



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Toxinas da peçonha de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae)
que interferem na agregação plaquetária

Aluno: Mayara Ribeiro de Queiroz

Orientador: Fábio de Oliveira

UBERLÂNDIA - MG

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Toxinas da peçonha de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae)
que interferem na agregação plaquetária**

Aluno: Mayara Ribeiro de Queiroz

Orientador: Fábio de Oliveira

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica).**

UBERLÂNDIA - MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

Q38t
2015

Queiroz, Mayara Ribeiro de,
Toxinas da peçonha de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata:
Viperidae) que interferem na agregação plaquetária / Mayara Ribeiro de
Queiroz. - 2015.
100 f. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. *Bothrops* - Teses. 3. Serpente peçonhenta -
Peçonha - Teses. I. Oliveira, Fábio de. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III.
Título.

CDU: 577.1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Toxinas da peçonha de *Bothrops moojeni* Hoge, 1966 (Squamata: Viperidae)
que interferem na agregação plaquetária**

Aluno: Mayara Ribeiro de Queiroz

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Fábio de Oliveira

Examinadores:

Dra. Leonilda Stanziola (UFU)

Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro (UFU)

Dr. Mário Sérgio Rocha Gomes (UESB)

Dr. Norival Alves Santos Filho (Unesp)

Data da Defesa: 25 / 07 / 2015

**As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o
formato da Tese foram contempladas**

Dr. Fábio de Oliveira

Dedico este trabalho

Ao meu esposo Adriano e ao meu filho Miguel, por todo amor, compreensão, paciência e inspiração. Meus companheiros, responsáveis pelos melhores momentos da minha vida. Meu amor por vocês é eterno e incondicional.

Aos meus pais, Simara e Queiroz, por todo sacrifício, carinho e dedicação. Sem vocês as conquistas seriam impossíveis. Meu sincero amor e eterna gratidão.

Tenho muita sorte!

Vocês são minha vida... o que há de melhor em mim...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) do Brasil.

Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos membros da Banca Examinadora, Dra. Leonilda Stanziola, Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro, Dr. Mário Sérgio Rocha Gomes e Dr. Norival Alves Santos Filho pela disponibilidade e atenção.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Obrigada por compartilharmos nossas dúvidas, problemas, aprendizados, momentos de alegria, conquistas profissionais e pessoais. Agradeço a todos, sem exceções. Aos colegas que estão iniciando e àqueles que deixaram o laboratório, mas que muito me ensinaram.

Às minhas companheiras de laboratório Carla, Nadia, Bruna, Déborah e Mariana. Vocês são muito importantes pela amizade, confiança, por todo carinho e apoio.

Ao Professor Dr. Fábio de Oliveira, meu orientador e amigo, exemplo de profissional e ser humano. Uma pessoa que nunca mediu esforços para me ajudar a trilhar meu caminho na pesquisa. Obrigada por todas as oportunidades, pela orientação criteriosa, pela inesgotável paciência, dedicação, confiança, motivação e por todas as oportunidades e conselhos. Seu apoio, fé e atenção contribuíram muito para a superação de cada desafio.

Aos meus amigos e familiares, por todos os momentos que passamos juntos e por tudo que vocês representam.

Aos meus pais, Simara e Queiroz, à minha irmã Thacyane e à minha avó Luzia. Obrigada pela confiança, por todos conselhos, carinho e dedicação. Vocês são minha fonte de esperança, proteção, alegria, fé, orientação, conforto e amor. O apoio de vocês foi de fundamental importância para minha persistência em direção aos meus ideais. Não é possível descrever com palavras a admiração, a gratidão e o amor infinito que sinto por vocês.

Ao Adriano, meu esposo e amigo. Obrigada pelo aprendizado que temos um com o outro, pela paciência, carinho, cooperação, companheirismo, confiança, amor, respeito e por sempre estar presente. Seu apoio, compreensão e dedicação à nossa família foram fundamentais para minha formação acadêmica. Serei sua eterna admiradora. Amo você!

Ao meu filho Miguel. Obrigada por tornar meus dias mais felizes e por despertar um desejo imenso de vencer os desafios e ser uma pessoa cada dia melhor. A sua existência é o meu melhor presente. Meu amor por você é eterno e incondicional!

Agradeço à Deus, força maior, que guia e protege minha vida, por me dar força e coragem para enfrentar os momentos difíceis. Pelas oportunidades e conquistas, pela família e pelos amigos.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 01. Morfologia das plaquetas humanas	11
Figura 02. Modelo de ativação de integrinas	16
Figura 03. Dentição proteróglifa	20
Figura 04. Dentição solenóglifa	21
Figura 05. <i>Bothrops moojeni</i>	22
Figura 06. Reação específica catalisada por PLA ₂ s na posição <i>sn</i> -2 da cadeia de glicerol	26
Figura 07. Classificação das SVMPS	30
Figura 08. Estrutura molecular da desintegrina rhodostomin da peçonha de <i>Calloselasma rhodostoma</i> , que possui a sequência RGD na alça de ligação à integrina	34
Figura 09. Diagrama da família das integrinas e os diferentes motivos tripeptídicos que bloqueiam especificamente interações entre integrina e molécula ligante	34
Figura 10. Classificação funcional das desintegrinas de peçonhas de serpentes	35
Figura 11. Reação química catalisada pelas LAAOs	37
Figura 12. Lectinas tipo C interagindo com receptores plaquetários.....	41

Capítulo II

Figure 1. Sequential purification steps of BmooAi from <i>Bothrops moojeni</i> venom	82
Figure 2. Mass determination of BmooAi by MALDI-TOF mass spectrometry	83

Figure 3. Effect of BmooAi (0.6, 1.0, and 1.4 μ g) on collagen-induced platelet aggregation	83
--	----

Figure 4. Effect of BmooAi (0.6 μ g) on ADP- and epinephrine-induced platelet aggregation	84
--	----

Capítulo III

Figure 01. Sequential purification steps of D3G4 fraction from <i>B. moojeni</i> venom	99
---	----

Figure 02. Peptides-induced platelet aggregation assay and effect of antibodies	100
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina

ADAMTS-13 - do inglês, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motives, member 13*

ADP - adenosina difosfato

AMBIC - bicarbonato de amônio

cAMP - monofosfato cíclico de adenosina

CaIDAG-GEFI - fator de troca de nucleotídeos de guanina I regulado por DAG e Ca^{2+}

CD39 - do inglês, *cluster of differentiation 39*

COX-1 - cicloxigenase-1

Cys-rich - domínio rico em cisteína

DAG - diacilglicerol

DEAE - dietilaminoetil

DFP - diisopropilfluorofosfato

Dis - domínio desintegrina

Dis-like - domínio semelhante à desintegrina

doi - do inglês, *digital object identifier*

ER - retículo endoplasmático

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FcR - receptor Fc

FvW - fator de von Willebrand

Glu - glutamato

Gly - glicina

GP - glicoproteína

His - histidina

IP₃ - inositol-trifosfato

IP₃-R - receptores de inositol-trifosfato

KGD - lisina-glicina-aspartato

LAAOs - L-aminoácido oxidases

Met - metionina

MGD - metionina-glicina-aspartato

MLD - metionina-leucina-aspartato

MVD - metionina-valina-aspartato

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NO - óxido nítrico

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PARs - receptores ativados por protease

PGI₂ - prostaciclina

PIP₂ - Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PKC - proteína-quinase C

PLA₂s - fosfolipases A₂

PLC - fosfolipase C

PMSF - fenilmetilsulfonilo

PPP - plasma pobre em plaquetas

PRP - plasma rico em plaquetas

RGD - arginina-glicina-aspartato

RhoGEFs - fatores de troca de nucleotídeo guanina-Rho

RTS/KTS - arginina-treonina-serina/ lisina-treonina-serina

SDS - dodecil sulfato de sódio

Ser - serina

snaclecs - do inglês, *snake C-type lectins*

STIM1 - molécula de interação estromal-1

SV-LAOs - L-aminoácido oxidases de peçonhas de serpentes, do inglês: *Snake venom L-amino acid oxidases*

SVMPs - metaloproteases de peçonhas de serpentes, do inglês: *Snake venom metalloproteinases*

SVSPs - serinoproteases de peçonhas de serpentes, do inglês: *Snake venom serine proteinases*

TDN - treonina-aspartato-asparagina

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

TxA₂ - tromboxano A₂

Tyr - tirosina

VGD - valina-glicina-aspartato

WGD - triptofano-glicina-aspartato

SUMÁRIO

Apresentação	1
Capítulo I - Fundamentação teórica: A função das plaquetas na hemostasia e a interferência de toxinas ofídicas	5
1 Hemostasia	6
1.1 Função das plaquetas	7
1.1.1 Adesão plaquetária	8
1.1.2 Ativação plaquetária	11
1.1.3 Integrinas	13
1.1.4 Agregação plaquetária	16
2 Serpentes peçonhentas brasileiras	19
3 Acidente botrópico	23
4 Composição das peçonhas botrópicas	24
5 Constituintes das peçonhas que interferem na agregação plaquetária	25
5.1 Fosfolipases A ₂ de peçonhas de serpentes	26
5.2 Serinoproteases de peçonhas de serpentes	28
5.3 Metaloproteases de peçonhas de serpentes	29
5.4 Desintegrinas de peçonhas de serpentes	32
5.5 L-aminoácido oxidases de peçonhas de serpentes	37
5.6 Lectinas tipo C de peçonhas de serpentes	39
5.7 5'-nucleotidases	41
6 Peçonha de <i>B. moojeni</i> e agregação plaquetária	42
7 Referências bibliográficas	43

Capítulo II - Purification and characterization of BmooAi: A new toxin from <i>Bothrops moojeni</i> snake venom that inhibits platelet aggregation	65
Resumo	67
Abstract	68
1. Introduction	69
2. Materials and Methods	70
2.1. Material	70
2.2. Blood collection.....	70
2.3. Purification of BmooAi	70
2.4. Estimation of protein concentration	71
2.5. Electrophoretic analysis	71
2.6. MALDI-TOF mass spectrometry analysis	72
2.7. N-terminal sequence determination	72
2.8. Peptide synthesis of N-terminal sequences	72
2.9. Proteolytic activity on fibrinogen	72
2.10. Platelet Aggregation	72
3. Results and discussion	73
4. Conclusion	76
Conflict of interest	77
Acknowledgements	77
References	78
Figures	82
 Capítulo III - Purification of platelet aggregation activators peptides from <i>Bothrops moojeni</i> venom	 85

Resumo	87
Abstract	88
Short communication	89
Conflict of interest	92
Acknowledgements	93
References	94
Figures	99
Anexos	101

Apresentação

O organismo humano apresenta um conjunto de processos fisiológicos, denominado hemostasia. Ele é capaz de manter o sangue em estado fluido e livre de coágulos nos vasos normais e, em caso de lesão vascular, induz a formação local do tampão hemostático, evitando a hemorragia. O desequilíbrio nos mecanismos de regulação que controlam o crescimento e o tamanho do trombo é um dos fatores que favorecem o desenvolvimento de doenças relacionadas a distúrbios trombóticos. O infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral são resultados desses distúrbios e estão entre as principais causas de morte no ocidente.

Os distúrbios trombóticos resultam, basicamente, da mesma sequência de eventos que leva a formação do trombo durante a hemostasia normal. E as plaquetas, por sua vez, desempenham função central nesse processo. Logo, as pesquisas relacionadas a moléculas que interfiram na agregação plaquetária são de grande relevância para o estudo de novos agentes antitrombóticos.

As peçonhas ofídicas são conhecidas por possuírem diversas substâncias que interferem na hemostasia, inclusive na agregação plaquetária. A caíçaca (*Bothrops moojeni*), também conhecida como jararaca, é uma das mais importantes serpentes responsáveis por acidentes ofídicos nas áreas de cerrado da região Sudeste. Sua peçonha, ferramenta de estudo do presente trabalho, contém uma complexa variedade de peptídeos e proteínas com diversas atividades biológicas, as quais apresentam potencial uso como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas para uso terapêutico e diagnóstico.

Há, na literatura, diversos trabalhos de caracterização bioquímica e funcional de componentes proteicos da peçonha de *B. moojeni*. Entretanto, pouco se sabe a respeito dos componentes de baixa expressão na peçonha que apresentam efeitos biológicos significativos, principalmente devido aos desafios e limitações do processo de purificação. Além disso, estão caracterizadas várias moléculas ofídicas que atuam na agregação plaquetária, mas as vias e os mecanismos pelos quais cada classe atua, ainda não estão completamente elucidados.

Dessa forma, as investigações acerca da constituição bioquímica da peçonha ofídica e a caracterização de seus componentes proteicos, inclusive daqueles que apresentam baixa expressão, por meio de ensaios de agregação

plaquetária, podem servir como ferramentas para estudos básicos de hemostasia, principalmente relativos à função das plaquetas, e como instrumentos de novas descobertas no diagnóstico e terapêutica de disfunções plaquetárias. Diante disso, os trabalhos desenvolvidos durante o doutorado foram direcionados para a busca de novas moléculas da peçonha de *B. moojeni* com efeito significativo na função das plaquetas.

A presente tese de doutorado foi redigida de acordo com as normas vigentes no Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e está contemplada em três capítulos.

O **capítulo I** (fundamentação teórica), foi denominado "A função das plaquetas na hemostasia e a interferência de toxinas ofídicas". Ele apresenta uma revisão fundamentada em publicações, a qual contextualiza o estudo desenvolvido durante o doutorado. Primeiramente é apresentada uma visão geral de cada etapa da função das plaquetas na hemostasia, incluindo a relevância da interferência na função plaquetária, em caso de distúrbios trombóticos. Em seguida, é feita uma breve apresentação das serpentes peçonhentas brasileiras, do acidente botrópico e da composição das peçonhas do gênero *Bothrops*. E por fim, foi estabelecida a relação dos componentes ofídicos e a agregação plaquetária, incluindo as principais classes de toxinas proteicas caracterizadas na literatura, as quais atuam na função plaquetária.

O **capítulo II** da tese apresenta o artigo "Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation". Ele descreve a purificação e caracterização parcial de um novo inibidor da agregação plaquetária presente e com baixa expressão na peçonha de *B. moojeni*. Esse artigo foi publicado no periódico BioMed Research International (Fator de impacto = 2,706) no ano de 2014 e pode ser localizado pelo doi (do inglês, *digital object identifier*) número 10.1155/2014/920942. O capítulo foi escrito de acordo com os padrões exigidos pelo periódico.

E, por fim, a tese apresenta no **capítulo III** a *Short Communication* "Purification of platelet aggregation activators peptides from *Bothrops moojeni* venom", a qual descreve a purificação e a caracterização parcial de uma fração da peçonha de *B. moojeni* capaz de ativar a agregação plaquetária. Os resultados são relevantes para o estudo de novas moléculas que interferem na função das

plaquetas, mas ainda precisam ser completados para fins de publicação. O capítulo foi escrito de acordo com os padrões exigidos pelo periódico Toxicon.

A sessão **Anexos**, ao final da tese, contempla dois trabalhos publicados, os quais apresentam novas toxinas da peçonha de *B. moojeni* que interferem na função das plaquetas. O primeiro é a versão publicada do artigo referente ao capítulo II dessa tese. O segundo, um artigo, no qual a maior parte dos resultados foi obtida durante o mestrado em Inovação Biofarmacêutica - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Entretanto, o trabalho foi concluído e o artigo "Rapid purification of a new P-I class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with antiplatelet activity" publicado durante o doutorado, também no periódico BioMed Research International (Fator de impacto = 2,706) no ano de 2014 e pode ser localizado pelo doi número 10.1155/2014/352420. Esse trabalho descreve a purificação e a caracterização de uma nova metaloprotease da peçonha de *B. moojeni* que inibe a agregação plaquetária.

Capítulo I

Fundamentação teórica

A função das plaquetas na hemostasia e a interferência de toxinas ofídicas

1 Hemostasia

A hemostasia é um conjunto complexo de processos biológicos responsável pela fluidez do sangue dentro dos vasos normais e pela interrupção fisiológica de hemorragias, em caso de lesão vascular. O sistema hemostático humano apresenta interações fisiológicas complexas que envolvem plaquetas, proteínas sanguíneas, células endoteliais e estruturas subendoteliais (GUYTON; HALL, 2011; MARKLAND, 1998; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011).

Em condições normais, o endotélio vascular proporciona uma superfície antitrombótica, a qual impede a adesão de plaquetas, bem como a ativação da cascata de coagulação. Sua superfície apresenta heparan sulfato, que é, tal qual a heparina, um cofator da antitrombina III, um inibidor da formação do trombo. Portanto, a superfície endotelial é indispensável para manter a fluidez normal do sangue (CARVALHO et al., 2001; WU; THIAGARAJAN, 1996). As células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos produzem prostaciclina (PGI_2) e óxido nítrico (NO), vasodilatadores e inibidores potentes da ativação de plaquetas e monócitos. O endotélio também sintetiza o ativador de plasminogênio tecidual, o qual ativa o sistema de degradação da fibrina insolúvel (fibrinólise). Além disso, as células endoteliais expressam CD39 (do inglês, *cluster of differentiation 39*) em sua superfície, uma ecto-adenosina difosfatase associada à membrana que degrada adenosina difosfato (ADP) à adenosina e inibe a função plaquetária; e trombomodulina, um receptor da trombina (a combinação trombomodulina-trombina ativa a proteína C, um anticoagulante dependente da vitamina K) (WU; THIAGARAJAN, 1996).

Apesar das características antitrombóticas, o endotélio vascular também atua como uma estrutura protrombótica quando estimulado. Ele sintetiza e armazena vários componentes hemostáticos envolvidos na formação do trombo. O fator de von Willebrand (FvW), o fator tecidual e o inibidor do ativador de plasminogênio-1 são particularmente importantes. Eles estão envolvidos, respectivamente, na adesão de plaquetas, na coagulação e estabilização do coágulo (RANG et al., 2011).

Mecanismos importantes são acionados para controlar a perda de sangue sempre que um vaso sanguíneo é lesionado, tais como: vasoconstrição, adesão e

ativação das plaquetas e formação da rede de fibrina (KOH; KINI, 2012; RANG et al., 2011). O trauma da própria parede vascular induz a contração da musculatura lisa desse vaso sanguíneo imediatamente após a lesão. Em vasos menores, as plaquetas também são responsáveis pela vasoconstrição por liberarem um vasoconstritor potente, o tromboxano A₂ (TxA₂) (GUYTON; HALL, 2011).

A formação do coágulo de fibrina “coágulo frouxo” é resultado da conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina pela trombina (fator IIa). A trombina, principal enzima da cascata de coagulação, é gerada durante a etapa final da cascata de ativação de componentes proteicos, denominados fatores da coagulação. Esses fatores estão presentes no sangue na forma de precursores inativos (zimogênios) de enzimas proteolíticas e cofatores. Esses precursores são ativados por proteólise em uma cascata que proporciona um mecanismo de amplificação (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

A trombina também ativa o fator XIII, uma fibrinoligase, que estabiliza o coágulo por reforçar as ligações entre uma fibrina e outra, transformando o “coágulo frouxo” em “coágulo denso”. Além de atuar na coagulação, a trombina é um agonista da agregação plaquetária (MONTEIRO, 2005; RANG et al., 2011).

1.1 Função das plaquetas

As plaquetas (também denominadas trombócitos) são fragmentos de megacariócitos, células muito grandes da medula óssea, semelhante aos leucócitos. Elas possuem forma de disco e medem de 1 a 4 µm de diâmetro (BLUTEAU et al., 2009; GUYTON; HALL, 2011; JURK; KEHREL, 2005). Apesar de anucleadas, as plaquetas são estruturas com metabolismo ativo. Elas têm muitas características funcionais de células completas, como presença de moléculas contráteis (trombostenina, actina e miosina), mitocôndrias e sistemas enzimáticos no citoplasma, além de resíduos do complexo golgiense e retículo endoplasmático, os quais sintetizam enzimas e armazenam íons cálcio (GUYTON; HALL, 2011; SALUK et al., 2014).

A superfície da membrana plaquetária possui diversas glicoproteínas que favorecem a sua adesão às regiões lesionadas da parede vascular. Essa característica é fundamental para que as plaquetas desempenhem seu papel na

hemostasia (GUYTON; HALL, 2011; JURK; KEHREL, 2005; NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009). Além da sua função central no sistema hemostático, as plaquetas também estão relacionadas a resposta imune inata, a inflamação e a metástase tumoral (JURK; KEHREL, 2005; KAUSHANSKY, 2005).

1.1.1 Adesão plaquetária

As plaquetas são recrutadas da circulação para a matriz subendotelial exposta ao ocorrer lesão de um vaso sanguíneo (JURK; KEHREL, 2005; KAMIGUTI, 2005). A adesão plaquetária ao vaso lesionado é um processo complexo que requer a interação coordenada dos receptores presentes na superfície das plaquetas e macromoléculas adesivas da matriz extracelular (NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009; SAVAGE; ALMUS-JACOBS; RUGGERI, 1998; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008).

O processo de adesão das plaquetas no local da lesão vascular depende da tensão de cisalhamento. Quando em altas forças de cisalhamento, tal como é encontrado em pequenas artérias e arteríolas, o recrutamento inicial das plaquetas ao subendotélio exposto é mediado pela interação do FvW com a subunidade GPIb α do complexo glicoproteico GPIb-V-IX. A ligação entre esse receptor plaquetário e o FvW, imobilizado sobre a superfície ativada das plaquetas, também é essencial para a captura das plaquetas em fluxo (ANDREWS; BERNDT, 2004; SAVAGE; ALMUS-JACOBS; RUGGERI, 1998; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). Ainda que em baixas forças de cisalhamento, a interação FvW-GPIb α também pode favorecer a interação inicial das plaquetas com o trombo em formação (KULKARNI et al., 2000).

GPIb-V-IX é um complexo de glicoproteínas codificadas por quatro genes diferentes, expresso exclusivamente em plaquetas e megacariócitos. As subunidades transmembranas GPIb α (135 kDa) e GPIb β (25 kDa) são ligadas por pontes dissulfeto e associadas não covalentemente à GPIX (22 kDa) e à GPV (88 kDa), na proporção de 2:2:2:1 (ANDREWS et al., 2003; ANDREWS et al., 2004; BERNDT et al., 2001; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). A extremidade N-terminal da GPIb α contém sítios de ligação para integrina α M β 2 de

leucócitos, trombina, P-selectina, cininogênio de alto peso molecular, fator XII da coagulação e FvW (BERNDT et al., 2001; ROMO et al., 1999).

A molécula madura do FvW é uma glicoproteína composta de um número variável de subunidades idênticas, contendo 2050 resíduos de aminoácidos cada, ligadas entre si por pontes dissulfeto (TITANI et al., 1986). Características específicas da biossíntese, armazenamento e processamento plasmático do FvW parecem ser direcionados para que a resposta trombogênica no local da lesão seja máxima, e a ativação plaquetária indesejada na circulação não ocorra. O grau de polimerização do FvW é regulado após sua liberação para a circulação, o que é necessário para prevenir a formação de trombo patológico (RUGGERI, 2003). A metaloprotease ADAMTS-13 (do inglês, *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motives, member 13*) cliva especificamente a ligação peptídica Tyr842–Met843 no domínio A2, modulando as funções adesivas do FvW (ANDREWS; BERNDT, 2004). Os grandes multímeros do FvW são mais ativos na adesão plaquetária que os pequenos multímeros, pois oferecem vários sítios de interação para componentes da parede vascular e plaquetas (RUGGERI, 2003).

O FvW é sintetizado exclusivamente em megacariócitos e células endoteliais e armazenado nos corpos de Weibel-Palade das células endoteliais e nos α -grânulos das plaquetas. Essa molécula pode seguir mais de uma via de secreção a partir de células endoteliais, ou seja, uma via constitutiva, diretamente ligada à síntese e uma via regulada, que envolve a liberação após estímulo (RUGGERI; WARE, 1993). Como nas plaquetas circulantes *in vivo*, ocorre apenas a via de secreção regulada da molécula estocada, o FvW encontrado no plasma sanguíneo tem origem principalmente nas células endoteliais (RUGGERI, 2003).

Os monômeros do FvW exibem uma estrutura distribuída em múltiplos domínios (HASSAN; SAXENA; AHMAD, 2012). O domínio C1 possui a sequência arginina-glicina-aspartato (RGD) que se liga às integrinas β_3 plaquetárias, denominadas $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GAWAZ, 2004; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). Quando em altas forças de cisalhamento, o domínio A1 pode ser ativado para se ligar à GPIIb α pela ligação do colágeno fibrilar ao A3 e mudança conformacional do A2 (ANDREWS; BERNDT, 2004). O domínio A1 se

liga exclusivamente ao colágeno tipo VI, enquanto o domínio A3 se liga aos colágenos tipo I e III (FARNDALÉ et al., 2004; HOYLAERTS et al., 1997).

A interação FvW-GPIIb α tem uma taxa de dissociação rápida, insuficiente para promover uma adesão plaquetária estável. Entretanto, fornece a força física que mantém as plaquetas em contato íntimo com a superfície, ainda que translocando continuamente na direção do fluxo sanguíneo (VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). Durante esse *rolling*, os receptores plaquetários de colágeno interagem com o colágeno da matriz subendotelial, induzindo sinais intracelulares de ativação (OZAKI et al., 2005).

O colágeno, situado na matriz subjacente às células endoteliais vasculares, não está exposto ao fluxo sanguíneo. O sangue entra em contato direto com estruturas subendoteliais, incluindo o tecido conjuntivo que possui elevada quantidade de colágeno, quando ocorre lesão vascular. Nesse caso, as plaquetas aderem rapidamente, são ativadas e iniciam a formação de um agregado. O colágeno é um dos principais ativadores da resposta plaquetária após lesão do vaso sanguíneo (FARNDALÉ et al., 2004).

O genoma humano possui mais de vinte formas de colágeno dos quais nove identificados são expressos na parede vascular, denominados I, III, IV, V, VI, VIII, XII, XIII, e XIV. Os tipos fibrilares I e III são os principais constituintes da matriz extracelular, enquanto o tipo IV é a principal forma na membrana basal subendotelial (NIESWANDT; WATSON, 2003). A molécula do colágeno apresenta três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , torcidas umas sobre as outras. A sequência de aminoácidos da cadeia α geralmente é uma repetição da unidade tripeptídica Gly-X-Y, na qual o X normalmente é uma prolina e o Y, uma hidroxiprolina (FARNDALÉ et al., 2004; NELSON; COX, 2011).

A GPVI é o principal receptor plaquetário de colágeno que atua como mediador da ativação das plaquetas, essencial para adesão e agregação eficientes. Essa molécula é uma glicoproteína transmembrana tipo I (60–65 kDa) que pertence à superfamília das imunoglobulinas e está associada à cadeia γ do receptor Fc (FcR) (NIESWANDT; WATSON, 2003).

A interação colágeno-GPVI desencadeia sinais intracelulares que levam à ativação e liberação de mediadores secundários, como ADP e TXA₂. Esses agonistas, em conjunto com a trombina produzida no local, contribuem para a

ativação celular por estimular receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, induzindo diferentes eventos de sinalização que agem sinergicamente para induzir completa ativação plaquetária (NIESWANDT et al., 2001; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008).

1.1.2 Ativação plaquetária

As plaquetas podem ser ativadas por interações de adesão, bem como pela ligação de diversos agonistas plaquetários a receptores específicos de superfície (WALLACE; SMYTH, 2013). Quando ativadas, as plaquetas mostram alterações na organização das proteínas que compõem o citoesqueleto. Esse evento está associado à mudança da forma discoide para irregular e ao prolongamento de múltiplas projeções citoplasmáticas. Os grânulos uniformemente distribuídos nas plaquetas em repouso sofrem centralização e fusão com a membrana plasmática com secreção do conteúdo por exocitose (Figura 01) (ANDREWS; BERNDT, 2004; FOX, 1993; JURK; KEHREL, 2005). As plaquetas contêm três formas diferentes de grânulos de armazenamento: corpos densos ou grânulos densos, α -grânulos e lisossomos (GAWAZ, 2004).

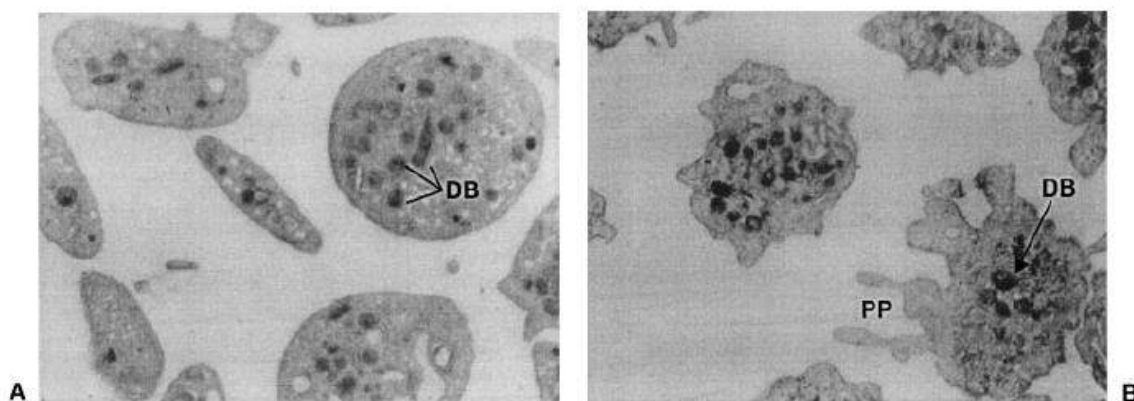


Figura 01. Morfologia das plaquetas humanas. A – Plaquetas não ativadas que apresentam grânulos distribuídos uniformemente. B – Plaquetas ativadas com formação de múltiplas projeções citoplasmáticas e centralização dos grânulos. DB: grânulos densos; PP: pseudópodo. Fonte: Jurk e Kehrel (2005).

Diversos produtos de secreção, tais como ADP, serotonina, trombina, TXA₂ e epinefrina sustentam e amplificam a resposta plaquetária inicial, além de estimular mais plaquetas circulantes, as quais são recrutadas para formar

agregados (DAVÌ; PATRONO, 2007). Exceto a epinefrina, todos os agonistas excitatórios das plaquetas induzem o aumento das concentrações citosólicas de Ca^{2+} , tanto a partir da sua mobilização dos estoques internos (sistema tubular denso) quanto a partir do aumento do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular (HOURANI; CUSACK, 1991). A maioria dos agonistas ativadores da função plaquetária atuam por meio de receptores acoplados à proteína G (OFFERMANN, 2006).

Cerca de 50% da molécula de ADP plaquetária é estocada em grânulos densos e excretadas após a ativação das plaquetas (JURK; KEHREL, 2005). A ativação plaquetária por ADP é mediada por dois importantes receptores plaquetários, P2Y_1 e P2Y_{12} . A ligação de ADP ao P2Y_1 causa a ativação mediada pela proteína G_q de isoformas β da fosfolipase C (PLC) (OFFERMANN, 2006; SAVAGE; CATTANEO; RUGGERI, 2001). A PLC ativa resulta na formação dos segundos mensageiros, inositol-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), levando ao aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} e ativação da proteína-quinase C (PKC) (DAVÌ; PATRONO, 2007; OFFERMANN, 2006). P2Y_{12} é o principal receptor capaz de sustentar e amplificar a ativação plaquetária em resposta ao ADP. A ativação desse receptor por meio da proteína G_i inibe a adenilato ciclase, causando uma redução nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (DAVÌ; PATRONO, 2007; OFFERMANN, 2006).

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um potente vasoconstritor que se liga ao receptor acoplado à proteína G_q , 5HT_{2A}, amplificando a resposta plaquetária, juntamente com o ADP. A serotonina também pode desempenhar um papel pró-coagulante ao aumentar a retenção de proteínas pró-coagulantes, como o fibrinogênio, na superfície da plaqueta (DALE et al., 2002).

A ativação das plaquetas induz a exposição de fosfolipídeos ácidos sobre a superfície externa da plaqueta, promovendo a formação de trombina a partir da protrombina (RANG et al., 2011). Além de atuar na cascata de coagulação, a trombina representa o mais potente ativador plaquetário (LEGER; COVIC; KULIOPULOS, 2006). A ativação das plaquetas pela trombina é mediada por receptores ativados por protease (PARs), os quais são acoplados às proteínas G_q , $\text{G}_{12}/\text{G}_{13}$ e, em alguns casos, à família G_i . As plaquetas humanas expressam os receptores PAR1 e PAR4. Os dados disponíveis na literatura sugerem que esses

receptores podem mediar a sinalização da trombina independentemente: PAR1 a baixas concentrações e PAR4 apenas a altas concentrações do agonista (KAHN et al., 1999).

As vias de sinalização, nas quais os PARs estão acoplados às proteínas G_q , que ativa a PLC, e G_i , que inibe a adenilato ciclase, resultam no aumento do Ca^{2+} intracelular e redução do cAMP, respectivamente. As subunidades α das proteínas G_{12}/G_{13} se ligam aos RhoGEFs (fatores de troca do nucleotídeo guanina-Rho, os quais ativam pequenas proteínas G), promovendo respostas do citoesqueleto dependente de Rho, as quais estão envolvidas na mudança de forma das plaquetas (COUGHLIN, 2001; DAVÌ; PATRONO, 2007).

O TxA_2 é um agonista plaquetário potente, produzido a partir da conversão do ácido aracdônico pela cicloxigenase-1 (COX-1) e tromboxano sintase. Assim como o ADP, o TxA_2 atua como um mediador de *feedback* positivo durante a ativação plaquetária. A ação do TxA_2 é restrita, pois possui uma meia vida curta. O receptor de TxA_2 (TP) está acoplado às proteínas G_q e G_{12}/G_{13} (OFFERMANN, 2006). A atividade vasoconstritora do TxA_2 favorece a formação do trombo pela desaceleração do fluxo sanguíneo (GAWAZ, 2004).

A epinefrina atua como agonista da agregação plaquetária ativando as plaquetas sem a mudança inicial na conformação. Esse agonista leva à liberação do ácido aracdônico endógeno com formação de TxA_2 e secreção plaquetária (BERNARDI; MOREIRA, 2004). A epinefrina sozinha não é capaz de ativar as plaquetas, mas potencializa o efeito de outros estímulos. Ela age através do receptor adrenérgico α_{2A} , o qual, nas plaquetas, apresenta preferência pela proteína G_z a outros membros da família G_i , expressos nas membranas plaquetárias (YANG et al., 2000).

1.1.3 Integrinas

As integrinas são proteínas heterodiméricas transmembrana que medeiam a interação de moléculas da matriz extracelular com o citoesqueleto da célula. Uma molécula de integrina é composta de duas subunidades de glicoproteínas distintas associadas não-covalentemente, uma maior denominada α e outra menor, a β (ALBERTS et al., 2010). Cada subunidade possui um grande domínio

extracelular N-terminal, um domínio transmembrana simples e uma pequena cauda C-terminal intracelular (NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008).

O genoma de mamíferos codifica 18 subunidades α e 8 subunidades β diferentes, dimerizadas em uma ampla gama de combinações com variadas especificidades para ligantes em vários tecidos. Cada uma das 24 integrinas encontradas até o momento parece desempenhar uma função específica. (ALBERTS et al., 2010; HYNES, 2002; NELSON; COX, 2011).

As plaquetas expressam três diferentes integrinas da família β_1 , denominadas $\alpha_2\beta_1$ (receptor de colágeno), $\alpha_5\beta_1$ (receptor de fibronectina) e $\alpha_6\beta_1$ (receptor de laminina), bem como duas integrinas da família β_3 , $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dentre as integrinas plaquetárias, $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ são consideradas de grande importância para a adesão e agregação das plaquetas ao subendotélio exposto (NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). Apesar de não ser essencial para a adesão plaquetária, o receptor de colágeno, integrina $\alpha_2\beta_1$, fortalece esse processo e ainda atua com menor relevância na ativação das plaquetas (NIESWANDT et al., 2001).

De modo geral, as integrinas são expressas na superfície das células em um estado inativo, no qual não podem se ligar a seus ligantes (HYNES, 2002). Quando uma integrina se liga ou se dissocia de seu ligante, ocorrem mudanças conformacionais que afetam tanto a extremidade intracelular quanto a extremidade extracelular da molécula (ALBERTS et al., 2010). Essa característica é importante para sua biologia funcional, principalmente tratando-se de integrinas da superfície de plaquetas (HYNES, 2002).

A alteração das integrinas plaquetárias de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade é a principal resposta celular aos eventos de sinalização na ativação das plaquetas. A ativação das integrinas, tais como a $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$, permite estabelecer um forte contato de adesão seguido por crescimento do trombo (HYNES, 2002; NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008).

Mais de vinte proteínas que interagem com uma ou ambas caudas citoplasmáticas já foram identificadas, participando da sinalização de dentro para fora (*inside-out*) e de fora para dentro (*outside-in*) através de integrinas.

Entretanto, somente em poucos casos a significância funcional é compreendida (NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009). Na sinalização de dentro para fora, sinais intracelulares podem favorecer uma conformação, na qual as integrinas aderem firmemente a proteínas extracelulares específicas (NELSON; COX, 2011). A sinalização de fora para dentro ocorre quando os domínios extracelulares de uma integrina passam por mudanças conformacionais, alterando a disposição das caudas citoplasmáticas das subunidades α e β . Nesse caso, as interações da integrina com proteínas intracelulares são favorecidas (NELSON; COX, 2011).

A figura 02 mostra um modelo de ativação de integrinas proposto por Nieswandt, Varga-Szabo e Elvers (2009). O estímulo por agonistas desencadeia a ativação da PLC e a formação de IP_3 e DAG. O IP_3 induz a liberação das reservas de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (ER) por meio de receptores de IP_3 (IP_3 -R) e subsequente ativação da entrada de Ca^{2+} através das proteínas Orai1, mediada pela molécula de interação estromal-1 (STIM1) (NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009). STIM1 atua como sensor dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , enquanto as proteínas Orai1, presentes na membrana plasmática, representam as subunidades que formam os canais de Ca^{2+} . Em condições onde os estoques intracelulares de Ca^{2+} são depletados, STIM1 e Orai1 se movem de forma coordenada, formando um complexo entre o retículo endoplasmático e a membrana plasmática (GIACHINI; WEBB; TOSTES, 2010; LUIK et al., 2006). DAG e Ca^{2+} ativam a PKC e o fator de troca de nucleotídeos de guanina I regulado por DAG e Ca^{2+} (CalDAG-GEFI), levando a ativação e translocação da proteína Rap1 para a membrana plasmática. A molécula efetora RIAM interage com ambos Rap1-GTP e talina-1 (*talin-1*), uma molécula de ancoramento intracelular, expondo o sítio de ligação à integrina na talina-1. A interação entre a talina-1 e a integrina resulta na mudança conformacional do domínio extracelular de um estado de baixa afinidade para um estado de alta afinidade e na ligação ao ligante da matriz extracelular. Esse passo final requer também a ligação da proteína kindlin-3 à cauda β da integrina, não se sabe se simultaneamente ou sequencialmente à ligação da talina-1 (NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009).

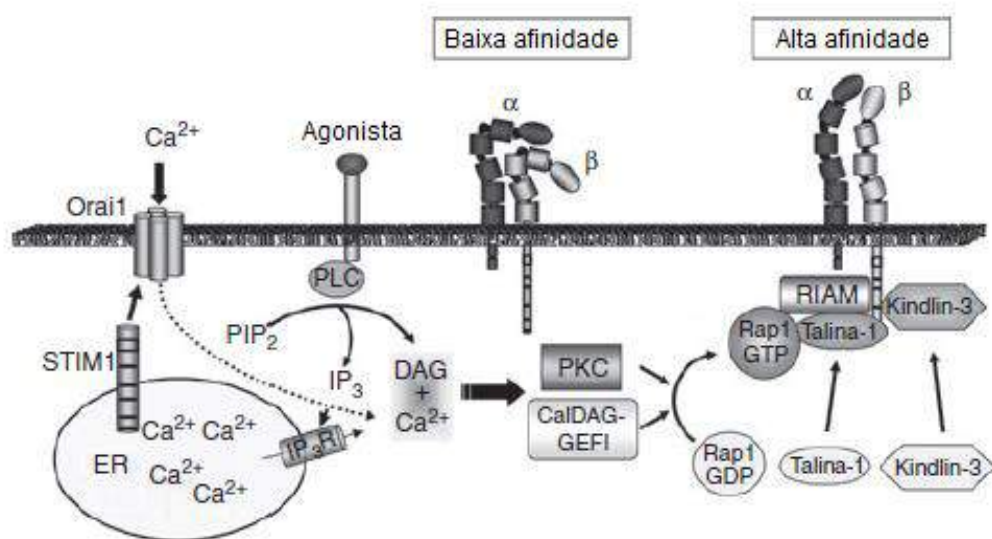


Figura 02. Modelo de ativação de integrinas. O estímulo por agonistas ativa a PLC e a formação de IP₃ e DAG. O IP₃ induz a liberação das reservas de Ca²⁺ do ER por meio de IP₃-R e subsequente ativação da entrada de Ca²⁺ a partir das proteínas Orai1, mediada por STIM1; DAG e Ca²⁺ ativam a PKC e o CalDAG-GEFI, levando a ativação e translocação da proteína Rap1 para a membrana plasmática. A molécula efetora RIAM interage com ambos Rap1-GTP e talina-1, expondo o sítio de ligação à integrina na talina-1. A interação entre a talina-1 e a integrina resulta na mudança conformacional do domínio extracelular para um estado de alta afinidade e na ligação ao ligante da matriz. PLC -fosfolipase C; IP₃ - inositol-trifosfato; DAG - diacilglicerol; PKC -proteína-quinase C; ER - retículo endoplasmático; IP₃-R - receptores de IP₃; CalDAG-GEFI - fator de troca de nucleotídeos de guanina I regulado por DAG e Ca²⁺; STIM1 - molécula de interação estromal-1; PIP₂ - Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato. Fonte: adaptado de Nieswandt; Varga-Szabo; Elvers, (2009).

Outro passo importante na ativação plaquetária é a exposição de fosfolipídios ácidos (especialmente fosfatidilserina) na superfície das plaquetas. Esses fosfolipídios funcionam como catalisadores de superfície, participando da ativação de alguns fatores de coagulação (RANG et al., 2011). Assim, a plaqueta ativada participa da formação de trombina e, conseqüentemente, da formação de fibrina a partir da clivagem do fibrinogênio (RANG et al., 2011; ROBERTS; MONROE; ESCOBAR, 2004).

1.1.4 Agregação plaquetária

A próxima fase da atividade plaquetária é a agregação, caracterizada pelo acúmulo de plaquetas em um tampão hemostático. Ela está interligada com as

últimas fases da cascata de coagulação e se sobrepõe ligeiramente à fase de ativação (JURK; KEHREL, 2005; VORCHHEIMER; BECKER, 2006).

O receptor central no processo de agregação plaquetária é a GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), cuja mudança conformacional de um estado de baixa para um de alta afinidade é considerada a via final da ativação das plaquetas, independente do agonista (JURK; KEHREL, 2005). GPIIb/IIIa é a integrina mais abundante na membrana plaquetária. As plaquetas em repouso apresentam cerca de 80.000 cópias dessa molécula em sua superfície, além daquelas presentes na membrana dos α -grânulos e no sistema canicular aberto (JENNINGS, 2009; WAGNER et al., 1996).

A ligação do fibrinogênio ou moléculas contendo a sequência RGD à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ativada garante a interação plaqueta-plaqueta. Essa ligação gera sinais de fora para dentro, resultando na formação irreversível de agregados plaquetários (KAMIGUTI, 2005). O fibrinogênio é uma glicoproteína dimérica, formada por um par de três cadeias polipeptídicas denominadas A α (63,5 kDa), B β (56 kDa) e γ (47 kDa), as quais são interconectadas por pontes dissulfeto (KAMIGUTI et al., 1996; MARKLAND, 1998). Essa molécula contém duas sequências RGD na sua cadeia A α , uma na região N-terminal e a outra, na C-terminal (DAVÌ; PATRONO, 2007). O FvW, assim como o fibrinogênio, é uma molécula multivalente, o que permite a ligação à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de duas plaquetas diferentes simultaneamente, resultando na ligação entre plaquetas adjacentes (COLLER, 1995). Estudos indicam que o FvW sozinho não é suficiente para garantir uma agregação plaquetária estável. Ele contribui para o contato inicial entre as plaquetas. Todavia, o fibrinogênio é necessário para assegurar a estabilidade do agregado (DAVÌ; PATRONO, 2007).

A agregação plaquetária *in vitro* é caracterizada por uma mudança no formato das plaquetas e por uma resposta bifásica. Ela exhibe uma primeira onda geralmente reversível (agregação primária), seguida de uma onda de agregação irreversível (agregação secundária), que ocorre quando as plaquetas secretam o conteúdo de seus grânulos (BERNARDI; MOREIRA, 2004; ZINGALI; FRATTANI, 2007).

O desequilíbrio nos mecanismos de regulação que controlam o crescimento do trombo e limitam seu tamanho é um dos fatores que favorecem o

desenvolvimento de doença trombótica. Nesse estado patológico, o crescimento descontrolado do trombo pode levar a consequências graves, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (CLEMETSON, 1999; RANG et al., 2011).

Uma das estratégias para o tratamento de distúrbios trombóticos é a interferência na função plaquetária (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). Os agentes antiplaquetários são utilizados principalmente em casos relacionados à trombose arterial e geralmente interferem na formação do tampão plaquetário por diversos mecanismos (ROBERTS; MONROE; ESCOBAR, 2004). A aspirina (ácido acetilsalicílico) é o antiplaquetário mais antigo e mais usado (VORCHHEIMER; BECKER, 2006). Ela inibe irreversivelmente a enzima COX-1, reduzindo a formação de prostaglandina e, conseqüentemente, de TXA₂ nas plaquetas, a partir do ácido aracdônico (HANKEY; EIKELBOOM, 2006). Apesar de ser altamente eficaz na maioria dos casos, a aspirina pode causar toxicidade gastrointestinal, e alguns pacientes podem apresentar uma síndrome de "resistência à aspirina" (GOODMAN; FERRO; SHARMA, 2008; HANKEY; EIKELBOOM, 2006; TÖRÜNER, 2007).

Atualmente, o clopidogrel é o principal fármaco do grupo de tienopiridinas, uma classe potente de agentes antiplaquetários (RANG et al., 2011; VORCHHEIMER; BECKER, 2006). Ele é inativo até ser absorvido e biotransformado pelo fígado, gerando um metabólito ativo, antagonista irreversível do receptor P2Y₁₂. Ele contribui para a desestabilização dos agregados plaquetários e não causa alteração significativa nas etapas iniciais da agregação plaquetária induzida por ADP (GACHET, 2001, 2005; SAVI et al., 1998; STOREY, 2006).

Os antagonistas do receptor GPIIb/IIIa são uma outra classe de potentes agentes antiplaquetários. Por agirem na via final comum da agregação plaquetária, são capazes de inibir a agregação induzida por diversos agonistas (KAMIGUTI, 2005; VORCHHEIMER; BECKER, 2006). Uma vantagem do uso de antagonistas da GPIIb/IIIa, é que apesar de impedir a ligação entre fibrinogênio ou FvW ao receptor glicoproteico, a ligação entre as plaquetas aos elementos subendoteliais permanece intacta, o que reduz o risco de hemorragia (SHLANSKY-GOLDBERG, 2002; TOPOL; BYZOVA; PLOW, 1999). Três

antagonistas do receptor GPIIb/IIIa são disponíveis para uso terapêutico, especialmente em caso de síndromes coronarianas agudas: o abciximab, o eptifibatide e o tirofiban. O abciximab é um fragmento de anticorpo monoclonal de longa ação. O eptifibatide, por sua vez, é um peptídeo cíclico baseado na sequência KGD (lisina-glicina-aspartato) da desintegrina barbourin da peçonha da serpente *Sistrurus miliarius barbouri*. O tirofiban é um não peptídeo sintético derivado de tirosina, que mimetiza a sequência RGD, e assim como o eptifibatide, possui efeito de curta duração e reversível (MARCINKIEWICZ, 2005; RANG et al., 2011; SCARBOROUGH et al., 1991; SHLANSKY-GOLDBERG, 2002; STAVROPOULOS; SHLANSKY-GOLDBERG, 2005; TOPOL; BYZOVA; PLOW, 1999; VORCHHEIMER; BECKER, 2006).

Basicamente a mesma sequência de eventos que leva a formação do trombo durante a hemostasia normal, resulta em doenças trombóticas. O infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral, como resultados desses distúrbios, estão entre as principais causas de morte na sociedade ocidental (ANDREWS; BERNDT, 2000; GAWAZ, 2004; WIDIMSKÝ et al., 2013). As pesquisas relacionadas a moléculas que interfiram na agregação plaquetária são de grande relevância, visto a importância das plaquetas na formação do trombo. Elas podem direcionar a busca por novos agentes antitrombóticos (KAMIGUTI, 2005).

Como as peçonhas de serpentes são conhecidas por possuírem diversas substâncias que interferem na hemostasia, inclusive na agregação plaquetária (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011), investigações sobre a constituição bioquímica dessas secreções e a caracterização de suas moléculas por meio de ensaios de agregação plaquetária podem servir como instrumento de novas descobertas na terapêutica antiplaquetária.

2 Serpentes peçonhentas brasileiras

Até novembro de 2014, foram reconhecidas 386 espécies de serpentes naturalmente ocorrentes no Brasil, distribuídas em 10 famílias: Anomalepididae (7 espécies), Typhlopidae (6), Leptotyphlopidae (16), Aniliidae (1), Tropidophiidae (3), Boidae (12), Colubridae (33), Dipsadidae (246), Elapidae (32) e Viperidae (30) (COSTA; BÉRNILS, 2014). As serpentes peçonhentas da fauna brasileira estão

distribuídas nas famílias: Viperidae (acidentes botrópico, crotálico e laquélico) e Elapidae (acidente elapídico) (MELGAREJO, 2009).

As serpentes conhecidas popularmente como corais-verdadeiras são as principais representantes da família Elapidae nas Américas (MELGAREJO, 2009). Essas serpentes apresentam um aparelho inoculador do tipo proteróglifo. As presas possuem um canal de peçonha não completamente fechado, não retráteis e estão posicionados na extremidade anterior da maxila (JACKSON, 2003). Além de dentição proteróglifa (Figura 03), as espécies dessa família possuem cabeça oval, recoberta por grandes placas simétricas, olhos pequenos e pretos, com pupila elíptica vertical (MELGAREJO, 2009). A família Elapidae apresenta dois gêneros que compõem a fauna brasileira: *Leptomicrurus*, representado por 3 espécies e *Micrurus*, por 27 espécies (COSTA; BÉRNILS, 2014).

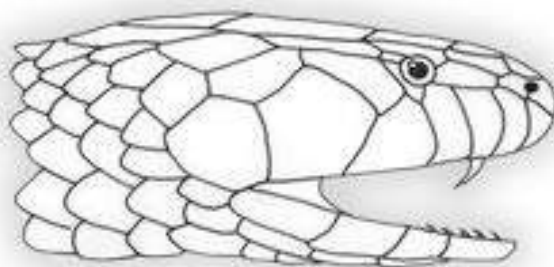


Figura 03. Dentição proteróglifa. As presas possuem um canal de peçonha não completamente fechado, não retráteis e estão posicionados na extremidade anterior da maxila. Fonte: <http://blogdonurof.wordpress.com/2010/09/03/sobre-o-tipo-de-denticao-das-serpentes/>, acessado em 11 de março de 2015.

A família Viperidae é constituída por três subfamílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae (FRANCO, 2009). Todas as espécies de viperídeos presentes na fauna brasileira são crotalíneos (COSTA; BÉRNILS, 2014). Uma das principais características da subfamília Crotalinae é a presença de fosseta loreal bem desenvolvida, órgãos termorreceptores presentes entre o olho e a narina (ZUG; VITT; CALDWELL, 2001). Em geral, o aparelho inoculador dessas serpentes é do tipo solenóglifo (Figura 04). Os únicos dois dentes funcionais na maxila, as presas, são muito grandes, agudos e ocos. Cada presa permanece paralela ao crânio em repouso, mas no momento do ataque, projeta-se 90° para

injetar a peçonha. A cabeça dos viperídeos tem formato triangular, e, é recoberta por pequenas escamas similares às do corpo (MELGAREJO, 2009).

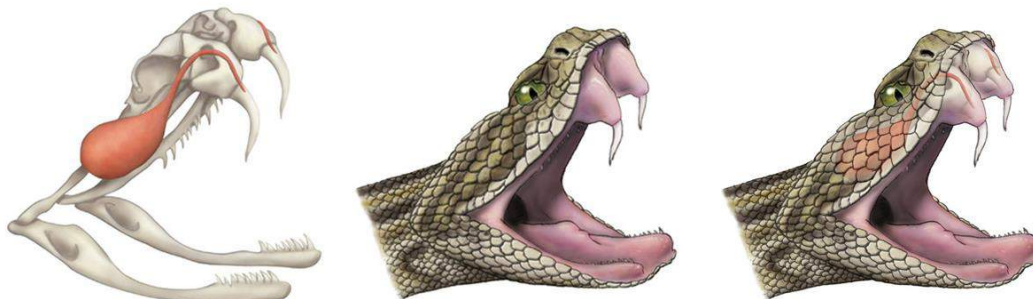


Figura 04. Dentição solenóglifa. As presas são muito desenvolvidas na região anterior da maxila, canaliculadas e ligadas através de ductos às glândulas de peçonha. Fonte: <https://classconnection.s3.amazonaws.com/436/flashcards/2703436/png/picture121366058616449.png>, acessado em 12 de setembro de 2013.

No Brasil, a família Viperidae é representada pelos gêneros *Bothrocophias* (2 espécies), *Bothrops* (26), *Crotalus* (1) e *Lachesis* (1) (CARRASCO et al., 2012; COSTA; BÉRNILS, 2014). Os viperídeos representam o grupo mais relevante para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria e pelos mais graves acidentes ofídicos registrados no Brasil (MELGAREJO, 2009). Dentre essas espécies, os representantes do gênero *Bothrops* provocam 73,5% do total de casos notificados no país, seguidos pelo crotálico (7,5%) e laquéutico (3,0%), variando com a região e a distribuição geográfica das serpentes (BRASIL, 2009).

As serpentes botrópicas são muito diversificadas quanto à morfologia e ecologia. Essa característica permite a distribuição dessas espécies ao longo de uma ampla variedade de regiões pela América do Sul, habitando extremos de altitudes (de 3.000 m ao nível do mar) e grande diversidade de climas e fitofisionomias (de florestas tropicais a ambientes áridos) (CARRASCO et al., 2012). Algumas das espécies são raras, como a *B. itapetiningae*, ou restritas a uma área geográfica limitada, como a *B. insularis* que se restringe apenas à Ilha da Queimada Grande, distante 33 km de Itanhaém, litoral sul do estado de São Paulo (MELGAREJO, 2009). Entretanto, o gênero *Bothrops* possui algumas das espécies brasileiras de maior importância médica. Essas serpentes são abundantes e possuem extensa distribuição geográfica. Um exemplo é a principal

espécie botrópica do Cerrado brasileiro, a serpente *Bothrops moojeni*, que é encontrada desde o Paraná até o Maranhão (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003).

A serpente *B. moojeni* (Caiçaca) (Figura 05), descrita por Hoge em 1966, é uma espécie que consegue se adaptar bem a ambientes modificados e que possui comportamento agressivo. Essas características contribuem para o crescimento do grupo em importância médica (MELGAREJO, 2009). Essa serpente possui porte médio, é encontrada principalmente em áreas ripárias, incluindo a borda e o interior da mata de galerias e brejos, e permanece ativa praticamente ao longo de todos os meses do ano, principalmente durante a noite (SAWAYA; MARQUES; MARTINS, 2008). Essas serpentes são vivíparas e sua reprodução é sazonal. A espécie apresenta dieta generalista, controlando populações de pequenos animais (lacraias, anuros, lagartos, serpentes, aves e mamíferos), alguns deles considerados pragas em áreas de cultivo (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002; NOGUEIRA; SAWAYA; MARTINS, 2003).

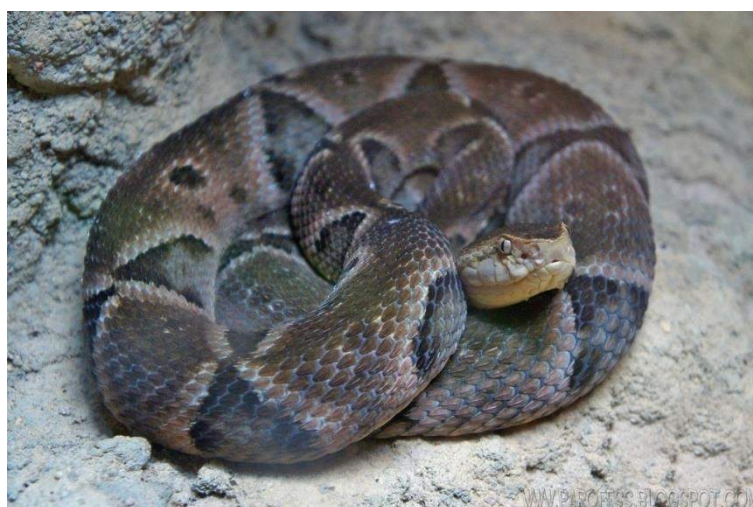


Figura 05. *Bothrops moojeni*. Serpente de porte médio, encontrada principalmente em áreas ripárias. Observe a presença da fosseta loreal bem desenvolvida entre o olho e a narina, órgão característico das espécies da subfamília Crotalinae. Fonte: <http://www.summitpost.org/b-i-bothrops-moojeni-b-i/809024>, acessado em 12 de setembro de 2013.

3 Acidente botrópico

Os acidentes por serpentes peçonhentas constituem um problema de saúde pública nos países tropicais, devido à frequência e à gravidade da maioria

dos casos (MARTINS et al., 2012). No Brasil, a epidemiologia dos casos registrados manteve-se inalterada no último século. Geralmente, ocorrem em áreas rurais, no início e no final do ano, em pessoas do gênero masculino, na faixa etária produtiva, atingindo, principalmente, os membros inferiores (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Os acidentes brasileiros provocados por serpentes do gênero *Bothrops* são os de maior importância epidemiológica (BRASIL, 2009). A gravidade desses acidentes depende de diversos fatores, tais como: peso e idade da vítima, localização, profundidade e número de picadas, a espécie, o comprimento, a idade e a variabilidade da peçonha da serpente envolvida, as condições das presas e das glândulas de peçonha, a quantidade de peçonha inoculada, o tempo decorrido entre o acidente e o início da soroterapia, e a qualidade da assistência (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; RUSSEL, 1973).

A inoculação da peçonha, na maioria dos casos, ocorre via subcutânea ou intramuscular (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; LALLOO, 2005). As manifestações locais surgem nas primeiras horas após a picada, caracterizadas por edema, dor intensa, inflamação e equimoses. Também podem surgir hemorragias no ponto da picada e bolhas com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico. Uma das complicações locais mais relevantes é a necrose muscular, que em casos extremos, pode levar a amputação de parte do membro afetado (COSTA et al., 2010a; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; GUTIÉRREZ et al., 2010; KOUYOUMDJIAN; POLIZELLI, 1988; NASCIMENTO et al., 2010; QUEIROZ et al., 2011; BRASIL, 2009; SOARES et al., 2003; STÁBELI et al., 2006). Hemorragias, hematúria, hematemese, alterações cardiovasculares e distúrbios na coagulação sanguínea são algumas manifestações sistêmicas decorrentes de acidentes botrópicos. Em casos graves, são observados choque e insuficiência renal (COSTA et al., 2010b; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; BRASIL, 2009).

O procedimento terapêutico utilizado no tratamento de acidentes ofídicos é a aplicação intravenosa do soro (antiveneno) específico para cada tipo de acidente, de acordo com a gravidade do mesmo (BRASIL, 2009; SILVA et al., 2013). A produção dos soros ocorre a partir da imunização de animais de grande porte com a peçonha de uma (soro monoespecífico) ou mais espécies de serpentes (soro poliespecífico). Os soros poliespecíficos também podem ser

produzidos pela mistura de soros monoespecíficos. Em ambos os casos, a eficiência dos soros poliespecíficos é muito reduzida, quando comparada aos monoespecíficos (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2009).

As peçonhas de serpentes podem apresentar variações na composição decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas e sazonais. A escolha dos antígenos utilizados na imunização é essencial para produtos ativos, pois a neutralização eficiente dos efeitos da peçonha depende da presença de anticorpos específicos dirigidos contra as principais toxinas. Por esse motivo, não apenas a variabilidade da peçonha entre espécies do mesmo gênero deve ser considerada na escolha dos antígenos de imunização, mas também a variabilidade entre indivíduos da mesma espécie. Portanto, a mistura para a imunização deve incluir as toxinas de indivíduos de diferentes idades, coletados em diferentes épocas do ano, nas regiões onde o soro será utilizado (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2009; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; FRANCISCHETTI et al., 1998; SILVA et al., 2013).

O soro antibotrópico produzido no Brasil é preparado a partir da imunização com a peçonha de cinco espécies: *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (CARDOSO; YAMAGUCHI; SILVA, 2009). Dentre as espécies utilizadas, *B. moojeni* possui a mais alta atividade enzimática (CAMPOS et al., 2013). O soro antibotrópico, assim como os demais tipos, deve ser aplicado o mais precocemente possível. Isso porque o soro possui ação apenas sobre a peçonha circulante, não regenerando os tecidos lesados (WEN, 2009). Dessa forma, estudos recentes, especialmente de biologia molecular, visam uma melhoria na eficácia do soro antiofídico.

4 Composição das peçonhas botrópicas

As peçonhas de serpentes são materiais biológicos que apresentam alto valor científico, principalmente farmacológico, considerando a grande variedade de moléculas ativas biologicamente. Cerca de 90 % do peso seco das peçonhas ofídicas corresponde a moléculas proteicas, compreendendo toxinas enzimáticas e não enzimáticas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; MARKLAND, 1998; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Acetilcolinesterases, ADPases, ATPases,

aminotransferases, metaloproteases (SVMPs), serinoproteases (SVSPs), fosfolipases A₂ (PLA₂s), hialuronidasas, 5'-nucleotidasas e L-aminoácido oxidases (LAAOs) são enzimas encontradas. As proteínas não enzimáticas são representadas por ativadores de proteína C, fatores de crescimento, lectinas, proteínas ligantes do FvW, precursores de peptídeos bioativos e desintegrinas (ANGULO; LOMONTE, 2009; CALGAROTTO et al., 2008; COSTA et al., 2010b; GOMES et al., 2009; SINGLETARY et al., 2005; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As demais moléculas que fazem parte da constituição das peçonhas de serpentes são representadas por carboidratos, lipídios, metais, nucleotídeos, aminoácidos livres e aminas biogênicas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Os componentes da peçonha, geralmente, atuam sinergicamente para induzir as atividades fisiopatológicas da peçonha botrópica, tais como: proteolítica, fosfolipásica, coagulante e hemorrágica. Esses efeitos, ocasionalmente, podem ser atribuídos a moléculas específicas ou ainda, uma única toxina pode apresentar diversas atividades (CINTRA et al., 2012; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; GAY et al., 2005; GUTIÉRREZ et al., 2005).

Nos últimos anos, o estudo dos componentes da peçonha ofídica tem permitido a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos, bem como o desenvolvimento de fármacos a partir de toxinas isoladas e caracterizadas (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009; KOH; KINI, 2012).

5 Constituintes das peçonhas que interferem na agregação plaquetária

As peçonhas ofídicas são constituídas por uma ampla variedade de componentes enzimáticos e não enzimáticos que interferem na agregação plaquetária (ANDREWS; BERNDT, 2000; MARKLAND, 1998; MARSH; WILLIAMS, 2005; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; SANO-MARTINS; SANTORO, 2009). Os mecanismos pelos quais essas moléculas causam inibição ou ativação das plaquetas são muito variados e complexos (SANO-MARTINS; SANTORO, 2009). Em muitos casos, o mecanismo de ação ainda não foi elucidado. Há um grande número de publicações nas quais são identificadas e

caracterizadas toxinas como PLA₂s, SVSPs, SVMPs, desintegrinas, LAAOs, lectinas tipo-C e 5'-nucleotidasas capazes de afetar a agregação plaquetária (MARKLAND, 1998; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011).

5.1 Fosfolipases A₂ de peçonhas de serpentes

As PLA₂s são as moléculas mais importantes das peçonhas ofídicas, quanto ao dano muscular. Essas enzimas catalisam especificamente a hidrólise de fosfolipídios de membranas biológicas e artificiais na ligação éster do carbono 2, liberando quantidades equimolares de lisofosfolipídios e ácidos graxos (Figura 06) (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003; KUDO; MURAKAMI, 2002). As PLA₂s são organizadas em 16 grupos, de acordo com sua origem, sequência de aminoácidos, mecanismos catalíticos, características bioquímicas adicionais, funcionais e estruturais. As moléculas provenientes das peçonhas ofídicas são classificadas nos grupos I e II (DENNIS et al., 2011; DUNCAN et al., 2008; SCHALOSKE; DENNIS, 2006). As PLA₂s das peçonhas botrópicas pertencem ao grupo II (DENNIS, 1994).

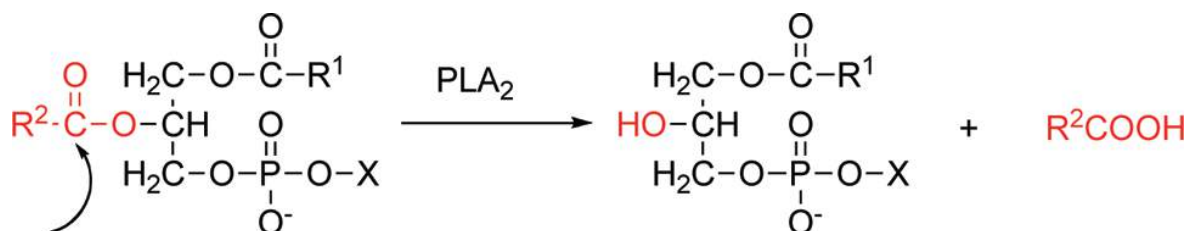


Figura 06. Reação específica catalisada por PLA₂s na posição *sn*-2 da cadeia de glicerol. X, qualquer grupo compoendo a cabeça polar; R¹ e R², cadeias de ácidos graxos. Fonte: Dennis et al. (2011).

O grupo II de PLA₂s de peçonhas de serpentes pode ser dividido em subgrupos, dos quais os principais são: (i) Asp49, que apresentam atividade catalítica e (ii) Lys49, com nenhuma atividade enzimática sobre fosfolipídios (ANGULO et al., 2001; GHAZARYAN et al., 2015; OWNBY et al., 1999). O resíduo de aspartato na posição 49 é essencial para a ligação do cálcio com a proteína, um cofator necessário para estabilização de uma conformação catalítica (LI; YU; ERIC, 1994). Nas PLA₂s Lys49, a substituição do resíduo de aspartato na

posição 49 pelo resíduo de lisina provoca uma redução drástica na associação ao cofator Ca^{2+} , comprometendo sua atividade enzimática (POLGAR et al., 1996).

As PLA₂s apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas, incluindo atividades neurotóxica, cardiotóxica, miotóxica, hemolítica, de indução de edema, anticoagulante e efeitos na agregação plaquetária (KINI, 2003). As PLA₂s de peçonhas ofídicas que afetam a função das plaquetas podem ser divididas em pelo menos três grupos (KINI; EVANS, 1990). O primeiro, inclui aquelas capazes de induzir a agregação plaquetária, como a bothropstoxin-II (Bthtx-II), uma PLA₂ Asp-49 isolada da peçonha de *B. jararacussu* (FULY et al., 2004). O segundo grupo, reúne as PLA₂s que inibem a agregação plaquetária induzida por diversos agonistas fisiológicos, tais como as PLA₂s Asp49 BmooTX-I e BmooPLA₂, purificadas da peçonha de *B. moojeni* (SANTOS-FILHO et al., 2008; SILVEIRA et al., 2013) e BthA-I-PLA₂ da peçonha de *B. jararacussu* (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002). Por sua vez, as PLA₂s do terceiro grupo apresentam uma resposta bifásica sobre as plaquetas - elas iniciam a agregação plaquetária a baixas concentrações ou após um curto período de incubação, mas inibem sua agregação a altas concentrações ou após um período prolongado de incubação (MARKLAND, 1998). A ação de uma PLA₂ da peçonha de *Vipera russellii* exemplifica esse perfil bifásico (TENG; CHEN; OUYANG, 1984). Em termos de mecanismo de ação, as atividades conhecidas das PLA₂s sobre a agregação plaquetária não são bem compreendidas (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). A interferência sobre a agregação plaquetária pode estar relacionada à região C-terminal da toxina, bem como à formação de metabólitos do ácido araquidônico, como o TXA₂ (KINI; EVANS, 1990; MARKLAND, 1998; Teixeira et al., 2011).

Os efeitos sobre as plaquetas também podem ser parcialmente independentes da atividade enzimática, como ocorre com a PLA₂ da peçonha de *Ophiophagus hannah*, OHV A-PLA₂. Estudos indicam que a atividade antiplaquetária dessa toxina é causada, pelo menos em parte, por alterações morfológicas relevantes induzidas no citoesqueleto das plaquetas (HUANG et al., 1987; MARKLAND, 1998).

5.2 Serinoproteases de peçonhas de serpentes

As SVSPs constituem um grupo amplamente estudado de toxinas que afetam principalmente o sistema hemostático. Elas agem sobre componentes da cascata de coagulação, sobre os sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina e sobre as plaquetas, levando a um desequilíbrio do sistema hemostático (SERRANO; MAROUN, 2005; SERRANO, 2013).

O mecanismo catalítico das SVSPs inclui um resíduo de serina altamente reativo (Ser195, seguindo a numeração do quimotripsinogênio), que exerce um papel crítico na formação de um complexo acil-enzima transitório, estabilizado pela presença de resíduos de histidina e aspartato dentro do sítio ativo (BARRETT; RAWLINGS, 1995). Logo, essas enzimas são sensíveis a compostos que reagem com o resíduo de serina do sítio ativo. As SVSPs são inibidas competitivamente por benzamidina e por p-aminobenzamidina e irreversivelmente por fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e por diisopropilfluorofosfato (DFP) (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; SERRANO; MAROUN, 2005; SERRANO, 2013).

Algumas SVSPs ativam a agregação plaquetária por um mecanismo semelhante à trombina, por clivagem proteolítica dos PARs, especialmente PAR1 e PAR4. As SVSPs PA-BJ e thrombocytin, purificadas das peçonhas de *B. jararaca* e de *B. atrox*, respectivamente, são enzimas que atuam dessa maneira (SANTOS et al., 2000). Por outro lado, a bothrombin (NISHIDA et al., 1994) e a cerastotin (MARRAKCHI et al., 1997) das peçonhas de *B. jararaca* e de *Cerastes cerastes*, respectivamente, ativam as plaquetas por interação com o receptor GPIIb α , o qual também tem sido indicado por alguns trabalhos como receptor funcional da trombina (OKAMURA; HASITZ; JAMIESON, 1978; VILCA-QUISPE et al., 2010).

Na literatura estão disponíveis outros exemplos de SVSPs que induzem a agregação plaquetária. No entanto, as vias de ativação das plaquetas por muitas dessas toxinas ainda não foram completamente elucidadas. Exemplos disso são a BpirSP27 e a BpirSP41 da peçonha de *B. pirajai* (MENALDO et al., 2012), a TLBm de *B. marajoensis* (VILCA-QUISPE et al., 2010) e a cerastocytin de *C. cerastes* (MARRAKCHI et al., 1995).

5.3 Metaloproteases de peçonhas de serpentes

As SVMPs constituem um grupo de proteases dependentes de metais, os quais desempenham um papel crítico nas atividades proteolítica e biológica dessas enzimas (FOX; SERRANO, 2009). As SVMPs dependentes de zinco pertencem à família metzincina. Elas possuem em comum um domínio de ligação de zinco com estruturas muito semelhantes entre si (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). O sítio ligante de zinco dessa família tem a sequência de aminoácidos HEBXHXBGBXHZ, comum em todas as subfamílias, onde H representa a histidina; E, o glutamato; G, a glicina; B, um resíduo hidrofóbico; X, um aminoácido qualquer e Z, um aminoácido diferente entre as subfamílias, mas conservado dentro das mesmas (MARKLAND, 1998).

As SVMPs são classificadas em três classes (PI, PII e PIII) de acordo com a organização de seus multidomínios, considerando a presença ou ausência de domínios não proteolíticos observados nos transcritos de mRNA e nas proteínas isoladas da peçonha (Figura 07) (FOX; SERRANO, 2008). A classe PI compreende SVMPs compostas somente de um domínio metaloprotease. As toxinas da classe PII, por sua vez, apresentam o domínio metaloprotease, seguido de um domínio desintegrina, os quais frequentemente são separados por um processo proteolítico pós-traducional. Ambos os produtos proteolíticos são estáveis (FOX; SERRANO, 2008; SHIMOKAWA et al., 1996). E por fim, as SVMPs classe PIII possuem um domínio rico em cisteína (*cys-rich*) em adição aos domínios metaloprotease e semelhante à desintegrina (*dis-like*). A classificação das subclasses de PII (PIIa, PIIb, PIIc, PIId e PIIe) e PIII (PIIIa, PIIIb, PIIIc e PIIId) reflete o potencial de processamento proteolítico, bem como a formação de estruturas diméricas (FOX; SERRANO, 2008, 2009).

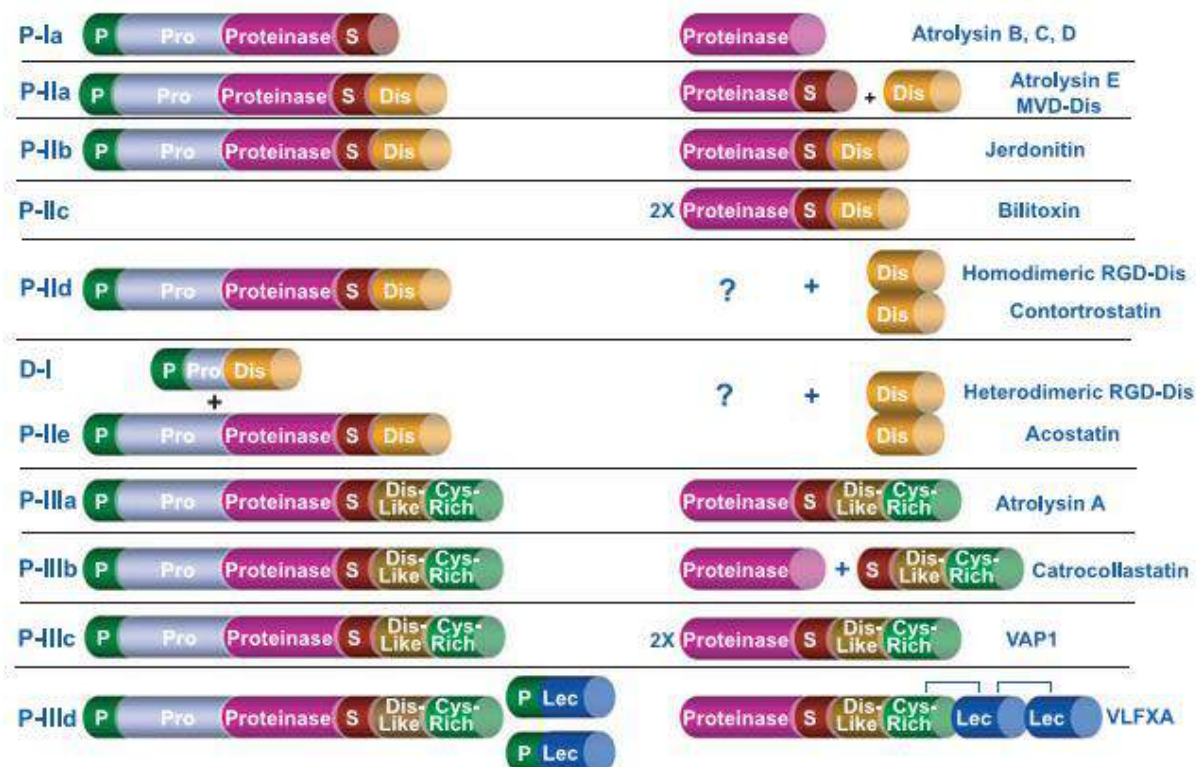


Figura 07. Classificação das SVMPs. P: peptídeo sinalizador; Pro: segmento da pró-proteína, removido durante sua ativação; S: sequência HEBXHXBGBXH; Dis: domínio desintegrina; *Dis-like*: domínio semelhante à desintegrina; *Cys-rich*: domínio rico em cisteína; Lec: lectina; (?): produto processado, mas não identificado na peçonha. Fonte: Fox e Serrano (2008).

Diversas atividades biológicas são atribuídas às SVMPs, incluindo hemorragia, edema, inflamação e necrose (GOMES et al., 2009; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; ZYCHAR et al., 2010). O desequilíbrio do sistema hemostático é o efeito biológico mais estudado causado por essas toxinas (MARKLAND JR.; SWENSON, 2013; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). Elas podem interferir na agregação plaquetária e na cascata de coagulação, exercendo efeitos pró ou anticoagulantes (CAMACHO et al., 2014; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000; QUEIROZ et al., 2014a; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012).

A maioria das SVMPs são enzimas fibrinogenolíticas assim como as SVSPs, clivando preferencialmente a cadeia A α e mais lentamente a cadeia B β do fibrinogênio. As proteases botrópicas neuwiedase (RODRIGUES *et al.*, 2000), BlaH1 (STROKA et al., 2005), BjussuMP-II (MARCUSSE et al., 2007), BmooMP α -I (BERNARDES et al., 2008) e BleucMP (GOMES et al., 2011) são algumas das α -

fibrinogenases descritas na literatura. A inibição da agregação plaquetária por SVMPs poderia ser atribuída a degradação do fibrinogênio, principal ligante da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Entretanto, é a cadeia γ que contém o mais importante sítio de ligação às plaquetas. Assim, a clivagem das cadeias A α e B β pelas α -fibrinogenases não afeta a agregação plaquetária (KAMIGUTI, 2005).

As SVMPs que afetam a função das plaquetas apresentam uma ampla diversidade de mecanismos de ação. Elas podem atuar por meio de ação específica estrutural ou enzimática sobre receptores das plaquetas ou sobre proteínas adesivas envolvidas na hemostasia, ativando ou inibindo a agregação plaquetária (KAMIGUTI, 2005; MARKLAND, 1998; PINYACHAT et al., 2011; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). A alborhagin, por exemplo, é uma SVMP isolada da peçonha de *Trimeresurus albolabris* que atua como um potente ativador da função plaquetária, porque interage com o receptor GPVI (ANDREWS et al., 2001).

As SVMPs também são moléculas muito versáteis quanto a inibição da agregação plaquetária. O domínio *dis-like* das SVMPs é o principal componente que interage com as plaquetas (PINYACHAT et al., 2011). A jararhagin (52 kDa), uma SVMP PIII hemorrágica isolada da peçonha de *B. jararaca*, inibe a agregação plaquetária induzida pela ristocetina e pelo colágeno. Essa ação sobre as plaquetas pode ser atribuída, respectivamente, à hidrólise do FvW e à ação direta sobre a integrina $\alpha_2\beta_1$ (LAING; MOURA-DA-SILVA, 2005). Essa enzima se liga à subunidade α_2 da integrina na superfície das plaquetas e cliva a subunidade β_1 . Além disso, estudos mostram que a jararhagin se liga fortemente ao colágeno e essa ligação pode manter a inibição da agregação plaquetária induzida por esse agonista, mesmo quando a enzima está inativa ou na ausência do domínio metaloprotease (KAMIGUTI, 2005; LAING; MOURA-DA-SILVA, 2005). A catrocollastatin (50 kDa), purificada da peçonha de *Crotalus atrox*, é outra SVMP que se liga ao colágeno e, conseqüentemente, inibe a agregação plaquetária. Essa ligação parece ser mediada pelo domínio *dis-like* dessa toxina, o qual é muito semelhante ao domínio correspondente da jararhagin (ZHOU; DANGELMAIER; SMITH, 1996).

Os domínios desintegrina e *dis-like* das SVMPs nem sempre conferem à molécula a atividade de inibição da agregação plaquetária. Um exemplo é a

BlatH1, uma SVMP PII purificada da peçonha de *Bothriechis lateralis* (CAMACHO et al., 2014). Nessa molécula, a sequência treonina-aspartato-asparagina (TDN) substitui a RGD típica das desintegrinas, que é capaz de bloquear integrinas plaquetárias (CAMACHO et al., 2014). Esses mesmos autores sugerem que a BlatH1 inibe a agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno por meio de um mecanismo exclusivamente dependente da sua atividade proteolítica.

Algumas SVMPs desprovidas do domínio *dis-like*, como a BjussuMPII (MARCUSI et al., 2007) e a atroxlysin-I (SANCHEZ et al., 2010) também são descritas na literatura como inibidores da função plaquetária. A atividade enzimática dessas SVMPs PI é fundamental para a inibição significativa da função das plaquetas.

Outra SVMP que inibe a agregação plaquetária devido a sua atividade proteolítica é a mocarhagin (55kDa), isolada da peçonha de *Naja mocambique mocambique* (WARD et al., 1996). Ela inibe a agregação das plaquetas dependente do FvW por remover especificamente o fragmento His1-Glu282 do receptor GPIIb/IIIa (DU et al., 2006; WARD et al., 1996; WIJEYEWICKREMA; BERNDT; ANDREWS, 2005). O grupo de SVMPs semelhantes à mocarhagin (*mocarhagin-like*) parece ser amplamente distribuído em peçonhas de viperídeos (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

5.4 Desintegrinas de peçonhas de serpentes

As desintegrinas são uma família de pequenos polipeptídeos (40-100 aminoácidos) não enzimáticos e ricos em cisteína (BRAUD; BON; WISNER, 2000; EBLE, 2010; KAMIGUTI; ZUZEL; THEAKSTON, 1998). A primeira desintegrina descrita na literatura, trigramin, isolada da peçonha de *Trimeresurus gramineus*, foi caracterizada como inibidor competitivo da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e como um potente inibidor da agregação plaquetária (HUANG et al., 1987). Apenas mais tarde, foram isoladas e caracterizadas desintegrinas que não inibem a agregação plaquetária. Isso foi possível graças ao desenvolvimento de ensaios de adesão celular usando linhagens de células que expressavam determinadas integrinas (MARCINKIEWICZ et al., 1999a,b).

As desintegrinas podem ser divididas em cinco grupos diferentes de acordo com o comprimento e o número de pontes dissulfeto dos polipeptídeos (CALVETE et al., 2003). O primeiro grupo inclui desintegrinas curtas contendo de 41 a 51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. O segundo grupo é formado por desintegrinas de tamanho médio que contêm cerca de 70 resíduos e seis pontes dissulfeto. As desintegrinas com aproximadamente 84 resíduos de aminoácidos e sete pontes dissulfeto formam o terceiro grupo (CALVETE et al., 2005; MARCINKIEWICZ, 2005). Os domínios *dis-like* derivados das SVMPs da classe PIII formam o quarto grupo das desintegrinas. Eles apresentam aproximadamente 100 resíduos e oito pontes dissulfeto. E o quinto, diferente dos demais grupos, é composto por desintegrinas homo e heterodiméricas (CALVETE et al., 2005). Cada subunidade possui cerca de 67 resíduos, dentre os quais 10 são de cisteína, envolvidos na formação de quatro pontes dissulfeto intracadeia e duas intercadeia (CALVETE et al., 2000; MARCINKIEWICZ, 2005). A maioria das desintegrinas é liberada de precursores das SVMPs PII (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

A atividade de inibição de integrinas pelas desintegrinas depende do pareamento adequado dos resíduos de cisteína que determinam a conformação da alça inibitória, cujo ápice contém uma sequência RGD (Figura 08) ou sequências homólogas, como MLD (metionina-leucina-aspartato), MGD (metionina-glicina-aspartato), VGD (valina-glicina-aspartato), KGD, WGD (triptofano-glicina-aspartato) ou RTS/KTS (arginina-treonina-serina/ lisina-treonina-serina) (CALVETE et al., 2003; EBLE, 2010). A sequência C-terminal da desintegrina, junto à sequência de aminoácidos dentro da alça inibitória (Figura 09), determina a especificidade de ligação à integrina (EBLE, 2010).

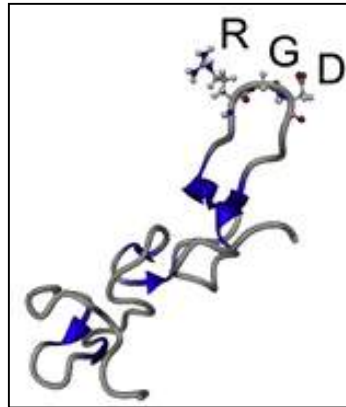


Figura 08. Estrutura molecular da desintegrina rhodostomin da peçonha de *Calloselasma rhodostoma*, que possui a sequência RGD na alça de ligação à integrina. Essa sequência se liga à integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$. Fonte: figura modificada de Eble (2010).

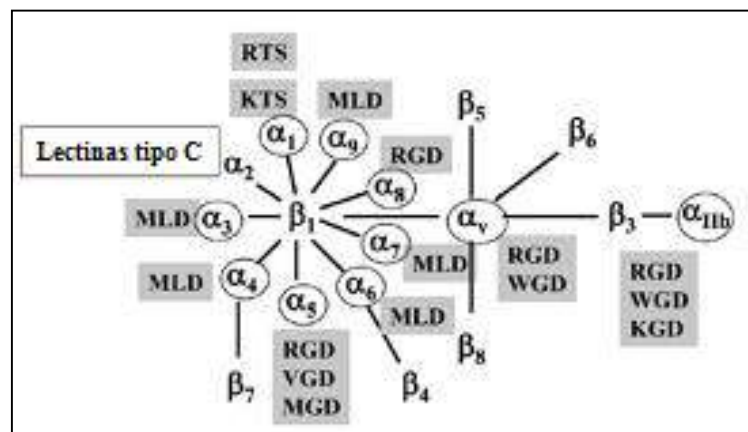


Figura 09. Diagrama da família das integrinas e os diferentes motivos tripeptídicos que bloqueiam especificamente interações entre integrina e molécula ligante. Integrinas heterodiméricas antagonizadas por desintegrinas de peçonhas de serpentes estão circuladas. Fonte: figura modificada de Calvete (2013).

As desintegrinas também podem ser classificadas quanto a sua função, de acordo com a especificidade de interação com integrinas. Segundo Marcinkiewicz (2005), podem ser diferenciados três grupos (Figura 10): as desintegrinas que interagem com integrinas RGD-dependentes, as que se ligam a integrinas de leucócitos e aquelas que se ligam a integrina $\alpha_1\beta_1$. O primeiro grupo inclui a maioria das desintegrinas monoméricas que contém o motivo RGD, bem como outras desintegrinas que apresentam sequências diferentes, mas que têm atividade inibitória contra integrinas RGD-dependentes. Esse grupo inclui desintegrinas monoméricas MVD (metionina-valina-aspartato) ou KGD, bem como

diméricas MGD, KGD ou WGD (MARCINKIEWICZ, 2005). O segundo grupo é representado por desintegrinas MLD, as quais interagem com as integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$ e $\alpha_9\beta_1$ (CALVETE, 2013; MARCINKIEWICZ, 2005). E por sua vez, as desintegrinas KTS, bem como as RTS, pertencem ao terceiro grupo. Elas são inibidores potentes e seletivos da integrina $\alpha_1\beta_1$, um receptor específico do colágeno IV (CALVETE, 2013; MARCINKIEWICZ, 2005).

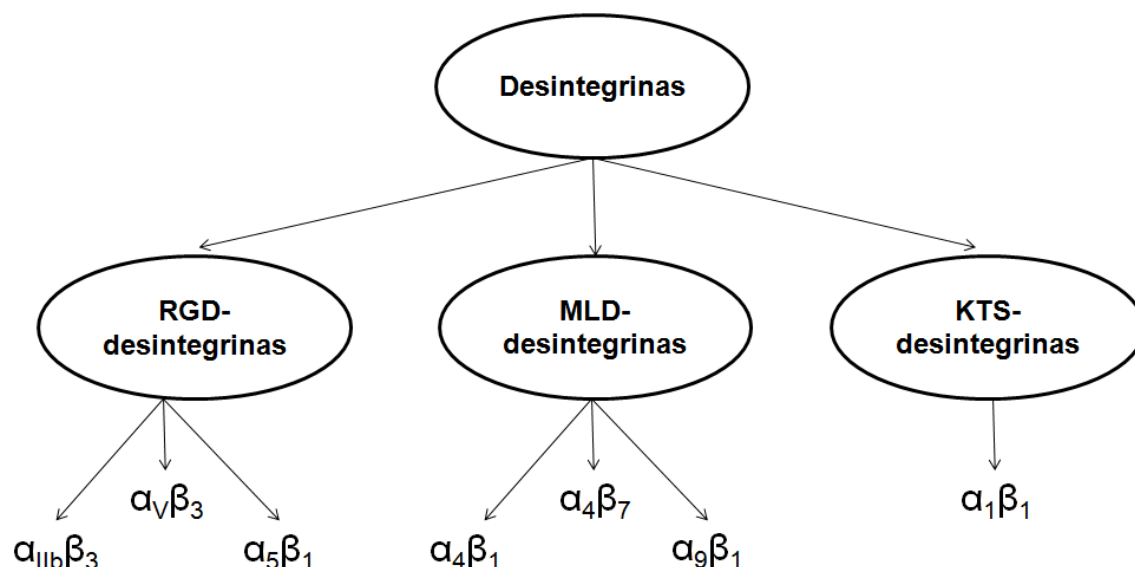


Figura 10. Classificação funcional das desintegrinas de peçonhas de serpentes. O esquema exemplifica a especificidade de ligação a integrinas de cada grupo. Fonte: figura modificada de Marcinkiewicz (2005).

Em geral, a potência de inibição da agregação plaquetária pelas desintegrinas de peçonhas de serpentes depende da sua capacidade de interagir com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (MARCINKIEWICZ, 2013). Considerando a eficácia da sua inibição no tratamento de distúrbios trombóticos, as pesquisas relacionadas à estrutura e função das desintegrinas RGD são, na maioria das vezes, direcionadas para o bloqueio da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Esses esforços resultaram em drogas disponíveis no mercado que mimetizam sua ação, como o eptifibatide e tirofiban. Ambos compostos são aprovados para uso na terapia de síndrome coronariana aguda e prevenção de complicações trombóticas (GOMES et al., 2000; MARCINKIEWICZ, 2005; RANG et al., 2011; TOPOL; BYZOVA; PLOW, 1999).

As plaquetas contribuem para o crescimento de tumores, angiogênese e metástase (TRIKHA; NAKADA, 2002). Elas facilitam a adesão e retenção das células tumorais na parede do vaso sanguíneo em forças de cisalhamento relativamente altas. Essas interações são mediadas pelas integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ e α_V , amplamente expressas em uma variedade de células tumorais (DARDIK et al., 1997; FELDING-HABERMANN, 2003). As desintegrinas RGD de peçonhas de serpentes são moléculas de interesse de muitos laboratórios que investigam a integrina $\alpha_V\beta_3$ como um alvo potencial na supressão do câncer (MARCINKIEWICZ, 2005). O bloqueio dessa integrina sobre células tumorais inibe a adesão à matriz extracelular, reduz significativamente sua motilidade e resulta na inibição de metástase (MARCINKIEWICZ, 2005).

As desintegrinas RGD jerdonin (7.483 Da e 71 resíduos de aminoácidos) (ZHOU et al., 2004a) e jerdonatin (8.011Da e 72 resíduos de aminoácidos) (ZHOU et al., 2004b) da peçonha de *Trimeresurus jerdonii*, ambas com 12 cisteínas, inibem a agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno, e ainda o crescimento tumoral (ZHOU et al., 2004a,b). A insularin (14.000Da), por sua vez, é uma desintegrina RGD da peçonha de *B. insularis* que possui 73 resíduos de aminoácidos e 12 cisteínas (DELLA-CASA et al., 2011). Ela inibe a agregação plaquetária induzida por ADP e a adesão de células endoteliais ao fibrinogênio imobilizado. Os autores do trabalho sugerem que a insularin pode ser usada como uma ferramenta nos estudos de patologias envolvendo adesão de plaquetas e células endoteliais dependentes das integrinas $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ (DELLA-CASA et al., 2011).

As desintegrinas de peçonhas de serpentes também podem se ligar a receptores expressos em leucócitos e em células endoteliais. A interação de desintegrinas RGD monoméricas com neutrófilos parece estar associada com a ligação à integrina $\alpha_M\beta_2$; e entre desintegrinas RGD e células T, com as integrinas $\alpha_V\beta_3$ e $\alpha_5\beta_1$ (MARCINKIEWICZ, 2013).

As pesquisas com os grupos de desintegrinas MLD e KTS, por sua vez, são direcionadas também para sistemas experimentais de terapia de câncer, assim como de doenças autoimune. Elas exibem novos motivos biologicamente ativos que podem ser usados como modelo para o desenvolvimento de compostos sintéticos para aplicação clínica (MARCINKIEWICZ, 2005).

5.5 L-aminoácido oxidases de peçonhas de serpentes

As LAAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, produzindo um α -cetoácido, amônia e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DU; CLEMETSON, 2002; FOX, 2013; GUO et al., 2012). Os elétrons retirados durante a reação catalisada pela LAAO reduzem o grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) da enzima, convertendo-o a FADH_2 , que posteriormente reduz oxigênio molecular a H_2O_2 , oxidando novamente FADH_2 , o que resulta na regeneração da enzima. Na figura 11 é possível observar que a reação tem um iminoácido como intermediário, o qual sofre uma hidrólise espontânea, gerando um α -cetoácido e amônia (MOUSTAFA et al., 2006).

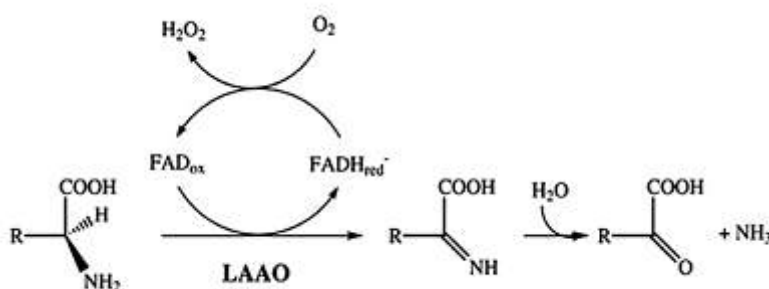


Figura 11. Reação química catalisada pelas LAAOs. O iminoácido gerado como produto intermediário sofre uma hidrólise espontânea, gerando um α -cetoácido e amônia. Os elétrons retirados durante a reação catalisada pela LAAO reduzem o grupo prostético FAD da enzima, convertendo-o a FADH_2 , que posteriormente reduz oxigênio molecular a H_2O_2 , oxidando novamente FADH_2 . Fonte: Guo et al. (2012).

Essa enzima é amplamente distribuída em muitos organismos diferentes, eucariotos e procariotos, mas as LAAOs de peçonhas de serpentes (SV-LAAOs) são os membros mais bem estudados dessa família (DU; CLEMETSON, 2002; IZIDORO et al., 2014). Em serpentes botrópicas, essas toxinas representam cerca de 2% do peso total da peçonha bruta dessecada. A coloração amarela dessas peçonhas está relacionada com a presença da riboflavina que faz parte do grupo prostético FAD ou nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) das LAAOs (SOUZA et al., 2005; ULLAH et al. 2012).

Essas enzimas são geralmente glicoproteínas homodiméricas ligadas ao FAD e quando analisadas em condições não desnaturantes apresentam massas moleculares de aproximadamente 110-150 kDa. Nessas condições, a CC-LAAO da peçonha de *Cerastes cerastes*, por exemplo, apresenta 115 kDa (ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2014) e a BmooLAAO-I da peçonha de *B. moojeni*, 130,779 kDa (STÁBELI et al., 2007). Em condições desnaturantes, analisadas por SDS-PAGE, ou por espectrometria de massa (MALDI-TOF), a massa de cada monômero das SV-LAAOs está em torno de 50-70 kDa (DU; CLEMETSON, 2002). A CC-LAAO apresenta 58 kDa (ABDELKAFI-KOUBAA et al., 2014) e a BmooLAAO-I 64,889 kDa (STÁBELI et al., 2007), em condições desnaturantes.

O papel fisiológico das SV-LAAOs ainda é desconhecido. Especula-se que estocada nas glândulas de peçonha, pode estar relacionada com a conservação e estabilização da peçonha e das próprias glândulas, em virtude de suas propriedades antibacterianas (FOX, 2013). Apesar dos mecanismos de ação dessas enzimas serem pouco conhecidos, muitos trabalhos descrevem uma ampla variedade de efeitos farmacológicos, como indução de apoptose, edema, hemólise, hemorragia e efeito bactericida, citotóxico, microbicida, antiparasitário, antitumoral, na agregação plaquetária, dentre outros (CISCOTTO et al., 2009; DU; CLEMETSON, 2002; GUO et al., 2012; IZIDORO et al., 2006; 2014; NAUMANN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2009; STÁBELI et al., 2004, 2007; TEMPONE et al., 2001). Muitos desses efeitos parecem estar relacionados, ao menos em parte, com o H₂O₂ produzido durante a reação química catalisada pelas LAAOs, o que contribui para a toxicidade do envenenamento através do estresse oxidativo decorrente (FOX, 2013; GUO et al., 2012; NAUMANN et al., 2011; RODRIGUES et al., 2009; STÁBELI et al., 2007; WEI et al., 2003).

As SV-LAAOs podem atuar como inibidores ou indutores da agregação plaquetária, embora o seu mecanismo de ação, não esteja bem esclarecido. Essas enzimas podem afetar a agregação plaquetária não somente por meio da produção de H₂O₂, mas também por mecanismos ainda desconhecidos (GUO et al., 2012).

TMLAO (WEI et al., 2003), BpirLAAO-I (IZIDORO et al., 2006), BmooLAAO-I (STÁBELI et al., 2007) e Bp-LAAO (RODRIGUES et al., 2009) são algumas das SV-LAAOs capazes de induzir a agregação das plaquetas. Em todos esses

casos, a catalase inibe essa atividade, sugerindo que esse efeito é mediado pela produção de H_2O_2 , durante a catálise enzimática. Segundo Li, Yu e Eric (1994), o H_2O_2 liberado poderia promover a síntese de TXA_2 , o qual induz a agregação plaquetária. Entretanto, a produção de H_2O_2 por si só é insuficiente para explicar a ativação da agregação, o que sugere a atuação de outros fatores (LI et al., 2008; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). Tanto a produção do H_2O_2 , quanto a ligação a proteínas da membrana plaquetária podem estar envolvidas na indução da agregação pela NA-LAAO da peçonha de *Naja atra* (LI et al., 2008). O estudo de Li et al. (2008) sugere que a enzima se liga à membrana plaquetária, aumentando a sensibilidade das plaquetas ao H_2O_2 , e, ao mesmo tempo, ativando as plaquetas por um mecanismo não conhecido.

Outras SV-LAAOs, como M-LAO (TAKATSUKA et al., 2001), ABU-LAO (WEI et al., 2007) e BI-LAO (NAUMANN et al., 2011) inibem a agregação plaquetária. A importância do H_2O_2 produzido nesse efeito biológico é observado, mais uma vez, considerando que a atividade normalmente é inibida pela catalase. O efeito inibitório pode estar relacionado à interferência do H_2O_2 na interação entre a integrina plaquetária ativada $\alpha_{IIb}\beta_3$ e o fibrinogênio, ou à redução da ligação do ADP nas plaquetas expostas ao H_2O_2 (BELISARIO et al., 2000; DU; CLEMETSON, 2002; TAKATSUKA et al., 2001).

Diante desse quadro, observa-se que estudos adicionais da ação das SV-LAAOs sobre a agregação plaquetária e uma melhor compreensão das atividades biológicas associadas a essas enzimas, especialmente seus mecanismos de ação, podem contribuir para o desenvolvimento de novos agentes para a terapia de doenças cardiovasculares (GUO et al., 2012).

5.6 Lectinas tipo C de peçonhas de serpentes

As lectinas tipo C são proteínas não enzimáticas que se ligam a mono e oligossacarídeos, e são dependentes de pontes dissulfeto em sua estrutura e da presença de íons Ca^{2+} no meio para sua atividade (DRICKAMER, 1988; KILPATRICK, 2002; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). As lectinas tipo C são compostas de homodímeros ou homo-oligômeros e normalmente possuem propriedades de ligação à galactose. Essas moléculas fazem parte da

constituição das peçonhas ofídicas (CLEMETSON, 2010). Tais peçonhas também contêm lectinas tipo C-like, proteínas que são heterodímeros ou complexos oligoméricos de heterodímeros, chamadas snaclecs (do inglês, *snake C-type lectins*). Sua estrutura básica inclui duas subunidades homólogas: subunidade α (cadeia A), de 14-15 kDa, e subunidade β (cadeia B), de 13-14 kDa (CLEMETSON, 2010; MORITA, 2005). As snaclecs são mais frequentemente encontradas em peçonhas de serpentes do que as lectinas tipo C (ZELENSKY; GREARY, 2005).

As snaclecs apresentam várias atividades biológicas, incluindo atividade anticoagulante e de interferência na função plaquetária (CLEMETSON; MORITA; KINI, 2009; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). A ação das snaclecs sobre as plaquetas pode ser utilizada como ferramenta para investigação de receptores de membrana e vias de sinalização (ANDREWS; BERNDT, 2000; CLEMETSON; POLGAR; CLEMETSON, 1998; CLEMETSON et al., 2001).

Algumas snaclecs agem como inibidores da função plaquetária, enquanto outras ativam as plaquetas (CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2005; CLEMENTSON, 2010). Como representado na figura 12, GPIb, GPVI e integrina $\alpha_2\beta_1$ são os principais receptores aos quais as snaclecs se ligam (CLEMETSON, 2010; JAKUBOWSKI et al., 2013). As snaclecs EMS16 de *Echis multisquamatus* e echicetin de *E. carinatus* atuam como inibidores plaquetários por meio da ação sobre a integrina $\alpha_2\beta_1$ e a GPIb, respectivamente (Figura 12) (CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2005). Outro exemplo de antagonista plaquetário é a sochicetin-A, uma snaclec da peçonha de *E. sochureki* com estrutura quaternária $(\alpha\beta)_3$. Ela interage com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno (JAKUBOWSKI et al., 2013). Por sua vez, a ação das demais snaclecs representadas na figura 12 sobre seus respectivos receptores resulta na ativação da função plaquetária (CHUNG; PENG; HUANG, 2001; CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2005). A jerdonuxin da peçonha de *Trimeresurus jerdonii* com estrutura heterodimérica $(\alpha\beta)_4$, também é um agonista plaquetário. Nesse caso, a GPIb parece, mais uma vez, ser o receptor envolvido na atividade sobre as plaquetas (CHEN et al., 2011).

6 Peçonha de *B. moojeni* e agregação plaquetária

Assim como para outras peçonhas ofídicas, os efeitos da peçonha de *B. moojeni* sobre a hemostasia despertam o interesse de pesquisadores, seja pela possibilidade de aplicação terapêutica e diagnóstica, seja pela relevância nos acidentes (SANO-MARTINS; SANTORO, 2009). O quadro 1 reúne toxinas da peçonha de *B. moojeni* que interferem na função plaquetária, descritas até 2014.

Quadro 1. Moléculas da peçonha de *B. moojeni* que ativam (+) ou inibem (-) a agregação plaquetária, descritas até 2014.

Nome	Classe	Ação sobre a agregação plaquetária	Referência
MSP 1	SVSP	+	Serrano et al., 1993
BmooLAAO-I	LAAO	+	Stábeli et al., 2007
BmooTX-I	PLA ₂	-	Santos-Filho et al., 2008
BmLec	lectina tipo C-like	+	Barbosa et al., 2010
BmooPLA ₂ -I	PLA ₂	-	Salvador et al., 2011
BmooPLA ₂	PLA ₂	-	Silveira et al., 2013
BmooMP α -II	SVMP	-	Queiroz et al., 2014a
BmooAi	?	-	Queiroz et al., 2014b

Fonte: do autor (2015)

Considerando a ampla variedade de moléculas presentes na peçonha de *B. moojeni*, o quadro 1 mostra que um número muito pequeno de toxinas que interferem na função das plaquetas foi descrito. Certamente, muitas moléculas ativas sobre as plaquetas ainda são desconhecidas. Além disso, pouco se conhece a respeito dos mecanismos de ação sobre a agregação plaquetária dessas toxinas. Esses fatores instigam as pesquisas na área, incluindo o estudo dos efeitos da peçonha botrópica no acidente ofídico, a função das plaquetas e a busca por novos modelos para diagnóstico e para fármacos antiplaquetários.

7 Referências bibliográficas

- ABDELKAFI-KOUBAA, Z. et al. A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom: Purification, biochemical and molecular characterization. *Toxicon*, v. 89, p. 32-44, 2014.
- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396p.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*, v. 38, p. 775-791, 2000.
- ANDREWS, R.K. et al. A novel viper venom metalloproteinase, alborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 28092-28097, 2001.
- ANDREWS, R.K. et al. Molecules in focus: glycoprotein Ib-IX-V. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, p. 1170-1174, 2003.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research*, v. 114, p. 447-453, 2004.
- ANDREWS, R.K. et al. Platelet interactions in thrombosis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, v. 56, p. 13-18, 2004.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochemical Pharmacology*, v. 64, p. 723-732, 2002.
- ANGULO, Y. et al. Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 39, p. 879-887, 2001.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, v. 54, p. 949-957, 2009.

BARBOSA, P.S.F. et al. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 16, p. 493-504, 2010.

BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D. Families and clans of serine peptidases. *Archives Biochemistry Biophysics*, v. 318, p. 247-250, 1995.

BELISARIO, M.A. et al. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1495, p. 183–193, 2000.

BERNARDES, C.P. et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 51, p. 574-584, 2008.

BERNARDI, P.S.; MOREIRA, H.W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. *Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia*, v. 26, p. 239-244, 2004.

BERNDT, M.C. et al. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 86, p. 178-188, 2001.

BLUTEAU, D. et al. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, p. 227-234, 2009.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v.19, p. 7-16, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de vigilância epidemiológica*. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

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

CALGAROTTO, A.K. et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 51, p. 1509-1519, 2008.

CALVETE, J.J. et al. Disulfide-bond pattern and molecular modelling of the dimeric disintegrin EMF-10, a potent and selective integrin $\alpha 5 \beta 1$ antagonist from *Eristocophis macmahoni* venom. *Biochemical Journal*, v. 345, p. 573-581, 2000.

CALVETE, J.J. et al. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochemical Journal*, v. 372, p. 725-734, 2003.

CALVETE, J.J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*, v. 45, p. 1063-1074, 2005.

CALVETE, J.J. The continuing saga of snake venom disintegrins. *Toxicon*, v. 62, p. 40-49, 2013.

CAMACHO, E. et al. Understanding structural and functional aspects of PII snake venom metalloproteinases: characterization of BlatH1, a hemorrhagic dimeric enzyme from the venom of *Bothriechis lateralis*. *Biochimie*, v. 101, p. 145-155, 2014.

CAMPOS, L.B. et al. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian *Bothrops* spp. venoms. *Toxicon* v. 76, p. 1-10, 2013.

CARDOSO, D.F; YAMAGUCHI, I.K.; SILVA, A.M.M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: CARDOSO, J.L.C. et al. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p.81-95.

CARRASCO, P.A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologia Scripta*, v. 41, p. 109-124, 2012.

CARVALHO, M.H.C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 8, p. 76-88, 2001.

CHEN, Z.M., et al. Jerdonuxin, a novel snake C-type lectin with platelet aggregation activity from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Toxicon*, v. 57, p. 109-116, 2011.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, v. 29, p. 1279-1303, 1991.

CHUNG, C.H.; PENG, H.C.; HUANG, T.F. Aggrexin, a C-type lectin protein, induces platelet aggregation via integrin $\alpha_2\beta_1$ and GPIb in a phosphatidylinositol 3-kinase independent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 285, p. 689-695, 2001.

CINTRA, A.C.O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon*, v. 60, p. 70-82, 2012.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, v. 53, p. 330-341, 2009.

CLEMETSON, K.J.; POLGAR, J.; CLEMETSON, J.M. Snake venom C-type lectins as tools in platelet research. *Platelets*, v. 9, p. 165-169, 1998.

CLEMETSON, K.J. Primary haemostasis: sticky fingers cement the relationship. *Current biology*, v. 9, p. R110-R112, 1999.

CLEMETSON, K.J. et al. Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. *Haemostasis*, v. 31, p. 148-154, 2001.

CLEMETSON, K.J.; LU, Q.; CLEMETSON, J.M.. Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, v. 34, p. 150-155, 2005.

CLEMETSON, K.J.; MORITA, T.; KINI, R.M. Scientific and standardization committee communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, p. 360, 2009.

CLEMETSON, K.J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon*, v. 56, p. 1236-1246, 2010.

COLLER, B.S. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation*, v. 92, p. 2373-2380, 1995.

COSTA, H.C.; BERNILS, R.S. Répteis brasileiros: Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 3, p. 74-84, 2014.

COSTA, J.O. et al. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. *Biochimie*, v. 92, p. 1760-1765, 2010a.

COSTA, J.O. et al. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*, v. 55, p. 1365-1377, 2010b.

COUGHLIN, S. R. Protease-activated receptors in vascular biology. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 86, p. 298-307, 2001.

DALE, G.L. et al.. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, v. 415, p. 175-179, 2002.

DARDIK, R. et al. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: involvement of platelet GPIIb-IIIa and tumor cell α_v integrins. *International Journal of Cancer*, v. 70, p. 201-207, 1997.

DAVÌ, G.; PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, v. 357, p. 2482-2494, 2007.

DELLA-CASA, M.S. et al. Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: Inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. *Toxicon*, v. 57, p. 125-133, 2011.

DENNIS, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E.A. et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chemical Reviews*, v. 111, p. 6130-6185, 2011.

DHANANJAYA, B.L.; D'SOUZA, C.J.M. The pharmacological role of nucleotidases in snake venoms. *Cell Biochemistry and Function*, v. 28, p. 171-177, 2010.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 9557-9560, 1988.

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

DU, X.Y. et al. Blood cells as targets of snake toxins. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 36, p. 414-421, 2006.

DUNCAN, R.E. et al. Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A₂ (AdPLA). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 25428-25436, 2008.

EBLE, J.A. Matrix biology meets toxinology. *Matrix Biology*, v. 29, p. 239-247, 2010.

FARNDAL, R.W. et al. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 2, p. 561-573, 2004.

FELDING-HABERMANN, B. Targeting tumor cell-platelet interaction in breast cancer metastasis. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, v. 33, p. 56-58, 2003.

FOX, J.E. The platelet cytoskeleton. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 70, p. 884-893, 1993.

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

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics*, v. 72, p. 200-209, 2009.

FOX, J.W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: L-Amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. *Toxicon*, v. 62, p. 75-82, 2013.

FRANÇA, F.O.S.; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (orgs.). *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 81-95.

FRANCISCHETTI, I.M.B. et al. *Bothrops* sp. snake venoms: Comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 119C, p. 21-29, 1998.

FRANCO, F.L. Origem e diversidade de serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (orgs.). *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 22-41.

FULY, A.L. et al. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie*, v. 86, p. 731-739, 2004.

GACHET, C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 86, p. 222-232, 2001.

GACHET, C. The platelet P₂ receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 108, p. 180-192, 2005.

GAWAZ, M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular Research*, v. 61, p. 498-511, 2004.

GAY, C.C. et al. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. *Toxicon*, v. 46, p. 546-554, 2005.

GHAZARYAN, N. A. et al. Phospholipases A₂ from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1848, p. 463-468, 2015.

GIACHINI, F.R.C.; WEBB, C.; TOSTES, R.C. STIM and Orai proteins: players in sexual differences in hypertension-associated vascular dysfunction? *Clinical Science*, v. 118, p. 391-396, 2010.

GOMES, M.E.W. et al. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 46, p. 255-264, 2000.

GOMES, M.S.R. et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 53, p. 24-32, 2009.

GOMES, M.S.R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 153, p. 290-300, 2011.

GOODMAN, T.; FERRO, A.; SHARMA, P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 66, p. 222-232, 2008.

GUO, C. et al. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. *Toxicon*, v. 60, p. 302-311, 2012.

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.; OWNBY, C.L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, v. 42, p. 915-931, 2003.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, v. 45, p. 997-1011, 2005.

- GUTIÉRREZ, J.M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*, v. 56, p. 1223-1235, 2010.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 1151 p.
- HANKEY, G.J.; EIKELBOOM, J.W. Aspirin resistance. *Lancet*, v. 367, p. 606-617, 2006.
- HASSAN, M.I.; SAXENA, A.; AHMAD, F. Structure and function of von Willebrand factor: the protein that is deficient and/or abnormal in inherited von Willebrand disease. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 23, p. 11-22, 2012.
- HOURANI, S.M.O.; CUSACK, N.J. Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacological Reviews*, v. 43, p. 243-298, 1991.
- HOYLAERTS, M.F. et al. Von Willebrand factor binds to native collagen VI primarily via its A1 domain. *Biochemical Journal*, v. 324, p. 185-191, 1997.
- HUANG, T.F. et al. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *Journal of Biological Chemistry*, v. 262, p. 16157-16163, 1987.
- HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, v. 110, p. 673-687, 2002.
- IZIDORO, L.F.M. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 7034-7043, 2006.
- IZIDORO, L.F.M. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in Pharmacology and Biochemistry. *BioMed Research International*, v. 2014, 19 p., 2014.
- JACKSON, J. The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 137, p. 337-354, 2003.

JAKUBOWSKI, P. et al. Identification of inhibitors of $\alpha_2\beta_1$ integrin, members of C-lectin type proteins, in *Echis sochureki* venom. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 269, p. 34-42, 2013.

JENNINGS, L.K. Role of platelets in atherothrombosis. *The American Journal of Cardiology*, v. 103, p. 4A-10A, 2009.

JURK, K.; KEHREL, B.E. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 31, p. 381-392, 2005.

KAHN, M.L. et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *Journal of Clinical Investigation*, v. 103, p. 879-887, 1999.

KAMIGUTI, A.S. et al. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 34, p. 627-642, 1996.

KAMIGUTI, A.S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D.G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v. 31, p. 853-862, 1998.

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

KAUSHANSKY, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, p. 3339-3347, 2005.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon*, v. 28, p. 1387-1422, 1990.

KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*, v. 42, p. 827-840, 2003.

KOH, C.Y.; KINI, R.M. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon*, v. 59, p. 497-506, 2012.

KOUYOUMDJIAN, J.A.; POLIZELLI, C. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: relato de 37 casos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 30, p. 424-432, 1988.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. v. 68-69, p. 3-58, 2002.

KULKARNI, S. et al. A revised model of platelet aggregation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 105, p. 783-791, 2000.

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

LALLOO, D. Venomous bites and stings. *Medicine*, v. 33, p. 74-76, 2005.

LEGER, A.J.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*, v. 114, p. 1070 -1077, 2006.

LI, Z.Y.; YU, T.F.; ERIC, C.Y.L. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon*, v. 32, p. 1349-1358, 1994.

LI, R. et al. L-amino acid oxidase from *Naja atra* venom activates and binds to human platelets. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 40, p. 19-26, 2008.

LUIK, R.M., et al. The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *The Journal of Cell Biology*, v. 174, p. 815-825, 2006.

MARCINKIEWICZ, C. et al. EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits α_4 and α_5 integrins in an RGD independent manner. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 12468-12473, 1999a.

MARCINKIEWICZ, C. et al. Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits $\alpha_5\beta_1$ integrin. *Biochemistry*, v. 38, p. 13302-13309, 1999b.

MARCINKIEWICZ, C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. *Current Pharmaceutical Design*, v. 11, p. 815-827, 2005.

MARCINKIEWICZ, C. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell–matrix interactions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, p. 1974-1986, 2013.

MARCUSSI, S. et al. Molecular and functional characterization of a new nonhemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*, v. 28, p. 2328-2339, 2007.

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

MARKLAND JR, F.S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon*, v. 62, p. 3-18, 2013.

MARRAKCHI, N. et al. Cerastocytin, a new thrombin-like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1244, p. 147-156, 1995.

MARRAKCHI, N. et al. Cerastotin, a serine protease from *Cerastes cerastes* venom, with platelet-aggregating and agglutinating properties. *European Journal of Biochemistry*, v. 247, p. 121-128, 1997.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, v. 45, p. 1171-1181, 2005.

MARTINS, B.F. et al. Acidentes por serpente (*Bothrops* spp. e *Crotallus* spp.) em crianças: relato de dois casos. *Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste*, v. 13, p. 693-703, 2012.

MARTINS, M., MARQUES, O.A.V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetics correlates of feeding Habits in neotropical pitvipers of the Genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.W. (org.). *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing: Eagle Mountain, 2002, p. 307-328.

- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1477, p. 146-156, 2000.
- MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (orgs.). *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 42-70.
- MENALDO, D.L. et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biochimie*, v. 94, p. 2545-2558, 2012.
- MONTEIRO, R.Q. Targeting exosites on blood coagulation proteases. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, p. 275-280, 2005.
- MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*, v. 45, p. 1099-1114, 2005.
- MOUSTAFA, I. M. et al. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *Journal of Molecular Biology*, v. 364, p. 991-1002, 2006.
- NASCIMENTO, N.G. et al. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*, v.55, p.343-352, 2010.
- NAUMANN, G.B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1810, p. 683-694, 2011.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274 p.
- NIESWANDT, B. et al. Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO Journal*, v. 20, p. 2120-2130, 2001.

NIESWANDT, B.; WATSON, S.P. Platelet collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*, v. 102, p. 449-461, 2003.

NIESWANDT, B.; VARGA-SZABO, D.; ELVERS, M. Integrins in platelet activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, p. 206-209, 2009.

NISHIDA, S. et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogenclotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, v. 33, p. 1843-1849, 1994.

NOGUEIRA, C.; SAWAYA, R.J.; MARTINS, M. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology*, v. 37, p. 653-659, 2003.

OFFERMANN, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation Research*, v. 99, p. 1293-1304, 2006.

OKAMURA, T.; HASITZ, M.; JAMIESON, G.A. Platelet glycoprotein IIb/IIIa: interaction with thrombin and role as thrombin receptor on the platelet surface. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 253, p. 3435-3443, 1978.

OWNBY, C.L. et al. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon*, v. 37, p. 411-445, 1999.

OZAKI, Y. et al. Platelet GPIIb-IX-V-dependent signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 3, p. 1745-1751, 2005.

PINYACHAT, A. et al. Albocollagenase, a novel recombinant P-III snake venom metalloproteinase from green pit viper (*Cryptelytrops albolabris*), digests collagen and inhibits platelet aggregation. *Toxicon*, v. 57, p. 772-780, 2011.

POLGAR, J. et al. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-Mr phospholipases A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). *Biochemical Journal*, v. 319, p. 961-968, 1996.

- QUEIROZ, M.R. et al. Biological characterization of a myotoxin phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 17, p. 49-58, 2011.
- QUEIROZ, M.R. et al. Rapid purification of a new PI class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with antiplatelet activity. *BioMed Research International*, v. 2014, 12 p., 2014a.
- QUEIROZ, M.R. et al. Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation. *BioMed Research International*, v. 2014, 7 p., 2014b.
- RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 142, p. 328-346, 2006.
- RANG, H.P. et al. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 768 p.
- ROBERTS, H.R.; MONROE, D.M.; ESCOBAR, M.A. Current concepts of hemostasis: implications for therapy. *Anesthesiology*, v. 100, p. 722-730, 2004.
- RODRIGUES, R.S. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie*, v. 91, p. 490-501, 2009.
- ROMO, G.M. et al. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 190, p. 803-814, 1999.
- RUGGERI, Z.M.; WARE, J. Von Willebrand factor. *The FASEB Journal*, v. 7, p. 308-316, 1993.
- RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 1, p. 1335-1342, 2003.
- RUSSELL, F.E. Venomous animal injuries. *Current Problems in Pediatrics*, v. 3, p. 3-47, 1973.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, v. 57, p. 627-645, 2011.

SALUK, J. et al. The formation, metabolism and the evolution of blood platelets. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, v. 68, p. 384-391, 2014.

SALVADOR, G.H. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of BmoPLA2-I, a platelet-aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* venom. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, v. 67, p. 900-902, 2011.

SANCHEZ, E.F. et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 496, p. 9-20, 2010.

SANO-MARTINS, I.S.; SANTORO, M.L. Distúrbios hemostáticos em envenenamento por animais peçonhento. In: CARDOSO, J.L.C. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 289-309.

SANTOS, B.F. et al. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Letters*, v. 477, p. 199-202, 2000.

SANTOS-FILHO, N.A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*, v. 52, p. 908-917, 2008.

SAVAGE, B.; ALMUS-JACOBS, F.; RUGGERI, Z.M. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, v. 94, p. 657-666, 1998.

SAVAGE, B.; CATTANEO, M.; RUGGERI, Z.M. Mechanisms of platelet aggregation. *Hemostasis and Thrombosis*, v. 8, p. 270-276, 2001.

SAVI, P. et al. Clopidogrel: a review of its mechanism of action. *Platelets*, v. 9, p. 251-255, 1988.

SAWAYA, R.J.; MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M. Composição e história natural das serpentes de Cerrado de Itirapina, São Paulo, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, v. 8, p. 127-149. 2008.

SCARBOROUGH, R.M. et al. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 9359-9362, 1991.

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SERRANO, S.M.T. et al. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (Caissaca) venom. Isolation and activity of two serine proteinases, MSP 1 and MSP 2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. *Toxicon*, v. 31, p. 471-481, 1993.

SERRANO, S.M.T.; 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.T. The long road of research on snake venom serine proteinase. *Toxicon*, v. 62, p. 19-26, 2013.

SHIMOKAWA, K. et al. Expression, activation and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. *Archives Biochemistry Biophysics*, v. 335, p. 283-294, 1996.

SHLANSKY-GOLDBERG, R. Platelet aggregation inhibitors for use in peripheral vascular interventions: What can we learn from the experience in the coronary arteries? *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, v. 13, p. 229-246, 2002.

SILVA, A.S.T. et al. *Soros e Vacinas*. 2. ed. São Paulo: Instituto Butantan, 2013. 60 p.

SILVEIRA, L. B. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 73, p. 35-43, 2013.

SINGLETERY, E.M. et al. Envenomations. *The Medical Clinics of North America*, v. 89, p. 1195-1224, 2005.

SOARES, A.M.; et al. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 302, p. 193-200, 2003.

SÖDERBÄCK, U.; SOLLEVI, A.; FREDHOLM, B.B. The disappearance of adenosine from blood and platelet suspension in relation to the platelet cyclic AMP content. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 129, p. 189-194, 1987.

SOUZA, A.C.S. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. *Química Nova*, v. 28, p. 887-891, 2005.

STÁBELI, R.G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STÁBELI, R.G. et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v.142, p.371-381, 2006.

STÁBELI, R.G. et al. Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, p. 132-140, 2007.

STAVROPOULOS, S.W.; SHLANSKY-GOLDBERG, R.D. Use of Antiplatelet Inhibitors in Peripheral Vascular Interventions. *Seminars in interventional radiology*, v. 22, p. 80-87, 2005.

STOREY, R.F. Biology and pharmacology of the platelet P2Y₁₂ receptor. *Current Pharmaceutical Design*, v. 12, p. 1255-1259, 2006.

- STROKA, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. *Toxicon*, v. 45, p. 411-420, 2005.
- TAKATSUKA, H. et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1544, p. 267-277, 2001.
- TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1824, p. 164-176, 2012.
- TEIXEIRA, S.S. et al. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. *Archives of Toxicology*, v. 85, p. 1219-1233, 2011.
- TEMPONE, A.G. et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 280, p. 620-624, 2001.
- TENG, C.M.; CHEN, Y.H.; OUYANG, C.. Biphasic effect on platelet aggregation by phospholipase a purified from *Vipera russellii* snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 772, p. 393-402, 1984.
- TITANI, K. et al. Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry*, v. 25, p. 3171-3184, 1986.
- TOPOL, E.J.; BYZOVA, T.V.; PLOW, E.F. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *The Lancet*, v. 353, p. 227-231, 1999.
- TÖRÜNER, M. Aspirin and gastrointestinal toxicity. *The Anatolian Journal of Cardiology*, v. 7, p. 27-30, 2007.
- TRIKHA, M.; NAKADA, M.T. Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 28, p. 39-44, 2002.

TRUMMAL, K. et al. 5'-Nucleotidase from *Vipera lebetina* venom. *Toxicon*, v. 93, p. 155-163, 2015.

ULLAH, A. et al. Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 421, p. 124-128, 2012.

VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 28, p. 403-412, 2008.

VILCA-QUISPE, A. et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon*, v. 55, p. 745-753, 2010.

VORCHHEIMER, D.A.; BECKER, R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 81, p. 59-68, 2006.

WAGNER, C.L. et al. Analysis of GP IIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, v. 88, p. 907-914, 1996.

WALLACE, E.L.; SMYTH, S.S. Targeting platelet thrombin receptor signaling to prevent thrombosis. *Pharmaceuticals*, v. 6, p. 915-928, 2013.

WARD, C.M. et al. Mocarhagin, a novel cobra venom metalloproteinase, cleaves the platelet von Willebrand factor receptor glycoprotein Iba. Identification of the sulfated tyrosine/anionic sequence Tyr-276-Glu-282 of glycoprotein Iba as a binding site for von Willebrand factor and α -thrombin. *Biochemistry*, v. 35, p. 4929-4938, 1996.

WEI, J.F. et al. Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica-Chinese Edition*, v. 35, p. 219-228, 2003.

WEI, X.L. et al. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. *Toxicon*, v. 50, p. 1126-1139, 2007.

- WEN, F.H. Soroterapia. In: CARDOSO, J.L.C. et al. *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2009, p. 81-95.
- WIDIMSKÝ, P. et al. Acute myocardial infarction and acute stroke: What are the differences? Focus on reperfusion therapy. *Cor et Vasa*, v. 55, p. 111-116, 2013.
- WIJEYEWICKREMA, L.C.; BERNDT, M.C.; ANDREWS, R.K. Snake venom probes of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*, v. 45, p. 1051-1061, 2005.
- WU, K.K.; THIAGARAJAN, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annual Review of Medicine*, v. 47, p. 315-331, 1996.
- YANG, J. et al. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 9984-9989, 2000.
- ZELENSKY, A.N.; GREASY, J.E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*, v. 272, p. 6179-6217, 2005.
- ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J.B. The hemorrhagin Catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 219, p. 720-726, 1996.
- ZHOU, X.D. et al. Purification, cloning and biological characterization of a novel disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Toxicon*, v. 43, p. 69-75, 2004a.
- ZHOU, X.D. et al. A novel disintegrin, jerdonatin, inhibits platelet aggregation and sperm-egg binding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 139, p. 117-122, 2004b.
- ZINGALI, R.B.; FRATTANI, F. S. Ensaios para estudo dos efeitos das toxinas sobre a agregação plaquetária. In: SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; SOUZA, D.H.F.

Métodos em Toxinologia: Toxinas de Serpentes. São Carlos: EdUFSCar, 2007, p. 105-114.

ZUG, G.R.; VITT, L.J.; CALDWELL, J.P. *Herpetology - An introductory biology of amphibians and reptiles*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2001. 630 p.

ZYCHAR, B.C. et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*, v. 55, p. 227-234, 2010.

Capítulo II

Purification and characterization of BmooAi: A new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation

(Research article)

Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation

Mayara Ribeiro de Queiroz^{1,2}, Carla Cristine N. Mamede^{1,2}, Nadia Cristina G. de Moraes^{1,2}, Kelly Cortes Fonseca^{1,2}, Bruna Barbosa de Sousa^{1,2}, Thaís M. Migliorini³, Déborah Fernanda C. Pereira¹, Leonilda Stanziola^{2,3}, Leonardo A. Calderon⁴, Rodrigo Simões-Silva⁴, Andreimar M. Soares⁴, Fábio de Oliveira^{2,3*}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil ³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil ⁴Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio), Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (Fiocruz Rondônia) e Núcleo de Saúde, Universidade Federal de Rondônia (UNIR), 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil

**Corresponding author.* Av. Pará, 1720, Bairro Umuarama; CEP 38400-902 - Uberlândia, MG - Brazil; Tel. (fax): +55-34-3218-2200. E-mail address: foliveira@umuarama.ufu.br.

Resumo

Neste trabalho, descrevemos a purificação e a caracterização de BmooAi, uma nova toxina de *Bothrops moojeni* que inibe a agregação plaquetária. A purificação de BmooAi foi realizada por meio de três passos cromatográficos (troca iônica em resina DEAE-Sephacel, exclusão molecular em resina Sephadex G-75 e fase reversa em coluna C2/C18). A análise por SDS-PAGE mostrou que a BmooAi possui uma única banda proteica de 15,000 Da. A BmooAi também foi analisada por espectrometria MALDI-TOF, a qual revelou dois componentes principais com massas moleculares de 7824,4 e 7409,2 Da, bem como, traços de proteína com massa molecular de 15.237,4 Da. O sequenciamento por degradação de Edman mostrou duas sequências de aminoácidos, a IRDFDPLTNAPENTA e a ETEEGAEETGQ, as quais não apresentaram homologia com nenhuma classe conhecida de peçonhas de serpentes. BmooAi mostrou um efeito inibidor específico sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno, difosfato de adenosina ou epinefrina, em plasma humano rico em plaquetas, dose-dependente. Entretanto, a nova toxina teve um pequeno ou nenhum efeito sobre a agregação induzida por ristocetina. O efeito inibitório da BmooAi sobre a agregação plaquetária permaneceu o mesmo quando a amostra foi aquecida a 100 °C. A BmooAi pode ser uma nova ferramenta de interesse médico para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para prevenção e tratamento de desordens trombóticas.

Palavras-chave: peçonha de serpente; *Bothrops moojeni*; agregação plaquetária.

Abstract

In this paper, we describe the purification/characterization of BmooAi, a new toxin from *Bothrops moojeni* that inhibits platelet aggregation. The purification of BmooAi was carried out through three chromatographic steps (ion-exchange on a DEAE-Sephacel column, molecular exclusion on a Sephadex G-75 column, and reverse-phase HPLC chromatography on a C2/C18 column). BmooAi was homogeneous by SDS-PAGE and shown to be a single-chain protein of 15,000 Da. BmooAi was analysed by MALDI-TOF Spectrometry and revealed two major components with molecular masses 7824.4 and 7409.2 as well as a trace of protein with a molecular mass of 15,237.4 Da. Sequencing of BmooAi by Edman degradation showed two amino acid sequences: IRDFDPLTNAPENTA and ETEEGAEETGQ, which revealed no homology to any known toxin from snake venom. BmooAi showed a rather specific inhibitory effect on platelet aggregation induced by collagen, adenosine diphosphate, or epinephrine in human platelet-rich plasma in a dose-dependent manner, whereas it had little or no effect on platelet aggregation induced by ristocetin. The effect on platelet aggregation induced by BmooAi remained active even when heated to 100°C. BmooAi could be of medical interest as a new tool for the development of novel therapeutic agents for the prevention and treatment of thrombotic disorders.

Word Keys: snake venom; *Bothrops moojeni*; platelet aggregation.

1. Introduction

Snake venoms are a complex mixture of various proteins, enzymes, and other substances with toxic properties. Among the complex pool of proteins (more than 90% of the dry weight) are included enzymes such as acetylcholinesterases, aminotransferases, phosphoesterases, ADPases, phospholipases, hyaluronidases, L-amino acid oxidases (LAAOs), and proteases (metalloproteinases and serinoproteases) [1–5]. Protein C activators, growth factors (NGF, VEGF), lectins, precursors of bioactive peptides, von Willebrand factor binding proteins, disintegrins, and bradykinin potentiators are some representatives of nonenzymatic components from snake venom [2, 6].

Snake venoms contain a wide variety of nonenzymatic and enzymatic components that have very specific effects on platelet aggregation [7]. Some phospholipases A₂ (PLA₂) can affect platelet function usually due to phospholipid hydrolysis and the formation of metabolites of arachidonic acid [8–10]. Serinoproteases can activate platelet aggregation directly by proteolytic cleavage of protease-activated receptors (PARs) or by binding to the GPIIb receptor [6, 9, 11]. Several snake venom metalloproteinases (SVMPs) have been shown to interfere with platelet function through specific structural or enzymatic effects on platelet receptors or their ligands [6–8]. The effects on platelet aggregation caused by LAAOs are generally related to platelet exposure to hydrogen peroxide which is generated by the enzymatic activity of the toxin [9, 12, 13]. Disintegrins are usually nonenzymatic inhibitors of platelet aggregation, which typically inhibit β_1 , β_3 and β_5 integrins. A common feature of disintegrins is the presence of the arginine-glycine-aspartate tripeptide sequence (RGD) or a homologous, non-RGD sequence, in their integrin-binding sites. Due to their binding to the fibrinogen receptor GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), disintegrins inhibit platelet aggregation induced by a wide range of agonists [14–17]. Snake venom C-type lectins are also able to affect platelet function by binding to von Willebrand factor (vWF) or receptors such as GPIIb, $\alpha_2\beta_1$, and GPVI [18, 19]. In contrast, inhibitory effects of 5'-nucleotidases on platelet aggregation probably occur via catalytic activity that causes the degradation of ADP, a platelet aggregation agonist [6].

In this paper, we describe the purification of BmooAi from *B. moojeni* venom and its characterization as a new toxin that inhibits platelet aggregation.

2. Materials and Methods

2.1. Material

Desiccated *B. moojeni* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais, SP, Brazil). Acetonitrile, acrylamide, ammonium bicarbonate, ammonium persulphate, bromophenol blue, bovine fibrinogen, glycine, β -mercaptoethanol, *N, N'*-methylene-bis-acrylamide, sodium dodecyl sulphate (SDS), *N, N, N', N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), trifluoroacetic acid, and Tris were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Molecular mass markers for electrophoresis and all chromatographic media (DEAE-Sephacel, Sephadex G-75, and C2/C18 columns) were purchased from GE Healthcare Technologies (Uppsala, Sweden). All the agonists used in the platelet aggregation assays (collagen, adenosine diphosphate, epinephrine, and ristocetin) were purchased from Helena Laboratories (Beaumont, Texas, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Blood collection

Human blood was obtained from volunteer-donors. The experiments reported here follow the guidelines established by the Human Research Ethics Committees of Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), Minas Gerais, Brazil (Protocol number 055/11).

2.3. Purification of BmooAi

BmooAi was first purified using the methodology previously described [20] with modifications. Crude venom from the *B. moojeni* snake (400 mg) was dissolved in 50 mmol/L ammonium bicarbonate buffer (pH = 7.8) and clarified by centrifugation at 10,000 \times g for 10 minutes. The supernatant solution was fractionated in a DEAE-Sephacel column (2.5 \times 20.0 cm) previously equilibrated

with 50 mmol/L ammonium bicarbonate (AMBIC), pH = 7.8. Elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with a concentration gradient (50 mmol/L–0.6 mol/L) of the same buffer. Fractions with 3.0 mL/tube were collected and their absorbance was recorded at a wavelength of 280 nm. Fractions corresponding to peak DS4 were pooled, lyophilized, dissolved in 50 mmol/L AMBIC, pH 7.8, and then applied to a Sephadex G-75 column (1.0 × 100.0 cm) previously equilibrated with the same buffer. The flow rate was 20 mL/hour, fractions of 3.0 mL were collected, and their absorbance was recorded at a wavelength of 280 nm. Fraction DS4G2, showing antiplatelet activity, was pooled, lyophilized, dissolved in solvent A (0.1% trifluoroacetic acid), and then subjected to reverse-phase chromatography in a C2/C18 column (4.6 × 100 mm) using the ÄKTApurifier HPLC system. The column was equilibrated with solvent A and eluted applying a concentration gradient toward solvent B (0.1% trifluoroacetic acid containing 80% acetonitrile) from 0 to 100% for column volume at a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature. Absorbance was monitored at wavelengths of 214 and 280 nm and 1 mL fractions were collected.

2.4. Estimation of protein concentration

The protein concentration of the fractions was determined using a UV absorption method that calculates concentration from absorbance at 214 nm, using a BioSpec-mini spectrophotometer (Shimadzu Biotech, Japan).

2.5. Electrophoretic analysis

Electrophoresis using polyacrylamide gel (SDS-PAGE) was performed as previously described [21] using 14% gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer, pH 8.3, containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97,000), bovine serum albumin (66,000), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,000), and α -lactalbumin (14,000). Gels were stained with Coomassie blue R-250, 0.2% (w/v).

2.6. MALDI-TOF mass spectrometry analysis

The molecular mass of BmooAi was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using a 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) as previously described [22] with modifications.

2.7. N-terminal sequence determination

The N-terminal sequence of BmooAi was determined by Edman degradation [23] performed on an automated sequencer (Procise model 494, Applied Biosystems). The identity of the primary sequence of BmooAi was compared with other proteins using BLAST (Basic Local Alignment Search) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.8. Peptide synthesis of N-terminal sequences

Both the Ile-Arg-Asp-Phe-Asp-Pro-Leu-Thr-Asn-Ala-Pro-Glu-Asn-Thr-Ala and Glu-Thr-Glu-Glu-Gly-Ala-Glu-Glu-Gly-Thr-Gln sequences were synthesized using GenScript (Piscataway, New Jersey, USA).

2.9. Proteolytic activity on fibrinogen

Fibrinogenolytic activity was assayed as previously described [24] with modifications. Fibrinogen (1.5 mg/mL) and samples (5 μ g) were mixed 1:100 (w/w) and the mixture was incubated at 37°C for 120 min. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of a denaturing buffer containing 2% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 10% β -mercaptoethanol. Reaction products were analyzed using 14% (w/v) SDS-PAGE.

2.10. Platelet Aggregation

Platelet aggregation assays were performed in human platelet-rich plasma (PRP) and measured using an automated 4-channel Aggregometer (AggRAM version 1.1, Helena Laboratories, USA). Human blood collected in sodium citrate (3.2%) was centrifuged at 100 \times g for 12 min at room temperature to obtain PRP.

Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at 1,000 ×g for 15 min. Assays were carried out using 200 µL of PRP maintained at 37°C under continuous stirring in siliconized glass cuvettes. Aggregation was triggered with collagen (10 µg/mL), ADP (20 µM), ristocetin (1.5 mg/mL), or epinephrine (300 µM) after the incubation of platelets with different doses of BmooAi (0.6, 1.0, and 1.4 µg). One hundred percent (100%) aggregation was expressed as the percentage absorbance relative to PPP aggregation. Control experiments were performed using only platelet agonists. All experiments were carried out in triplicate.

3. Results and discussion

In this study, we describe the purification and partial characterization of a new toxin from *B. moojeni* venom that inhibits platelet aggregation. The fractionation of the *B. moojeni* venom was carried out by three chromatographic steps involving ion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose column, molecular exclusion chromatography on a Sephadex G-75 column, and reverse-phase HPLC chromatography on a C2/C18 column. The fractionation of *B. moojeni* venom by ion-exchange chromatography resulted in five major protein fractions named DS1 through DS5 (Figure 1(a)). Fraction DS4 was further fractionated by size exclusion chromatography (Sephadex G-75) and three fractions were collected (DS4G1 through DS4G3) (Figure 1(b)). All fractions were tested on collagen-, ristocetin-, epinephrine-, or ADP-induced platelet aggregation in human plasma. Fraction DS4G2 (80 µg) inhibited around 85% of collagen-induced and around 75% of ADP-induced platelet aggregation; it was also able to degrade both the A α and B β chains of bovine fibrinogen (results not shown). Even when preincubated at 100°C, fraction DS4G2 maintained its inhibitory effect on platelet aggregation, but lost its fibrinogenolytic activity (results not shown). These results suggest that the effect on aggregation induced by fraction DS4G2 is not dependent on enzymatic action, since the proteins present in this fraction were denatured by a high temperature. Fraction DS4G2 was lyophilized and subjected to reverse-phase HPLC chromatography on a C2C18 column (Figure 1(c)). This procedure resulted in four major protein fractions at 214 nm but only two at

280 nm. These results suggest that the first two peaks at 214 nm are composed of proteins poor in aromatic amino acids. The first peak at 214 nm was also analyzed by SDS-PAGE and showed a single polypeptide chain around 15 kDa (Figure 1(d)). This peak was able to interfere with platelet aggregation and was named BmooAi (*Bothrops moojeni* platelet aggregation inhibitor). BmooAi showed no fibrinogenolytic activity.

BmooAi seems to have low expression in *B. moojeni* snake venom, since it represented ~0.005% (w/w) of the initial crude venom. It is not advantageous when compared to the overall yield of other protein molecules with inhibitory effects on platelet aggregation such as atroxlysin-I from *B. atrox* [25] or BI-LAAO from *B. leucurus* [26], which represent around 5.1 and 3.7% (w/w) of their crude venoms, respectively. In this study, we had to repeat the purification steps several times in order to obtain sufficient material for an initial characterization of this new toxin. For this reason, BmooAi concentration determinations were performed by a UV absorption method; thus, there was no sample waste from using traditional methods to determine protein concentration. The low recovery of BmooAi likely discouraged other researchers from investigating this protein, mainly due to the challenges of its purification. In spite of the disadvantages, BmooAi has high antiplatelet activity that may contribute significantly to the overall effects of envenomation by *B. moojeni*.

Mass spectrometry analysis of BmooAi indicated two major components with molecular masses ($M + H$) 7824.4 and 7409.2 (Figure 2(a)). These two compounds are also seen as doubly charged ions ($M/Z = 3910.5$ and 3703.4 , resp.). Figure 2(b) shows traces of a protein with a molecular mass (15237.4) similar to that found via SDS-PAGE (Figure 1(d)). Based on the analysis by SDS-PAGE (single band) and reverse-phase chromatography (symmetric peak), we suggest that BmooAi is a unique protein that undergoes autolysis/proteolysis, releasing two peptides of molecular mass around 7.5 kDa. Indeed, some snake venom toxins can undergo proteolysis/autolysis under nonphysiological conditions *in vitro*, such as in the presence of reducing agents, alkaline pH, or low calcium concentration [27]. Additionally, the presence of two peptides composed of different amino acids corroborates the suggestion that they originate from the

autolysis/hydrolysis of BmooAi, since peptides that differ in hydrophobicity should elute in different peaks in reverse-phase chromatography.

BmooAi was subjected to N-terminal sequencing by Edman degradation and revealed two amino-acid sequences: IRDFDPLTNAPENTA and ETEEGAEEGTQ. Both N-terminal sequences were submitted to BLAST but neither shared homology with other snake venom protein. Interestingly, the primary sequence of BmooAi has the sequence APEN in the same position (residues 10–13) occupied by the identical sequence in Insularin, a disintegrin from *B. insularis* venom that inhibits platelet aggregation induced by ADP [28]. This finding deserves attention, but more studies are needed to elucidate the importance of this sequence for inhibition of platelet aggregation.

Platelets play an essential role in hemostasis. Alterations in normal platelet function are involved in various thrombotic and cardiovascular disorders [29, 30]. Modulation of platelet activation and aggregation are currently applied to treat and prevent cardiovascular disorders and stroke [6, 29, 31, 32].

In this study, we characterized the interference of BmooAi with agonist-induced platelet aggregation (collagen, ADP, epinephrine, and ristocetin). Our results showed that BmooAi inhibited collagen-induced (10 μ g/mL) platelet aggregation in a concentration-dependent manner. Complete inhibition of collagen-induced platelet aggregation was obtained with only 1.4 μ g of BmooAi (Figure 3). Even after heating to 100°C, BmooAi maintained its inhibitory activity, supporting the hypothesis that its inhibition of platelet aggregation is nonenzymatic in nature (data not shown). The assays of inhibition of ADP-, epinephrine-, and ristocetin-induced platelet aggregation were performed using a dose of 0.6 μ g, due to the low amount obtained from purification. BmooAi inhibited over 80% of epinephrine-induced (300 μ M) platelet aggregation and around 30% of ADP-induced aggregation (20 μ M) (Figure 4). Under the same conditions, BmooAi did not show any inhibitory effect on ristocetin-induced (1 mg/mL) aggregation.

Platelet aggregation is characterized by the accumulation of platelets into a hemostatic plug. The GPIIb/IIIa receptor plays a central role in linking activated platelets. Independent of the initial stimulus, blocking integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ prevents platelet aggregation and subsequent thrombus formation by preventing binding to fibrinogen. The participation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in platelet aggregation, whatever the

initiating event or agonist, justifies the interest in the therapeutic blockade of this receptor, since all routes of platelet activation converge on to this final common pathway [7, 31, 33–35]. Here, we show that BmooAi can inhibit ADP-, epinephrine-, and collagen-induced platelet aggregation at low concentrations, which suggests that this toxin may act on integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. On the other hand, the lack of an inhibitory effect on ristocetin-induced platelet aggregation suggests that BmooAi does not interfere with von Willebrand factor.

Disintegrins are a family of cysteine-rich low-molecular-mass polypeptides (40–100 amino acids) present in viperid venoms that are usually nonenzymatic inhibitors of platelet aggregation [6, 14, 15, 17]. They typically have an RGD sequence that binds to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and other integrins inhibiting their functions [15, 28, 36]. The RGD sequence presents inhibitory activity on platelet aggregation induced by several agonists [6]. However, the Gly position can be occupied by other individual amino acid residues or even by two residues in conformationally restrained peptides and still retain integrin-binding activity [36]. In the venom of the same snake species there are disintegrins that exhibit a conserved RGD-motif and disintegrins with variable non-RGD sequences, such MLD, MGD, VGD, KGD, WGD, or RTS/KTS [16, 17]. However, the short N-terminal sequence of the BmooAi, obtained in this work was not sufficient to show the presence or absence of RGD or variable non-RGD sequences.

In order to determine the influence of the N-terminal region of the peptides found, we synthesized the two peptides and evaluated their effect on aggregation. Neither synthesized peptides (50.0 μ g) showed any inhibitory effect on ADP-, epinephrine-, ristocetin-, or collagen-induced platelet aggregation. These results suggest that the antiplatelet action of BmooAi depends not only on its N-terminal but also on other regions formed by adjacent amino acids and the C-terminal may be essential for its activity [16, 17, 37].

4. Conclusion

In conclusion, we describe a new toxin from snake venom that inhibits platelet aggregation. The reported toxin, BmooAi, has a molecular mass around 15,000 Da and showed no homology with any other snake venom toxin. BmooAi

has great potential for pharmacological studies due to the low dose used to inhibit platelet aggregation and can be of medical interest as a new tool for the development of novel therapeutic agents to prevent and treat patients with thrombotic disorders.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Tecnologia do Acre (FUNTAC/FDCT), Projeto NanoBiotec, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE/CNPq/MCT), Instituto Nacional para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INCT-INPeTAm/CNPq/MCT) e Instituto Nacional para Pesquisa em Toxinas (INCT-Tox), and Secretaria de Desenvolvimento do Estado de Rondonia (SEPLAN-RO/PRONEX/CNPq). Amy Grabner provided the English editing of the paper.

References

1. Singletary EM, Rochman AS, Bodmer JCA, Holstege CP. Envenomations. *Medical Clinics of North America*. 2005; 89(6): 1195–1224.
2. Ramos OHP, Selistre-De-Araujo HS. Snake venom metalloproteases—structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology and Pharmacology*. 2006; 142(3-4): 328–346.
3. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*. 2009; 54(7): 949–957.
4. Gomes MSR, Mendes MM, de Oliveira F, et al. BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 2009; 53(1): 24–32.
5. Costa JDO, Fonseca KC, Garrote-Filho MS, et al. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. *Biochimie*. 2010; 92(12): 1760–1765.
6. Sajevec T, Leonardi A, Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. 2011; 57(5): 627–645.
7. Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 2005; 45(8): 1041–1049.
8. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998; 36(12): 1749–1800.
9. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3(8): 1791–1799.
10. Santos-Filho NA, Silveira LB, Oliveira CZ, et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 2008; 52(8): 908–917.

11. Santos BF, Serrano SMT, Kuliopulos A, Niewiarowski S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Letters*. 2000; 477(3): 199–202.
12. Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, et al. H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000; 1495(2): 183–193.
13. Clemetson KJ, Lu Q, Clemetson JM. Snake venom proteins affecting platelets and their applications to anti-thrombotic research. *Current Pharmaceutical Design*. 2007; 13(28): 2887–2892.
14. Kamiguti AS, Zuzel M, Theakston RDG. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998; 31(7): 853–862.
15. Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000; 82(9-10): 851–859.
16. Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleón D, et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*. 2005; 45(8): 1063–1074.
17. Eble JA. Matrix biology meets toxinology. *Matrix Biology*. 2010; 29(4): 239–247.
18. Clemetson KJ, Lu Q, Clemetson JM. Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*. 2006; 34(4-5): 150–155.
19. Morita T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*. 2005; 45(8): 1099–1114.
20. Bernardes CP, Santos-Filho NA, Costa TR, et al. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. 2008; 51(4): 574–584.

21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–685.
22. Vilca-Quispe A, Ponce-Soto LA, Winck FV, Marangoni S. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon*. 2010; 55(4): 745–753.
23. Edman P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica*. 1950; 4: 283–293.
24. Edgar W, Prentice CRM. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. *Thrombosis Research*. 1973; 2(1): 85–95.
25. Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010; 496(1): 9–20.
26. Naumann GB, Silva LF, Silva L, et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1810(7): 683–694.
27. Fox JW, Serrano SMT. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal*. 2008; 275(12): 3016–3030.
28. Della-Casa MS, Junqueira-de-Azevedo I, Butera D, et al. Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. *Toxicon*. 2011; 57(1): 125–133.
29. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 102(2): 248–257.
30. Koh CY, Kini RM. From snake venom toxins to therapeutics—cardiovascular examples. *Toxicon*. 2012; 59(4): 497–506.

31. Speich HE, Earhart AD, Hill SN, et al. Variability of platelet aggregate dispersal with glycoprotein IIb-IIIa antagonists eptifibatide and abciximab. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009; 7(6): 983–991.
32. Michelson AD. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010; 9(2): 154–169.
33. Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *The Lancet*. 1999; 353(9148): 227–231.
34. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2005; 31(4): 381–392.
35. Shlansky-Goldberg R. Platelet aggregation inhibitors for use in peripheral vascular interventions: what can we learn from the experience in the coronary arteries? *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2002; 13(3): 229–246.
36. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1996; 12: 697–715.
37. Barja-Fidalgo C, Coelho ALJ, Saldanha-Gama R, Helal-Neto E, Mariano-Oliveira A, de Freitas MS. Disintegrins: integrin selective ligands which activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005; 38(10): 1513–1520.

Figures

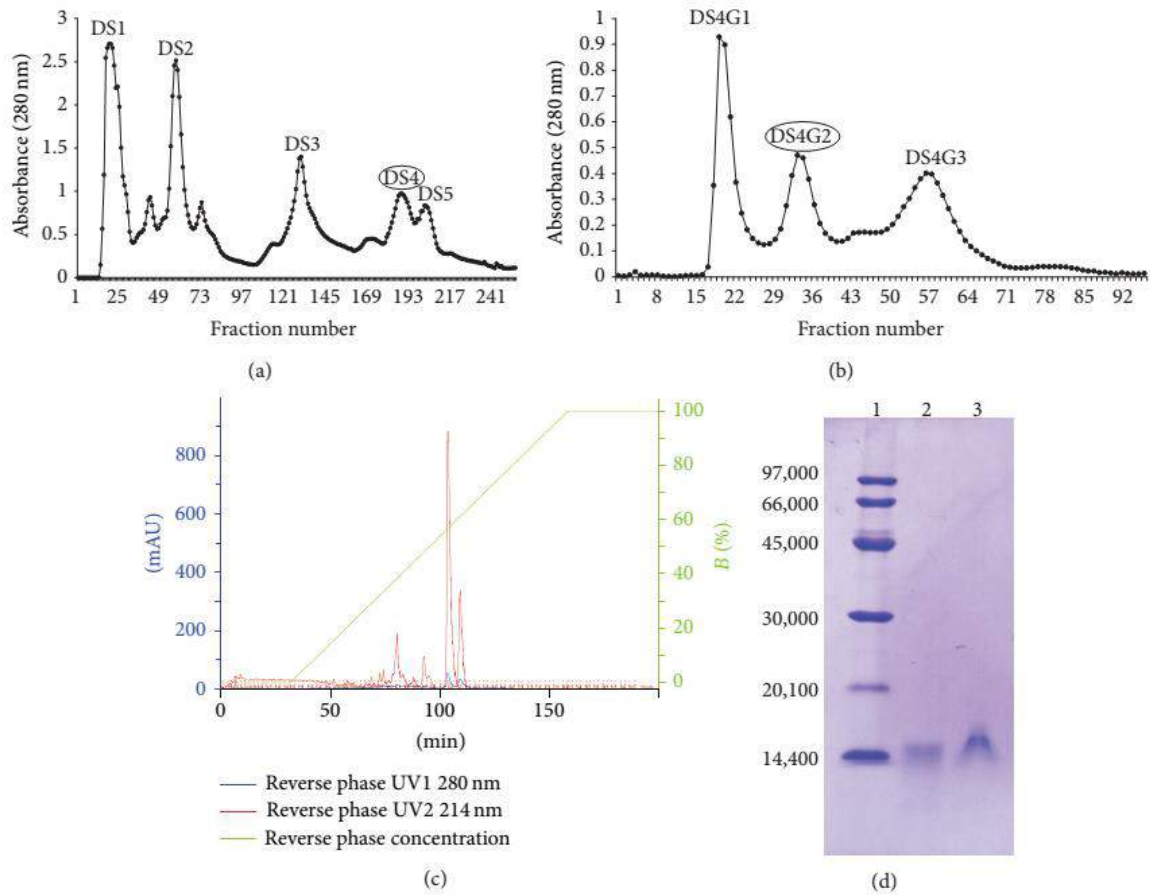


Figure 1. Sequential purification steps of BmooAi from *Bothrops moojeni* venom. (a) Ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephacel column: crude venom (400 mg) was applied to the column (2.5 × 20 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate gradient buffer (50 mmol/L–0.6 mol/L). Fractions of 3.0 mL/tube were collected and their absorbance read at 280 nm. (b) Molecular exclusion on a Sephadex G-75 column: the active fraction (DS4) was applied to the column and eluted with 50 mmol/L ammonium bicarbonate buffer at pH 7.8 with a flow rate of 20 mL/hour. (c) Reverse-phase HPLC chromatography on a 2.0 × 2.5 cm C2/C18 column (GE Health Care), equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid) and eluted with a concentration gradient of solvent B (80% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100% at a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature. (d) SDS-PAGE in a 14% (w/v) gel. Lanes: 1: standard proteins; 2: reduced BmooAi fraction; 3: nonreduced BmooAi fraction. The gel was stained with Coomassie blue R-250.

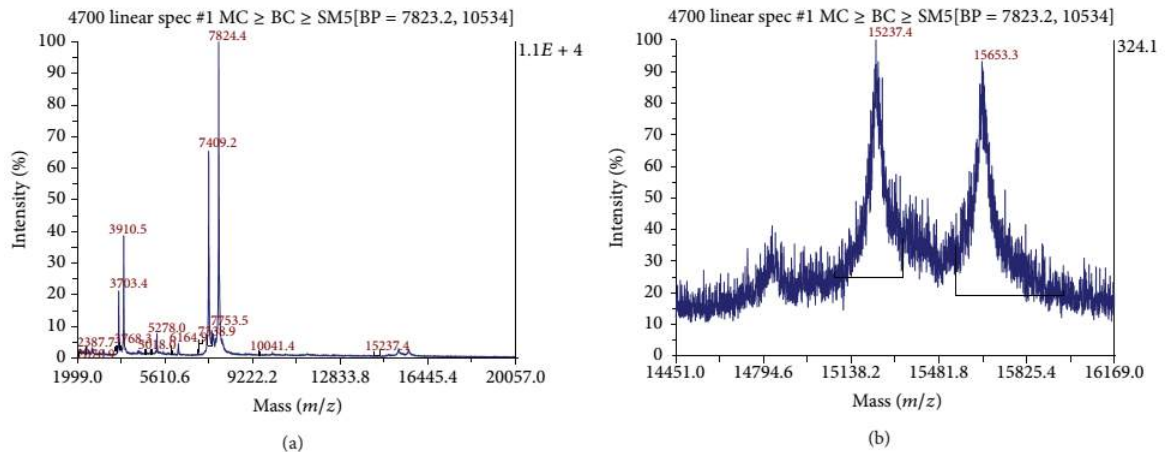


Figure 2. Mass determination of BmooAi by MALDI-TOF mass spectrometry. (a) The fraction consisted of two major components with molecular masses ($M + H$) of 7824.4 and 7409.2. These two compounds are also seen as doubly charged ions ($M/Z = 3910.5$ and 3703.4 , resp.). (b) Expansion of the area around 15 kDa to better visualize the presence of a trace of this protein.

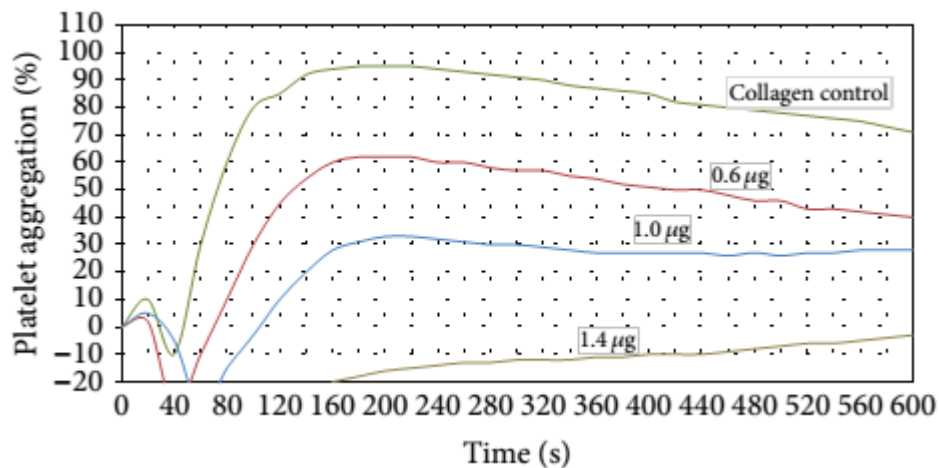


Figure 3. Effect of BmooAi (0.6, 1.0, and $1.4 \mu\text{g}$) on collagen-induced platelet aggregation. Human PRP was preincubated with the indicated doses of BmooAi for 8 min at 37°C before adding collagen ($10 \mu\text{g/mL}$). Platelet aggregation was recorded for 10 min in an AggRAM platelet aggregation system with four-channel laser optics (Helena Laboratories, EUA). Results were expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Control experiments were performed in the absence of BmooAi.

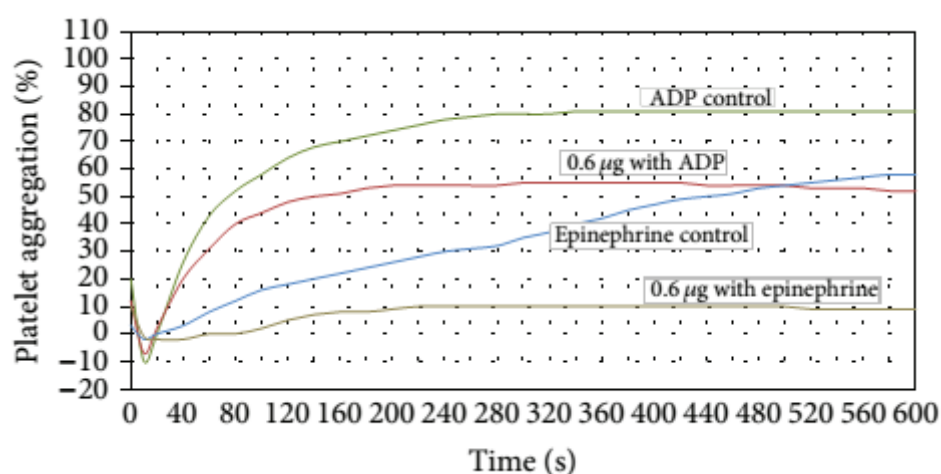


Figure 4. Effect of BmooAi (0.6 μ g) on ADP- and epinephrine-induced platelet aggregation. Human PRP was preincubated with the indicated dose of BmooAi for 8 min at 37°C before adding ADP (20 μ mol/L) or epinephrine (300 μ mol/L). Platelet aggregation was recorded for 10 min in an AggRAM platelet aggregation system with four-channel laser optics (Helena Laboratories, EUA). Results are expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Control experiments were performed in the absence of BmooAi.

Capítulo III

Purification of platelet aggregation activators peptides from *Bothrops moojeni* venom

(Short communication)

PURIFICATION OF PLATELET AGGREGATION ACTIVATORS PEPTIDES FROM *BOTHROPS MOOJENI* VENOM

Mayara Ribeiro de Queiroz^{1,2}, Carla Cristine N. Mamede^{1,2}, Mariana Santos Matias¹, Bruna Barbosa de Sousa^{1,2}, Déborah Fernanda C. Pereira¹, Nadia Cristina G. de Moraes^{1,2}, Fábio de Oliveira^{2,3*}

¹Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901 Belo Horizonte-MG, Brazil ³Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

**Corresponding author.* Av. Pará, 1720, Bairro Umuarama; CEP 38400-902 - Uberlândia, MG - Brazil; Tel. (fax): +55-34-3218-2200. E-mail address: foliveira@umuarama.ufu.br.

Resumo

As peçonhas ofídicas contêm uma mistura complexa de compostos enzimáticos e não enzimáticos que interferem na agregação das plaquetas. Peptídeos que ativam a agregação plaquetária foram purificados a partir da peçonha de *Bothrops moojeni* por dois passos cromatográficos (de troca iônica e exclusão molecular). A agregação induzida por esses peptídeos foi inibida pelos anticorpos monoclonais anti-integrina $\alpha 2b$ (CD41) e anticorpos anti-GP1BA. Estes resultados indicam que estes peptídeos podem ativar as plaquetas por interação com a GPIb ou vWF e essa ativação culmina na ativação de integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Palavras-chave: peçonha de serpente; *Bothrops moojeni*; agregação plaquetária

Abstract

Snake venoms contain complex mixture of nonenzymatic and enzymatic compounds which interfere in platelet aggregation. Peptides that activates platelet aggregation were purified from *Bothrops moojeni* venom by two chromatographic steps (ion-exchange and molecular exclusion). Peptides-induced platelet aggregation was inhibited by monoclonal anti-integrin $\alpha 2b$ (CD41) and anti-GP1BA antibodies. These results indicate that these peptides may activate platelets by interaction with GPIb or vWF and culminates in activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin.

Word Keys: snake venom; *Bothrops moojeni*; platelet aggregation

When a blood vessel is injured, important mechanisms for controlling blood loss are triggered: vasoconstriction, activation and platelets aggregation and blood coagulation (Koh and Kini, 2012). Platelets play an essential role in thrombus formation, closing the leak in the vessel wall. The first step involves immobilization of platelets at sites of vascular injury through specific platelet receptors-exposed subendothelial ligands interactions (adhesion) (Jurk and Kehrel, 2005; Kamiguti, 2005). Under low shear forces, platelets adhere to collagen, fibronectin and laminin, via β_1 integrins. In contrast, under high shear forces, platelets adhere to subendothelial-bound von Willebrand factor (vWF) through GPIb α (Kulkarni et al., 2000; Nieswandt et al., 2001). FvW-GPIb binding is insufficient for stable adhesion for its rapid dissociation rate. However, it is important to recruit platelets to the site of damage and to enable the interaction of other receptors with the thrombogenic surface, as the binding of GPVI, major signaling receptor, to collagen. This interaction triggers intracellular signals that activate platelets, which change their shape and release different mediators, e.g. adenosine diphosphate (ADP) and thromboxane A_2 (TXA $_2$) and start to synthesize prostaglandins. Released molecules, together with locally produced thrombin, amplify activation and mediate recruitment of additional platelets (Jurk and Kehrel, 2005; Nieswandt et al., 2001; Offermanns, 2006; Varga-Szabo et al., 2008). Regardless of the activation via, the final common pathway to platelet aggregation is the $\alpha_{IIb}\beta_3$ receptor. This receptor binds platelet-to-platelet through fibrinogen or vWf and forms the plug (Stavropoulos and Shlansky-Goldberg, 2005; Vorchheimer and Becker, 2006).

Snake venoms contain a complex mixture of nonenzymatic and enzymatic compounds that selectively modulate platelet adhesion, activation and aggregation through a specific effect on adhesion receptors or their ligands (Andrews and Berndt, 2000). The components that interfere with platelet function are divided into two main categories: those which inhibit platelet aggregation (Della-Casa et al., 2011; Jakubowski et al., 2013; Naumann et al., 2011; Queiroz et al., 2014a,b; Silveira et al., 2013) and those that activate it (Andrews et al., 2001; Fully et al., 2004; Rodrigues et al., 2009; Vilca-Quispe et al., 2010). Both attract researchers, the first by medical interest, as a tool for the development of novel therapeutic agents to prevent and treat thrombotic disorders and the latter as a tool for diagnosis (Hutton and Warrell, 1993).

Platelets can be activated by adhesive interactions as well as diverse soluble agonists, such as ADP, arachidonate, serotonin, epinephrine, and thrombin (Wallace and Smyth, 2013). Among the large range of enzymatic components that compose snake venoms, there are many classes described in literature as platelet aggregation inductor, such as phospholipases A₂ (PLA₂s), serine proteinases, metalloproteinases (SVMPs), L-amino acid oxidases (LAAOs) and C-type lectins. Until now, there are no published reports about low molecular weight peptides able to activate platelet aggregation. In this work we report, for the first time, new peptides from *B. moojeni* venom that induce the platelet aggregation.

Desiccated *B. moojeni* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais, SP, Brazil). Crude venom from the *B. moojeni* snake was fractionated using the methodology previously described by Bernardes et al. (2008) with modifications. Crude venom was dissolved in 50 mmol/L ammonium bicarbonate buffer (AMBIC), (pH = 7.8) and clarified by centrifugation at 10,000 ×g for 10 minutes. The supernatant solution was fractionated in a DEAE-Sephacel column with a concentration gradient (50 mmol/L–0.8 mol/L) of AMBIC. The third fraction of this chromatography was applied to a Sephadex G-75 column and eluted with 50 mmol/L AMBIC. The flow rate was 20 mL/hour, fractions with 3.0 mL/tube were collected and absorbance was recorded at a wavelength of 280 nm in both steps. The protein concentration of the fractions was determined using a UV absorption method that calculates concentration from absorbance at 280 nm, using a BioSpec-mini spectrophotometer (Shimadzu Biotech, Japan). Electrophoresis using polyacrylamide gel (SDS-PAGE) was performed as previously described by Laemmli (1970) using 20% gels.

Platelet aggregation assays were performed in human platelet-rich plasma (PRP) and measured using an automated four-channel Aggregometer (AggRAM version 1.1, Helena Laboratories, USA). Human blood from volunteer-donors collected in sodium citrate (3.2%) was centrifuged at 100 × g for 12 min at room temperature to obtain PRP. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained by centrifugation from the residue of citrated blood at 1,000 × g for 15 min. Assays were carried out using 200 µL of PRP maintained at 37°C under continuous stirring in siliconized glass cuvettes. Aggregation was triggered with collagen (10 µg/mL)

or peptides (10, 30 and 50 μg). Platelet aggregation inhibition by antibodies (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was analyzed by pretreatment of PRP with monoclonal anti-GP1BA, anti-GPVI (ab1) and monoclonal anti-integrin $\alpha 2\text{b}$ (CD41) (Sigma-Aldrich Co.) for 5 min and then activated with the peptides (50 μg). One hundred percent (100%) aggregation was expressed as the percentage absorbance relative to PPP aggregation. All experiments were carried out in triplicate and ANOVA were used to measure the different between maximum percentages of each group.

The fractionation of *B. moojeni* venom by ion-exchange chromatography resulted in six major fractions named D1 to D6 (Fig. 1A). Fraction D3 was further fractionated by size exclusion chromatography (Sephadex G-75) and four fractions were collected (D3G1 to D3G4) (Fig. 1B). Electrophoretic analysis (SDS-PAGE 20%) under reducing and nonreducing conditions showed that D3G4 fraction is composed of small peptides, which do not appeared on the electrophoresis due to their low molecular weight (results not shown). Purified peptides represented $\sim 2\%$ (w/w) of the initial *B. moojeni* crude venom.

Peptides were tested on human PRP and activated platelet aggregation in a dose-dependent manner ($F_{3,8}=38.22$, $p<0.001$) (Fig. 2A). These peptides (50 μg)-induced platelet aggregation not differ significantly from that induced by collagen (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Fig. 2A). When preincubated for 15 minutes at 100°C , peptides lose their activity on platelet aggregation (results not shown). These results indicate that the changing of the three-dimensional structure of the peptides by heat leads to loss of activity on platelet aggregation.

Antibodies (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were used to identify the platelet membrane receptors involved in platelet aggregation induced by peptides (Fig. 2B). GPVI is the major signaling receptor for the collagen on platelets (Nieswandt and Watson, 2003). Our results showed that the anti-GPVI (ab1) antibody did not inhibit platelet function. Interesting, the blockade of final pathway of platelet aggregation, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ integrin (Jurk and Kehrel, 2005), by monoclonal anti-integrin $\alpha 2\text{b}$ (CD41) inhibited the peptides effect on platelets. This peptides-induced platelet aggregation was also inhibited by monoclonal anti-GP1BA antibody. These findings suggest that the peptides may activate platelets by interacting with GPIb or vWF and culminates in activation of $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ integrin. GPIb α represents the major functional subunit of the GPIb-V-IX receptor complex. The vWf-GPIb α interaction is

indispensable for platelet tethering at arterial shear rates. This binding initiates signaling that results in $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and platelet aggregation (Gawaz, 2004; Jurk and Kehrel, 2005; Kulkarni et al., 2000; Ruggeri, 2003).

A number of snake venom proteins that specifically modulate vWF-GPIIb interaction have been isolated (Markland, 1998). An example is the serine proteinase bothrombin from *B. jararaca* venom, which activate platelet aggregation by binding to the GPIIb receptor (Nishida et al., 1994; Serrano and Maroun, 2005). These snake venom proteins are suitable probes for basic research on platelet plug formation mediated by vWF and GPIIb-V-IX receptor and for subsidiary diagnostic use for some platelet disorders (Matsui and Hamako, 2005). C-type lectin alboaggregin-B from *Trimeresurus albolabris* venom, also binds to platelet GPIIb receptor and has been used to quantitate vWF receptors on platelets (Kowalska et al., 1998; Peng et al., 1991; Yoshida et al., 1993, 1995). Other C-type lectin, botrocetin from *B. jararaca* venom, even as antibiotic ristocetin, is used to induce vWF-GPIIb interaction *in vitro* (Jurk and Kehrel, 2005; Scott et al., 1991). Botrocetin (Pentapharm) is used for assaying the concentration of vWF in plasma and for detecting vWF-GPIIb-dependent disorders (Andrews et al., 1989; Sajevec et al., 2011; Schmugge et al., 2003).

In summary, we describe, for first time, the purification of activators peptides with low molecular weight from *B. moojeni* venom that induces the platelet aggregation. These peptides-induced platelet aggregation was inhibited by monoclonal anti-integrin α_{2b} (CD41) and anti-GP1BA antibodies. We suggest that the peptides may activate platelets by interacting with GPIIb or vWF and culminates in activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. These peptides could be of interest as a new tool for basic research on platelet plug formation and diagnostic use for some platelet disorders. Anyway, more investigations about these peptides are needed to detail the mechanisms of activation and elucidate molecular characteristics of these activators.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil).

References

- Andrews, R.K., Booth, W.J., Gorman, J.J., Castaldi, P.A., Berndt, M.C., 1989. Purification of botrocetin from *Bothrops jararaca* venom. Analysis of the botrocetin-mediated interaction between von Willebrand factor and the human platelet membrane glycoprotein Ib-IX complex. *Biochemistry* 28, 8317–8326.
- Andrews, R.K.; Berndt, M.C., 2000. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon* 38, 775-791.
- Andrews, R.K., Gardiner, E.E., Asazuma, N., Berlanga, O., Tulasne, D., Nieswandt, B., Smith, A.I., Berndt, M.C., Watson, S.P., 2001. A novel viper venom metalloproteinase, alborhagin, is an agonist at the platelet collagen receptor GPVI. *J. Biol. Chem.* 276, 28092–28097.
- Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S., Torres, F.S., Costa, J., Borges, M.H., Richardson, M., Santos, D.M., Castro Pimenta, A.M., Homsí-Brandeburgo, M.I., Soares, A.M., Oliveira, F., 2008. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon* 51, 574–584.
- Della-Casa, M.S., Junqueira-de-Azevedo, I., Butera, D., Clissa, P.B., Lopes, D.S., Serrano, S.M.T., Pimenta, D.C., Magalhães, G.S., Ho, P.L., Moura-da-Silva, A.M., 2011. Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: Inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. *Toxicon* 57, 125–133.
- Fuly, A.L., Soares, A.M., Marcussi, S., Giglio, J.R., Guimarães, J. A., 2004. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 86, 731–739.
- Gawaz, M., 2004. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc. Res.* 61, 498–511.

Hutton, R.A., Warrell, D.A., 1993. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood reviews* 7, 176–189.

Jakubowski, P., Calvete, J.J., Eble, J.A., Lazarovici, P., Marcinkiewicz, C., 2013. Identification of inhibitors of $\alpha_2\beta_1$ integrin, members of C-lectin type proteins, in *Echis sochureki* venom. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 269, 34–42.

Jurk, K.; Kehrel, B.E., 2005. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Semin. Thromb. Hemost.* 31, 381–392.

Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 1041-1049.

Koh, C.Y.; Kini, R.M., 2012. From snake venom toxins to therapeutics – Cardiovascular examples. *Toxicon* 59, 497–506.

Kowalska, M.A., Tan, L., Holt, J.C., Peng, M., Karczewski, J., Calvete, J.J., Niewiarowski, S., 1998. Alboaggregins A and B. Structure and interaction with human platelets. *Thromb. Haemost.*, 79, 609–613.

Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Yap, C.L., Ravanat, C., Freund, M., Mangin, P., Heel, K. A., Street, A., Harper, I.S., Lanza, F., Jackson, S.P., 2000. A revised model of platelet aggregation. *J. Clin. Invest.* 105, 783–791.

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

Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 36, 1749–1800.

Matsui, T., Hamako, J., 2005. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. *Toxicon* 45, 1075–1087.

Naumann, G.B., Silva, L.F., Silva, L., Faria, G., Richardson, M., Evangelista, K., Kohlhoff, M., Gontijo, C.M.F., Navdaev, A., Rezende, F.F., Eble, J.A., Sanchez, E.F., 2011. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-

amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. Biochim. Biophys. Acta. 1810, 683–694.

Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., Lindhout, T., Heemskerk, J.W.M., Zirngibl H, Fassler R., 2001. Glycoprotein VI but not $\alpha_2\beta_1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. EMBO J. 20, 2120–2130.

Nieswandt B., Watson S.P., 2003. Platelet collagen interaction: is GPVI the central receptor? Blood 102, 449–461.

Nishida, S., Fujimura, Y., Miura, S., Yoshida, E., Sugimoto, M., Yoshioka, A., Fukui, H., Ozaki, Y., Usami, Y., 1994. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry 33, 1843–1849.

Offermanns, S., 2006. Activation of platelet function through G protein–coupled receptors. Circulation Research 99, 1293–1304.

Queiroz, M.R., Mamede, C.C.N., Fonseca, K.C., Morais, N.C., Sousa, B.B., Santos-Filho, N.A., Beletti, M.E., Arantes, E.C., Stanziola, L., Oliveira, F., 2014a. Rapid purification of a new pi class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with antiplatelet activity. Biomed. Res. Int., 1–12.

Queiroz, M.R., Mamede, C.C.N., Morais, N.C.G., Fonseca, K.C., Sousa, B.B., Migliorini, T.M., Pereira, D.F.C., Stanziola, L., Calderon, L.A., Simões-Silva, R., Soares, A.M., Oliveira, F., 2014b. Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation. Biomed. Res. Int., 1–7.

Peng, M., Lu, W., Kirby, E.P., 1991. Alboaggregin-B: a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib. Biochemistry, 30, 11529–11536.

Rodrigues, R.S., Silva, J.F., Boldrini França, J., Fonseca, F.P., Otaviano, A.R., Henrique Silva, F., Hamaguchi, A., Magro, A. J., Braz, A.S.K., Santos, J.I.S., Homs-Brandeburgo, M.I., Fontes, M.R.M., Fuly, A.L., Soares, A.M., Rodrigues,

- V.M., 2009. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie* 91, 490–501.
- Ruggeri, Z.M., 2003. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost.* 1, 1335–1342.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, 57, 627-645.
- Schmugge, M., Rand, M.L., Bang, K.W.A., Mody, M., Dunn, M.S., Amankwah, K.S., Blanchette, V.S., Freedman, J., 2003. The relationship of von Willebrand factor binding to activated platelets from healthy neonates and adults. *Pediatr. Res.*, 54, 474–479.
- Scott, J.P., Montgomery, R.R., Retzinger, G.S., 1991. Dimeric ristocetin flocculates proteins, binds to platelets, and mediates von Willebrand factor-dependent agglutination of platelets. *J. Biol. Chem.* 266, 8149–8155.
- Serrano, S.M., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45, 1115–1132.
- Silveira, L. B., Marchi-Salvador, D. P., Santos-Filho, N. A., Silva, F. P., Marcussi, S., Fuly, A. L., Nomizo, A., Silva, S.L., Stábeli, R.G., Arantes, E.C., Soares, A.M., 2013. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73, 35–43.
- Stavropoulos, S.W., Shlansky-Goldberg, R.D. 2005. Use of antiplatelet inhibitors in peripheral vascular interventions. *Semin. Intervent. Radiol.* 22, 80–87.
- Varga-Szabo, D., Pleines, I., Nieswandt, B. 2008. Cell Adhesion Mechanisms in Platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 403–412.
- Vilca-Quispe, A., Ponce-Soto, L.A., Winck, F.V., Marangoni, S. 2010, Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. *Toxicon* 55, 745–753.

Vorchheimer, D.A., Becker, R. 2006, Platelets in atherothrombosis. Mayo Clinic Proceedings 81, 59–68.

Wallace, E.L.; Smyth, S.S., 2013, Targeting Platelet Thrombin Receptor Signaling to Prevent Thrombosis. Pharmaceuticals 6, 915–928.

Yoshida, E., Fujimura, Y., Miura, S., Sugimoto, M., Fukui, H., Narita, N., Usami, Y., Suzuki, M., Titani, K., 1993. Alboaggregin-B and botrocetin, two snake venom proteins with highly homologous amino acid sequences but totally distinct functions on von Willebrand factor binding to platelets. Biochem. Biophys. Res. Commun., 191, 1386–1392.

Yoshida, E., Fujimura, Y., Ikeda, Y., Takeda, I., Yamamoto, Y., Nishikawa, K., Miyataka, K., Oonuki, M., Kawasaki, T., Katayama, M., 1995. Impaired high-shear-stress-induced platelet aggregation in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. Br. J. Haematol. 89, 861–867.

Figures

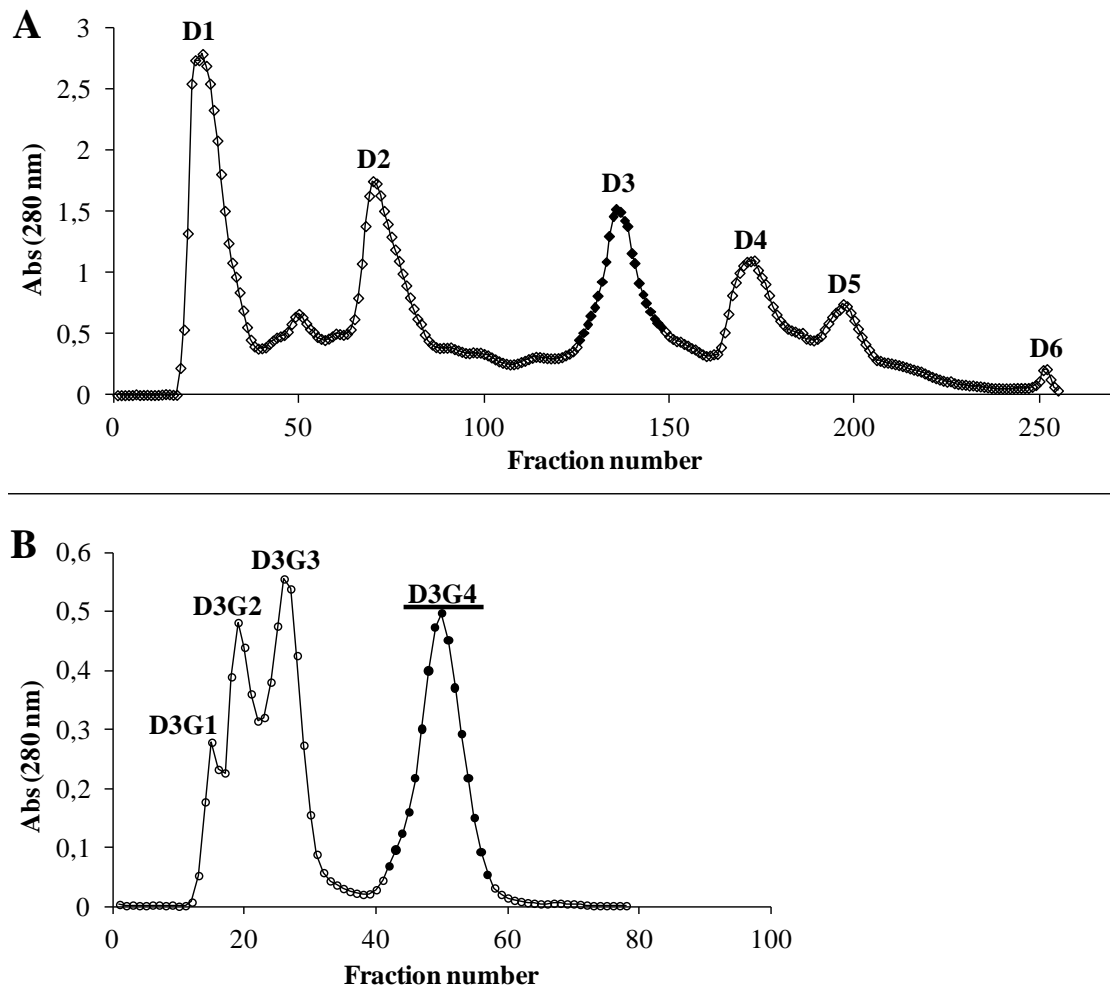


Fig. 1: Sequential purification steps of D3G4 fraction from *B. moojeni* venom. (A) Ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephacel column: crude venom was eluted at a flow rate of 20 mL/h with AMBIC buffer (50 mmol/L–0.8 mol/L). (B) Molecular exclusion on a Sephadex G-75 column: fraction D3 was eluted with 50 mmol/L AMBIC buffer at pH 7.8 with a flow rate of 20 mL/hour. Fractions of 3.0 mL/tube were collected and their absorbance read at 280 nm. Pooled fractions of interest are indicated by the closed circle.

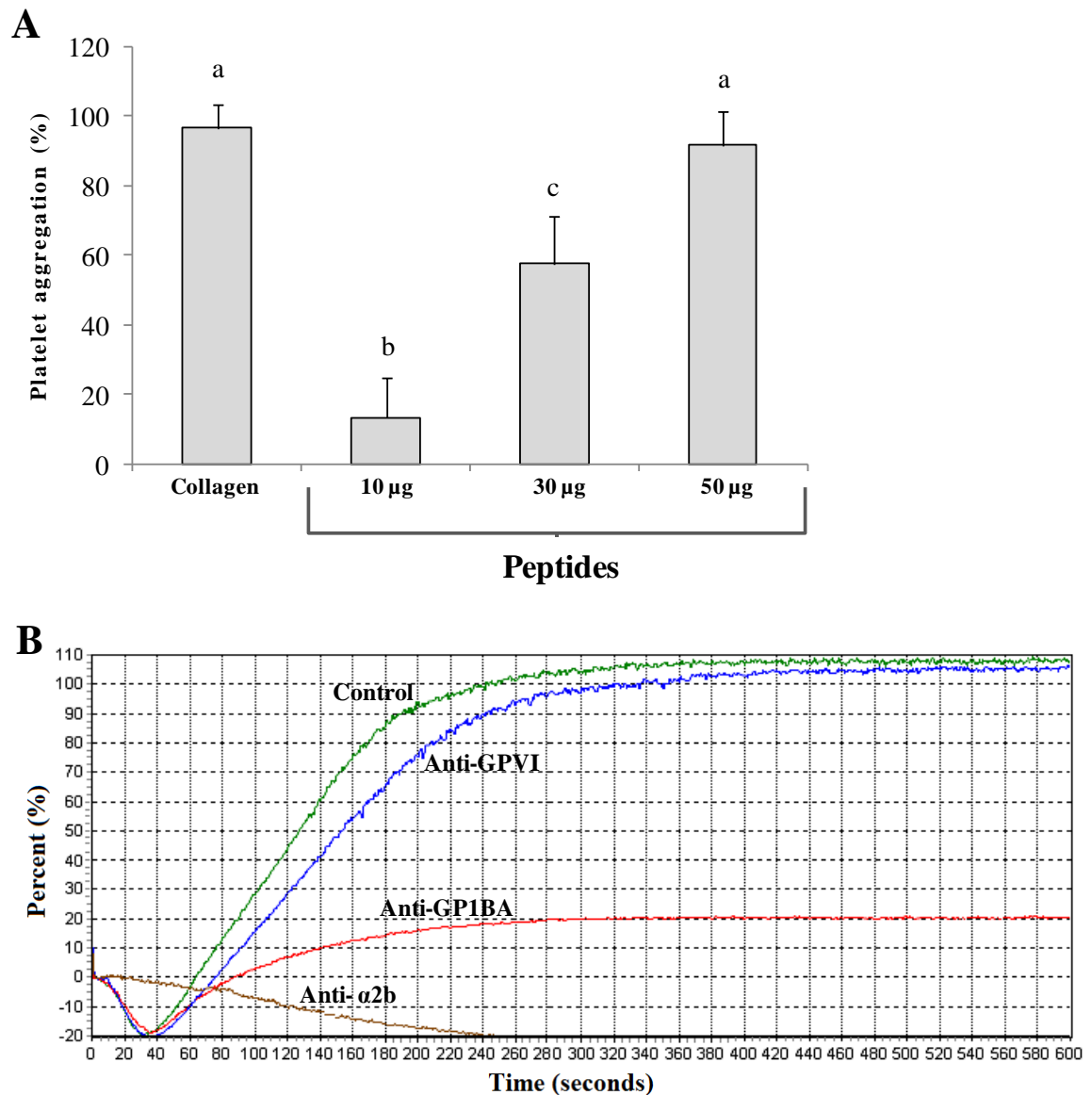


Fig. 2: Peptides-induced platelet aggregation assay and effect of antibodies. (A) D3G4 (10, 30 and 50 µg) -induced platelet aggregation. Aggregation was triggered with collagen (10 µg/mL) or peptides (10, 30 and 50 µg) on PRP. Mean±SD of maximum percentages of platelet aggregation of each group. (B) Inhibition by antibodies (25 µg/mL) was analyzed by pretreatment of PRP with monoclonal anti-GP1BA, anti-GPVI (ab1) and monoclonal anti-integrin α2b (CD41) for 5 min and then activated with peptides. Control experiment was performed using only the peptides (50 µg). Results were expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Different letters indicate statistically significant difference among groups ($p < 0.001$).

Anexos

Artigos publicados relacionados ao tema da tese:

"Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation."

"Rapid purification of a new P-I class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with antiplatelet activity."

Research Article

Purification and Characterization of BmooAi: A New Toxin from *Bothrops moojeni* Snake Venom That Inhibits Platelet Aggregation

Mayara Ribeiro de Queiroz,^{1,2} Carla Cristine N. Mamede,^{1,2} Nadia Cristina G. de Moraes,^{1,2}
Kelly Cortes Fonseca,^{1,2} Bruna Barbosa de Sousa,^{1,2} Thaís M. Migliorini,³
Déborah Fernanda C. Pereira,¹ Leonilda Stanziola,^{2,3} Leonardo A. Calderon,⁴
Rodrigo Simões-Silva,⁴ Andreimar Martins Soares,⁴ and Fábio de Oliveira^{2,3}

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

⁴ Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio), Fundação Oswaldo Cruz Rondônia
(Fiocruz Rondônia) e Núcleo de Saúde, Universidade Federal de Rondônia (UNIR), 76812-245 Porto Velho, RO, Brazil

Correspondence should be addressed to Fábio de Oliveira; foliveira@umarama.ufu.br

Received 1 March 2014; Revised 5 May 2014; Accepted 6 May 2014; Published 29 May 2014

Academic Editor: Phillip I. Bird

Copyright © 2014 Mayara Ribeiro de Queiroz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In this paper, we describe the purification/characterization of BmooAi, a new toxin from *Bothrops moojeni* that inhibits platelet aggregation. The purification of BmooAi was carried out through three chromatographic steps (ion-exchange on a DEAE-Sephacel column, molecular exclusion on a Sephadex G-75 column, and reverse-phase HPLC chromatography on a C2/C18 column). BmooAi was homogeneous by SDS-PAGE and shown to be a single-chain protein of 15,000 Da. BmooAi was analysed by MALDI-TOF Spectrometry and revealed two major components with molecular masses 7824.4 and 7409.2 as well as a trace of protein with a molecular mass of 15,237.4 Da. Sequencing of BmooAi by Edman degradation showed two amino acid sequences: IRDFDPLTNAPENTA and ETEEGAEETQ, which revealed no homology to any known toxin from snake venom. BmooAi showed a rather specific inhibitory effect on platelet aggregation induced by collagen, adenosine diphosphate, or epinephrine in human platelet-rich plasma in a dose-dependent manner, whereas it had little or no effect on platelet aggregation induced by ristocetin. The effect on platelet aggregation induced by BmooAi remained active even when heated to 100°C. BmooAi could be of medical interest as a new tool for the development of novel therapeutic agents for the prevention and treatment of thrombotic disorders.

1. Introduction

Snake venoms are a complex mixture of various proteins, enzymes, and other substances with toxic properties. Among the complex pool of proteins (more than 90% of the dry weight) are included enzymes such as acetylcholinesterases, aminotransferases, phosphoesterases, ADPases, phospholipases, hyaluronidases, L-amino acid oxidases (LAAOs), and proteases (metalloproteinases and serinoproteases) [1–5].

Protein C activators, growth factors (NGF, VEGF), lectins, precursors of bioactive peptides, von Willebrand factor binding proteins, disintegrins, and bradykinin potentiators are some representatives of nonenzymatic components from snake venom [2, 6].

Snake venoms contain a wide variety of nonenzymatic and enzymatic components that have very specific effects on platelet aggregation [7]. Some phospholipases A₂ (PLA₂) can affect platelet function usually due to phospholipid hydrolysis

and the formation of metabolites of arachidonic acid [8–10]. Serinoproteases can activate platelet aggregation directly by proteolytic cleavage of protease-activated receptors (PARs) or by binding to the GPIb receptor [6, 9, 11]. Several snake venom metalloproteinases (SVMPs) have been shown to interfere with platelet function through specific structural or enzymatic effects on platelet receptors or their ligands [6–8]. The effects on platelet aggregation caused by LAAOs are generally related to platelet exposure to hydrogen peroxide which is generated by the enzymatic activity of the toxin [9, 12, 13]. Disintegrins are usually nonenzymatic inhibitors of platelet aggregation, which typically inhibit β_1 , β_3 , and β_5 integrins. A common feature of disintegrins is the presence of the arginine-glycine-aspartate tripeptide sequence (RGD) or a homologous, non-RGD sequence, in their integrin-binding sites. Due to their binding to the fibrinogen receptor GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$), disintegrins inhibit platelet aggregation induced by a wide range of agonists [14–17]. Snake venom C-type lectins are also able to affect platelet function by binding to Von Willebrand factor (vWF) or receptors such as GPIb, $\alpha_2\beta_1$, and GPVI [18, 19]. In contrast, inhibitory effects of 5'-nucleotidases on platelet aggregation probably occur via catalytic activity that causes the degradation of ADP, a platelet aggregation agonist [6].

In this paper, we describe the purification of BmooAi from *B. moojeni* venom and its characterization as a new toxin that inhibits platelet aggregation.

2. Materials and Methods

2.1. Material. Desiccated *B. moojeni* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais, SP, Brazil). Acetonitrile, acrylamide, ammonium bicarbonate, ammonium persulphate, bromophenol blue, bovine fibrinogen, glycine, β -mercaptoethanol, *N,N'*-methylene-bis-acrylamide, sodium dodecyl sulphate (SDS), *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), trifluoroacetic acid, and Tris were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Molecular mass markers for electrophoresis and all chromatographic media (DEAE-Sephacel, Sephadex G-75, and C2/C18 columns) were purchased from GE Healthcare Technologies (Uppsala, Sweden). All the agonists used in the platelet aggregation assays (collagen, adenosine diphosphate, epinephrine, and ristocetin) were purchased from Helena Laboratories (Beaumont, Texas, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Blood Collection. Human blood was obtained from volunteer-donors. The experiments reported here follow the guidelines established by the Human Research Ethics Committees of Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), Minas Gerais, Brazil (Protocol number 055/11).

2.3. Purification of BmooAi. BmooAi was first purified using the methodology previously described [20] with modifications. Crude venom from the *B. moojeni* snake (400 mg) was dissolved in 50 mmol/L ammonium bicarbonate buffer (pH = 7.8) and clarified by centrifugation at 10,000 ×g for

10 minutes. The supernatant solution was fractionated in a DEAE-Sephacel column (2.5 × 20.0 cm) previously equilibrated with 50 mmol/L ammonium bicarbonate (AMBIC), pH = 7.8. Elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with a concentration gradient (50 mmol/L–0.6 mol/L) of the same buffer. Fractions with 3.0 mL/tube were collected and their absorbance was recorded at a wavelength of 280 nm. Fractions corresponding to peak DS4 were pooled, lyophilized, dissolved in 50 mmol/L AMBIC, pH 7.8, and then applied to a Sephadex G-75 column (1.0 × 100.0 cm) previously equilibrated with the same buffer. The flow rate was 20 mL/hour, fractions of 3.0 mL were collected, and their absorbance was recorded at a wavelength of 280 nm. Fraction DS4G2, showing antiplatelet activity, was pooled, lyophilized, dissolved in solvent A (0.1% trifluoroacetic acid), and then subjected to reverse-phase chromatography in a C2/C18 column (4.6 × 100 mm) using the ÄKTApurifier HPLC system. The column was equilibrated with solvent A and eluted applying a concentration gradient toward solvent B (0.1% trifluoroacetic acid containing 80% acetonitrile) from 0 to 100% for column volume at a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature. Absorbance was monitored at wavelengths of 214 and 280 nm and 1 mL fractions were collected.

2.4. Estimation of Protein Concentration. The protein concentration of the fractions was determined using a UV absorption method that calculates concentration from absorbance at 214 nm, using a BioSpec-mini spectrophotometer (Shimadzu Biotech, Japan).

2.5. Electrophoretic Analysis. Electrophoresis using polyacrylamide gel (SDS-PAGE) was performed as previously described [21] using 14% gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer, pH 8.3, containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97,000), bovine serum albumin (66,000), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (30,000), soybean trypsin inhibitor (20,000), and α -lactalbumin (14,000). Gels were stained with Coomassie blue R-250, 0.2% (w/v).

2.6. MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis. The molecular mass of BmooAi was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using a 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) as previously described [22] with modifications.

2.7. N-Terminal Sequence Determination. The N-terminal sequence of BmooAi was determined by Edman degradation [23] performed on an automated sequencer (Procise model 494, Applied Biosystems). The identity of the primary sequence of BmooAi was compared with other proteins using BLAST (Basic Local Alignment Search) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.8. Peptide Synthesis of N-Terminal Sequences. Both the Ile-Arg-Asp-Phe-Asp-Pro-Leu-Thr-Asn-Ala-Pro-Glu-Asn-Thr-Ala and Glu-Thr-Glu-Glu-Gly-Ala-Glu-Glu-Gly-Thr-Gln

sequences were synthesized using GenScript (Piscataway, New Jersey, USA).

2.9. Proteolytic Activity on Fibrinogen. Fibrinogenolytic activity was assayed as previously described [24] with modifications. Fibrinogen (1.5 mg/mL) and samples (5 µg) were mixed 1:100 (w/w) and the mixture was incubated at 37°C for 120 min. The reaction was stopped by the addition of an equal volume of a denaturing buffer containing 2% sodium dodecyl sulphate (SDS) and 10% β-mercaptoethanol. Reaction products were analyzed using 14% (w/v) SDS-PAGE.

2.10. Platelet Aggregation. Platelet aggregation assays were performed in human platelet-rich plasma (PRP) and measured using an automated 4-channel Aggregometer (AggRAM version 1.1, Helena Laboratories, USA). Human blood collected in sodium citrate (3.2%) was centrifuged at 100×g for 12 min at room temperature to obtain PRP. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at 1,000×g for 15 min. Assays were carried out using 200 µL of PRP maintained at 37°C under continuous stirring in siliconized glass cuvettes. Aggregation was triggered with collagen (10 µg/mL), ADP (20 µM), ristocetin (1.5 mg/mL), or epinephrine (300 µM) after the incubation of platelets with different doses of BmooAi (0.6, 1.0, and 1.4 µg). One hundred percent (100%) aggregation was expressed as the percentage absorbance relative to PPP aggregation. Control experiments were performed using only platelet agonists. All experiments were carried out in triplicate.

3. Results and Discussion

In this study, we describe the purification and partial characterization of a new toxin from *B. moojeni* venom that inhibits platelet aggregation. The fractionation of the *B. moojeni* venom was carried out by three chromatographic steps involving ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephadex column, molecular exclusion chromatography on a Sephadex G-75 column, and reverse-phase HPLC chromatography on a C2/C18 column. The fractionation of *B. moojeni* venom by ion-exchange chromatography resulted in five major protein fractions named DS1 through DS5 (Figure 1(a)). Fraction DS4 was further fractionated by size exclusion chromatography (Sephadex G-75) and three fractions were collected (DS4G1 through DS4G3) (Figure 1(b)). All fractions were tested on collagen-, ristocetin-, epinephrine-, or ADP-induced platelet aggregation in human plasma. Fraction DS4G2 (80 µg) inhibited around 85% of collagen-induced and around 75% of ADP-induced platelet aggregation; it was also able to degrade both the Aα and Bβ chains of bovine fibrinogen (results not shown). Even when preincubated at 100°C, fraction DS4G2 maintained its inhibitory effect on platelet aggregation, but lost its fibrinogenolytic activity (results not shown). These results suggest that the effect on aggregation induced by fraction DS4G2 is not dependent on enzymatic action, since the proteins present in this fraction were denatured by a high

temperature. Fraction DS4G2 was lyophilized and subjected to reverse-phase HPLC chromatography on a C2/C18 column (Figure 1(c)). This procedure resulted in four major protein fractions at 214 nm but only two at 280 nm. These results suggest that the first two peaks at 214 nm are composed of proteins poor in aromatic amino acids. The first peak at 214 nm was also analyzed by SDS-PAGE and showed a single polypeptide chain around 15 kDa (Figure 1(d)). This peak was able to interfere with platelet aggregation and was named BmooAi (*Bothrops moojeni* platelet aggregation inhibitor). BmooAi showed no fibrinogenolytic activity.

BmooAi seems to have low expression in *B. moojeni* snake venom, since it represented ~0.005% (w/w) of the initial crude venom. It is not advantageous when compared to the overall yield of other protein molecules with inhibitory effects on platelet aggregation such as atroxlysin-I from *B. atrox* [25] or BI-LAAO from *B. leucurus* [26], which represent around 5.1 and 3.7% (w/w) of their crude venoms, respectively. In this study, we had to repeat the purification steps several times in order to obtain sufficient material for an initial characterization of this new toxin. For this reason, BmooAi concentration determinations were performed by a UV absorption method; thus, there was no sample waste from using traditional methods to determine protein concentration. The low recovery of BmooAi likely discouraged other researchers from investigating this protein, mainly due to the challenges of its purification. In spite of the disadvantages, BmooAi has high antiplatelet activity that may contribute significantly to the overall effects of envenomation by *B. moojeni*.

Mass spectrometry analysis of BmooAi indicated two major components with molecular masses ($M + H$) 7824.4 and 7409.2 (Figure 2(a)). These two compounds are also seen as doubly charged ions ($M/Z = 3910.5$ and 3703.4 , resp.). Figure 2(b) shows traces of a protein with a molecular mass (15237.4) similar to that found via SDS-PAGE (Figure 1(d)). Based on the analysis by SDS-PAGE (single band) and reverse-phase chromatography (symmetric peak), we suggest that BmooAi is a unique protein that undergoes autolysis/proteolysis, releasing two peptides of molecular mass around 7.5 kDa. Indeed, some snake venom toxins can undergo proteolysis/autolysis under nonphysiological conditions *in vitro*, such as in the presence of reducing agents, alkaline pH, or low calcium concentration [27]. Additionally, the presence of two peptides composed of different amino acids corroborates the suggestion that they originate from the autolysis/hydrolysis of BmooAi, since peptides that differ in hydrophobicity should elute in different peaks in reverse-phase chromatography.

BmooAi was subjected to N-terminal sequencing by Edman degradation and revealed two amino-acid sequences: IRDFDPLTNAPENTA and ETEEGAEEGTQ. Both N-terminal sequences were submitted to BLAST but neither shared homology with other snake venom protein. Interestingly, the primary sequence of BmooAi has the sequence APEN in the same position (residues 10–13) occupied by the identical sequence in Insularin, a disintegrin from *B. insularis* venom that inhibits platelet aggregation induced by ADP [28]. This finding deserves attention, but more studies are needed to

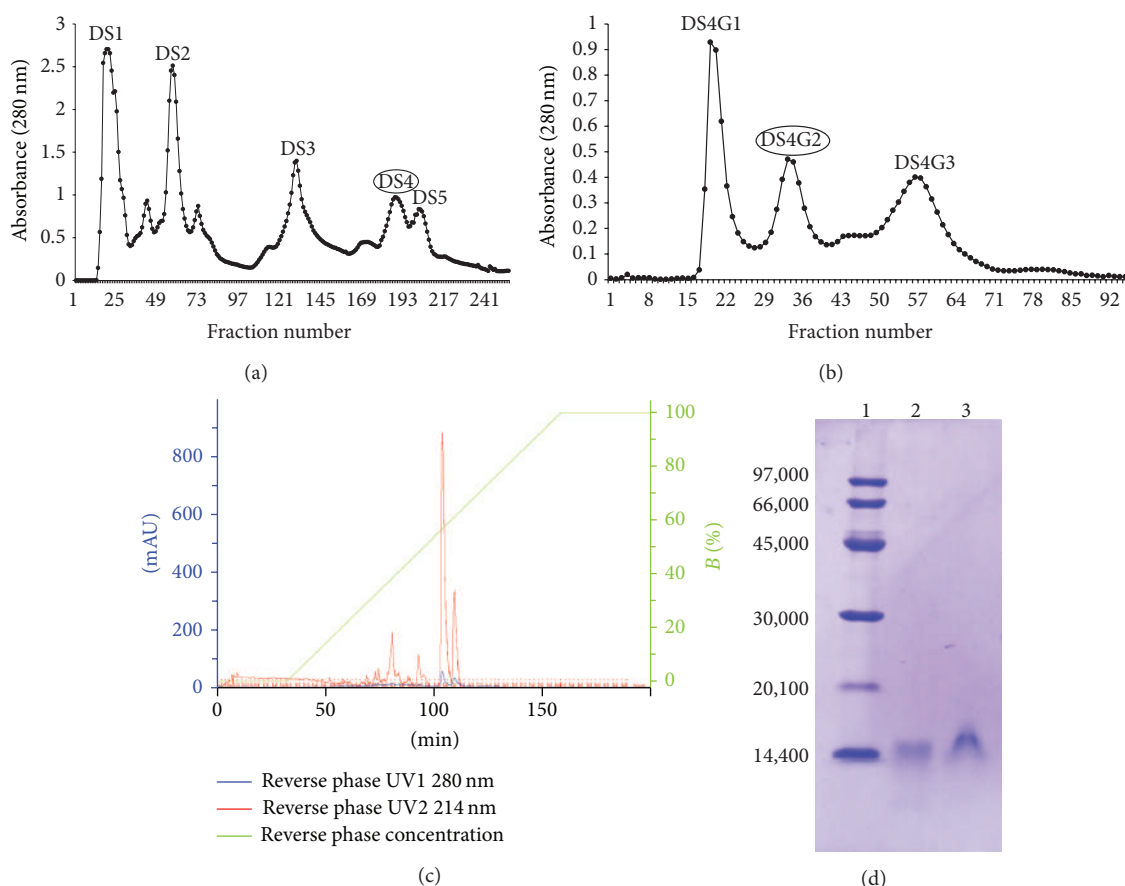


FIGURE 1: Sequential purification steps of BmooAi from *Bothrops moojeni* venom. (a) Ion-exchange chromatography on a DEAE-Sephacel column: crude venom (400 mg) was applied to the column (2.5 × 20 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate gradient buffer (50 mmol/L–0.6 mol/L). Fractions of 3.0 mL/tube were collected and their absorbance read at 280 nm. (b) Molecular exclusion on a Sephadex G-75 column: the active fraction (DS4) was applied to the column and eluted with 50 mmol/L ammonium bicarbonate buffer at pH 7.8 with a flow rate of 20 mL/hour. (c) Reverse-phase HPLC chromatography on a 2.0 × 2.5 cm C2/C18 column (GE Health Care), equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid) and eluted with a concentration gradient of solvent B (80% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100% at a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature. (d) SDS-PAGE in a 14% (w/v) gel. Lanes: 1: standard proteins; 2: reduced BmooAi fraction; 3: nonreduced BmooAi fraction. The gel was stained with Coomassie blue R-250.

elucidate the importance of this sequence for inhibition of platelet aggregation.

Platelets play an essential role in hemostasis. Alterations in normal platelet function are involved in various thrombotic and cardiovascular disorders [29, 30]. Modulation of platelet activation and aggregation are currently applied to treat and prevent cardiovascular disorders and stroke [6, 29, 31, 32].

In this study, we characterized the interference of BmooAi with agonist-induced platelet aggregation (collagen, ADP, epinephrine, and ristocetin). Our results showed that BmooAi inhibited collagen-induced (10 µg/mL) platelet aggregation in a concentration-dependent manner. Complete inhibition of collagen-induced platelet aggregation was obtained with only 1.4 µg of BmooAi (Figure 3). Even after heating to 100°C, BmooAi maintained its inhibitory activity, supporting the hypothesis that its inhibition of platelet aggregation is nonenzymatic in nature (data not shown). The assays

of inhibition of ADP-, epinephrine-, and ristocetin-induced platelet aggregation were performed using a dose of 0.6 µg, due to the low amount obtained from purification. BmooAi inhibited over 80% of epinephrine-induced (300 µM) platelet aggregation and around 30% of ADP-induced aggregation (20 µM) (Figure 4). Under the same conditions, BmooAi did not show any inhibitory effect on ristocetin-induced (1 mg/mL) aggregation.

Platelet aggregation is characterized by the accumulation of platelets into a hemostatic plug. The GPIIb/IIIa receptor plays a central role in linking activated platelets. Independent of the initial stimulus, blocking integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ prevents platelet aggregation and subsequent thrombus formation by preventing binding to fibrinogen. The participation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in platelet aggregation, whatever the initiating event or agonist, justifies the interest in the therapeutic blockade of this receptor, since all routes of platelet activation converge on to this final common pathway [7, 31, 33–35].

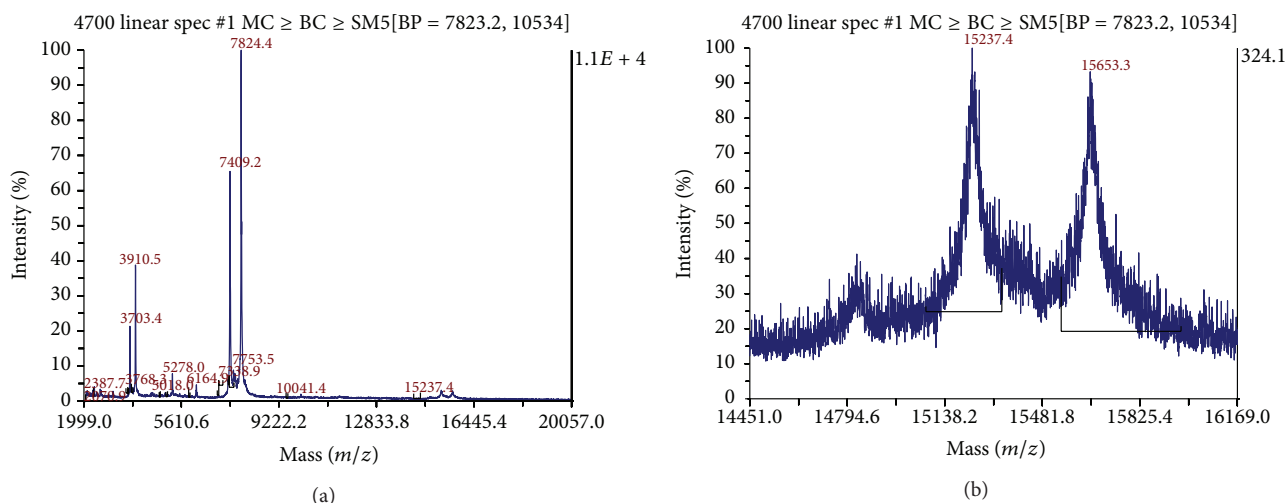


FIGURE 2: Mass determination of BmooAi by MALDI-TOF mass spectrometry. (a) The fraction consisted of two major components with molecular masses ($M + H$) of 7824.4 and 7409.2. These two compounds are also seen as doubly charged ions ($M/Z = 3910.5$ and 3703.4, resp.). (b) Expansion of the area around 15 kDa to better visualize the presence of a trace of this protein.

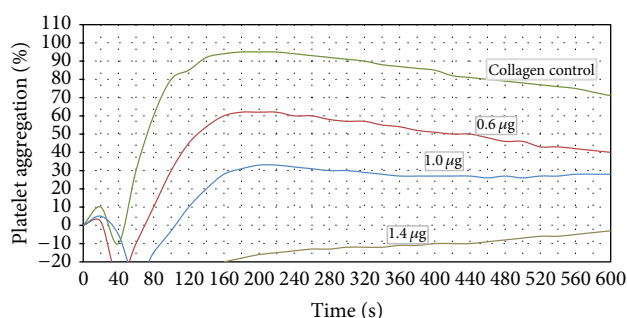


FIGURE 3: Effect of BmooAi (0.6, 1.0, and 1.4 μg) on collagen-induced platelet aggregation. Human PRP was preincubated with the indicated doses of BmooAi for 8 min at 37°C before adding collagen (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Platelet aggregation was recorded for 10 min in an AggRAM platelet aggregation system with four-channel laser optics (Helena Laboratories, EUA). Results were expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Control experiments were performed in the absence of BmooAi.

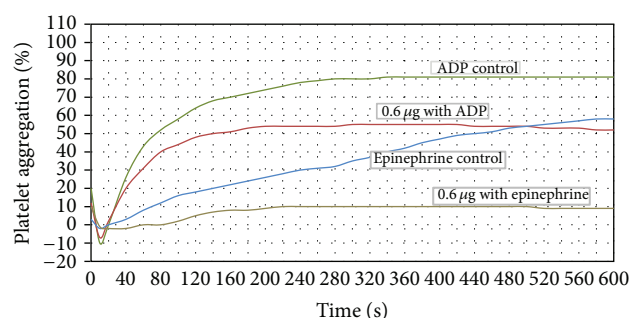


FIGURE 4: Effect of BmooAi (0.6 μg) on ADP- and epinephrine-induced platelet aggregation. Human PRP was preincubated with the indicated dose of BmooAi for 8 min at 37°C before adding ADP (20 $\mu\text{mol}/\text{L}$) or epinephrine (300 $\mu\text{mol}/\text{L}$). Platelet aggregation was recorded for 10 min in an AggRAM platelet aggregation system with four-channel laser optics (Helena Laboratories, EUA). Results are expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Control experiments were performed in the absence of BmooAi.

Here, we show that BmooAi can inhibit ADP-, epinephrine-, and collagen-induced platelet aggregation at low concentrations, which suggests that this toxin may act on integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. On the other hand, the lack of an inhibitory effect on ristocetin-induced platelet aggregation suggests that BmooAi does not interfere with von Willebrand factor.

Disintegrins are a family of cysteine-rich low-molecular-mass polypeptides (40–100 amino acids) present in viperid venoms that are usually nonenzymatic inhibitors of platelet aggregation [6, 14, 15, 17]. They typically have an RGD sequence that binds to integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ and other integrins inhibiting their functions [15, 28, 36]. The RGD sequence presents inhibitory activity on platelet aggregation induced by several agonists [6]. However, the Gly position can be occupied by other individual amino acid residues or even

by two residues in conformationally restrained peptides and still retain integrin-binding activity [36]. In the venom of the same snake species there are disintegrins that exhibit a conserved RGD-motif and disintegrins with variable non-RGD sequences, such as MLD, MGD, VGD, KGD, WGD, or RTS/KTS [16, 17]. However, the short N-terminal sequence of the BmooAi, obtained in this work was not sufficient to show the presence or absence of RGD or variable non-RGD sequences.

In order to determine the influence of the N-terminal region of the peptides found, we synthesized the two peptides and evaluated their effect on aggregation. Neither synthesized peptides (50.0 μg) showed any inhibitory effect on ADP-, epinephrine-, ristocetin-, or collagen-induced platelet aggregation. These results suggest that the antiplatelet action of

BmooAi depends not only on its N-terminal but also on other regions formed by adjacent amino acids and the C-terminal may be essential for its activity [16, 17, 37].

4. Conclusion

In conclusion, we describe a new toxin from snake venom that inhibits platelet aggregation. The reported toxin, BmooAi, has a molecular mass around 15,000 Da and showed no homology with any other snake venom toxin. BmooAi has great potential for pharmacological studies due to the low dose used to inhibit platelet aggregation and can be of medical interest as a new tool for the development of novel therapeutic agents to prevent and treat patients with thrombotic disorders.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil, Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Tecnologia do Acre (FUNTAC/FDCT), Projeto NanoBiotec, Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (BIONORTE/CNPq/MCT), Instituto Nacional para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INCT-INPeTAm/CNPq/MCT) e Instituto Nacional para Pesquisa em Toxinas (INCT-Tox), and Secretaria de Desenvolvimento do Estado de Rondonia (SEPLAN-RO/PRONEX/CNPq). Amy Grabner provided the English editing of the paper.

References

- [1] E. M. Singletary, A. S. Rochman, J. C. A. Bodmer, and C. P. Holstege, "Envenomations," *Medical Clinics of North America*, vol. 89, no. 6, pp. 1195–1224, 2005.
- [2] O. H. P. Ramos and H. S. Selistre-De-Araujo, "Snake venom metalloproteases—structure and function of catalytic and disintegrin domains," *Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology and Pharmacology*, vol. 142, no. 3-4, pp. 328–346, 2006.
- [3] Y. Angulo and B. Lomonte, "Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*," *Toxicon*, vol. 54, no. 7, pp. 949–957, 2009.
- [4] M. S. R. Gomes, M. M. Mendes, F. de Oliveira et al., "BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom," *Toxicon*, vol. 53, no. 1, pp. 24–32, 2009.
- [5] J. D. O. Costa, K. C. Fonseca, M. S. Garrote-Filho et al., "Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms," *Biochimie*, vol. 92, no. 12, pp. 1760–1765, 2010.
- [6] T. Sajevec, A. Leonardi, and I. Križaj, "Haemostatically active proteins in snake venoms," *Toxicon*, vol. 57, no. 5, pp. 627–645, 2011.
- [7] A. S. Kamiguti, "Platelets as targets of snake venom metalloproteinases," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1041–1049, 2005.
- [8] F. S. Markland, "Snake venoms and the hemostatic system," *Toxicon*, vol. 36, no. 12, pp. 1749–1800, 1998.
- [9] Q. Lu, J. M. Clemetson, and K. J. Clemetson, "Snake venoms and hemostasis," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 3, no. 8, pp. 1791–1799, 2005.
- [10] N. A. Santos-Filho, L. B. Silveira, C. Z. Oliveira et al., "A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom," *Toxicon*, vol. 52, no. 8, pp. 908–917, 2008.
- [11] B. F. Santos, S. M. T. Serrano, A. Kuliopulos, and S. Niewiarowski, "Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets," *FEBS Letters*, vol. 477, no. 3, pp. 199–202, 2000.
- [12] M. A. Belisario, S. Tafuri, C. Di Domenico et al., "H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1495, no. 2, pp. 183–193, 2000.
- [13] K. J. Clemetson, Q. Lu, and J. M. Clemetson, "Snake venom proteins affecting platelets and their applications to anti-thrombotic research," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 13, no. 28, pp. 2887–2892, 2007.
- [14] A. S. Kamiguti, M. Zuzel, and R. D. G. Theakston, "Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, no. 7, pp. 853–862, 1998.
- [15] S. Braud, C. Bon, and A. Wisner, "Snake venom proteins acting on hemostasis," *Biochimie*, vol. 82, no. 9-10, pp. 851–859, 2000.
- [16] J. J. Calvete, C. Marcinkiewicz, D. Monleón et al., "Snake venom disintegrins: evolution of structure and function," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1063–1074, 2005.
- [17] J. A. Eble, "Matrix biology meets toxinology," *Matrix Biology*, vol. 29, no. 4, pp. 239–247, 2010.
- [18] K. J. Clemetson, Q. Lu, and J. M. Clemetson, "Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors," *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, vol. 34, no. 4-5, pp. 150–155, 2006.
- [19] T. Morita, "Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1099–1114, 2005.
- [20] C. P. Bernardes, N. A. Santos-Filho, T. R. Costa et al., "Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom," *Toxicon*, vol. 51, no. 4, pp. 574–584, 2008.
- [21] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [22] A. Vilca-Quispe, L. A. Ponce-Soto, F. V. Winck, and S. Marangoni, "Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*," *Toxicon*, vol. 55, no. 4, pp. 745–753, 2010.
- [23] P. Edman, "Method for determination of the amino acid sequence in peptides," *Acta Chemica Scandinavica*, vol. 4, pp. 283–293, 1950.
- [24] W. Edgar and C. R. M. Prentice, "The proteolytic action of anacrod on human fibrinogen and its polypeptide chains," *Thrombosis Research*, vol. 2, no. 1, pp. 85–95, 1973.

- [25] E. F. Sanchez, F. S. Schneider, A. Yarleque et al., "The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 496, no. 1, pp. 9–20, 2010.
- [26] G. B. Naumann, L. F. Silva, L. Silva et al., "Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an l-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1810, no. 7, pp. 683–694, 2011.
- [27] J. W. Fox and S. M. T. Serrano, "Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity," *FEBS Journal*, vol. 275, no. 12, pp. 3016–3030, 2008.
- [28] M. S. Della-Casa, I. Junqueira-de-Azevedo, D. Butera et al., "Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins," *Toxicon*, vol. 57, no. 1, pp. 125–133, 2011.
- [29] L. K. Jennings, "Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 102, no. 2, pp. 248–257, 2009.
- [30] C. Y. Koh and R. M. Kini, "From snake venom toxins to therapeutics—cardiovascular examples," *Toxicon*, vol. 59, no. 4, pp. 497–506, 2012.
- [31] H. E. Speich, A. D. Earhart, S. N. Hill et al., "Variability of platelet aggregate dispersal with glycoprotein IIb-IIIa antagonists eptifibatide and abciximab," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, no. 6, pp. 983–991, 2009.
- [32] A. D. Michelson, "Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 2, pp. 154–169, 2010.
- [33] E. J. Topol, T. V. Byzova, and E. F. Plow, "Platelet GPIIb-IIIa blockers," *The Lancet*, vol. 353, no. 9148, pp. 227–231, 1999.
- [34] K. Jurk and B. E. Kehrel, "Platelets: physiology and biochemistry," *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 31, no. 4, pp. 381–392, 2005.
- [35] R. Shlansky-Goldberg, "Platelet aggregation inhibitors for use in peripheral vascular interventions: what can we learn from the experience in the coronary arteries?" *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 13, no. 3, pp. 229–246, 2002.
- [36] E. Ruoslahti, "RGD and other recognition sequences for integrins," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 12, pp. 697–715, 1996.
- [37] C. Barja-Fidalgo, A. L. J. Coelho, R. Saldanha-Gama, E. Helal-Neto, A. Mariano-Oliveira, and M. S. de Freitas, "Disintegrins: integrin selective ligands which activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 38, no. 10, pp. 1513–1520, 2005.

Research Article

Rapid Purification of a New P-I Class Metalloproteinase from *Bothrops moojeni* Venom with Antiplatelet Activity

Mayara R. de Queiroz,^{1,2} Carla C. Neves Mamede,^{1,2} Kelly C. Fonseca,^{1,2}
Nadia C. G. de Moraes,^{1,2} Bruna B. de Sousa,^{1,2} Norival A. Santos-Filho,³ Marcelo E. Beletti,⁴
Eliane C. Arantes,³ Leonilda Stanziola,^{2,4} and Fábio de Oliveira^{2,4}

¹ Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

² Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

⁴ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

Correspondence should be addressed to Fábio de Oliveira; foliveira@umarama.ufu.br

Received 24 February 2014; Revised 1 May 2014; Accepted 12 May 2014; Published 1 June 2014

Academic Editor: Jozef Anné

Copyright © 2014 Mayara R. de Queiroz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present study aimed to evaluate the proteolytic and biological activities of a new metalloproteinase from *B. moojeni* venom. The purification of BmooMP α -II was carried out through two chromatographic steps (ion-exchange and affinity). BmooMP α -II is a monomeric protein with an apparent molecular mass of 22.5 kDa on SDS-PAGE 14% under nonreducing conditions. The N-terminal sequence (FSPRYIELVVADHGMFTKYKSNLN) revealed homology with other snake venom metalloproteinases, mainly among P-I class. BmooMP α -II cleaves A α -chain of fibrinogen followed by B β -chain, and does not show any effect on the γ -chain. Its optimum temperature and pH for the fibrinogenolytic activity were 30–50°C and pH 8, respectively. The inhibitory effects of EDTA and 1,10-phenanthroline on the fibrinogenolytic activity suggest that BmooMP α -II is a metalloproteinase. This proteinase was devoid of haemorrhagic, coagulant, or anticoagulant activities. BmooMP α -II caused morphological alterations in liver, lung, kidney, and muscle of Swiss mice. The enzymatically active protein yet inhibited collagen, ADP, and ristocetin-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner. Our results suggest that BmooMP α -II contributes to the toxic effect of the envenomation and that more investigations to elucidate the mechanisms of inhibition of platelet aggregation may contribute to the studies of snake venom on thrombotic disorders.

1. Introduction

Snake venoms comprise a complex mixture of proteins, organic compounds with low molecular mass, and inorganic compounds [1–3]. The biologically active proteins and peptides induce a wide variety of effects on preys and human victims [4]. Viperid venoms contain powerful enzymatic and nonenzymatic components that affect haemostatic mechanism, such as proteinases, phospholipases A₂, and disintegrins [5–14].

Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs) play a key role in local tissue damage and systemic alterations resulting from viperid snake envenomations. These enzymes can induce haemorrhage, necrosis, oedema, skin damage, and

inflammation, and degrade extracellular matrix components and impair the regeneration of affected skeletal muscle [6, 9, 15–17]. SVMPs can also affect platelet function through specific structural or enzymatic effects on platelet receptors or their ligands and the coagulation cascade by multiple mechanisms [2, 13, 15, 18].

In Brazil, *Bothrops* snakes are responsible for more than 90% of all snakebites in which the species was identified, representing a serious medical problem [19]. *B. moojeni* is a snake that occurs in central and southeastern Brazil and adjacent countries including Paraguay and Argentina. *B. moojeni* are predominantly found in riparian vegetation in the central Brazilian savannahs, such as gallery forests and adjacent wet grasslands, although they are occasionally

found in drier interfluvial areas [20]. This snake is responsible for the majority of snakebite accidents that occurred in the Triângulo Mineiro region and were registered in the Hospital of Clinics of the Federal University of Uberlândia-MG. In this work, we describe the purification, determination of N-terminal amino acid sequence, and functional characterisation of BmooMP α -II, a metalloproteinase from *B. moojeni* snake venom with antiplatelet activity.

2. Materials and Methods

2.1. Materials. Desiccated *B. moojeni* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais, SP, Brazil). Acrylamide, ammonium bicarbonate, ammonium persulphate, aprotinin, benzamidine, bromophenol blue, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), bovine fibrinogen, β -mercaptoethanol, leupeptin, N,N'-methylene-bis-acrylamide, sodium dodecyl sulphate (SDS), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), 1,10-phenanthroline, and DEAE-Sephacel column were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Glycine, tris, molecular weight markers for electrophoresis, and benzamidine-sepharose column were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). All the agonists used in the platelet aggregation assays (collagen, adenosine diphosphate and ristocetin) were purchased from Helena Laboratories (Beaumont, Texas, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Animals. Swiss male mice (20–25 g) and Wistar male rats (200–250 g) were maintained under controlled temperature ($22\pm 2^\circ\text{C}$), humidity (60–70%), and light/dark cycle (12 hours) with free access to food and water. The experiments were carried out in accordance with the current guidelines established by Ethical Committee in Animals Experimentation of Federal University of Uberlândia (Minas Gerais, Brazil; protocol 108/12).

2.3. Blood Collection. Human blood was obtained through donation from volunteers. The experiments reported here followed the guidelines established by the Human Research Ethics Committees of Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), Minas Gerais, Brazil (Protocol n° 055/11).

2.4. Isolation of BmooMP α -II. Crude venom of *B. moojeni* (400 mg) was dissolved in 50 mmol/L ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, and clarified by centrifugation at $10,000\times g$ for 10 min. The supernatant solution was chromatographed on a DEAE-Sephacel column ($2.5\times 20\text{ cm}$) previously equilibrated with 50 mmol/L ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, and eluted with a concentration gradient (50 mmol/L–0.6 mol/L) of the same buffer. Elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h and fractions of 3.0 mL/tube were collected. The fibrinogenolytic fraction (peak DS7) was pooled, lyophilised, and applied on a benzamidine-sepharose column, previously equilibrated with 50 mmol/L Tris-HCl and 500 mmol/L NaCl buffer (pH 7.4). The samples were eluted with 50 mmol/L glycine buffer, pH 3.0. Elution was carried out at a flow rate of 30 mL/h; fractions of 3.0 mL/tube

were collected and their absorbances at 280 nm were read. The enzyme that was not absorbed by the column was named BmooMP α -II.

2.5. Estimation of Protein Concentration. Protein concentration was determined by the microbiuret method of Itzhaki and Gill [21], using bovine serum albumin as standard.

2.6. Electrophoretic Analysis. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) was performed by the method of Laemmli [22] using 14% (w/v) gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer, pH 8.3, containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactalbumin (14.4 kDa). Gels were stained with Coomassie blue R-250, 0.2% (w/v). The relative molecular mass of BmooMP α -II was estimated by Kodak 1D image analysis software.

2.7. N-Terminal Sequencing. The N-terminal sequence of BmooMP α -II was determined by Edman degradation, performed on an automated sequencer model PPSQ-33A (Shimadzu Co., Kyoto, Japan). The identity of the primary sequence of BmooMP α -II compared with other proteins was evaluated using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.8. Proteolytic Activity upon Fibrinogen. Fibrinogenolytic activity was assayed as previously described by Rodrigues et al. [23], with modifications. Samples of 25 μL of bovine fibrinogen (3 mg/mL saline) were incubated with 10 μg of BmooMP α -II at 37°C for different periods of time (0, 15, 30, 60, and 120 minutes). The reaction was stopped with 0.0625 mol/L Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 10% (v/v) glycerol, 10% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.2% (w/v) SDS, and 0.001% (w/v) bromophenol blue. Reaction products were analysed by 14% (w/v) SDS-PAGE. The effect of inhibitors on the fibrinogenolytic activity was assayed after preincubation of BmooMP α -II (10 μg) in saline, pH 8.0, for 15 minutes with each of following inhibitors (5 mmol/L): EDTA, β -mercaptoethanol, 1,10-phenanthroline, benzamidine, leupeptin, and aprotinin. The thermal stability of BmooMP α -II was tested by preincubating the enzyme (10 μg) in saline, pH 8.0, for 15 min at varying temperatures ($30\text{--}90^\circ\text{C}$). Similarly, 10 μg of BmooMP α -II was preincubated at different pH (4.0 to 10.0). The treated samples were added to bovine fibrinogen and incubated for 60 minutes at 37°C . The reaction was stopped and analysed by 14% (w/v) SDS-PAGE.

2.9. Haemorrhagic Activity. Haemorrhagic activity was determined by the method of Nikai et al. [24], with slight modifications. Test solutions of BmooMP α -II (100 μg) were subcutaneously injected into the dorsal skin of mice ($n = 3$). Control animals received the same volume of sterile saline. After 3 hours, mice were sacrificed by overdose of

ketamine/xylazine. The skin was removed and the diameter of haemorrhagic spot was measured on the inside surface.

2.10. Defibrinating Activity. Defibrinating activity was tested by the method of Gene et al. [25], with slight modifications. Groups of three Swiss male mice were injected i.p. with BmooMP α -II (100 μ g/100 μ L saline). Control animals received the same volume of sterile saline. After one hour, mice were sacrificed by overdose of ketamine/xylazine and bled by cardiac puncture. Whole blood was placed in tubes and kept at 25–30°C. Activity was determined by measuring the time until blood clotting onset.

2.11. Blood Clotting Activity. Clotting activity was assayed on platelet-rich plasma (PRP). Human blood collected in sodium citrate (3.2%) was centrifuged at 100 \times g for 12 minutes at room temperature to obtain PRP. BmooMP α -II (10 μ g/10 μ L saline) or the same volume of saline (negative control) or 0.2 mol/L calcium chloride (positive control) was added to 200 μ L of human PRP at 37°C. Clotting activity was determined by measuring the time until fibrin clot onset.

2.12. Histological Characterisation of Pathological Effects. Systemic histological alterations induced by BmooMP α -II in various organs were assayed as described by Costa et al. [6], with some modifications. Groups of four mice were injected i.p. with BmooMP α -II (50 μ g/100 μ L saline) or *B. moojeni* crude venom (50 μ g/100 μ L saline). Control animals received i.p. injection of 100 μ L of saline under identical conditions.

Myotoxic activity was assayed as described by Rodrigues et al. [17], with slight modifications. Groups of four mice were injected i.m. in the right gastrocnemius muscle with BmooMP α -II (50 μ g/50 μ L saline) or *B. moojeni* crude venom (50 μ g/50 μ L saline). Control animals received i.m. injection of 50 μ L of saline under identical conditions.

After 24 hours of injection, mice were sacrificed by overdose of ketamine/xylazine and heart, lung, liver, kidney, and right gastrocnemius muscle were dissected out. For histological analysis, the different tissues were then fixed in solution containing 10% (v/v) formalin, dehydrated by increasing concentrations of ethanol (70 a 100%), diaphanised with xylol, and embedded in paraffin. Thick sections (5 μ m) were cut in a microtome and stained with hematoxylin-eosin to be examined under a light microscope.

2.13. Platelet Aggregation. Platelet aggregation assays were performed in human PRP and measured using an automated 4 channel Aggregometer (AggRAMTM version 1.1, Helena Laboratories, USA). Human blood collected in sodium citrate (3.2%) was centrifuged at 100 \times g for 12 minutes at room temperature to obtain PRP. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at 1,000 \times g for 15 minutes. Assays were carried out using 200 μ L of PRP maintained at 37°C under continuous stirring in siliconized glass cuvettes. Aggregation was triggered with collagen (10 μ g/mL), ADP (20 μ M) or ristocetin (1.5 mg/mL) immediately after adding BmooMP α -II (20, 40 or 80 μ g) to human PRP. One hundred percent (100%) aggregation was expressed as the percentage absorbance relative to PPP

aggregation. Control experiments were performed using only platelet agonists. All experiments were carried out in triplicate.

2.14. Statistical Analysis. The statistical analyses were carried out by ANOVA using the GraphPad prism program version 5.01. Differences with *P* values of less than 5% (*P* < 0.05) were considered significant.

3. Results and Discussion

Proteolytic enzymes from snake venoms have attracted the interest of researchers due to their important role in envenomation caused by *Bothrops* snakes. In this work, we describe the purification and characterisation of a P-I SVMF from *B. moojeni* venom. The proteinase was purified from crude venom using a DEAE-Sephacel column producing eight main protein fractions (Figure 1(a)). The proteins present in the DS7 fraction showed substantial fibrinogenolytic activity (data not shown). The DS7 fraction was further fractionated using affinity chromatography on a benzamidine sepharose column (Figure 1(b)). The nonadsorbed fraction showed a single-band protein with great purity level, which we named BmooMP α -II. Electrophoretic analysis (SDS-PAGE) under reducing and nonreducing conditions indicated that the BmooMP α -II enzyme had a molecular mass about 25.5 and 22.5 kDa, respectively (Figure 1(c)). This molecular mass is similar to other bothropic SVMFs such as BjussuMP-II (24 kDa) from *B. jararacussu* [26], BmooMP α -I (24.5 kDa) from *B. moojeni* [27], Atroxlysin-I (23 kDa) from *B. atrox* [28], and BleucMP (23.5 kDa) from *B. leucurus* [10].

BmooMP α -II represents around 0.9% of the *B. moojeni* crude venom (data not shown). This yield was similar to the haemorrhagic metalloproteinase BlaH1 (0.8–1%) from *B. lanceolatus* venom [29]. In contrast, the yield was lower than several proteinases purified from bothropic venom by different methodologies such as BthMP [9] and BmooMP α -I [27] representing 2.3% and 8.7% of *B. moojeni* venom, respectively; BpSP-I represents about 3% of *B. pauloensis* venom [30] and Leucurobin represents about 3.5% of *B. leucurus* venom [31].

Both BmooMP α -II and BmooMP α -I (which was purified by Bernardes et al. [27]) were purified from the same snake venom. However, though both proteins are fibrinogenolytic enzymes and have similar molecular mass they differ from each other mainly because BmooMP α -II was obtained from the DS7 fraction while BmooMP α -I was obtained from the DS2 fraction.

BmooMP α -II was subjected to N-terminal sequencing by Edman degradation. The first 25 amino acid residues from N-terminal sequencing (FSPRYIELVVADHGMFTKYK-SNLN) were submitted to BLAST. The primary sequence of the BmooMP α -II shared a high degree of identity with other P-I SVMFs, such as BmooMP α -I from *B. moojeni* [27], leucurolysin-a from *B. leucurus* [32], Bap1 from *B. asper* [33–35], BaTX-I from *B. atrox* [36], and BnP1 from *Bothropoides pauloensis* [37] (Figure 2).

Fibrinogenolytic enzymes found in snake venoms may be classified depending on the specificity of hydrolysis of

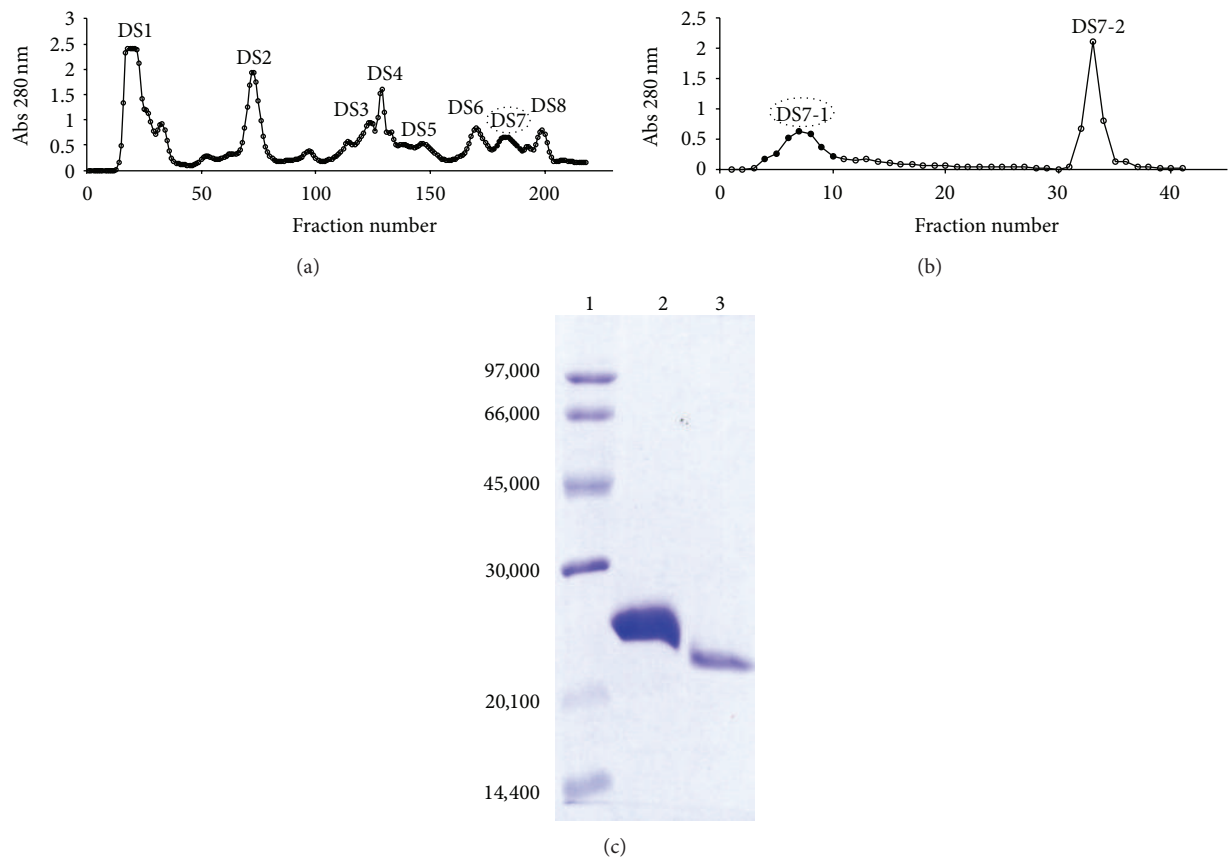


FIGURE 1: Purification of the BmooMPα-II from *B. moojeni* venom. (a) Separation on DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography: crude venom (400 mg) was applied on the column (2.5 × 20 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate gradients buffer (50 mmol/L–0.6 mol/L). Fractions of 3.0 mL/tube were collected and their absorbances at 280 nm were read. (b) Separation on benzamidine sepharose affinity chromatography: fraction DS7 was applied to the column previously equilibrated with 50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4. After elution of the unbound fraction, 50 mmol/L glycine buffer, pH 3.0, was applied to the column and the absorbance of the fractions was monitored at 280 nm. Fractions of 3.0 mL/tube were collected at a flow rate of 30 mL/h. Pooled fractions are indicated by the closed circle. (c) SDS-PAGE in 14% (w/v) gel. Lanes: 1-standard proteins; 2-reduced BmooMPα-II; 3-non-reduced BmooMPα-II. The gel was stained with Coomassie blue R-250.

				Identity (%)
BmooMPalpha-II	1	---FSPRYIELVVADHGMFTKYKSNLN-----	25	--
BmooMPalpha-I	1	EqQKFSPRYIELVVADHGMFKKYNSNLNTIRKVV	35	92
Leuc-A	1	--QQFSPRYIELVVADHGMFKKYNSNLNTIRKVV	33	92
Bap1	1	X--RFSPRYIELAVVADHGIFTKYNSNLNTIRTRV	33	88
Batx-1	1	-----YIELAVVADHGIFTKYNSNLNTIR---	24	86
BnP1	1	SqIKFKPSYIELAVVADHGMFTKYNSNLNTIR-IV	34	80

FIGURE 2: Sequence alignments of the initial N-terminal of BmooMPα-II with other metalloproteinases from P-I SVMP. BmooMPα-I from *B. moojeni* (see [27], P85314.2); leucorolysin-a from *B. leucurus* (see [32], P84907.2); Bap1 from *B. asper* (see [33–35], 1ND1.A); BaTX-I from *B. atrox* (see [36], P0DJE1.1); BnP1 from *Bothropoides pauloensis* (see [37], P0C6S0.1). The highly conserved residues are in bold, and those conserved are highlighted in gray.

the fibrinogen chains [2]. BmooMPα-II was active upon bovine fibrinogen, preferentially hydrolysing the Aα chain followed by the Bβ chain, while apparently the γ chain was unchanged. Aα- and Bβ-chain degradation was completed after 60 min incubation (Figure 3(a)). Therefore, BmooMPα-II is classified as α-fibrinogenase, similar to neuwiedase [23], BlaH1 [29], BjussuMP-II [26], BmooMPα-I [27], BthMP [9], and BleucMP [10].

BmooMPα-II is able to hydrolyze bovine fibrinogen by molecular mechanisms that are not understood. Okamoto et al. [38] showed that the BmooMPα-I is active upon neuro- and vasoactive peptides including angiotensin I, bradykinin, neurotensin, oxytocin, and substance P. Interestingly, BmooMPα-I showed a strong bias towards hydrolysis after proline residues, which is unusual for most of characterized peptidases. Moreover, BmooMPα-I showed

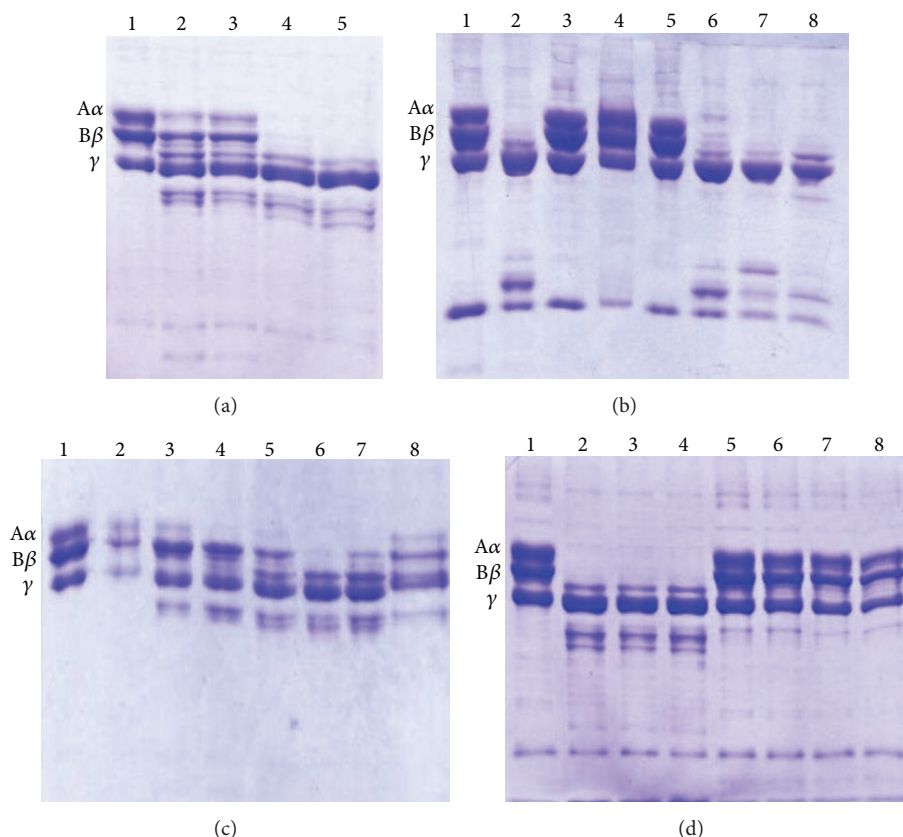


FIGURE 3: Proteolysis of bovine fibrinogen by BmooMP α -II. Line 1: negative control-fibrinogen incubated with enzyme for 0 minutes. (a) Proteolysis of bovine fibrinogen by BmooMP α -II time-dependent. Lanes 2–5: fibrinogen incubated with enzyme for 15, 30, 60 and 120 minutes, respectively. (b) Proteolysis of bovine fibrinogen by BmooMP α -II and effect of inhibitors. Lanes 2: positive control-fibrinogen incubated with enzyme for 60 minutes, 3–8: fibrinogen incubated with enzyme for 60 minutes after preincubation of BmooMP α -II with 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L β -mercaptoethanol, 5 mmol/L 1,10-phenanthroline, 5 mmol/L benzamidine, 5 mmol/L leupeptin, and 5 mmol/L aprotinin for 15 minutes, respectively. (c) Effect of the pH on the stability of BmooMP α -II. Lanes 2–8: fibrinogen incubated with enzyme for 60 minutes after preincubation of BmooMP α -II in pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, and 10.0, respectively. (d) Effect of temperature on the stability of the BmooMP α -II. Lanes 2–8: fibrinogen incubated with enzyme for 60 minutes after preincubation of BmooMP α -II for 15 minutes at 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90°C, respectively.

kininogenase activity similar to that observed in plasma and cells by kallikrein [38].

BmooMP α -II fibrinogenolytic activity was completely inhibited by metal-chelating agents EDTA and 1,10-phenanthroline (Figure 3(b)), which remove metallic cofactors that are necessary for enzymatic catalysis [39]. These results, in addition to the sequence from the N-terminal and the molecular mass, corroborate the suggestion that this enzyme belongs to class P-I of the SVMPs. Moreover, the absence of haemorrhage caused by BmooMP α -II corroborates this finding. The fibrinogenolytic activity of the enzyme was also abolished by the reducing agent β -mercaptoethanol (Figure 3(b)), indicating that disulphide bonds are fundamental to the structural and functional integrity of BmooMP α -II. In addition, BmooMP α -II was not inhibited by benzamidine, leupeptin, or aprotinin (Figure 3(b)).

Stability tests upon bovine fibrinogen showed that the optimum pH for the proteolytic activity was pH 8.0, though the enzyme was partially active in the pH range of 5.0–10.0 (Figure 3(c)). Furthermore, BmooMP α -II showed proteolytic

activity at temperatures of 30–50°C; however, at high temperatures ($\geq 60^\circ\text{C}$), the fibrinogenolytic activity was fully lost (Figure 3(d)).

Histological examination showed important morphological alterations in the liver, lung, kidney, and gastrocnemius muscle from mice caused by BmooMP α -II (Figures 4 to 7), which seem to contribute to the toxic effect of *B. moojeni* crude venom. In the heart, crude venom caused hyaline degeneration and haemolysis, while BmooMP α -II did not induce changes (results not shown). BmooMP α -II (Figures 4(d) and 4(e)) and crude venom (Figures 4(b) and 4(c)) induced haemorrhage in the liver evidenced by erythrocytes between the hepatocytes and not limited by the endothelium. Even in the liver, BmooMP α -II and venom caused necrosis characterised by loss of cellular boundaries, cytoplasmic changes, pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis. In the lung, crude venom (Figures 5(b) and 5(c)) and BmooMP α -II (Figures 5(d) and 5(e)) caused pneumonitis evidenced by dilatation in the alveolar septa due to inflammatory infiltrate. Moreover, *B. moojeni* venom induced pulmonary

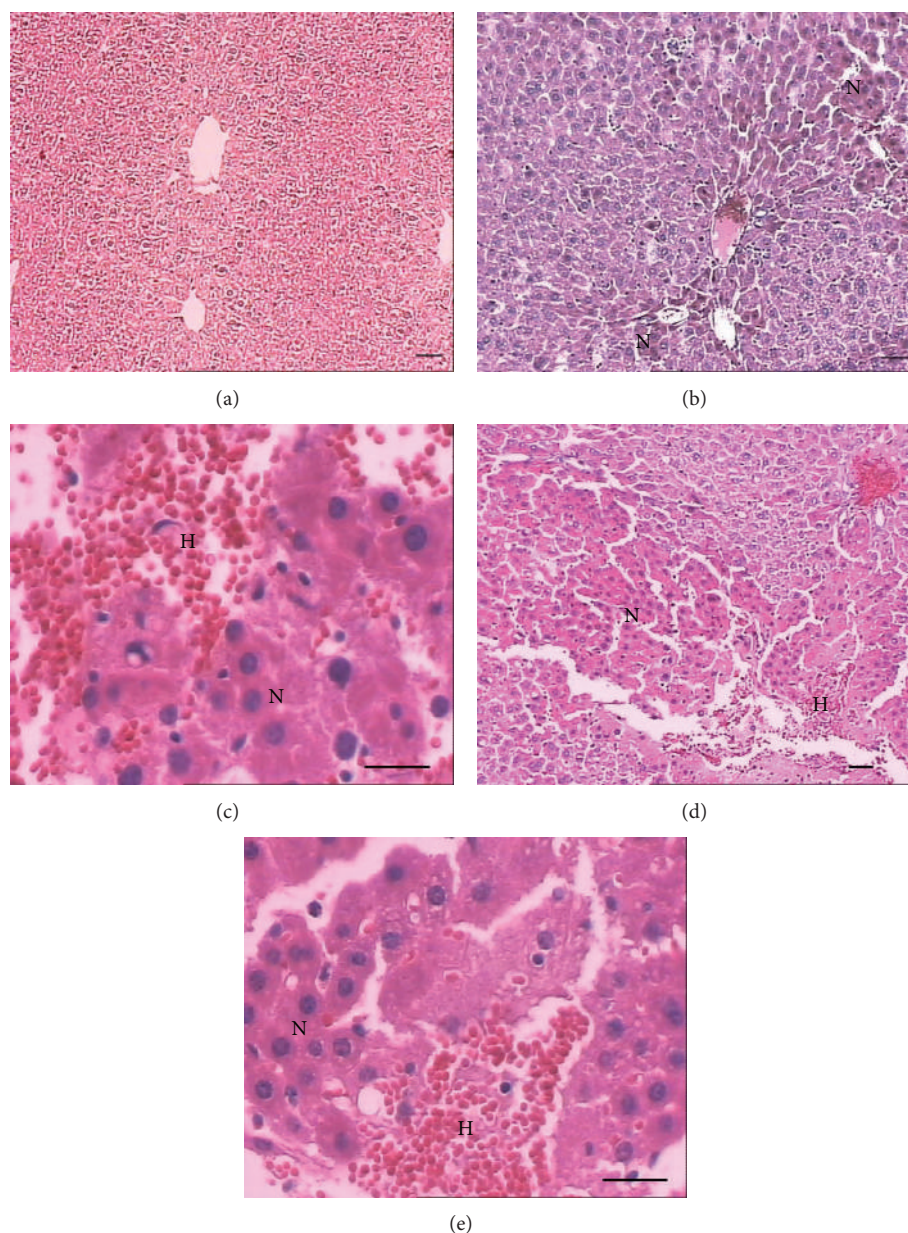


FIGURE 4: Light micrographs of section of mouse liver 24 hours after i.p. injection of *B. moojeni* crude venom or BmooMPα-II (50 $\mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ saline), stained with hematoxylineosin. (a) Control: normal tissue. (b-c) and (d-e) *B. moojeni* crude venom and BmooMPα-II, respectively: note necrosis and haemorrhage. Letters indicate the presence of necrosis (N) and haemorrhage (H). Scale bar = 100 μm (a, b, d); scale bar = 50 μm (c, e).

hyperaemia. Figure 6 shows that BmooMPα-II (Figures 6(d) and 6(e)) and *B. moojeni* crude venom (Figures 6(b) and 6(c)) induced renal tubule degeneration with formation of cell debris and inflammatory infiltrate. Direct nephrotoxic action of *B. moojeni* venom on tubule cells and glomerular structures is the most important physiopathologic factor in envenomation-induced renal failure [40]. Renal changes induced by BmooMPα-II can lead to renal failure.

Local tissue damage is a relevant problem caused by *Bothrops* snake envenomations, resulting from the combined action of several components of venom [6, 9, 12, 15, 41,

42]. BmooMPα-II and *B. moojeni* crude venom induced myonecrosis when compared with the control group. As expected, histological analysis of the control group showed the fibres intact, with clear striations and peripheral nuclei (Figure 7(a)). Therefore, the histological changes observed are due to action of inoculated toxins. BmooMPα-II (Figures 7(d) and 7(e)), as well as *B. moojeni* crude venom (Figures 7(b) and 7(c)), induced myonecrosis after 24 hours, evidenced by loss of cellular boundaries, cytoplasmic changes, no apparent striations, and few or absent nuclei, accompanied by inflammatory infiltrate and haemorrhage. Bleeding found

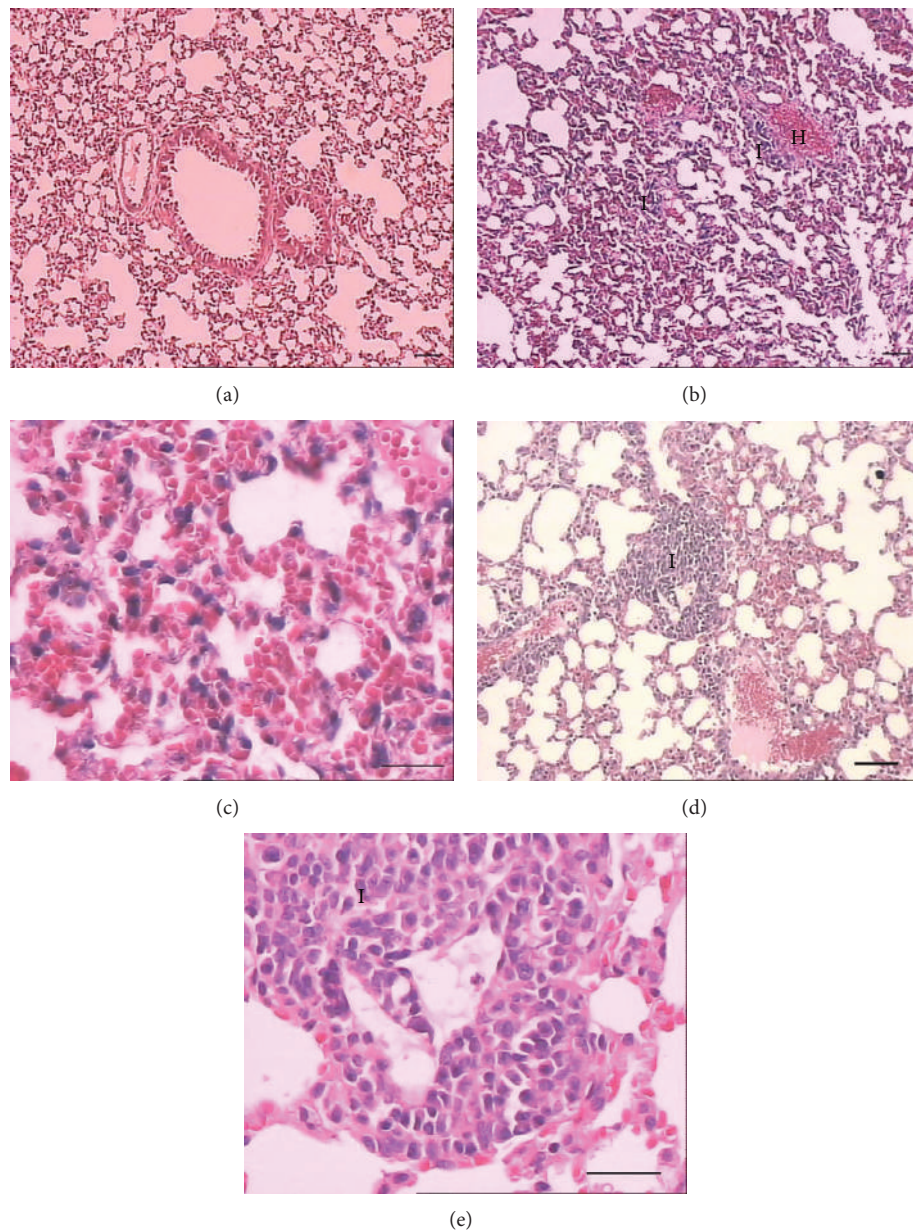


FIGURE 5: Light micrographs of section of mouse lung 24 hours after i.p. injection of *B. moojeni* crude venom or BmooMPα-II (50 μg/100 μL saline), stained with hematoxylin-eosin. (a) Control: normal tissue. (b-c) and (d-e) *B. moojeni* crude venom and BmooMPα-II, respectively: note pneumonitis evidenced by dilatation of the alveolar septa due to inflammatory infiltrate and hyperaemia. Letters indicate the presence of inflammatory infiltrate (I) and hyperaemia (H). Scale bar = 100 μm (a, b, d); scale bar = 50 μm (c, e).

in muscle tissue can be an indirect secondary effect of intense necrosis or due to the action of the metalloproteinase domain on vascular components after 24 hours of action *in vivo*. The mechanism of action of SVMP-induced muscle tissue damage is not well established. Some haemorrhagic SVMP-induced muscle damage is a secondary effect of ischaemia. However, others SVMPs can have a direct cytotoxic action on muscle cells or other unknown mechanisms [15].

Although a wide range of functional activities is assigned to SVMPs [3, 15], our results show that BmooMPα-II was unable to induce haemorrhagic, blood clotting, and

defibrinating activities. Our results show that BmooMPα-II hydrolysed chains of the fibrinogen *in vitro* but did not cause defibrinating activity when administered i.p. to mice. This fact can be explained by inactivation of the enzyme by endogenous inhibitors of proteases present in the blood of animals.

The SVMPs have broad substrate specificity and have been shown to interfere by different mechanisms on platelet aggregation [13, 18]. The effects of several SVMPs on platelet aggregation are associated with the presence of disintegrin and disintegrin-like domains in P-II and P-III classes,

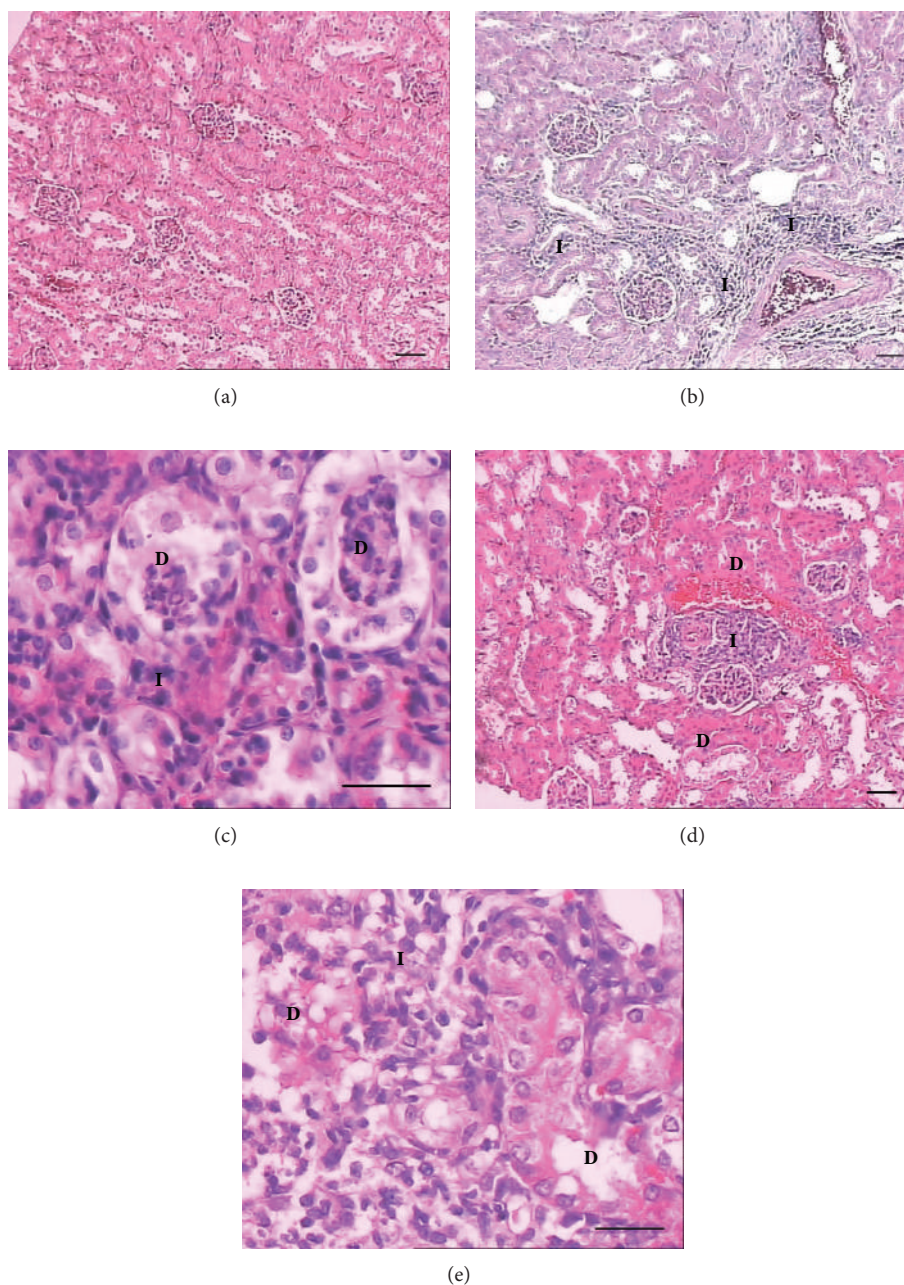


FIGURE 6: Light micrographs of section of mouse kidney 24 hours after i.p. injection of *B. moojeni* crude venom or BmooMPα-II (50 μg/100 μL saline), stained with hematoxylin-eosin. (a) Control: normal cortical region in the kidney. (b-c) and (d-e) *B. moojeni* crude venom and BmooMPα-II, respectively: note renal tubular degeneration with cell debris formation and inflammatory infiltrate. Letters indicate the presence of renal tubular degeneration (D) and inflammatory infiltrate (I). Scale bar = 100 μm (a, b, d); scale bar = 50 μm (c, e).

respectively [5, 13, 43, 44]. Many P-II and P-III SVMPs that interfere on platelet aggregation have been purified and characterised [45–49]. However, there are few studies that show the action of PI SVMPs on inhibition of platelet aggregation.

BmooMPα-II belongs to PI classes of metalloproteinases and therefore it is devoid of disintegrin or disintegrin-like domains. Interestingly, BmooMPα-II inhibited collagen, ADP, and ristocetin-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner. Our results showed that

80 μg of BmooMPα-II inhibited over 80% of agonists-induced platelet aggregation (Figure 8). The absence of disintegrin and disintegrin-like domains suggests that the enzyme does not cause inhibition of platelet aggregation via interaction with membrane receptors. Furthermore, inhibition of the platelet aggregation caused by BmooMPα-II appears to begin after some time of start of the assay. These results suggest that BmooMPα-II inhibits platelet aggregation due to hydrolysis of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. This receptor plays a central role in linking activated platelets. Independent of the initial

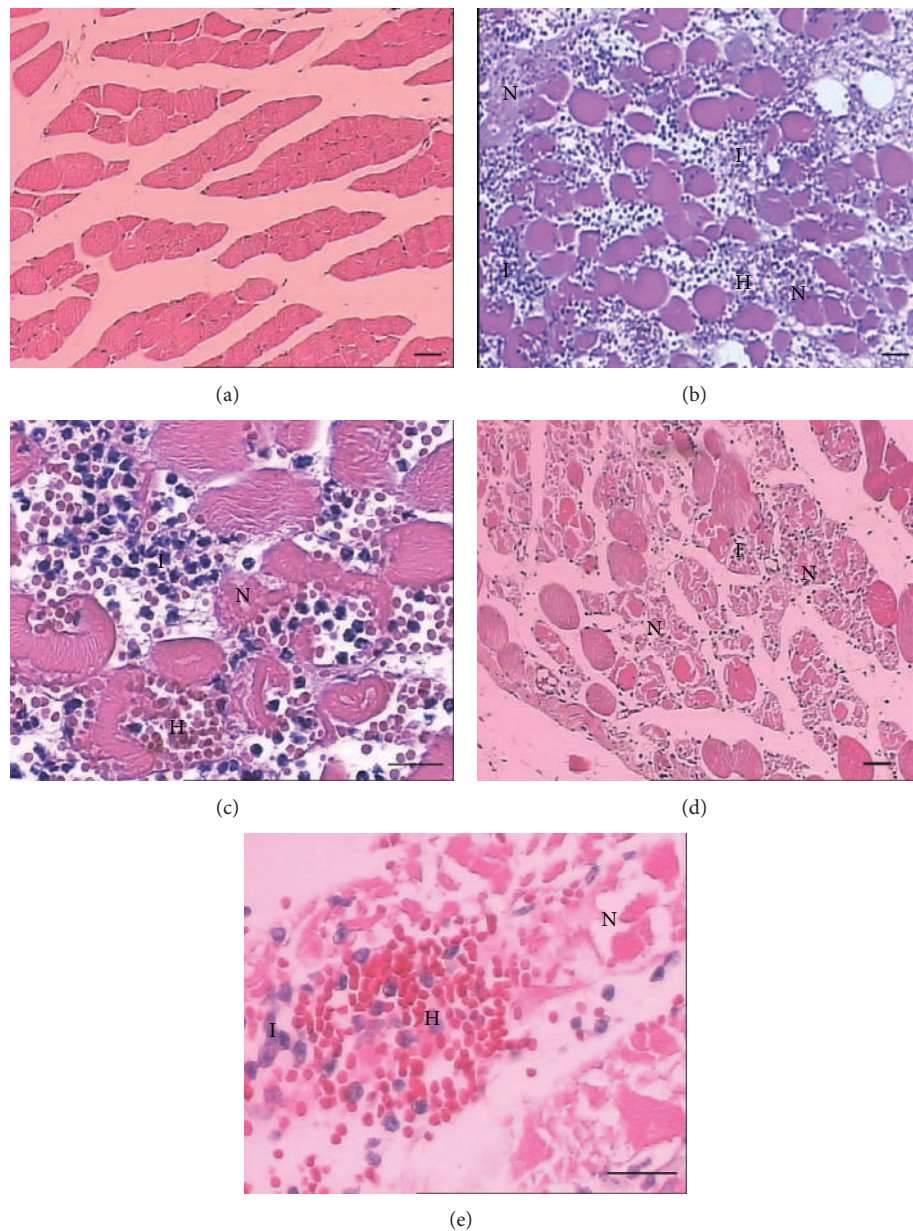


FIGURE 7: Histopathological analysis of myonecrosis induced by *B. moojeni* or BmooMP α -II. Light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle 24 hours after i.m. injection of *B. moojeni* crude venom or BmooMP α -II (50 μ g/50 μ L saline), stained with hematoxylin-eosin. (a) Control: normal integer fibres are seen. (b-c) and (d-e) *B. moojeni* crude venom and BmooMP α -II, respectively: note myonecrosis evidenced by loss of cellular boundaries, cytoplasmic changes, no apparent striations and low or absent nuclei, accompanied by inflammatory infiltrate and haemorrhage. Letters indicate the presence of necrosis (N), inflammatory infiltrate (I) and haemorrhage (H). Scale bar = 100 μ m (a, b, d); Scale bar = 50 μ m (c, e).

stimulus, blocking or hydrolysis of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ prevents platelet aggregation and subsequent thrombus formation by preventing binding to fibrinogen. The participation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in platelet aggregation, whatever the initiating event or agonist, justifies the interest in therapeutic blockade of this receptor, since all routes of platelet activation converge on to this final common pathway [18, 50, 51].

BmooMP α -II degrades bovine fibrinogen, the major ligand for the platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. However, the hydrolysis of A α and B β chains of fibrinogen by BmooMP α -II is not

responsible for the inhibition of platelet aggregation since it does not hydrolyze the γ chain, which contains the more important platelet-binding site [52].

4. Conclusion

In conclusion, our results suggest that BmooMP α -II from *B. moojeni* venom belongs to class P-I of SVMs and probably is an α -fibrinogenase. BmooMP α -II induced relevant histological changes in the liver, lungs, kidneys, and muscle from mice,

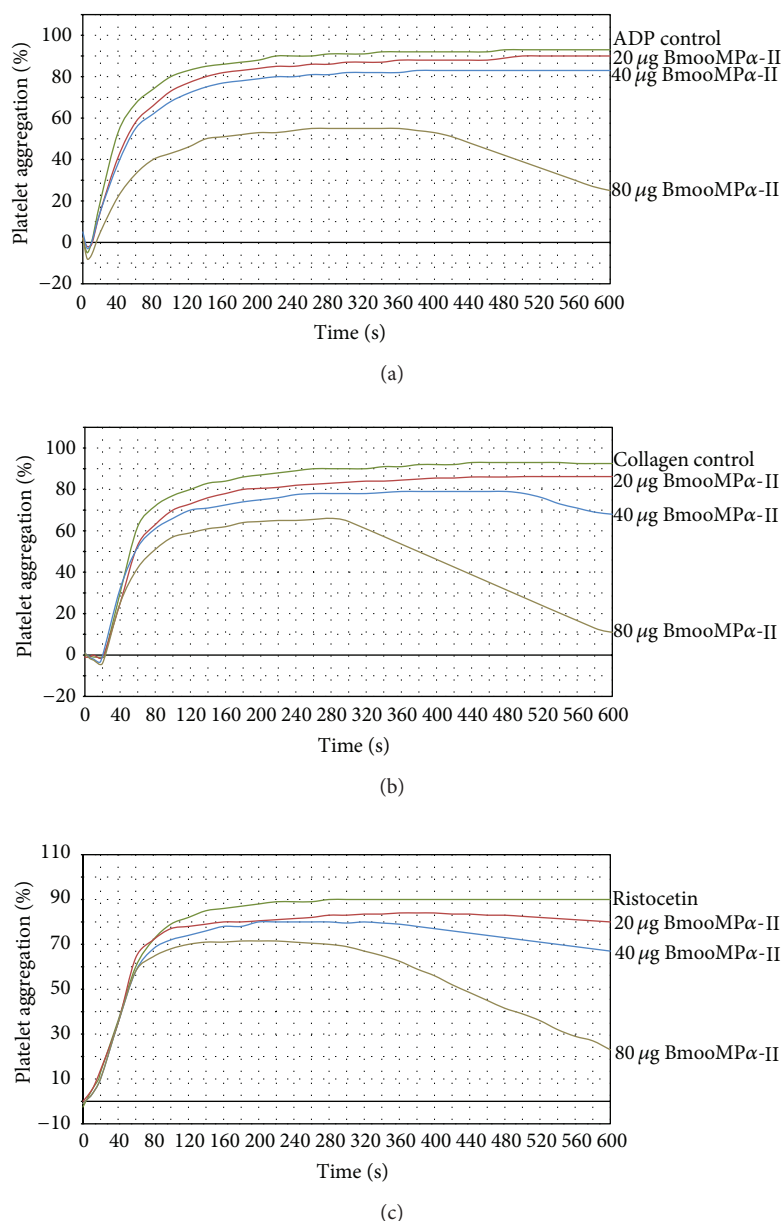


FIGURE 8: Effect of BmooMPα-II (20, 40, and 80 μg) from *B. moojeni* venom on (a) ADP, (b) collagen, and (c) ristocetin-induced platelet aggregation. Aggregation was triggered for 10 min in an AgGRAM platelet aggregation system with four-channel laser optics (Helena Laboratories, EUA). Results were expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Control experiments were performed in the absence of BmooMPα-II.

contributing to the toxic effect of the envenomation caused by *B. moojeni* venom. Moreover, the enzymatically active protein inhibited collagen, ADP, and ristocetin-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner. Anyway, more investigations about BmooMPα-II are needed to elucidate the mechanisms of inhibition and may contribute to the basic studies of *B. moojeni* venom of platelet function and for the development of novel therapeutic agents to prevent and treat thrombotic disorders.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors thank Karla de C. F. Bordon for technical assistance during amino-terminal sequencing. This work was

supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil.

References

- [1] A. K. Calgarotto, D. C. S. Damico, L. A. Ponce-Soto et al., "Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom," *Toxicon*, vol. 51, no. 8, pp. 1509–1519, 2008.
- [2] F. S. Markland, "Snake venoms and the hemostatic system," *Toxicon*, vol. 36, no. 12, pp. 1749–1800, 1998.
- [3] O. H. P. Ramos and H. S. Selistre-De-Araujo, "Snake venom metalloproteases—structure and function of catalytic and disintegrin domains," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 142, no. 3-4, pp. 328–346, 2006.
- [4] J.-P. Chippaux, V. Williams, and J. White, "Snake venom variability: methods of study, results and interpretation," *Toxicon*, vol. 29, no. 11, pp. 1279–1303, 1991.
- [5] J. J. Calvete, C. Marcinkiewicz, D. Monleón et al., "Snake venom disintegrins: evolution of structure and function," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1063–1074, 2005.
- [6] J. D. O. Costa, K. C. Fonseca, C. C. N. Mamede et al., "Bhalthrin: functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom," *Toxicon*, vol. 55, no. 7, pp. 1365–1377, 2010.
- [7] M. S. Della-Casa, I. Junqueira-de-Azevedo, D. Butera et al., "Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins," *Toxicon*, vol. 57, no. 1, pp. 125–133, 2011.
- [8] M. E. G. Denegri, O. C. Acosta, S. Huancahuire-Vega et al., "Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina," *Toxicon*, vol. 56, no. 1, pp. 64–74, 2010.
- [9] M. S. R. Gomes, M. M. Mendes, F. de Oliveira et al., "BthMP: a new weakly hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom," *Toxicon*, vol. 53, no. 1, pp. 24–32, 2009.
- [10] M. S. R. Gomes, M. R. de Queiroz, C. C. N. Mamede et al., "Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 153, no. 3, pp. 290–300, 2011.
- [11] E. M. Singletary, A. S. Rochman, J. C. A. Bodmer, and C. P. Holstege, "Envenomations," *Medical Clinics of North America*, vol. 89, no. 6, pp. 1195–1224, 2005.
- [12] M. R. Queiroz, C. C. Mamede, K. C. Fonseca et al., "Biological characterization of a myotoxin phospholipase A₂ homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*," *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, vol. 17, no. 1, pp. 49–58, 2011.
- [13] T. Sajevec, A. Leonardi, and I. Križaj, "Haemostatically active proteins in snake venoms," *Toxicon*, vol. 57, no. 5, pp. 627–645, 2011.
- [14] N. A. Santos-Filho, L. B. Silveira, C. Z. Oliveira et al., "A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom," *Toxicon*, vol. 52, no. 8, pp. 908–917, 2008.
- [15] J. M. Gutiérrez and A. Rucavado, "Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage," *Biochimie*, vol. 82, no. 9-10, pp. 841–850, 2000.
- [16] J. M. Gutiérrez, A. Rucavado, T. Escalante, and C. Díaz, "Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 997–1011, 2005.
- [17] V. M. Rodrigues, A. M. Soares, S. H. Andrião-Escarso et al., "Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom," *Biochimie*, vol. 83, no. 6, pp. 471–479, 2001.
- [18] A. S. Kamiguti, "Platelets as targets of snake venom metalloproteinases," *Toxicon*, vol. 45, no. 8, pp. 1041–1049, 2005.
- [19] Ministério da Saúde, *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos*, Fundação Nacional de Saúde, Natal, Brazil, 2nd edition, 2001.
- [20] C. Nogueira, R. J. Sawaya, and M. Martins, "Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado," *Journal of Herpetology*, vol. 37, no. 4, pp. 653–659, 2003.
- [21] R. F. Itzhaki and D. M. Gill, "A micro-biuret method for estimating proteins," *Analytical Biochemistry*, vol. 9, no. 4, pp. 401–410, 1964.
- [22] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [23] V. M. Rodrigues, A. M. Soares, R. Guerra-Sá, V. Rodrigues, M. R. M. Fontes, and J. R. Giglio, "Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 381, no. 2, pp. 213–224, 2000.
- [24] T. Nikai, N. Mori, M. Kishida, H. Sugihara, and A. T. Tu, "Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake)," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 231, no. 2, pp. 309–319, 1984.
- [25] J. A. Gene, A. Roy, G. Rojas, J. M. Gutierrez, and L. Cerdas, "Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom," *Toxicon*, vol. 27, no. 8, pp. 841–848, 1989.
- [26] S. Marcussi, C. P. Bernardes, N. A. Santos-Filho et al., "Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity," *Peptides*, vol. 28, no. 12, pp. 2328–2339, 2007.
- [27] C. P. Bernardes, N. A. Santos-Filho, T. R. Costa et al., "Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom," *Toxicon*, vol. 51, no. 4, pp. 574–584, 2008.
- [28] E. F. Sanchez, F. S. Schneider, A. Yarleque et al., "The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 496, no. 1, pp. 9–20, 2010.
- [29] A. Stroka, J. L. Donato, C. Bon, S. Hyslop, and A. L. de Araújo, "Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom," *Toxicon*, vol. 45, no. 4, pp. 411–420, 2005.
- [30] F. L. S. Costa, R. S. Rodrigues, L. F. M. Izidoro et al., "Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme

- isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom," *Toxicon*, vol. 54, no. 6, pp. 725–735, 2009.
- [31] A. Magalhães, H. P. B. Magalhães, M. Richardson et al., "Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*," *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology*, vol. 146, no. 4, pp. 565–575, 2007.
 - [32] C. A. Bello, A. L. N. Hermogenes, A. Magalhaes et al., "Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom," *Biochimie*, vol. 88, no. 2, pp. 189–200, 2006.
 - [33] J. Gutiérrez, M. Romero, C. Díaz, G. Borkow, and M. Ovadia, "Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo)," *Toxicon*, vol. 33, no. 1, pp. 19–29, 1995.
 - [34] A. Rucavado, J. Núñez, and J. M. Gutiérrez, "Blister formation and skin damage induced by BaPI, a haemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*," *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 79, no. 4, pp. 245–254, 1998.
 - [35] L. Watanabe, J. D. Shannon, R. H. Valente et al., "Amino acid sequence and crystal structure of BaPI, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities," *Protein Science*, vol. 12, no. 10, pp. 2273–2281, 2003.
 - [36] A. C. Patiño, J. A. Pereañez, V. Núñez et al., "Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom," *Toxicon*, vol. 56, no. 6, pp. 936–943, 2010.
 - [37] C. Baldo, I. Tanjoni, I. R. León et al., "BnPI, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararagin, a P-III SVMP," *Toxicon*, vol. 51, no. 1, pp. 54–65, 2008.
 - [38] D. N. Okamoto, M. Y. Kondo, L. C. G. Oliveira et al., "P-I class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom is a post-proline cleaving peptidase with kininogenase activity: insights into substrate selectivity and kinetic behavior," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1844, no. 3, pp. 545–552, 2014.
 - [39] J. D. O. Costa, K. C. Fonseca, M. S. Garrote-Filho et al., "Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms," *Biochimie*, vol. 92, no. 12, pp. 1760–1765, 2010.
 - [40] P. A. Boer-Lima, J. A. R. Gontijo, and M. A. da Cruz-Höfling, "Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 61, no. 5, pp. 698–706, 1999.
 - [41] B. C. Zychar, C. S. Dale, D. S. Demarchi, and L. R. C. Gonçalves, "Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice," *Toxicon*, vol. 55, no. 2-3, pp. 227–234, 2010.
 - [42] A. M. Soares, S. Marcussi, R. G. Stábeli et al., "Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 302, no. 2, pp. 193–200, 2003.
 - [43] T. Matsui, Y. Fujimura, and K. Titani, "Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1477, no. 1-2, pp. 146–156, 2000.
 - [44] Q. Zhou, C. Dangelmaier, and J. B. Smith, "The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 219, no. 3, pp. 720–726, 1996.
 - [45] R.-Q. Chen, Y. Jin, J.-B. Wu et al., "A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 310, no. 1, pp. 182–187, 2003.
 - [46] P. Jangprasert and P. Rojnuckarin, "Molecular cloning, expression and characterization of albolamin: a type P-IIa snake venom metalloproteinase from green pit viper (*Cryptelytrops albolabris*)," *Toxicon*, vol. 79, pp. 19–27, 2014.
 - [47] A. S. Kamiguti, C. R. M. Hay, R. D. G. Theakston, and M. Zuzel, "Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases," *Toxicon*, vol. 34, no. 6, pp. 627–642, 1996.
 - [48] J. Song, X. Xu, Y. Zhang et al., "Purification and characterization of AHPM, a novel non-hemorrhagic P-IIIc metalloproteinase with α -fibrinogenolytic and platelet aggregation-inhibition activities, from *Agkistrodon halys pallas* venom," *Biochimie*, vol. 95, no. 4, pp. 709–718, 2013.
 - [49] W.-J. Wang, "Purification and functional characterization of AAV1, a novel P-III metalloproteinase, from Formosan *Agkistrodon acutus* venom," *Biochimie*, vol. 89, no. 1, pp. 105–115, 2007.
 - [50] R. Shlansky-Goldberg, "Platelet aggregation inhibitors for use in peripheral vascular interventions: what can we learn from the experience in the coronary arteries?" *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 13, no. 3, pp. 229–246, 2002.
 - [51] H. E. Speich, A. D. Earhart, S. N. Hill et al., "Variability of platelet aggregate dispersal with glycoprotein IIb-IIIa antagonists eptifibatide and abciximab," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 7, no. 6, pp. 983–991, 2009.
 - [52] A. S. Kamiguti, M. Zuzel, and R. D. G. Theakston, "Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, no. 7, pp. 853–862, 1998.