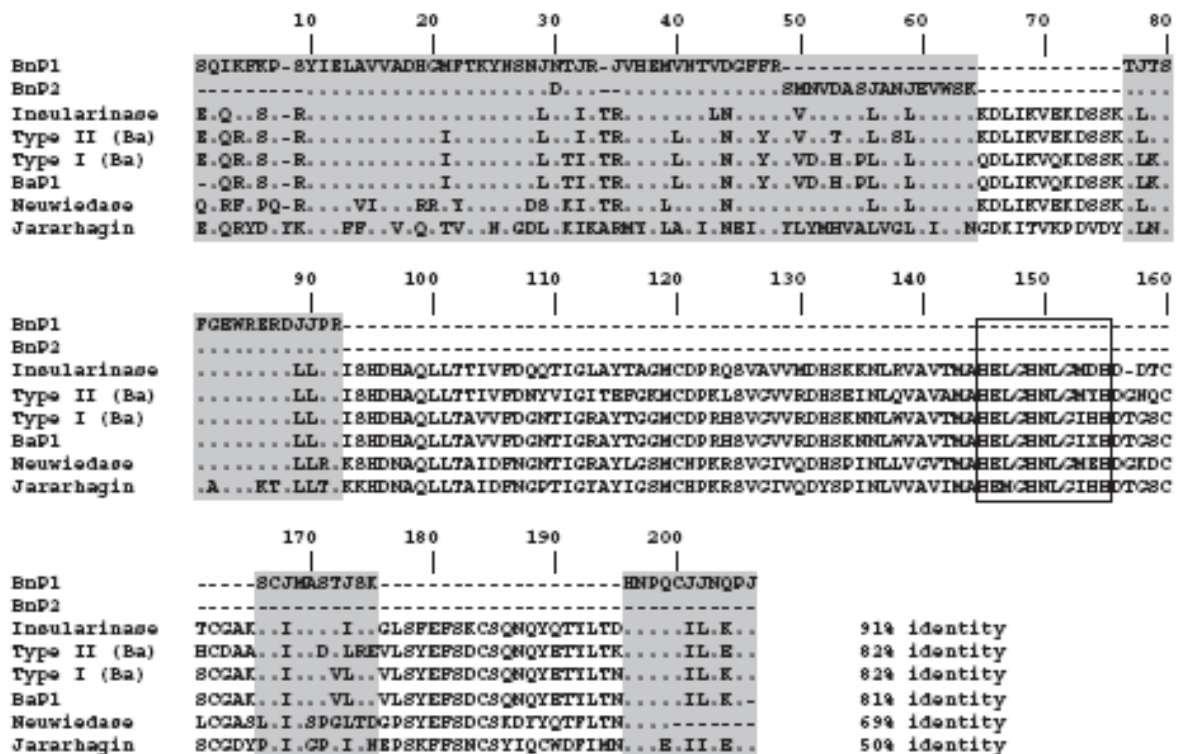


Figura 2 - Alinhamento das seqüências da BnP1 e BnP2 com outras SVMPs. A linha tracejada representa *gaps* para melhorar o alinhamento. A caixa cinza corresponde a regiões cobertas pelas seqüências parciais da BnP1 e BnP2, os resíduos idênticos são indicados por pontos, e o motivo de ligação ao zinco está indicado no retângulo.
FONTE: Baldo et al., 2008.

As toxinas isoladas, por apresentarem maior similaridade à SVMPs derivadas de precursores de P-II, poderiam ser o domínio catalítico de precursores da classe P-II que após o processamento, tiveram os domínios metaloproteinase e disintegrina liberados separadamente. Dessa forma, essas proteínas se incluiriam na classe P-IIa, e seriam um modelo importante para se estudar a biossíntese de SVMPs dessa classe, e para elucidar se existem diferenças nas atividades biológicas quando comparadas com dados já descritos na literatura correspondentes a SVMPs da classe P-I. A Figura 3 mostra um esquema hipotético da estrutura da BnP1 antes e depois do processamento que ocorre antes da liberação da proteína no lúmen da glândula de veneno de *B. neuwiedi*.

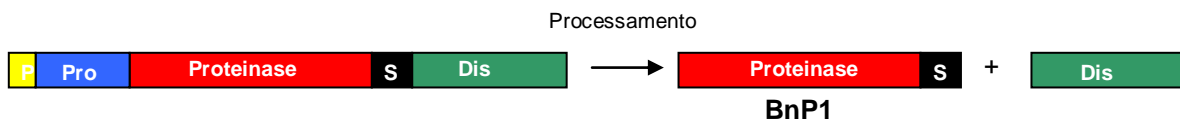


Figura 3 - Esquema sugerido para o processamento e origem da BnP1, que se incluiria na classe PIIa, segundo a classificação de Fox e Serrano (2008). P: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio, Proteínase: domínio metaloproteinase; S: espaçador; Dis: domínio disintegrina.

Com relação aos testes de ação biológica, os resultados indicaram fraca atividade hemorrágica da BnP1 e BnP2 e nenhuma atividade miotóxica direta. Entretanto, ambas apresentaram atividade fibrino(geno)lítica e a BnP1 mostrou capacidade de induzir apoptose em células endoteliais (BALDO et al., 2008). Resultados preliminares mostraram ainda uma discreta ação na agregação plaquetária induzida pelo ADP, fato este que chamou mais ainda nossa atenção sobre a possibilidade dessas serem sintetizadas por precursores da classe P-II.

No sentido de caracterizar o tipo de precursor e confirmar qual a classe das toxinas, além da avaliação da estrutura da proteína madura e da análise de suas atividades, é importante fazer um estudo do cDNA que codifica a proteína. Dessa forma, neste trabalho nos concentramos na caracterização dos precursores da BnP1 e de outras SVMPs do veneno de *B. neuwiedi*, através da clonagem e seqüenciamento

de cDNAs, para assim elucidarmos a origem e correlacionarmos com a atividade anti-agregação plaquetária dos componentes originados de P-II. Esses estudos em conjunto auxiliam na análise da relação entre a complexidade estrutural dos venenos de serpentes e suas múltiplas ações.

6 CONCLUSÕES

- A BnP1 foi obtida com alto grau de pureza após o aprimoramento do protocolo de isolamento, cujas alterações incluiu a seleção específica de apenas uma fração eluída da cromatografia de exclusão molecular, e a alteração de gradiente de NaCl na cromatografia de troca iônica;
- A BnP1 não foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP, colágeno, trombina e ristocetina, como a maioria das metaloproteinases da classe P-I ou domínios catalíticos de P-II;
- As disintegrinas D2 e D4 inibiram a agregação plaquetária induzida por todos os agonistas testados, de acordo com outras disintegrinas descritas na literatura;
- Foram clonados e seqüenciados 21 cDNAs que codificam SVMPs;
- Foi detectado um tipo de precursor de SVMP classe P-II que apresenta seqüências gênicas comuns para a região N-terminal do domínio catalítico de metaloproteinases das classes P-I;
- A BnP1 e a disintegrina MS são provenientes desse tipo particular de precursor (P-I/P-II);
- A disintegrina D4 é proveniente de precursores tipicamente da classe P-II;
- Estes estudos confirmam a variabilidade das SVMPs nos venenos botrópicos e sugerem um novo mecanismo gerador de diversidade nos mesmos.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, I.; GUERRERO, B.; MARIA SALAZAR, A.; GIRÓN, M. E.; PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, E. E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Individual venom variability in the South American rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 214-224, 2007.

ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual and ontogenetic variations. **J. Proteome. Res.**, v. 7, n. 8, p. 3556-3571, 2008.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDREWS, R. K.; KAMIGUTI, A. S.; BERLANGA, O.; LEDUC, M.; THEAKSTON, R. D.; WATSON, S. P. The use of snake venom toxins as tools to study platelet receptors for collagen and von Willebrand factor. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 155-172, 2001.

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, n. 9, p. 943-946, 1986.

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, n. 1, p. 54-65, 2008.

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, n. 4, p. 488-501, 2008.

BJARNASON, J. B.; FOX J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 325-372, 1994. Review.

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 Lett.**, v. 331, p. 134-140, 1993.

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.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom.**, v. 42, p. 1405–1414, 2007.

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, n. 8, p. 1063-1074, 2005. Review.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. W.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. **Animais peçonhentos no Brasil** – Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Ed. Sarvier, 2003.

CHEN, R. Q.; JIN, Y.; WU, J. B.; ZHOU, X. D.; LU, Q. M.; WANG W. Y.; XIONG, Y. L. A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 310, n. 1, p. 182-187, 2003.

CIDADE, D. A.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L.; BOM, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 437-461, 2006.

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, n. 10, 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, n. 5, p. 591-596, 2006.

DÍAZ, C.; VALVERDE, L.; BRENES, O.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **J. Cell Biochem.**, v. 94, n. 3, p. 520-528, 2005.

DU, X. Y.; CLEMETSON, J. M.; NAVDAEV, A.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King Cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 35124–35132, 2002.

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur. J. Biochem.**, v. 1, n. 1, p. 80-91, 1967.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005. Review.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008. Review.

FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 48, n. 4, p. 401-410, 2006.

GAN, Z. R.; GOULD, R. J.; JACOBS, J. W.; FRIEDMAN, P. A.; POLOKOFF, M. A. Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 36, p. 19827-19832, 1988.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003.

GOLUBKOV, V.; HAWES, D.; MARKLAND, F.S. Anti-angiogenic activity of contortrostatin, a disintegrin from *Agkistrodon contortrix contortrix* snake venom. **Angiogenesis**, v. 6, n. 3, p. 213-224, 2003.

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, n. 1, p. 24-32, 2009.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, 2000. Review.

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, n. 1, p. 19-29, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEÓN, G.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; ANGULO, Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 28, p. 2935-2950, 2007.

HAN, Y. P.; LU, X. Y.; WANG, X. F.; XU, J. Isolation and characterization of a novel P-II class snake venom metalloproteinase from *Trimeresurus stejnegeri*. **Toxicon.**, v. 49, n. 7, p. 889-898, 2007.

HSU, C. C.; WU, W. B.; HUANG, T. F. A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions. **J. Thromb. Haemost.**, v. 6, n. 9, p. 1578-1585, 2008.

HSU, C. C.; WU, W. B.; CHANG, Y. H.; KUO, H. L.; HUANG, T. F. Antithrombotic effect of a protein-type I class snake venom metalloproteinase, kistomin, is mediated by affecting glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction. **Mol. Pharmacol.**, v. 72, n. 4, p. 984-992, 2007.

HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; KIRBY, E. P.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin: primary structure and its inhibition of von Willebrand factor binding to glycoprotein IIb/IIIa complex on human platelets. **Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 661-666, 1989.

HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; LUKASIEWICZ, H.; NIEWIAROWSKI, S. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 33, p. 16157-16163, 1987.

JACKSON, S. P.; MISTRY, N.; YUAN, Y. Platelets and the injured vessel wall -“rolling into action”. Focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 10, p. 192-197, 2001.

JANDROT-PERRUS, M.; LAGRUE, A. H.; OKUMA, M.; BON, C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involve glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 27035–27041, 1997.

JESPERSEN, J.; ASTRUP, T. A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents: optimal conditions, reproducibility and precision. **Haemostasis**, v. 13, p. 301-315, 1983.

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

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 (Pt 2), p. 635-641, 1996b.

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

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, n. 2, p. 244-249, 1994.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 7, p. 853-862, 1998.

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, n. 1-3, p. 129-134, 2003.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v. 397, n. 3, p. 377-387, 2006.

KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins from snake venoms. **Haemostasis**, v. 31, n. 3-6, p. 218-224, 2001.

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

LU, Q.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. GPIIb is involved in platelet aggregation induced by mucetin, a snake C-type lectin protein from Chinese habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*) venom. **Thromb. Haemost.**, v. 91, p. 1168-1176, 2004.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **J Thromb. Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1791-1799, 2005. Review.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; OLIVEIRA, C. Z.; IZIDORO, L. F.; FULY, A. L.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; FONTES, M. R.; 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, n. 12, p. 2328-2339, 2007.

MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L.; TERRUGGI, C. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M. S. Alternagin-C, a non RGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, n. 24, p. 4799-4808, 2003.

MODESTO, J. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; NEVES-FERREIRA, A. G.; FRITZEN, M.; OLIVA, M. L.; HO, P. L.; PERALES, J.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. **Biol. Chem.**, v. 386, n. 6, p. 589-600, 2005.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; THEAKSTON, R. G. D.; CRAMPTON, J. M. Evolution of disintegrin cystein-rich and mammalian matrix-degrading metalloproteinases: gene-duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. **J. Mol. Evol.**, v. 43, p. 263-269, 1996.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, n. 28, p. 2893-2905, 2007. Review.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Snake venom metalloproteinases. In: DE LIMA, M. E.; PIMENTA, A. M. C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R. B.; ROCHAT, H. **Animal Toxins: State of the Art – Perspectives in Health and Biotechnology**. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2009, p. 525 – 546.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B.; DE SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A. R.; WALTER, M. E.; BRIGIDO M. M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, n. 4, p. 427-436, 2009.

OFFERMANN, S.; LAUGWITZ, K. L.; SPICHER, K.; SCHULTZ, G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, n. 2, p. 504-508, 1994.

PHILLIPS, D. R.; SCARBOROUGH R. M. Clinical pharmacology of eptifibatide. **Am. J. Cardiol.**, v. 80, n. 4A, p. 11B-20B, 1997.

RAMOS, O. H.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol Pharmacol.**, v. 142, n. 3-4, p. 328-346, 2006.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of neuwidase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biophys.**, v. 381, p. 213-224, 2000.

RUCAVADO, A.; BORKOW, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Immunological studies on BaH1 and BaP1, two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 33, n. 8, p. 1103-1106, 1995.

SAMBROOK, S.; RUSSEL. D.W. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. 3. ed. New York: Ed. Cold Spring Harbor, 2001.

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

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. **Anal. Chem.**, v. 68, n. 5, p. 850-858, 1996.

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, n. 3, 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, n. 1, p. 129-139, 2003.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso: março de 2010.

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. **Cur. Opin. Struct. Biol.**, v. 5, p. 383-390, 1995.

SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. J. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1021-1039, 2005.

TAI, H.; WEI, Q.; JIN, Y.; SU, M.; SONG, J. X.; ZHOU, X. D. TMVA, a snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom, activates platelet via GPIb. **Toxicon**, v. 44, p. 649–656, 2004.

TANIUSHI, Y.; KAWASAKI, T.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; SAKAI, Y. Flavocetin-A and -B, two high molecular mass glycoprotein Ib binding proteins with high affinity purified from *Trimeresurus flavoviridis* venom, inhibit platelet aggregation at high shear stress. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1244, p. 331-338, 1995.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 801-808, 2003.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; SALDANHA-GAMA, R. F.; DE FREITAS, M. S.; BARJA-FIDALGO, C.; AMARANTE-MENDES, G. P.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 4, p. 851-61, 2005.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TSENG, Y. L.; LEE, C. J.; HUANG, T. F. Effects of a snake venom metalloproteinase, triflamb, on platelet aggregation, platelet-neutrophil and neutrophil-neutrophil interactions: involvement of platelet GPIIb/IIIa and neutrophil PSGL-1. **Thromb. Haemost.**, v. 91, n. 2, p. 315-24, 2004.

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, n. 1, p. 331-339, 1994.

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, n. 2, p. 241-255, 2009.

VU, T. K.; WHEATON, V. I.; HUNG, D. T.; CHARO, I.; COUGHLIN, S. R. Domains specifying thrombin-receptor interaction. **Nature**, v. 353, n. 6345, p. 674-677, 1991.

WANG, R.; KINI, R. M.; CHUNG, M. C. Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper): synergistic and noncovalent interaction between its subunits, **Biochemistry**, v. 38, p. 7584–7593, 1999.

WANG, W. J.; SHIH, C. H.; HUANG, T. F. A novel P-I class metalloproteinase with broad substrate-cleaving activity, agkislysin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 324, n. 1, p. 224-230, 2004.

WANG, W. J.; HUANG, T. F. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Thromb. Haemost.**, v. 87, n. 4, p. 641-650, 2002.

WANG, R.; KINI, R. M.; CHUNG, M. C. Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper): synergistic and noncovalent interaction between its subunits. **Biochemistry**, 1999 v. 38, n. 23, p. 7584-7593, 1999.

WARD, C. M.; ANDREWS, R. K.; SMITH A. I.; BERNDT M. C. Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein I α . Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein I α as a binding site for von Willebrand factor and alpha-thrombin. **Biochemistry**, v. 35, p. 4929–4938, 1996.

WATSON, S. P.; GIBBINS, J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. **Immunol. Today**, v. 19, n. 6, p. 260-264, 1998. Review.

WILLIS, T. W.; TU, A. T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. **Biochemistry**, v. 27, n. 13, p. 4769-4777, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected Tropical Diseases – Snakebite. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/. Cited: março de 2010.

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, n. 3, p. 719-728, 2001.

WU, W. B.; PENG, H. C.; HUANG, T. F. Crotalin, a vWF and GP Ib cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*. **Thromb. Haemost.**, v. 86, n. 6, p. 1501-1511, 2001.

YAMADA, D.; SHIN, Y.; MORITA, T. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **FEBS Lett.**, v. 451, n. 3, p. 299-302, 1999.

YANG, R. S.; TANG, C. H.; CHUANG, W. J.; HUANG, T. H.; PENG, H. C.; HUANG, T. F.; FU, W. M. Inhibition of tumor formation by snake venom disintegrin. **Toxicon**, v. 45, n. 5, p. 661-669, 2005.

YEH, C. H.; PENG, H. C.; HUANG, T. F. Accutin, a new disintegrin, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo by acting as integrin $\alpha v \beta 3$ antagonist and inducing apoptosis. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3268-3276, 1998.

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, n. 3, p. 964-970, 2006.

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, n. 5, p. 739-749, 2003.

ZHA, H. G.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Cloning of cDNAs encoding C-type lectins from Elapidae snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*. **Toxicon**, v. 39, n. 12, p. 1887-1892, 2001.

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, n. 2, p. 411-417, 1995.