

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Inibição da angiogênese inflamatória e da agregação plaquetária
pela enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease da peçonha da
serpente *Bothrops moojeni***

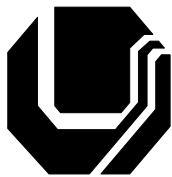
Aluno: Saulo Antônio Gomes Filho

Orientador: Dr. Fábio de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Uberlândia-MG

2012



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Inibição da angiogênese inflamatória e da agregação plaquetária
pela enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease da peçonha da
serpente *Bothrops moojeni***

Aluno: Saulo Antônio Gomes Filho

Orientador: Dr. Fábio de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Maria Inês Homsí Brandeburgo

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

Uberlândia-MG

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G633i Gomes Filho, Saulo Antônio, 1987-
2012 Inibição da angiogênese inflamatória e da agregação plaquetária pela enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* / Saulo Antônio Gomes Filho. – 2012.

58 f. : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.

Coorientadora: Maria Inês Homsí Brandeburgo.

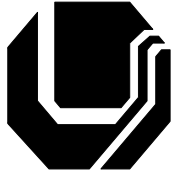
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Proteínas - Teses. 3. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. I. Oliveira, Fábio de. II. Brandeburgo, Maria Inês Homsí. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*, metaloproteases, agregação plaquetária, angiogênese.



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Inibição da angiogênese inflamatória e da agregação plaquetária
pela enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease da peçonha da
serpente *Bothrops moojeni***

ALUNO: SAULO ANTÔNIO GOMES FILHO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Fábio de Oliveira

Examinadores: Dra. Júnia de Oliveira Costa
Dra. Renata Santos Rodrigues

Data da Defesa: 30/07/2012

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

(Fábio de Oliveira)

AGRADECIMENTOS

Agradeço

- a Deus pela Sua infinita misericórdia que me possibilita, dia após dia, vencer desafios através de Suas bênçãos e graça. Por me dar sabedoria e paciência, sobretudo na espera da chegada de reagentes e quando o trabalho não dependia apenas do meu empenho e esforço.
- a minha família por ser o suporte que me sustém de pé e por ser o espelho de conduta moral a ser seguido;
- ao meu orientador, Dr. Fábio, por ter aceitado prosseguir orientando-me, possibilitando a oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;
- a Dra. Fernanda a qual teve importante participação em boa parte deste trabalho, me ensinando novas técnicas que possibilitaram a realização das análises propostas;
- aos membros da banca por me honrarem aceitando o pedido para contribuir para a melhoria deste trabalho;
- as “meninas do Fábio” que compõe um grupo que acredito ser mais justo chamar de família! Temo o dia que chegarei ao laboratório e ele estará todo pintado de rosa! Agradeço especialmente a Mayara, Nadia e Kelly pela contribuição mais efetiva em relação a estes experimentos, sobretudo a Carla que sentia certo prazer em tirar meu sangue. Mas não posso me esquecer das minhas importantes e queridas coleguinhas Déborah, Ana Luiza, Thalita, Bruna, Mariana, Thaís e Thaísa;
- ao David, meu companheiro de tantas agregações e também ao Lino;
- aos “cirurgiões de camundongo” Simone, Puebla e Amanda que não pouparam esforços e não tiveram restrição quanto aos finais de semana e terminar as atividades já de madrugada. Sem vocês este trabalho, sem dúvida, não teria sido concluído ainda.
- aos meus amigos Pedro, pelas dicas para escrever, e ao Renato, pela parceria e sempre dizer que tudo ia dar certo, como de fato aconteceu.

Obrigado!

SUMÁRIO

Apresentação	1
Capítulo I: Fundamentação Teórica	3
1. Peçonha ofídica	4
2. Agregação plaquetária	10
3. Angiogênese e infamação.....	15
4. Referências bibliográficas	20
Capítulo II: Trabalho Experimental	31
Abstract	32
Resumo	33
Introduction.....	34
Materials and methods	35
Bothrops moojeni venom	35
Animals.....	35
Isolation of BmooMP α -I.....	35
Estimation of protein concentration.....	36
Electrophoretic analysis	36
Platelet aggregation assay.....	36
Sponge implants assay	37
Preparation of sponge discs, implantation and treatment	37
Hemoglobin extraction	37
Tissue extraction and determination of N-acetylglucosaminidase activity	38
Measurement of VEGF, TNF- α , KC and MCP-1 production.....	38
Collagen measurement.....	39
Statistical Analysis	39
Results.....	39
Isolation of BmooMP α -I.....	39
Platelet aggregation assay.....	40
Measurement of anti-angiogenic effects.....	40
Measurement of leukocyte accumulation and the proinflammatory cytokines	40
Measurement of TNF- α and collagen deposition.....	41
Discussion	41
References	45

Apresentação

Essa dissertação reúne fundamentos teóricos e experimentais de pesquisas científicas desenvolvidas de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica para obtenção do título de Mestre.

O objetivo principal desse trabalho foi investigar as atividades da metaloprotease BmooMP α -I, quanto a agregação plaquetária e angiogênese inflamatória. Nesse propósito, as seguintes metas foram definidas:

- 1- obtenção da enzima BmooMP α -I, proveniente da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, através da combinação de diferentes passos cromatográficos, como descrito por Bernardes et al., 2008;
- 2- ensaios de agregação plaquetária para a determinação da atividade da enzima sobre este processo;
- 3- caracterização da atividade da enzima sobre a angiogênese, inflamação e reparo tecidual.

Cumpridas as metas, esse trabalho resultou nos estudos das atividades da enzima BmooMP α -I, uma metaloprotease isolada da peçonha de *B. moojeni*. Essa protease com massa molecular aparente de 24,5 kDa é uma enzima fibrin(ogen)olítica não hemorrágica. Além disto, apresentou atividades inibitórias sobre a agregação plaquetária e a angiogênese inflamatória. Para melhor fundamentação teórica e descrição dos resultados alcançados essa dissertação foi dividida em capítulos.

No capítulo I foi feita uma abordagem teórica a respeito de assuntos relacionados às diferentes etapas do trabalho experimental. Foram descritas as características das peçonhas ofídicas relacionando-as aos efeitos fisiopatológicos das peçonhas, fornecendo informações relevantes para o entendimento e discussão dos resultados obtidos. As referências citadas foram acessadas nos serviços *on line* de indexação científica como, *Scielo*, *Web of Knowlegde* e *NCBI*.

O capítulo II apresenta as etapas de purificação da metaloprotease da peçonha da serpente *B. moojeni* e a caracterização das suas atividades. Nesse sentido foi isolada a metaloprotease fibrin(ogen)olítica da classe P-I, denominada BmooMP α -I, que foi capaz de inibir a agregação plaquetária e a angiogênese inflamatória. Os resultados e implicações desse trabalho são apresentados de

acordo com padrões textuais e científicos exigidos pelo periódico a ser submetido (Toxicon).

Os resultados e discussão aqui apresentados são relevantes para o enriquecimento teórico, metodológico e científico de pesquisas relacionadas ao estudo de proteases de peçonhas de serpentes. As informações contidas nessa dissertação destacam uma diferente abordagem do estudo de efeitos biológicos desencadeados por metaloproteases botrópicas, bem como contribuem para o entendimento do mecanismo de ação e caracterização dessas toxinas.

Capítulo I

Fundamentação Teórica

1. Peçonha ofídica

A peçonha produzida pelas serpentes configura um arsenal bioquímico, decorrente de aquisições evolutivas, que garante a captura e digestão de presas, bem como uma eficiente estratégia de defesa (Kochva et al., 1983). Quanto à sua constituição, as peçonhas ofídicas têm em sua composição componentes protéicos, compostos orgânicos com baixo peso molecular e compostos inorgânicos. Biomoléculas como serotonina, histamina, aminoácidos, carboidratos, citratos e nucleosídeos são exemplos de componentes orgânicos de baixo peso molecular encontrados nas peçonhas de serpentes (Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006). Já os compostos inorgânicos incluem cálcio, cobalto, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês, sódio e zinco (Markland, 1998; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006; Calgarotto et al., 2008).

Em relação aos componentes protéicos, mais de 90% do peso seco das peçonhas ofídicas é constituído por um conjunto complexo de peptídeos e proteínas. Estes podem ser classificados em peptídeos, compostos enzimáticos, não-enzimáticos ou inibidores enzimáticos (Matsui et al., 2000; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006). Do primeiro grupo podemos citar peptídeos citotóxicos, miotóxicos, cardiotoxícos, neurotóxicos, desintegrinas e proteínas secretórias, ricas em cisteína (CRISPs). Acetilcolinesterases, ADPases, ATPases, aminotransferases, metaloproteases, serinoproteases, fosfolipase A_2 (PLA₂), hialuronidases e L-aminoácido oxidases (LAO) são alguns dos componentes enzimáticos presentes na peçonha ofídica (Singletary et al., 2005; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006; Ângulo e Lomonte, 2009; Gomes et al., 2009; Costa et al., 2010). Os componentes não-enzimáticos da peçonha são representados pelos ativadores de proteína C, fatores de crescimento (NGF, VEGF), lectinas, proteínas ligantes do fator de von Willenbrand (FvW), e precursores de peptídeos bioativos, dentre outros (Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006).

Várias substâncias farmacologicamente ativas que compõem as peçonhas, principalmente constituintes protéicos, atuam na indução de alterações fisiológicas locais e sistêmicas no organismo no qual é inoculada a peçonha (Francischetti, 1998). O conhecimento do mecanismo de ação dessas toxinas possibilita a elaboração de modelos farmacológicos eficientes no tratamento do

próprio envenenamento e de outras disfunções similares, bem como em diversas aplicações clínicas, desde o diagnóstico à terapêutica (Marsh e Williams, 2005).

Diversos componentes das peçonhas são capazes de afetar o sistema hemostático. As toxinas que agem nos processos hemodinâmicos podem ter ação coagulante, por apresentar atividade semelhante à trombina (*trombina-símile*), ou pela ativação dos fatores II (protrombina) ou X da cascata de coagulação (Kini et al., 2001). Outras podem ter ação anticoagulante, pela ativação da proteína C, que atua ou pela inibição direta da trombina ou de alguns fatores da cascata de coagulação, como os fatores IX e X (Kini, 2006). Além disso, as toxinas podem apresentar atividade fibrinogênica, que dissolve a rede de fibrina ou impede sua formação pelo consumo do estoque de fibrinogênio no organismo, ocasionando a incoagulabilidade sanguínea frequente em acidentes ofídicos (Swenson e Markland, 2005). Existem ainda toxinas com ação no endotélio vascular, gerando o quadro hemorrágico comumente encontrado nestes acidentes (Gutiérrez e Rucavado, 2000); e com ação direta sobre as plaquetas, interferindo na sua agregação (Kamiguti, 2005).

De forma geral, nas peçonhas ofídicas, os componentes mais representativos são as enzimas classificadas em fosfolipases A₂, serino e metaloproteases, de acordo com a estrutura e mecanismo catalítico (Alam et al., 1996; Tashima et al., 2008). As fosfolipases A₂ são enzimas que catalisam a hidrólise específica da ligação 2-acil-éster de fosfolipídeos de membrana, promovendo a liberação de ácidos graxos e lisofosfatídeos (Kini e Evans, 1989; Kudo e Murakami, 2002; Soares et al., 2004). Elas são consideradas uma importante classe de proteínas encontradas em peçonhas do gênero *Bothrops* sp., responsáveis por diversas propriedades biológicas, incluindo cardio e miotoxicidade, ações hemolíticas, anticoagulantes e interferência na agregação plaquetária (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Kini, 2003; Rodrigues et al., 2004; Montecucco et al., 2008; Santos-Filho et al., 2008).

As serinoproteases compreendem enzimas com região responsável pela catálise altamente conservada, onde sua tríade catalítica é composta pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Serina¹⁹⁵, Histidina⁵⁷ e Aspartato¹⁰² (Serrano e Maroun, 2005). No seu mecanismo catalítico o resíduo de serina, que é altamente reativo, exerce um papel crítico na reação. O mecanismo consiste na

formação de um complexo transitório acil-enzima pelo resíduo de serina, estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico dentro do sítio ativo (Barrett e Rawlings, 1995). As serinoproteases agem de diferentes formas sobre a hemostasia, interferindo na agregação plaquetária, em diversos fatores da cascata de coagulação e no sistema fibrinolítico (Pirkle, 1998). As enzimas trombina-símile (ou *trombin-like*) são exemplos de serinoproteases de peçonha de serpentes que tem efeito semelhante à trombina plasmática, pois também são capazes de degradar o fibrinogênio plasmático, que é um importante fator da cascata de coagulação (Pirkle, 1998; Matsui et al., 2000). Diversas serinoproteases *thrombin-like* têm sido purificadas de peçonhas de serpentes botrópicas, tais como BthT1 de *Bothrops moojeni* (Oliveira, 2001), Leucurobin de *B. leucurus* (Magalhães et al., 2007), BpSP-I de *B. pauloensis* (Costa et al., 2009), Bhalternin de *B. alternatus* (Costa et al., 2010) e TLBm de *B. marajoensis* (Vilca-Quispe et al., 2010) e TLBan (Valeriano-Zapana et al., 2012).

As metaloproteases de peçonhas de serpente (SVMPs) constituem um grande grupo de proteases metais-dependentes. Os metais, principalmente os cátions divalentes, como o cálcio e o zinco, desempenham um papel crítico na atividade proteolítica e, conseqüentemente, na atividade biológica dessas proteases (Fox e Serrano, 2009). As SVMPs zinco-dependentes pertencem à família metzincina. Essas enzimas possuem em comum um domínio de ligação de zinco com estruturas muito semelhantes entre si (Gutiérrez e Rucavado, 2000). A família metzincina pode ser subdividida nas subfamílias reprotinas, serralisinas, astacinas e matrixinas (Bode et al., 1993; Ra e Parks, 2007). O domínio catalítico das metaloproteases zinco-dependentes é constituído por uma sequência peptídica metal-ligante com três resíduos de histidina, e, além disto, o sítio ligante de zinco tem uma sequência de aminoácidos comum em todas as subfamílias (HEBXHXBGBXHZ) onde H representa a histidina; E, o ácido glutâmico; G, a glicina; B, um resíduo hidrofóbico; X, um aminoácido qualquer e Z, um aminoácido diferente entre as quatro subfamílias, mas conservado dentro das mesmas (Fig. 1) (Markland, 1998; Fox e Serrano, 2005; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006).

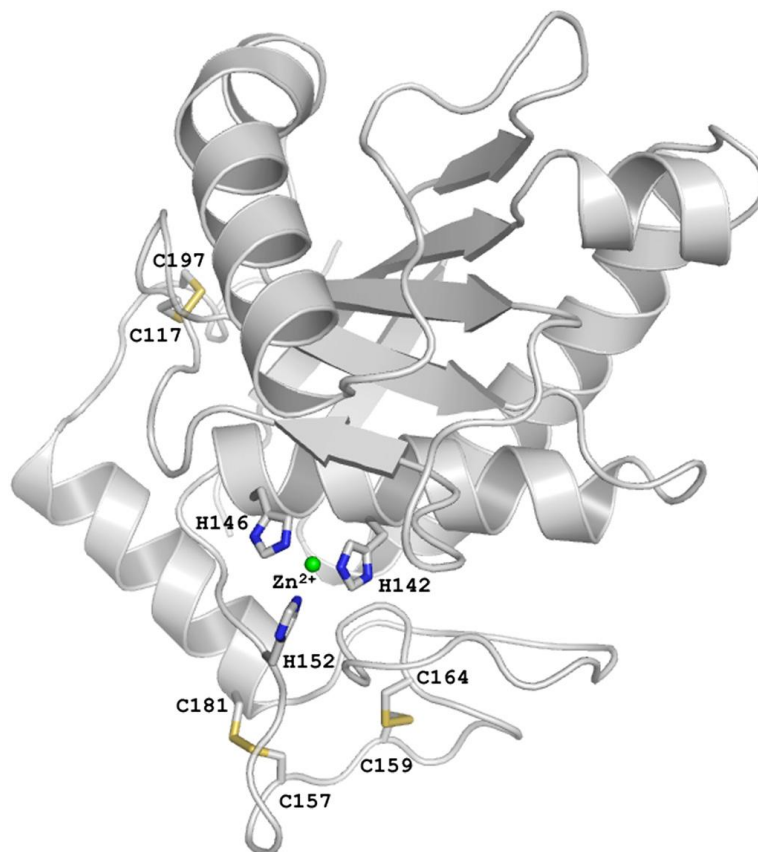


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da BmooMP α -I. Destaque para o domínio metaloprotease com o átomo de zinco (esfera verde) e os 3 resíduos de histidina (H142/146/152) representados em azul. A estrutura da enzima é estabilizada por 3 pontes dissulfeto representadas em amarelo (Cys¹¹⁷-Cys¹⁹⁷, Cys¹⁵⁷-Cys¹⁸¹ e Cys¹⁵⁹-Cys¹⁶⁴) (Akao et al, 2010)

As metaloproteases são sintetizadas no citoplasma das células secretoras que compõe a glândula de peçonha. Em seguida, elas se encaminham para o retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, de onde são subsequentemente transportadas para o lúmen da glândula via grânulos de secreção (Warshawsky et al., 1973). No retículo endoplasmático as proteases são oxidadas, glicosiladas, enoveladas e as pontes dissulfeto são formadas, e, além disto, algumas proteases como certas desintegrinas diméricas sofrem multimerização (Fox e Serrano, 2008). As metaloproteases são sintetizadas como proteínas multidomínios, incluindo um domínio pró-enzima responsável pela inativação dessas proteases antes da secreção, sendo portanto, armazenadas nas glândulas de peçonha como zimogênios. A ativação dessas enzimas pode ocorrer por atividade autocatalítica residual ou pela ação de outras proteases presentes na

peçonha (Rodrigues et al., 2000; Swenson e Markland, 2005; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006).

As SVMPs são enzimas capazes de hidrolisar componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo IV e fibronectina (Gutiérrez et al., 2005), proteínas plasmáticas, como fibrinogênio, fibrina, fator de von Willenbrand, protrombina (Kamiguti et al., 1994; Silva et al., 2004; Wang et al., 2004) e proteínas de superfície celular como algumas integrinas e caderinas (Kamiguti et al., 1996; You et al., 2006). As metaloproteases também interagem com receptores de plaquetas, células endoteliais e fibroblastos, promovendo diretamente ou participando dos principais efeitos dos envenenamentos, como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose e resposta inflamatória. (Moura-da-Silva et al., 2007).

De acordo com a classificação proposta por Fox e Serrano (2008), que se baseia em análises proteômicas e transcriptômicas, as SVMPs se dividem em 3 classes (P-I, P-II e P-III), de acordo com os domínios não enzimáticos observados nos transcritos de mRNA (Fig 2).

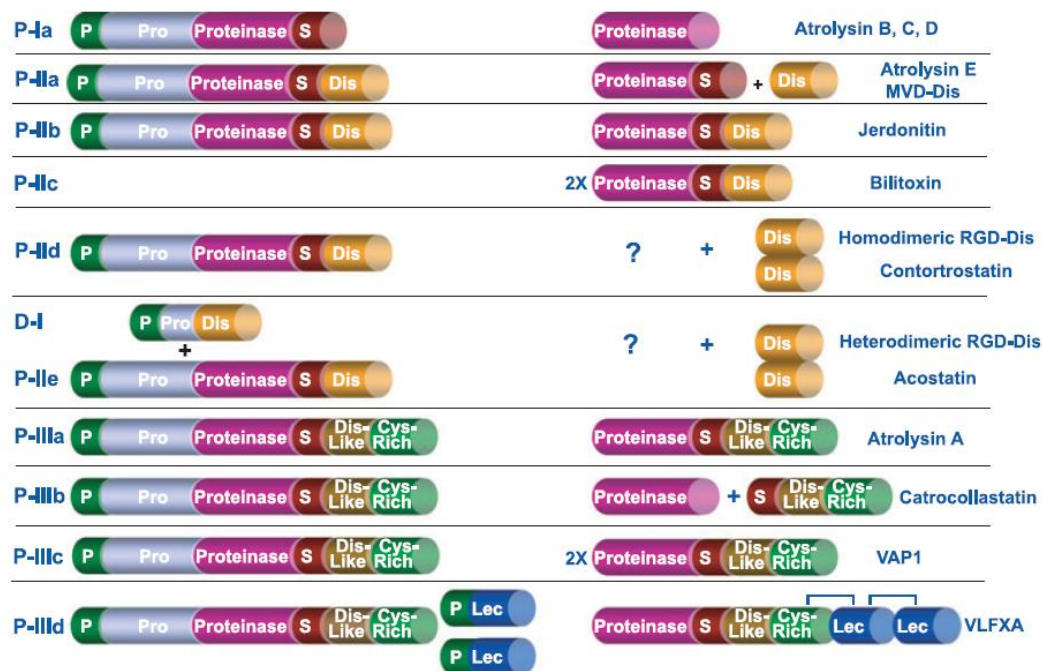


Figura 2: Classificação estrutural das SVMPs. P: peptídeo sinal; Pro: pró-domínio, removido durante a ativação da proteína; S: espaçador; Dis: domínio desintegrina; *Dis-like*: domínio tipo-desintegrina; *Cys-rich*: domínio rico em cisteína; Lec: domínio ligante de lectina (Fox e Serrano, 2008).

As metaloproteases de classe I (P-I) apresentam proteínas com massa molecular entre 20 e 30 kDa que contêm apenas o domínio catalítico. As enzimas desta classe podem apresentar diversas atividades biológicas, dentre as quais podemos citar: atividade fibrino(geno)lítica, mionecrótica, inflamatória, pró-apoptótica, ativadora de protrombina, além de inibição da agregação plaquetária. Além disto, em geral, essas toxinas são pouco ou não hemorrágicas (Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006; Moura-da-Silva et al., 2007).

A classe PII inclui enzimas que apresentam o domínio metaloprotease, seguido de um domínio tipo-desintegrina (*Disintegrin-like*), sendo que, em muitos casos, este último é separado do domínio metaloprotease por um processo proteolítico pós-traducional. A atividade biológica das SVMPs da classe P-II depende do resultado deste processamento pós-traducional, que determina se a enzima apresenta o domínio catalítico ligado ao domínio desintegrina, com a sequência de aminoácidos RGD, ou se a molécula estará na forma processada, gerando os domínios catalíticos e desintegrina de forma independente. A massa molecular das enzimas da classe P-II com atividade catalítica varia entre 30 e 60 kDa. As desintegrinas livres monoméricas podem apresentar de 40 a 84 resíduos de aminoácidos; e as diméricas, em torno de 67 resíduos em cada subunidade (Calvete et al., 2005).

As SVMPs da classe P-III possuem o domínio catalítico mais os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína (*Cys-rich*). Essas proteases são normalmente encontradas na forma catalítica, contendo os três domínios e apresentando massa molecular entre 60 e 110 kDa. Em geral, são altamente hemorrágicas, e podem ter ação sobre diversos substratos, tipos celulares e processos fisiológicos. Além da forma catalítica, as toxinas da classe P-III também podem ser liberadas na forma processada, contendo apenas os domínios tipo desintegrina e rico em cisteína. Essas toxinas processadas apresentam ações semelhantes às das toxinas contendo o domínio metaloproteases, exceto aquelas dependentes de catálise. Assim, elas também são capazes de inibir a agregação plaquetária e ativar a resposta inflamatória (Moura-da-Silva et al., 2007).

2. Agregação plaquetária

A hemostasia pode ser descrita como o conjunto de mecanismos fisiológicos que atuam para a manutenção da fluidez sanguínea e evitar a perda de sangue, em caso de lesão vascular (Markland, 1998). O sistema hemostático conjuga processos regulados incluindo a parede vascular, estruturas e agentes vasoativos envolvidos na vasoconstrição e vasodilatação, fatores que levam à adesão e agregação das plaquetas circulantes que formam um tampão hemostático e a ativação dos fatores da cascata de coagulação que levam à formação de coágulos de fibrina. Para permitir a regeneração total do tecido danificado, os coágulos são subseqüentemente removidos pelo sistema fibrinolítico. (Dahlback, 2000).

O estado normal de fluidez do sangue circulante é mantido pelas propriedades não-trombogênicas das paredes intactas das células do endotélio vascular. O dano aos vasos provoca uma pronta resposta hemostática que previne a hemorragia e é caracterizada pelos processos de vasoconstrição, adesão e agregação das plaquetas, e formação da rede de fibrina. O primeiro mecanismo decorre da ação de agentes vasoativos sobre a musculatura lisa da parede do vaso lesado, ocasionando sua contração. Em seguida, há a adesão das plaquetas circulantes ao local da lesão e posterior agregação de outras plaquetas às primeiras, formando o tampão plaquetário. Finalmente, a coagulação do sangue ocorre através da ação dos fatores da cascata de coagulação, que permite, mediante a formação de uma rede de fibrina, a consolidação do tampão plaquetário, formando o tampão hemostático (Rang et al., 2004; Kumar et al., 2008).

As plaquetas ocupam um papel fundamental no controle da hemostasia e, desta forma, são um importante alvo de ação das peçonhas (Kamiguti, 2005). Elas são corpúsculos anucleadas, geradas a partir da fragmentação citoplasmática dos megacariócitos, e participam ativamente em diversas etapas do processo hemostático, sendo os primeiros elementos sanguíneos que reagem a uma lesão endotelial, formando o tampão hemostático primário.

Em sua forma inativa, as plaquetas são discóides, mas quando ativadas elas tornam-se arredondadas, estendendo numerosos pseudópodos, levando à

adesão e agregação. Isso ocorre quando as plaquetas são expostas a ADP, trombina, adrenalina, colágeno e outros agonistas (Jenny e Mann, 1998; Braud et al., 2000; Andrews e Berndt, 2004).

Quatro mecanismos fundamentais estão envolvidos na atividade funcional plaquetária: a adesão, a agregação, a secreção e a contração. O conceito de adesão se refere a princípio à interação entre as plaquetas e a matriz subendotelial, enquanto que a agregação indica a associação entre plaquetas. A secreção descreve o processo pelo qual o conteúdo das organelas de secreção plaquetária é liberado no local de lesão vascular, sem a perda de conteúdo citoplasmático. A contração é um processo crítico para o desenvolvimento do tampão hemostático, relacionando-se com a mudança de forma, a secreção e a retração plaquetárias (White, 1983).

A lesão tecidual e rompimento dos vasos induzem a agregação plaquetária pela exposição do tecido subendotelial e, conseqüentemente, dos ligantes fibronectina, laminina, colágeno e fator de von Willebrand, até então indisponível para o contato com proteínas plasmáticas e componentes celulares da circulação. Em pequenos vasos, as plaquetas sozinhas são capazes de cessar um sangramento.

A primeira reação de plaquetas em um vaso danificado é a sua interação com proteínas adesivas, como fator de von Willebrand (FvW) e o colágeno no subendotélio, através dos receptores glicoprotéicos GPIb-IX-V e GPVI e a integrina $\alpha 2\beta 1$ (Fig. 3). Durante uma lesão endotelial, em condições de alta força de cisalhamento, a GPIb é o receptor responsável pela adesão plaquetária e início da formação do tampão plaquetário. A GPIb forma com as glicoproteínas IX e V um complexo na membrana plaquetária. A adesão plaquetária sob alta força de cisalhamento é mediada pelo FvW, que é uma grande glicoproteína plasmática multimérica que contém três domínios com a capacidade de se ligar à GPIb e aos diferentes tipos de colágeno da matriz subendotelial exposta (Andrews et al, 1997; Berndt et al, 2001).

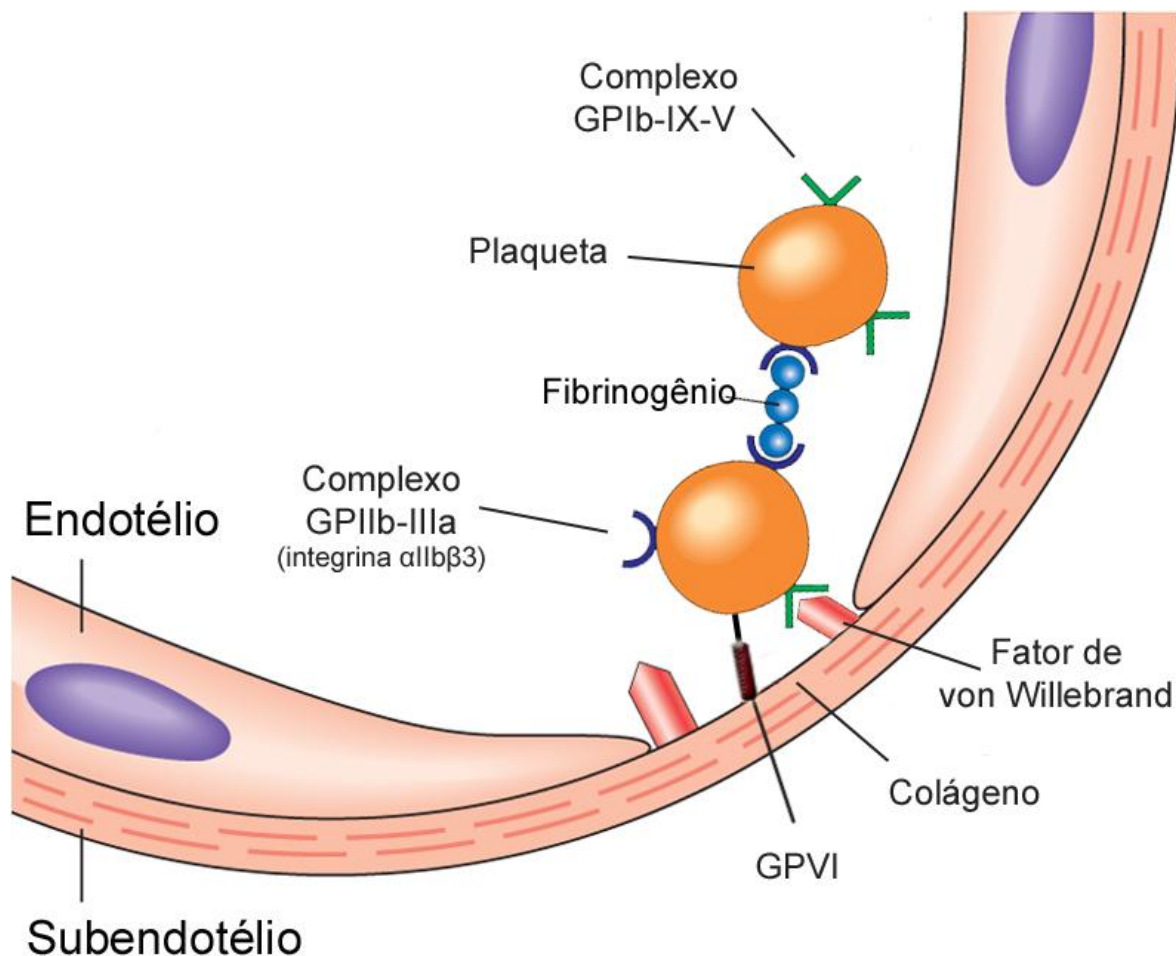


Figura 3: Ilustração esquemática da adesão e agregação plaquetária. O fator de von Willebrand funciona como uma ponte adesiva entre o colágeno subendotelial e o complexo GPIb-IX-V. A plaqueta também adere diretamente ao subendotélio através do receptor glicoprotéico VI que se liga ao colágeno. A agregação é concluída pela ligação do fibrinogênio aos receptores GPIIb-IIIa que une as plaquetas umas as outras. (Adaptado de Kumar et al., 2008)

A adesão plaquetária induz rápida transdução de sinais que desencadeia uma série de eventos, como a ativação plaquetária, alterações no citoesqueleto, difusão e secreção do conteúdo granular e ativação de integrinas que sustentarão a adesão e a agregação. A alteração no citoesqueleto das plaquetas ativadas está associada à mudança da forma discóide e prolongamento de pseudópodos, à contração interna e liberação dos constituintes de seus grânulos (Andrews e Berndt, 2004; Jurk e Kehrel, 2005).

A ativação das plaquetas leva a liberação de agonistas, tais como ADP, tromboxano (TXA₂) e serotonina (5-HT) e proteínas envolvidas na adesão, como fibrinogênio e P-selectina (Jackson et al., 2001). Ocorre então a ativação da

integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, que permite a interação plaqueta-plaqueta pela ligação do fibrinogênio com as integrinas $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ativadas, sinalizando para a formação de agregados mais estáveis que formam o tampão plaquetário no local da ruptura do vaso. A ação das plaquetas, juntamente com a ativação da cascata de coagulação e consequente formação da malha de fibrina, são os fatores responsáveis por cessar a hemorragia. Juntamente com a mudança de forma e adesão, um rearranjo nas fosfolipoproteínas de membrana forma uma superfície catalítica pró-coagulante (Marcus e Safier, 1993; Kamiguti, 2005).

As integrinas são receptores heterodiméricos, constituídos de uma subunidade α associada de forma não covalente a uma subunidade β . Os sinais mediados por elas regulam a interação célula-célula e célula-matriz, eventos importantes em uma grande variedade de fenômenos biológicos. A integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ é formada pelo complexo GPIIb-IIIa, onde a subunidade α é a GPIIb (αIIb) e a β a GPIIIa (β_3) (Calvete, 1994; Bennett, 2001).

As glicoproteínas IIb e IIIa são as proteínas mais abundantes da membrana plasmática plaquetária humana. A GPIIb e a GPIIIa formam um complexo dependente de Ca^{+2} , não covalentemente associado na membrana plaquetária e sua estabilidade depende da presença de uma concentração micromolar de cálcio extracelular. A formação de um complexo entre as duas glicoproteínas é de primeira importância para a expressão da sua capacidade de ligação ao fibrinogênio (Calvete, 1994; Bennett, 2001).

O fibrinogênio é o principal ligante da GPIIb-IIIa e sua ligação a dois destes receptores localizados em plaquetas diferentes ocasiona a agregação plaquetária. Além de seu papel principal como receptor do fibrinogênio, a GPIIb-IIIa também pode se ligar a outras proteínas adesivas encontradas no plasma ou no subendotélio, como a fibronectina, o FvW e a vitronectina. A ligação tanto ao fibrinogênio como ao FvW causa a agregação plaquetária, contudo, devido à sua alta concentração no plasma, o fibrinogênio é o ligante fisiológico mais importante da GPIIb-IIIa (Calvete, 1994; Bennett, 2001).

As SVMPs apresentam ampla especificidade de substrato, sendo capazes de degradar proteínas envolvidas na hemostasia e digerir glicoproteínas presentes nas membranas das plaquetas e seus ligantes (Marsh e Williams, 2005; Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006). Elas são enzimas que degradam o fibrinogênio e/ou

fibrina, e pelo fato do fibrinogênio ter a função de principal ligante da integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, a inibição da agregação plaquetária por SVMPs poderia ser atribuída a sua degradação. Entretanto, a clivagem das cadeias $\text{A}\alpha$ e $\text{B}\beta$ pelas fibrinogenases não afeta a agregação plaquetária pelo fato de os sítios de ligação às plaquetas estar contido na cadeia γ do fibrinogênio (Kamiguti, 2005).

As plaquetas ativadas secretam, dentre outros, o conteúdo de seus grânulos, que inclui agonistas secundários, como ADP e 5-HT (Rang et al., 2004). O ADP atua via receptores acoplados à proteína G, reforçando a agregação plaquetária relacionada à integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. O agonista 5-HT é um potente vasoconstritor que, juntamente com o ADP, amplifica a resposta plaquetária (Andrews e Berndt, 2004; Jurk e Kehrel, 2005). Vários produtos de secreção das plaquetas aderidas provocam estímulos adicionais às plaquetas circulantes que são recrutadas para formar agregados (Jurk e Kehrel, 2005).

As plaquetas aderidas e ativadas formam, a partir do ácido araquidônico, TxA_2 pela ação da tromboxano sintase, reforçando o processo de ativação após a liberação no espaço extracelular e ligação ao receptor específico de TxA_2 ($\text{TP}\alpha$ e $\text{TP}\beta$). O TxA_2 também possui atividade vasoconstritora, o que favorece a formação do trombo pela desaceleração do fluxo sanguíneo (Gawaz, 2004).

A epinefrina atua como agente agonista da agregação plaquetária ativando as plaquetas sem a mudança inicial na conformação, levando à liberação do ácido araquidônico endógeno com formação de TxA_2 e secreção plaquetária (Bernardi e Moreira, 2004).

Todos os agonistas excitatórios da plaqueta, exceto a epinefrina, induzem o aumento das concentrações citosólicas de Ca^{+2} , tanto a partir da sua mobilização dos estoques internos quanto a partir do aumento do influxo de Ca^{+2} do meio extracelular (Hourani e Cusack, 1991).

As toxinas da peçonha de serpentes agem nas glicoproteínas presentes na superfície das plaquetas, impedindo a ação dos ligantes naturais e interferindo na adesão, ativação ou agregação plaquetária. O complexo GPIb-IX-V é alvo de lectinas tipo-C e de metaloproteases. As metaloproteases se ligam ou clivam a sua subunidade GPIb, e impedem a ligação desse complexo ao FvW, inibindo a agregação plaquetária; enquanto as lectinas tipo-C podem se ligar a subunidade GPIb e ativar as plaquetas pela sinalização a outros receptores, induzindo neste

caso a agregação. Os receptores de colágeno, GPVI e $\alpha 2\beta 1$, também são alvos de lectinas tipo C e metaloproteases, que podem se ligar ou clivar esses receptores (Lu et al., 2005; Du et al., 2006). As integrinas $\alpha \text{IIb}\beta 3$ são bloqueadas pelas desintegrinas da peçonha, que apresentam alta afinidade para esses receptores, sendo potentes inibidores da agregação plaquetária (Calvete et al., 2005). A interferência das toxinas da peçonha na agregação das plaquetas pode ocorrer ainda pela ação direta sobre ligantes naturais, como FvW e colágeno (Kamiguti et al., 1996).

Em relação à ação específica das SVMPs, as metaloproteases da classe P-I inibem a agregação plaquetária geralmente por interferência com o complexo GPIIb-IX-V e FvW, como nos casos da toxina Crotalina e Triflamp das serpentes *Crotalus atrox* e *Trimeresurus flavoviridis*, respectivamente, que atuam na inibição da agregação via hidrólise do FvW (Wu et al., 2001; Tseng et al., 2004). Na classe P-II O principal alvo das desintegrinas tipo RGD é a integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$, que tem papel fundamental na agregação das plaquetas, por ser a via final de ativação. Assim, sua inibição faz com que a agregação plaquetária não ocorra, mesmo que ativadas por diferentes agonistas. (Andrews et al., 2001). Dentre as atividades biológicas descritas para metaloproteases da classe P-III estão a ação sobre células endoteliais, atividade pró-inflamatória e inibição da agregação plaquetária por interferência com a integrina $\alpha 2\beta 1$ e com o colágeno (Moura-da-Silva et al., 2007).

3. Angiogênese e inflamação

O desenvolvimento e o funcionamento adequado dos tecidos dependem de um suprimento de oxigênio, nutrientes, moléculas e células do sistema imune. Esse suprimento é fornecido através dos vasos sanguíneos. Em várias circunstâncias fisiológicas normais e em processos patológicos ocorre a demanda pela formação de novos vasos sanguíneos através da angiogênese (Folkman, 1995; Carmeliet, 2005).

A angiogênese é definida como o brotamento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes resultando em uma nova rede de capilares (Heil et al., 2006). Dentre os processos fisiológicos na qual a angiogênese está presente pode-se citar o desenvolvimento, a reprodução e o reparo tecidual. Sob estas condições, a angiogênese é altamente regulada e a vasculatura permanece em estágio quiescente, sendo ativada por um breve período de tempo (Carmeliet, 2005). Em relação aos processos patológicos, a neovascularização está presente no crescimento e metástase tumoral, retinopatia diabética, artrite reumatóide, psoríase, aterosclerose, isquemia, dentre outras (Folkman, 1995).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem nos vários tecidos de modo que, os neovasos terão aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido. A heterogeneidade das células endoteliais é determinada pela expressão e atividade de fatores angiogênicos que variam grandemente em diferentes tecidos (Benjamin et al., 1998; Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2003).

As etapas da angiogênese envolvem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular em resposta ao óxido nítrico e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), degradação da membrana basal por metaloproteases de matriz, perda das junções entre as células endoteliais pela ação do ativador do plasminogênio, migração e proliferação das células endoteliais, formação de cordões endoteliais, formação de membrana basal, maturação e remodelamento, recrutamento de células periendothelias (Jain, 2003).

A angiogênese esta sujeita a um complexo sistema de controle através do balanço da ação de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos (angiostáticos). No indivíduo adulto o crescimento vascular esta sob rigoroso controle, havendo uma predominância dos fatores angiostáticos sobre os angiogênicos, sendo que, a neovascularização só ocorrerá quando esta relação for inversa (Folkman, 2005). Como exemplo de fatores angiostáticos temos os pericitos, vários componentes da matriz extracelular e membrana basal (O'Reilly et al., 1997; Maeshima et al., 2000). Dentre os fatores pro-angiogênicos estão: injúria, hipóxia, citocinas, quimiocinas e células inflamatórias (D'amore e Thompson, 1987; Bernardini et al., 2003).

A inflamação e a angiogênese são dois processos que podem acontecer concomitantemente com influência mútua de um sobre o outro (Murdock et al., 2005). A angiogênese sustenta a inflamação através do fornecimento de oxigênio e nutrientes para as necessidades metabólicas das células presentes no sítio inflamatório e proporciona um aumento do infiltrado leucocitário. Já as células do sistema imune produzem mediadores inflamatórios que podem atuar de forma direta ou indireta. Na primeira ocorre a liberação de fatores angiogênicos pelas células inflamatórias, e no segundo, as células do sistema imune atuam sobre fibroblastos e células endoteliais ocasionando a liberação dos fatores angiogênicos, gerando um estímulo indireto para que a angiogênese ocorra (Naldini e Carraro, 2005; Benelli et al., 2006).

A inflamação é uma reação complexa que congrega respostas vasculares, celulares (migração e ativação de leucócitos) e reações sistêmicas. Estão envolvidos nos eventos da inflamação o fluido e proteínas plasmáticas, as células circulantes (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas), os vasos sanguíneos, os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (mastócitos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, proteínas fibrosas estruturais, glicoproteínas de adesão e proteoglicanos) (Kumar et al., 2005).

As reações vasculares e celulares da inflamação são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou de células plasmáticas e são produzidos ou ativados pelo estímulo inflamatório. Esses mediadores agem isoladamente, em conjunto ou em sequência, amplificando a resposta inflamatória e influenciando sua evolução (Kumar et al., 2005).

O processo inflamatório pode ser classificado em inflamação aguda e crônica. O aumento na permeabilidade vascular é uma característica da inflamação aguda, sendo que, este aumento permite o extravasamento de elementos presentes na corrente sanguínea, como componentes do plasma e células inflamatórias, levando à formação de uma matriz provisória derivada de proteínas plasmáticas e à presença de leucócitos no espaço subendotelial. Este extravasamento irá iniciar e sustentar a resposta inflamatória (Singer e Clark, 1999).

O processo inflamatório pode passar de agudo para crônico quando há a permanência do estímulo lesivo, sendo a inflamação crônica caracterizada por aumento do número de macrófagos no local, proliferação de fibroblastos, que

aumenta a síntese de matriz, a angiogênese e a lesão tecidual (Jackson et al., 1997). Esse aumento na angiogênese leva a mecanismos de *feedback* positivo entre os vasos e o infiltrado inflamatório os quais irão sustentar a formação de novos vasos e promover uma resposta inflamatória exacerbada. A inflamação e a angiogênese são assim, dois processos que se interrelacionam (Carmeliet e Jain, 2000; Murdock et al., 2005; Carmeliet, 2005). Portanto, atuar sobre a formação de novos vasos sanguíneos pode promover a redução do influxo de células inflamatórias, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios e proteolíticos, e prevenir o suprimento de nutrientes para um processo inflamatório ativo. Enquanto que, atuar sobre a resposta inflamatória afetaria negativamente a formação de novos vasos sanguíneos (Costa et al., 2007).

Os mecanismos de regulação do processo angiogênico e resposta inflamatória envolvem uma sequência de eventos influenciados por sinais biológicos através da liberação de mediadores como citocinas e quimiocinas (Coussers e Werb, 2002; Otrrock et al., 2007;).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma citocina, considerada como um dos mais importantes fatores pró-angiogênicos. Ele também age na potencialização do aumento da permeabilidade vascular que pode preceder ou acompanhar a angiogênese (Hoeben et al., 2004).

O fator de necrose tumoral (TNF) é representado por dois polipeptídios homólogos derivados de fagócitos mononucleares e linfócitos (TNF- α e TNF- β). O TNF- α é um potente ativador de neutrófilos, mediando a aderência, quimiotaxia, degranulação e a explosão respiratória deste tipo celular (Sedgwick et al., 2000; Borish e Steinke, 2003). Além disto, o TNF- α aumenta a expressão de VEGF e dos receptores desta citocina nas células endoteliais (Balkwill e Mantovani, 2001).

As quimiocinas formam uma grande família de citocinas estruturalmente homologas, de baixa massa molecular (8-12 kDa). Elas são reconhecidas por seus efeitos de ativação e diferenciação celular, por estimular o movimento dos leucócitos e regular sua migração do sangue para os tecidos. Atualmente, tem sido reconhecido seu papel em muitos processos biológicos tais como angiogênese, produção de colágeno, hematopoese, organogênese, proliferação celular, polarização linfocitária, apoptose, metástase e defesa (Gerard e Rollins, 2001; Murakami et al., 2004; Esche et al., 2005).

As quimiocinas dividem-se em quatro sub-grupos com base no número e no espaçamento entre os seus dois primeiros resíduos de cisteína conservados na posição amino-terminal. São classificadas como CC, CXC, CX3C e C, onde “X” e um aminoácido (Bernardini et al., 2003; Zimmermann et al., 2003).

As quimiocinas CC exibem os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes. Compõe este grupo a Proteína-1 quimiotática para monócitos (MCP-1/JE) atualmente denominada CCL2 (Kunkel et al., 1995). O MCP-1 é essencial no recrutamento de monócitos, e quimiotática para células endoteliais humanas, induz *in vivo* a formação de vasos sanguíneos, sendo essa resposta angiogênica por ação indireta (via leucócitos) e direta (via receptor CCR2, presente na célula endotelial) (Salcedo et al., 2000).

As quimiocinas CXC tem um resíduo de aminoácido entre os dois primeiros resíduos de cisteína e atuam principalmente nos neutrófilos. Esse grupo pode ser subdividido baseado na presença ou ausência da sequência de aminoácidos Glu-Leu-Arg (ELR) precedendo o primeiro resíduo de cisteína. O motivo ELR é importante na regulação da angiogênese induzida por quimiocinas CXC (Kunkel et al., 1995, Addison et al., 2000). Vários estudos têm mostrado que as quimiocinas CXC exercem importante papel na angiogênese associada aos processos inflamatórios, de reparo e tumorais (Szekanecz et al., 1998; Moore et al., 1998; Belperio et al., 2000).

O sítio Arg-Gly-Asp (RGD) é um importante sítio matricrítico que está presente na fibronectina e outras proteínas da matriz extracelular como colágenos, vitronectina e osteopontina (Ruoslahti, 1996). Esse motivo RGD é exposto pela proteólise e pode se ligar às integrinas e assim, promover a adesão, migração, proliferação, sobrevivência e interação célula-célula durante a angiogênese (Ramjaun e Hodivala-Dilke, 2009). O uso de peptídeos solúveis que competem com a ligação do RGD às integrinas tem um importante potencial terapêutico em desordens caracterizadas pela vascularização exacerbada ou aberrante como o câncer e as inflamações crônicas (Meyer et al., 2006).

As SVMPs da classe P-II e P-III podem apresentar em seu domínio desintegrinas a sequência RGD ou uma sequência semelhante, com habilidade de bloquear a interação de integrinas com seus ligantes (Calvete, et al., 2005).

Contortrostatina e Accutina são desintegrinas livres, provenientes da peçonha da serpente do gênero *Agkistrodon*, com atividade de inibição da angiogênese através do bloqueio de integrinas (Yeh et al., 1998; Golubkov et al., 2003;). Não há relatos de SVMPs da classe P-I atuando na inibição da angiogênese.

Referências

ADDISON, C.L.; DANIEL, T.O.; BURDICK, M.D.; LIU, H.; EHLERT, J.E.; XUE, Y.Y.; BUECHI, L.; WALZ, A.; RICHMOND, A.; STRIETER, R.M., 2000. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. **J Immunol.**, v. 165, n.9, p. 5269-5277.

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

ALAM, J.M., QASIM, R., ALAM, S.M., 1996. Enzymatic activities of some snake venoms from families Elapidae and Viperidae. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v.9, n. 1, p. 37-41.

ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C., 2004. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v.114, p.447-453.

ANDREWS, R.K., BERNDT, M.C., 2000. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v.38, p.775-791.

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

ANDREWS, R.K.; LÓPEZ, J.A.; BERNDT, M.C., 1997. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, p. 91-105.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B., 2009. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v.54, p.949-957.

BALKWILL, F. & MANTOVANI, A., 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow. **Lancet**, v. 357, p. 539-545.

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

BELPERIO, J. A.; KEANE, M. P.; ARENBERG, D. A.; ADDISON, C. L.; EHLERT, J. E.; BURDICK, M. D. & STRIETER, R. M., 2000. CXC chemokines in angiogenesis. **J Leukoc Biol.**, v. 68, n. 1, p. 1-8.

BENELLI, R.; LORUSSO, G.; ALBINI, A.; NOONAN, D.M., 2006. Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. **Curr. Pharm. Des.**,v. 12, n. 24, p. 3101-3115.

BENJAMIN, L. E.; HEMO, I. & KESHET, E., 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. **Development.**, v. 125, n. 9, 1591-1598.

BENNETT, J.S., 2001. Platelet-fibrinogen interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 340-354.

BERNARDINI, G.; RIBATTI, D.; SPINETTI, G.; MORBIDELLI, L.; ZICHE, M.; SANTONI, A.; CAPOGROSSI, M.C. & NAPOLITANO, M., 2003. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. **J Immunol Methods.**, v. 273, n. 1-2, p. 83-101.

BERNARDI, P.S.; MOREIRA, H.W., 2004. 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.

BERNDT, M.C.; SHEN, Y.; DOPHEIDE, S.M.; GARDINER, E.E.; ANDREWS, R.K., 2001. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, p. 178-188.

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

BORISH, I. C. & STEINKE, J. W., 2003. Cytokines and chemokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 11, p. 460-475.

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

CALGAROTTO, A.K.; DAMICO, D.C.S.; PONCE-SOTO, L.A.; BALDASSO, P.A.; SILVA, S.L.; SOUZA, G.H.M.F; EBERLIN, M.N.; MARANGONI, S., 2008. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v.51, p.1509-1519.

CALVETE, J.J., 1994. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 72, p. 1-15.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L., 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-1074.

CARMELIET, P., 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med.**, v. 6, n. 4, p. 389-95.

CARMELIET, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.**, v. 9, n. 6, p. 653-660.

CARMELIET, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nat.**, v. 438, n. 7070, p. 932-936.

CARMELIET, P. & JAIN, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nat.**, v. 407, n. 6801, p. 249-257.

COSTA, C.; INCIO, J.; SOARES, R., 2007. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? **Angiog.**, v. 10, n. 3, p. 149-166.

COSTA, F.L.S.; RODRIGUES, R.S.; IZIDORO, L.F.M.; MENALDO, D.L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; FULY, A.L.; SOARES, S.G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M., 2009. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.54, p.725-35.

COSTA, J.O.; FONSECA, K.C.; MAMEDE, C.C.N.M.; BELETTI, M.E.; SANTOS-FILHO, N.A.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C.; HIRAYAMA, S.N.S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F., 2010. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377.

COUSSERS, L.; WERB, Z., 2002. Inflammation and cancer. **Nat.**, v. 420, n. 6927, p. 860-867.

D'AMORE, P.A. & THOMPSON, R.W., 1987. Mechanisms of angiogenesis. **Annu Rev Physiol.**, v. 49, p. 453-464.

DAHLBACK, B., 2000. Blood coagulation. **Lancet**, v.355, p.1627-1632.

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

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

ESCHE, C.; STELLATO, C. & BECK, L.A. (2005). Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. **J Invest Dermatol.**, v. 125, n.4, p. 615-28.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A., 1988. *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.

FOLKMAN, J., 1995. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid and other disease. **Nat. Med.**, v. 1, n. 1, p. 27 -31.

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

FOX, J.W.; SERRANO, S.M.T., 2008. 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.

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

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

GERARD, C.; ROLLINS, B. J., 2001. Chemokines and disease. **Nat Immunol.**, v. 2, n. 2, p. 108-115.

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

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

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B., 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n.11, p. 1405–1424.

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

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

HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M.S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A.T. & DE BRUIJN, E.A., 2004. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Rev.**, v. 56, n.4, p. 549-80.

HEIL, M.; EITENMÜLLER, I.; SCHMITZ-RIXEN, T.; SCHAPER, W., 2006. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 10, n. 1, p. 45-55.

HOURANI, S.M.O.; CUSACK, N.J., 1991. Pharmacological receptors on blood platelets. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 243-298.

JACKSON, J.R.; BOLOGNESE, B.; KIRCHER, C.H.; MARSHALL, L.A.; WINKLER, J.D., 1997. Modulation of angiogenesis in a model of chronic inflammation. **Inflamm. Res.**, v. 46, n. 2 Suppl, p. S129-30.

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

JAIN, R. K., 2003. Molecular regulation of vessel maturation. **Nat. Med.**, 9, 685-693.

Jenny, N.S. e Mann, K.G., 1998. Coagulation Cascade: An Overview. In Loscalzo, J. e Schafer, A.I. (eds.), **Thrombosis and Hemorrhage**. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 3-27.

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

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

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

KAMIGUTI, A. S.; SLUPSKY, J. R.; ZUZEL, M.; HAY, C. R., 1994. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb. Haemost.**, v. 72, n. 2, p. 244-249.

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

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

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

KINI, R. M.; EVANS, H. J., 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635.

KOCHVA, E., NAKAR, O., OVADIA, M., 1983. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. **Am. Zool.**, v. 23, p. 427-430.

KUDO, I.; MURAKAMI, M., 2002. Phospholipases A2 enzymes. **Prostaglandins other lipid mediat.**, v. 69, p. 3-58.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N., Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. In: ROBBINS. Patologia básica. 8ed. Rio de Janeiro: **Elsevier** Ltda, 2008, p. 81-106.

KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; SCHOEN, F.J. Robbins – Patologia estrutural e funcional. 7ed. Rio de Janeiro: **Elsevier** Ltda, 2005.

KUNKEL, S. L.; LUKACS, N.; STRIETER, R. M., 1995. Chemokines and their role in human disease. **Agents Actions Suppl.**, v. 46, p. 11-22.

MAESHIMA, Y.; COLORADO, P.C.; TORRE, A.; HOLTHAUS, K.A.; GRUNKEMEYER, J.A.; ERICKSEN, M.B.; HOPFER, H.; XIAO, Y.; STILLMAN, I.E. & KALLURI, R., 2000. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 28, p. 21340-8.

MAGALHÃES, A.; MAGALHÃES, H.P.B. RICHARDSON., M.; GONTIJO, S.; FERREIRA, R.N.; ALMEIDA, A.P.; SANCHEZ, E.F., 2007. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v.146, p.565-575.

MARKLAND JR., F.S., 1998. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 668–674.

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

MATSUI, T., FUJIMURA, Y., TITANI, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, n. 1–2, p. 146–156.

MEYER, A., AUERNHEIMER, J., MODLINGER, A., KESSLER, H., 2006. Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. **Curr Pharm Des.**, v. 12, 2006, p. 2723-47.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B., 2008. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 2897-2912.

MOORE B. B.; ARENBERG D. A.; ADDISON C. L.; KEANE M. P.; STRIETER R. M., 1998. Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 132, p. 97-103.

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

MURAKAMI, T.; CARDONES, A. R. & HWANG, S. T., 2004. Chemokine receptors and melanoma metastasis. **J Dermatol Sci.**, v. 36, n. 2, p. 71-8.

NALDINI, A. & CARRARO, F., 2005. Role of inflammatory mediators in angiogenesis. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.**, v. 4, n. 1, p. 3-8

O'REILLY, M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; FUKAI, N.; VASIOS, G.; LANE, W.S.; LYNN, E.; BIRKHEAD, J.R.; OLSEN, B.R.; FOLKMAN, J., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 277-85.

OLIVEIRA, F. **Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthas) e caracterização bioquímica da BthTI.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

OTROCK, Z.K.; MAHFOUZ, R.A.R.; MAKAREM, J.A.; SHAMSEDDINE, A.I., 2007. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 39, n. 2, p. 212-220.

PIRKLE, H., 1998. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thromb. Haemostasis**, v. 79, p. 675-683.

RA, H.J.; PARKS, W.C., 2007. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology**, v. 26, p. 587-596.

RAMJAUN, A.R. & HODIVALA-DILKE, K., 2009. The role of cell adhesion pathways in angiogenesis. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 41, p. 521-530.

RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., 2006. Review: snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v. 142, p. 328–346.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Farmacologia. 5ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2004.

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R., 2000. Structural and Functional Characterization of Neuwiedase, a Nonhemorrhagic Fibrin(ogen)olytic Metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* Snake Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, p. 213-224.

RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; MARCUSSI, S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; SOARES, A. M., 2004. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi* pauloensis snake venom, **Toxicon.**, v. 44, p. 305-314.

RUOSLAHTI, E., 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 12, p. 697-715.

SALCEDO, R.; PONCE, M. L.; YOUNG, H. A.; WASSERMAN, K.; WARD, J. M.; KLEINMAN, H. K.; OPPENHEIM, J. J. & MURPHY, W. J., 2000. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. **Blood**, v. 96, n. 1, p. 34-40.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M., 2008. 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.

SEDGWICK, J. D.; RIMINTON, D. S.; CYSTER, J. G. & KORNER, H., 2000. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. **Immunol. Today**, v. 21, n. 3, p. 110-113.

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

SINGER, A.J. & CLARK, R.A., 1999. Cutaneous wound healing. **N.Engl. J. Med. Vol.**, v. 341, p 738-746.

SINGLETERY, E.M.; ROCHMAN, A.S.; BODMER, J.C.A.; HOLSTEGE, C.P., 2005. Envenomations. **The Medical Clinics of North America**, v. 89, p. 1195-1224.

SILVA, C. A.; ZULIANI, J. P.; ASSAKURA, M. T.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; TEIXEIRA, C. F.; SERRANO, S. M., 2004. Activation of alpha(M)beta(2)-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 322, n. 3, p. 950-956.

SOARES, A.M., FONTES, M.R.M., GIGLIO, J.R., 2004. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, p. 1677-1690.

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

SZEKANECZ, Z.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. & KOCH, A. E., 1998. Chemokines in rheumatoid arthritis. **Springer Semin Immunopathol.**, v. 20, n.1-2, p. 115-32.

TASHIMA, A.K.; SANZ, L.; CAMARGO, A.C.M.; SERRANO, S.M.T.; CALVETE, J.J., 2008. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **J Proteomics**, v. 71, p. 473–485.

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

VALERIANO-ZAPANA, J.A.; SEGOVIA-CRUZ, F.S.; ROJAS-HUALPA, J.M.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S., 2012. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean Lancehead) snake venom. **Toxicon**, v. 59 (2), p. 231-240.

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**, v. 55, p. 745-753.

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

WARSHAWSKY, H., HADDAD, A., GONÇALVES, R., VELERI, V., DE LUCCA, F., 1973. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by secretory cells. **Am J. Anat.**, v. 138, p. 79-120.

WHITE, J.G. The morphology of platelet function. In: HARKER, L.A. ; ZIMMERMAN, T.S., 1983. Measurements of platelet function. **New York: Churchill Livingstone**, p. 1-25.

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

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

YOU, W. K.; JANG, Y. J.; CHUNG, K. H.; JEON, O. H.; KIM, D. S., 2006. Functional roles of the two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 339, n. 3, p. 964-970.

ZIMMERMANN, N.; HERSHEY, G.K.; FOSTER, P. S.; ROTHENBERG, M. E., 2003. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, p. 227-242.

Capítulo II

Trabalho Experimental:

Inhibition of inflammatory angiogenesis and platelet aggregation by BmooMP α -I, a P-I metalloproteinase from Bothrops moojeni snake venom

Resultados e implicações desse trabalho são apresentados de acordo com padrões textuais e científicos exigidos pelo periódico a ser submetido (Toxicon)

Inhibition of inflammatory angiogenesis and platelet aggregation by BmooMP α -I, a P-I metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom

Saulo A. G. Filho ^a, Simone Ramos Deconte ^a, Puebla Cassini Vieira ^b, Amanda Vieira ^b, Fernanda de Assis Araújo ^b, Fábio de Oliveira ^{b,c}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

^b Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), Belo Horizonte-MG, Brazil

Abstract

The venom of snakes from genus *Bothrops* contain toxin composed of several pharmacologically active substances, especially protein constituents, which act to induce local and systemic physiological changes in the body in which it is inoculated. Among the enzymatic component of the venoms are metalloproteinases, which are proteolytic enzymes zinc-dependents involved in the effects of ofidic envenoming. BmooMP α -I is a fibrin(ogen)olytic non-hemorrhagic enzyme isolated from *B. moojeni* snake venom. It shows a molecular mass of about 24.5 kDa, and belongs to the P-I class. In order to investigate its activity in relation to physiological processes, this work had as objective evaluated the BmooMP α -I influence in platelet aggregation and in inflammatory angiogenesis. The enzyme inhibited specifically the epinephrine-induced platelet aggregation when previously incubated with platelet rich plasma, not showing inhibition with ADP, collagen and ristocetin. Its activity is suppressed by denaturation, showing the dependence of the enzymatic action in the inhibition mechanism. About the inflammatory angiogenesis, our results showed that BmooMP α -I is an angiogenesis inhibitor.

Keyword: *Bothrops moojeni*, metalloproteinase, platelet aggregation, angiogenesis.

Resumo

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* contêm toxinas compostas por várias substâncias farmacologicamente ativas, principalmente constituintes protéicos, que atuam na indução de alterações fisiológicas locais e sistêmicas no organismo no qual é inoculada. Dentre o componente enzimático das peçonhas estão as metaloproteases, que são enzimas proteolíticas dependentes de zinco, envolvidas nos efeitos do envenenamento ofídico. BmooMP α -I é uma enzima fibrin(ogen)olítica não-hemorrágica isolada da peçonha de *B. moojeni*. Ela possui massa molecular aproximada de 24,5 kDa, pertencendo à classe P-I. A fim de investigar sua atividade em relação a processos fisiológicos, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da BmooMP α -I sobre a agregação plaquetária e sobre a angiogênese inflamatória. A enzima inibiu especificamente a agregação plaquetária induzida por epinefrina quando incubada previamente com o plasma rico em plaquetas, não demonstrando inibição com ADP, colágeno e ristocetina. Sua atividade é suprimida pela desnaturação, evidenciando a dependência da ação enzimática no mecanismo de inibição. Sobre a angiogênese inflamatória, nossos resultados mostraram que a BmooMP α -I é um inibidor da angiogênese.

Palavras-chave: *Bothrops moojeni*, metaloproteases, agregação plaquetária, angiogênese.

Introduction

Envenoming represents a public health problem world wide with 1.841.000 cases per year according to World Health Organization (2010). In Brazil, occurred 21.446 cases reported to Ministry of Health and 74% were caused by snakes from genus *Bothrops* (Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN, 2010). The specie responsible for the most snakebite accidents registered in the Hospital of Clinics of Federal University of Uberlândia-MG is *B. moojeni* (Da Silva et al., 2003).

The clinic manifestation of the bite depends on the composition of the venom. *Bothrops* envenoming are characterized by local and systemic effects. Necrosis, edema, hemorrhage and inflammation are included in the local manifestations while systemic effects are coagulopathy, internal hemorrhage, cardiovascular shock and acute renal failure (Cardoso et al., 2003; França and Málaque, 2003; Costa et al., 2010).

In its composition, snake venom has many different compounds with the predominance of proteins with enzymatic action. Several of these compounds display an interesting whole in envenomation leading to physiological alterations in the victim organism such as interference in the platelet aggregation (Francischetti, 1998; Kamiguti, 2005; Calvete et al., 2007; Zychar et al., 2010).

Bernardes et al (2008) described the isolation of BmooMP α -I. This enzyme is a fibrin(ogen)olytic non-hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. The toxin showed a molecular mass of about 24.5 kDa and induces defibrinating activity. In this report, we investigate the effects of BmooMP α -I in platelet aggregation and, using the sponge implantation model, we evaluate local inflammatory changes, angiogenesis index and fibrogenic response.

Materials and methods

Bothrops moojeni venom

Desiccated *B. moojeni* venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais-SP, Brazil).

Animals

Male Swiss mice 7–8 weeks (30–35 g body weight) used in these experiments were obtained by donation from Vallée S.A. e Pentapharm do Brasil LTDA (Uberlândia-MG, Brazil). The animals were housed individually in a temperature-controlled room (23°C), on an automatic 12 h light/dark cycle (6 a.m. to 6 p.m. of light phase) and provided with food and water *ad libitum*. Housing, anaesthesia, postoperative care and the experimental protocol was approved and concurred with the guidelines established by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU, Protocol number 007/11).

Isolation of BmooMP α -I

BmooMP α -I was purified from *B. moojeni* snake venom as previously described by Bernardes et al. (2008) with modifications. Crude venom of *B. moojeni* (200mg) was dissolved in 50mM ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) and clarified by centrifugation at 10.000xg for 10min. The supernatant solution was chromatographed on a DEAE-Sephacel column (2,5 x 20cm), previously equilibrated with 50mM, pH 7.8, ammonium bicarbonate (AMBIC) and eluted with a concentration gradient (50mM—0.45M) of the same buffer. Fractions of 3.0mL/tube were collected, their absorbances at $\lambda = 280\text{nm}$ were read and those corresponding to peak D2 were pooled, lyophilized, dissolved in 50mM, pH 7.8, ammonium bicarbonate and applied on HiPrepTM 26/60 SephacrylTM S-300 in HPLC - ÄKTApurifierTM 10 system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden). Samples were eluted from this column with the same buffer at a flow rate of 1mL/min. All peaks were monitored by absorbance at 280nm.

Estimation of protein concentration

Protein concentration was determined by the method of Itzhaki and Gill (1964), using bovine serum albumin as standard.

Electrophoretic analysis

Electrophoresis using polyacrylamide gels (SDS–PAGE) was performed as described by Laemmli (1970) 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 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactoalbumin (14.4 kDa). The slab gels were stained with coomassie blue R-250. The relative molecular mass of the purified enzyme was estimated by Kodak 1D image analysis software.

Platelet aggregation assay

The platelet-rich plasma (PRP) was prepared as described by Sanchez et al. (2010) with slight modifications. The *pool* of human blood, collected in presence of sodium citrate (3.8%), was centrifuged at 100xg during 12min at room temperature. After the removing of PRP, the sample of blood was submitted to a new centrifugation at 1000xg for 15min to obtain the platelet poor plasma (PPP). The aggregation was measured utilizing a 4 channels automatic Aggregometer (AggRAM™ 1.1 version, Helena Laboratories, EUA). Different doses of enzyme (5, 15 e 50 μ g) were pre-incubated (20-30min) with 200 μ L of PRP. Then the solution contained PRP and enzyme received the platelet agonists. We used the following agonists: ADP (20 μ M), collagen (10 μ g/mL), ristocetin (1mg/mL), arachidonic acid (200 μ M) and epinephrine (300 μ M).

The assay resulting curves were expressed in percentage of aggregation related to the PPP absorbance, which represents 100% of aggregation. Controls received saline instead of enzyme.

Sponge implants assay

Preparation of sponge discs, implantation and treatment

Polyether-polyurethane sponge (Vitafoam Ltd., Manchester, UK) was used as the implanted material. The implants were discs, 5mm thick X 8mm diameter and were soaked overnight in 70% v/v ethanol and sterilized by boiling in distilled water for 15 minutes before implantation. For that, the animals were anaesthetized with xilazin/ketamin (10mg/kg e 60mg/kg, respectively), the dorsal hair shaved and the skin wiped with 70% ethanol. The sponge discs were aseptically implanted into a subcutaneous pouch, which had been made with curved artery forceps through a 1cm long dorsal mid-line incision. Postoperatively, the animals were monitored for any signs of infection at the operative site, discomfort or distress; any showing such signs were immediately humanely killed. Animal received daily 10 μ L injection intraimplant containing different doses of BmooMP α -I (1000ng, 100ng, 10ng). The treatment started one day after the implantation and lasted for 9 days. The control group of mice received saline according to the same schedule. The treatment and sponge implants were well tolerated by the mice over the experimental period.

Hemoglobin extraction

The extent of the vascularization of the sponge implants was assessed by the amount of hemoglobin (Hb) detected in the tissue using the Drabkin's method (Drabkin, 1935) e adapted with the vascularization index by Plunkett *et al.* (1990) and Hu *et al.* (1995). Nine days postimplantation, the animals were euthanized and the sponge implants carefully removed, dissected from adherent tissue, weighed. Each implant was homogenized (Tekmar TR-10, OH) in 2mL of Drabkin reagent (Labtest, São Paulo, Brazil), and centrifuged at 12,000xg for 20min. The supernatants were filtered through a 0.22- μ m millipore filter. The hemoglobin concentration of the samples was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 540nm using an Elisa plate reader and was compared against a standard curve of hemoglobin. The content of hemoglobin in the implant was expressed as μ g Hb per mg wet tissue.

Tissue extraction and determination of N-acetylglucosaminidase activity

The infiltration of mononuclear cells into the implants was quantified by measuring the levels of the lysosomal enzyme N-acetylglucosaminidase (NAG) which is present in high levels in activated macrophages as previously described (Phillips, 2004; Ferreira, 2007;). After processing the supernatant of the implants for the hemoglobin determination (see above), a part of the corresponding pellet was kept for this assay. These pellets were weighed, homogenized in NaCl solution (0.9% w/v) containing 0.1% v/v Triton X-100 (Promega), and centrifuged (3.000xg; 10 min at 4°C). Samples of the resulting supernatant (100µL) were incubated for 10min with 100µL of P-nitrophenyl-N-acetyl-beta-D-glucosaminide (Sigma) prepared in citrate/phosphate buffer (0.1M citric acid, 0.1M Na₂HPO₄; pH 4.5) to yield a final concentration of 2.24mM. The reaction was stopped by the addition of 100µL of 0.2M glycine buffer (pH 10.6). Hydrolysis of the substrate was determined by measuring the absorption at 400nm. The readings were interpolated on a standard curve constructed with p-nitrophenol (0–500nmol/mL) (Sigma-Aldrich). Data are reported as nanomole of products formed per milligram of wet tissue (implant).

Measurement of VEGF, TNF- α , KC and MCP-1 production in the sponge implants

For this procedure, the implants were removed at day 9 postimplantation, homogenized in PBS pH 7.4 containing 0.05% Tween 20 and centrifuged at 10.000xg for 30min. The cytokines VEGF, TNF- α , KC and MCP-1 in the supernatant from each implant were measured in 50µL of the supernatant using Immunoassay Kits (R and D Systems, USA) following the manufacturer's protocol. Briefly, dilutions of cell-free supernatants were added in duplicate to ELISA plates that were coated with a specific murine monoclonal antibody against the cytokine. This was followed by the addition of a second horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody against the cytokine. After washing to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution (50µL of a 1:1 solution of hydrogen peroxide and tetramethylbenzidine 10mg/mL in DMSO) was added to the wells. Color development was stopped, after 20min of incubation, with 2N sulphuric acid (50µL) and the intensity of the color was measured at 540nm on MR-96A

microplate reader (Mindray, China). Standards were 0.5- \log_{10} dilutions of recombinant murine cytokines from 7.5pg/mL to 1000pg/mL (100 μ L). The results were expressed as pico cytokine per milligram wet tissue.

Collagen measurement

Total soluble collagen was measured in whole tissue homogenates by the Sirius Red reagent based-assay (Phillips, 2004; Campos, 2008;). The implants were homogenized in 1mL of PBS and 50 μ L of sample were mixed with 50 μ L of Sirius Red reagent. Samples were mixed by gentle inversion. The collagen-dye complex was precipitated by centrifugation at 5000xg for 10min. The supernatants were drained off and discarded and the pellet washed with 500 μ L of ethanol (99% pure and methanol free). One milliliter of a 0.5M NaOH solution was added to the remaining pellet of collagen-bound dye. After solubilization, samples were transferred to a 96-well plate and read at 540nm. The calibration curve was set up on the basis of a gelatin standard (Merck, USA). The results are expressed as microgram collagen per milligram wet tissue.

Statistical Analysis

All data are expressed as mean \pm standard deviation. Comparisons were carried out using one-way analysis of variance (Anova) followed by Newman-Keuls correction factor for multiple comparisons as a post-test. Groups contained 15 animals. Differences between means were considered significant when *P* value was < 0.05.

Results

Isolation of BmooMP α -I

Chromatography of *B. moojeni* venom on a DEAE-Sephacel column (Fig. 1A) resulted in the separation of several protein fractions. BmooMP α -I it is found in P2 fraction, we ensure that by analyzing and comparing the proteolytic activity and electrophoretic profile of the fraction (data not shown). BmooMP α -I was isolated from P2 fraction by a second chromatography step on HiPrepTM 26/60 SephacrylTM S-300 column (Fig. 1B). Electrophoretic (SDS-PAGE) analysis (Fig. 1C) under

denaturing and reducing conditions demonstrated that BmooMP α -I enzyme, with 24.5kDa (23kDa under non-reducing conditions), was obtained with high purity.

Platelet aggregation assay

Several platelet agonists were utilized in the platelet aggregation assay. BmooMP α -I demonstrated dose-dependent inhibition activity in aggregation induced by epinephrine (Fig. 2A). In addition, the inhibition mechanism depends on the proteolytic activity of BmooMP α -I. In Fig. 2B we can see that the enzyme denatured by heating (heated at 100°C by 15min before the assay) showed decreased activity. Our results also showed that BmooMP α -I only inhibited platelet aggregation when previously incubated with PRP (Fig. 2C).

The enzyme also showed partial inhibition in aggregation induced by arachidonic acid (Fig. 3) and did not inhibited aggregation induced by ADP, collagen and ristocetin (data not shown).

Measurement of anti-angiogenic effects

Daily doses of BmooMP α -I (10ng, 100ng and 1000ng) given to different groups of mice during 8 days reduced neovascularization of the implants, as detected by changes in the hemoglobin content (Fig. 4A) and in the levels of VEGF of the implants (a marker for angiogenesis) (Fig. 4B).

Measurement of leukocyte accumulation and the proinflammatory cytokines

The inflammatory components of the sponge-induced inflammation were determined by estimating the numbers of the leukocytes in the implant by assaying inflammatory enzyme activities and levels of pro-inflammatory cytokines (CXCL2 [KC] and CCL2 [MCP-1/JE]). Macrophages numbers (as NAG activity) was not affected by BmooMP α -I treatment (Fig. 5A). However, the compound at both doses (10ng and 100ng) was able to decrease CXCL2 (KC) and CCL2 (MCP-1/JE) levels in the implants (Fig. 5B and 5C).

Measurement of TNF- α and collagen deposition

In the supernatant of the implants there was no significant influence in cytokine levels (TNF- α) and in collagen deposition intrainplant by BmooMP α -I treatment (data not shown).

Discussion

Proteinases from venomous snakes act in the induction of local and systemic physiological alterations in the organism in which the venom is inoculated (Francischetti, 1998). The knowledge of the action mechanisms of these proteinases could lead to the elaboration of pharmacological model with efficiency in treatment of envenomation itself and other similar dysfunctions, as well as several clinical applications, in diagnosis or therapeutic (Marsh and Williams, 2005). In this study we purified and investigate the influence of BmooMP α -I in platelet aggregation and chronic inflammatory responses. This enzyme is a metalloproteinase that, according to Fox and Serrano (2008) classification, belongs to the P-I class. BmooMP α -I is a fibrin(ogen)olytic toxin isolated from *B. moojeni* snake venom by Bernardes et al. (2008) and, the characterization of the enzyme, showed that it cause defibrinogenation *in vivo* but has non-hemorrhagic, phospholipase A₂ or thrombin-like activities.

In our work, we described the involvement of the BmooMP α -I in platelet aggregation, demonstrating the inhibition caused by the enzyme. We also show its influence in chronic inflammatory responses as well, which allow us the characterization of key components of fibrovascular tissue as cell influx, blood vessels formation and extracellular matrix deposition.

The blood vessel lesions results in subendotelial proteins exposition such as collagen and vWF. These molecules bind to specific receptors presents in platelet surface. This phenomenon stimulates the platelet activation and leads to intracellular second messengers generation that result in responses that include cytoskeletal rearrangement, granules exocytosis and GPIIb/IIIa (α IIb β 3 integrin) receptors expression. The plasmatic fibrinogen bind to the expressed receptor promoting the adjacent platelet binding, which adhere to each other, generating

the platelet aggregation and the origin of the hemostatic tampon (Shlansky-Goldberg, 2002; Fuly et al., 2004).

The snakes venom show a great variety of toxin that affect the platelet function by acting in the specific receptors in the platelet surface or their ligands (Andrews and Berndt, 2000; Kamiguti, 2005; Marsh and Williams, 2005; Sanchez et al., 2010). The interference in platelet aggregation is related to the toxin structure (Moura-da-Silva, 2007). SVMPs from P-III class have several ways to inhibit platelet aggregation such as: cleavage of GPIb (the platelet vWF receptor glycoprotein) by Mocarhagin from *Naja mocambique mocambique* (Ward et al., 1996); binding and cleavage of $\alpha 2\beta 1$ integrin by Jararhagin from *Bothrops jararaca* (Kamiguti et al., 1996); binding to collagen by Cetrocollastatin from *Crotalus atrox* (Zhou, 1995); and cleavage of vWF by Acurhagin from *Agkistrodon acutus* (Wang and Huang, 2002). The main way of platelet aggregation inhibition by PII class SVMPs occur through binding of RGD motif to $\alpha 11\beta 3$ integrin as describe about Trigramin from *Trimeresurus gramineus* (Huang et al., 1989) and Echistatin from *Echis carinatus* (Gan et al., 1988).

Has been reported platelet aggregation inhibition by SVMPs from P-I class as Crotalin, isolated from *Crotalus atrox* venom, that is a vWF binding and cleaving metalloproteinase who also cleaves GPIb (Wu et al., 2001). Triflamp, from *Trimeresurus flavoviridis* has selective inhibitory activity to GPIb, as demonstrated by Tseng et al. (2004). In our work we demonstrate that BmooMP α -I inhibit platelet aggregation induced by epinephrine (Fig. 2A) and this depends on the enzymatic activity of the toxin (Fig. 2B). BjussuMP α -I, a toxin isolated from *Bothrops jararacussu* venom by Marcussi et al. (2007) show similarity to our enzyme: both are fibrin(ogen)olytic non-hemorrhagic P-I metalloproteinases that depends on enzymatic activity to inhibit platelet aggregation. Otherwise, atroxlysin-I a P-I hemorrhagic SVMP isolated from *Bothrops atrox* venom do not depend on the proteolytic activity to inhibit platelet aggregation (Sanchez et al., 2010)

We also showed that BmooMP α -I inhibition activity demands preincubation of the enzyme with platelet-rich plasma (Fig. 2C), the same behavior described to Acurhagin, from *Agkistrodon acutus*, that exerts an inhibitory effect on platelet aggregation of platelet-rich plasma in an incubation-time dependent manner (Wang and Huang, 2002).

Our results pointed that BmooMP α -I act specifically on epinephrine-induced aggregation (Fig. 2A, B and C), show only partial activity in arachidonic acid-induced aggregation (Fig. 3A) and no activity with ADP, collagen and ristocetin. Epinephrine act in aggregation by activating platelets without initial conformational change, leading to endogenous arachidonic acid releasing with TxA₂ formation and platelet secretion (Bernardi and Moreira, 2004). Our results suggest that BmooMP α -I interfere in the epinephrine platelet activation, avoiding the endogenous arachidonic acid releasing. Moreover, in the arachidonic acid-induced aggregation, the enzyme seems to interfere in aggregation that is reversed by increase of arachidonic acid concentration caused by the endogenous releasing.

All excitatory platelet agonists induces increasing in the cytosolic concentration of Ca⁺², both from internal mobilization and from the increased influx of extracellular Ca⁺², except epinephrine (Hourani and Cusack, 1991). Therefore, our results suggest that BmooMP α -I inhibition of epinephrine-induced aggregation keeps close relationship to endogenous arachidonic acid releasing and cytosolic concentration of Ca⁺².

The term angiogenesis usually defines the growth of sprouts from capillary blood vessels that depends on a delicate balance between pro- and anti-angiogenic factors. In mammals, physiological angiogenesis is restricted to specific situations, including growth, tissue regeneration and reproduction. In contrast, some angiogenesis-dependent diseases, such as tumor growth, age-related macular degeneration and atherosclerosis, have been described (Folkman, 2007)

The anti-angiogenic activity of SVMPs has been reported in the literature only for disintegrins with RGD motif. Some examples of that are the disintegrins prevent from genus *Agkistrodon* snake venom such as Contortrostatin (that presents anti-angiogenic and anti-tumor activity) and Accutin (that is an α v β 3 integrin antagonist and so inhibits angiogenesis) from *Agkistrodon contortrix contortrix* and *Agkistrodon acutus*, respectively (Yeh et al., 1998; Swenson et al., 2005;). Other disintegrins act on angiogenesis by selective α v β 3 blockade as described to Rhodostomin from *Calloselasma rhodostoma* and DisBa-01, isolated from a cDNA library made with RNAs from the venom gland of *Bothrops alternatus*

(Yeh et al., 2001; Ramos et al., 2008). There is no report of P-I SVMPs with anti-angiogenic activity.

VEGF is a cytokine that has been shown to be an essential mediator of neovascularization, inducing dose-related growth of new blood vessels (Dvorak, 2002). Our results demonstrated that BmooMP α -I act decreasing angiogenesis which was assessed by hemoglobin content (Fig. 4A) and by VEGF levels (Fig. 4B). This result is remarkable since there are no records of such activity by P-I SVMPs and by the importance of angiogenesis studies, since it is related to several pathological processes.

The inflammatory components of the implants were assessed by pro-inflammatory enzymes and cytokines measurement. NAG activity (representing activated macrophages/monocytes accumulation) was not affected by the treatment (Fig. 5A). Otherwise, CXCL2 (KC) and CCL2 (MCP-1/JE) were decreased in the implants of 10ng and 100ng BmooMP α -I -treated groups (Fig. 5B and C), suggesting that, during the treatment, there is a down regulation of macrophages and neutrophils recruitment. Although fibrogenic response assessed by collagen measurement was not affected by the enzyme administration.

In conclusion, BmooMP α -I, a metalloprotease isolated from *B. moojeni* venom is able to inhibit platelet aggregation and reveal a new way of anti-angiogenic activity by SVMPs, not related to RGD motif.

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), Ministério da Ciências e Tecnologia (MCT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

References

ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C., 2000. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v.38, p.775-791.

BERNARDI, P.S.; MOREIRA, H.W., 2004. 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.

BERNARDES, C.P.; SANTOS-FILHO, N.A.; COSTA, T.R.; GOMES, M.S.R.; TORRES, F.S.; COSTA, J.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; SANTOS, D.M.; PIMENTA, A.M.C.; HOMSI-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**, v.51, p.574-584.

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

CAMPOS PP, BAKHLE YS, ANDRADE SP., 2008. Mechanisms of wound healing responses in lupus-prone New Zealand White mouse strain. **Wound Rep Reg**, v.16, p. 416–24.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. SP: Sarvier, 2003.

COSTA, J.O.; FONSECA, K.C.; MAMEDE, C.C.N.M.; BELETTI, M.E.; SANTOS-FILHO, N.A.; SOARES, A.M.; ARANTES, E.C.; HIRAYAMA, S.N.S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; FONSECA, F.; HENRIQUE-SILVA, F.; PENHA-SILVA, N.; OLIVEIRA, F., 2010. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 1365-1377.

DA SILVA, C.J.; JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A., 2003. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, p. 251–255.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H., 1935. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphhemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 112, p. 51-65.

DVORAK, HF., 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol**, v. 21, p. 4368–80.

FRANÇA, F. O. S., MÁLAQUE, C. M. S., 2003. Acidente botrópico. In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Cardoso et al. (Orgs.). **Sarvier**, São Paulo – SP. 72-86.

FRANCISCHETTI, I.M.B.; CASTRO, H.C.; ZINGALI, R.B.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A., 1998. *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.

FERREIRA, M.A.; BARCELOS, L.S.; TEIXEIRA, M.M.; BAKHLE, Y.S.; ANDRADE, S.P., 2007. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). **Life Sci**, v. 81, p. 210–7.

FOLKMAN, J., 2007. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? **Nat. Rev. Drug Discov**, v. 6, p. 273-286.

FOX, J.W., SERRANO, S.M., 2008. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J**, v. 275(12), p.3016-30.

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**, v.86, p.731-739.

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

HOURANI, S.M.O.; CUSACK, N.J., 1991. Pharmacological receptors on blood platelets. **Pharmacological Reviews**, v.43, p.243-298.

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

HU, D. E.; HILEY, C. R.; SMITHER, R. L.; GRESHAM, G. A.; FAN, T. P., 1995. Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. **Lab Invest.**, v. 72, n. 5, p. 601-10.

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M., 1964. A micro-biuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v.9, p.401-410.

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

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

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.277, p.680-689.

MARCUSSI, S.; BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; MAZZI, M. V.; OLIVEIRA, C. Z.; IZIDORO, L. F.; FULY, A. L.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M., 2007. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*, v. 28, n. 12, p. 2328-2339.

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

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

PHILLIPS, R.J.; BURDICK, M.D.; HONG, K.; LUTZ, M.A.; MURRAY, L.A.; XUE, Y.Y., 2004. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. **J Clin Invest.**, v. 114, p. 438–46.

PLUNKETT, M. L. & HAILEY, J. A., 1990. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Lab. Invest.**, v. 62, n. 4, p. 510-517.

RAMOS, O. H. P.; KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; BECHYNE, I.; PONTES, C.L.S.; CHAREYRE, F.; MANENT, J.; VASSY, R.; GIOVANNINI, M.; LEGRAND, C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.; CREPIN, M.; BONNEFOY, A., 2008. A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 25, p. 53-64.

SANCHEZ, E.F.; SCHNEIDER, F.S.; YARLEQUE, A.; BORGES, M.H.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G.; EVANGELISTA, K.S.; EBLE, J.A., 2010. 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.

SHLANSKY-GOLDBERG, R., 2002. 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.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN. Acidente por animais peçonhentos. Disponível in: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>. Acesso: june 2012

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

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

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected Tropical Diseases – Snakebite. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/. Cited: june 2012.

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

YEH CH, PENG HC, YANG RS, HUANG TF., 2001. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells. **Mol Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p.1333-42.

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

ZHOU, Q.; SMITH, J. B.; GROSSMAN, M. H., 1995. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem. J.**, v. 307, n. 2, p. 411-417.

ZYCHAR, B.C.; DALE, C.S.; DEMARCHI, D.S.; GONÇALVES, L.R.C. 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.

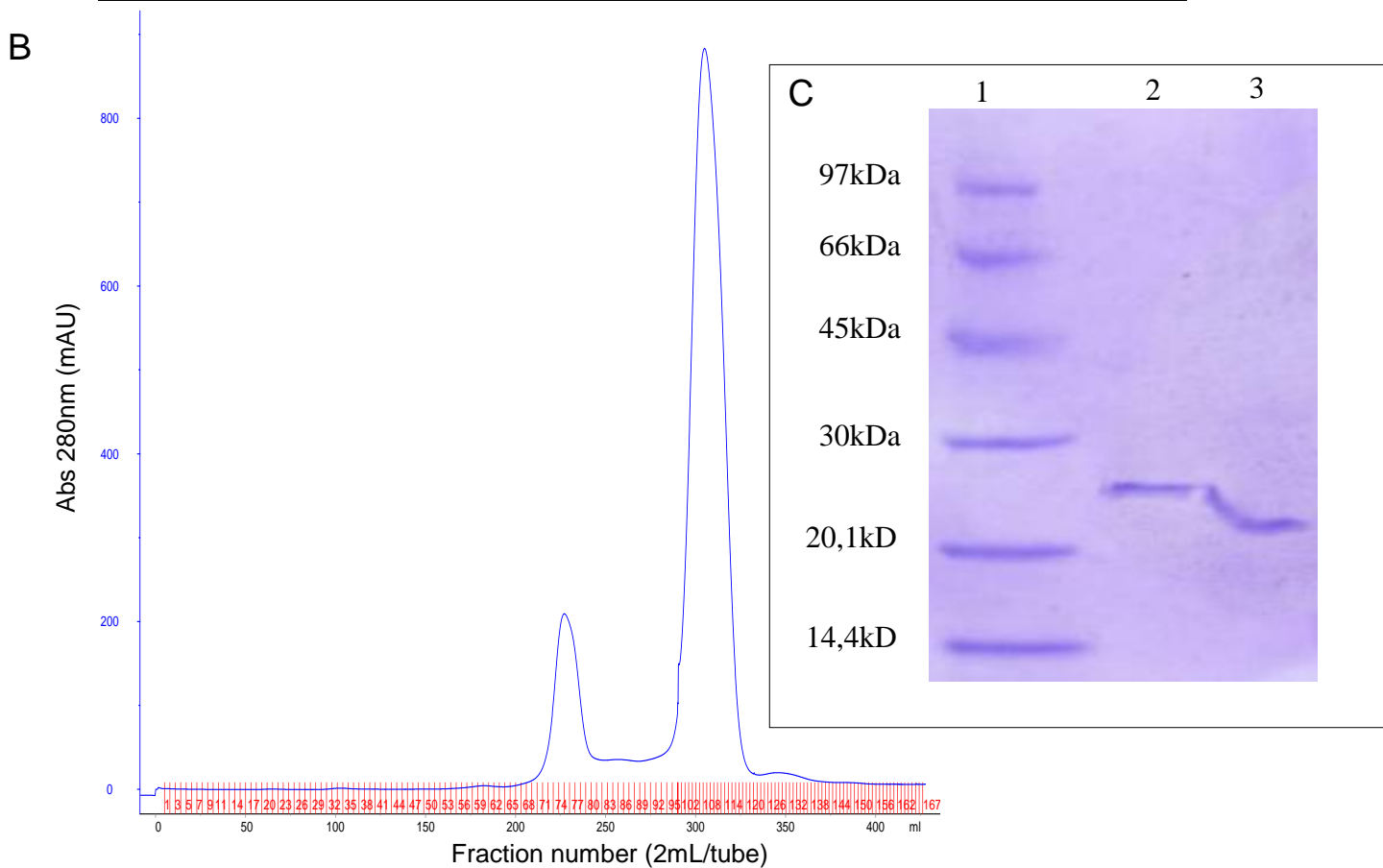
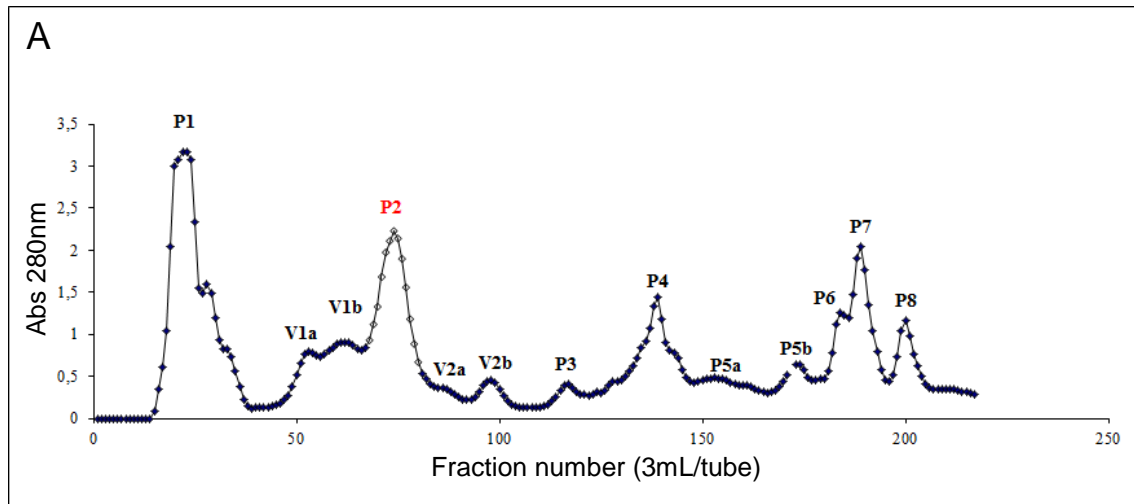


Figure 1. Purification of BmooMP α -I. (A) Anion-exchange chromatography of *Bothrops moojeni* crude venom on a DEAE–Sephacel column (2,5 x 20cm) equilibrated with 50mM ammonium bicarbonate (pH 7.8) and eluted with a convex concentration gradient of the same buffer (0,05–0,6M). (B) Gel filtration of the P2 fraction (indicated by the empty lozenge) on HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-300 in ÄKTApurifier™ 10 HPLC system, equilibrated and eluted with 50mM ammonium bicarbonate (pH 7.8). (C) SDS–PAGE: Lane 1 - standard proteins. Lane 2 – BmooMP α -I (10 μ g) under reducing conditions. Lane 3 – BmooMP α -I (10 μ g) non-reducing.

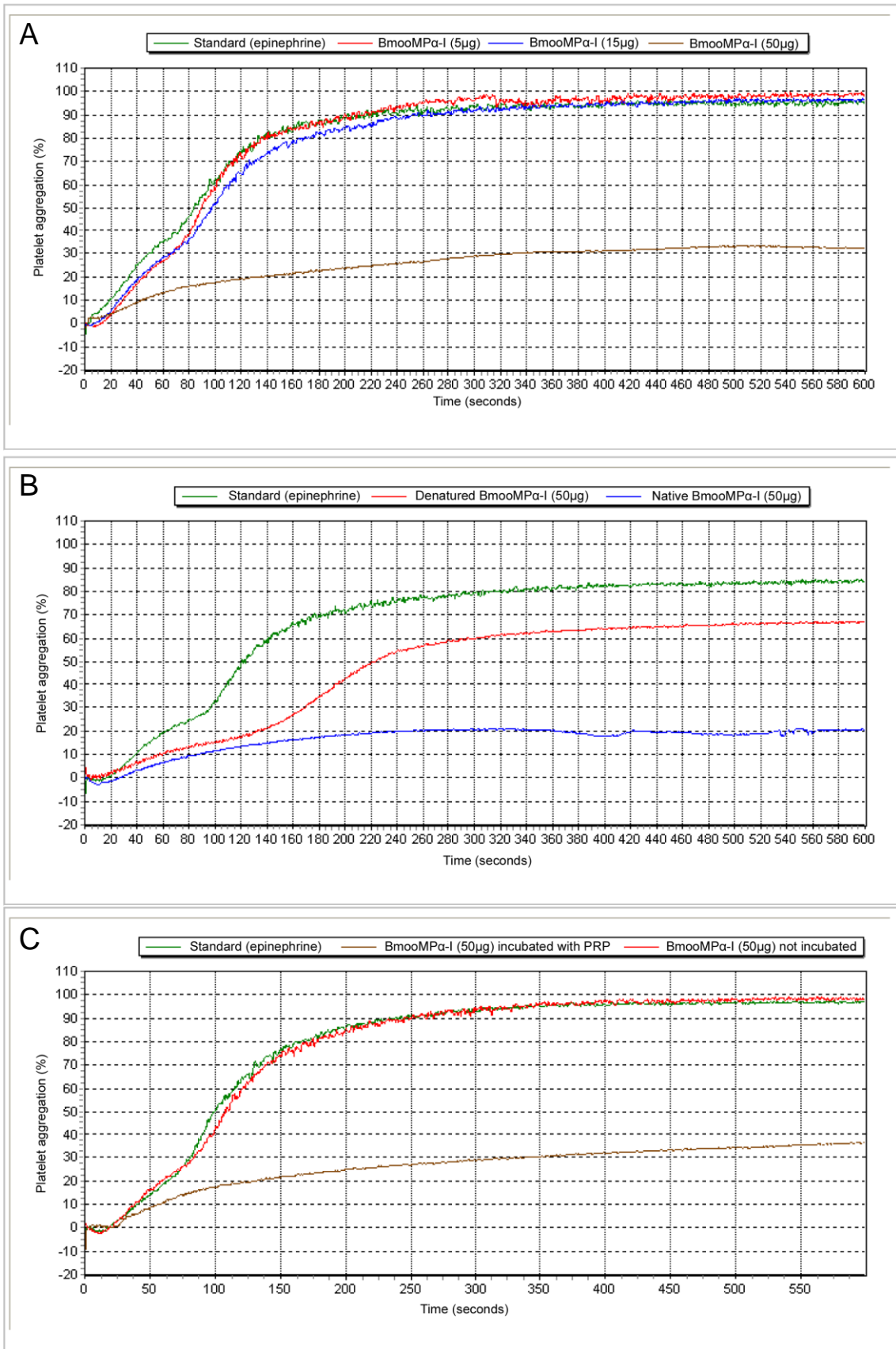


Figure 2: Epinephrine-induced platelet aggregation inhibition by BmooMPα-I. (A) Dose-dependent activity of the enzyme. Green curve: standard of platelet aggregation induced by epinephrine. Red curve: platelet aggregation inhibition by

5µg of BmooMPα-I. Blue curve: platelet aggregation inhibition by 15µg of BmooMPα-I. Brown curve: platelet aggregation inhibition by 50µg of BmooMPα-I (B) Assay with denatured (heated at 100°C by 15min before the assay) and native enzyme. Green curve: standard of platelet aggregation induced by epinephrine. Red curve: 50µg of denatured BmooMPα-I. Blue curve: 50µg of native BmooMPα-I (C) Assay with enzyme pre-incubated with PRP (20min) and not incubated. Green curve: standard of platelet aggregation induced by epinephrine. Brown curve: 50µg of BmooMPα-I pre-incubated with PRP. Red curve: 50µg of BmooMPα-I not incubated with PRP. All assays, except in C, done with 20min pre-incubation of BmooMPα-I with PRP.

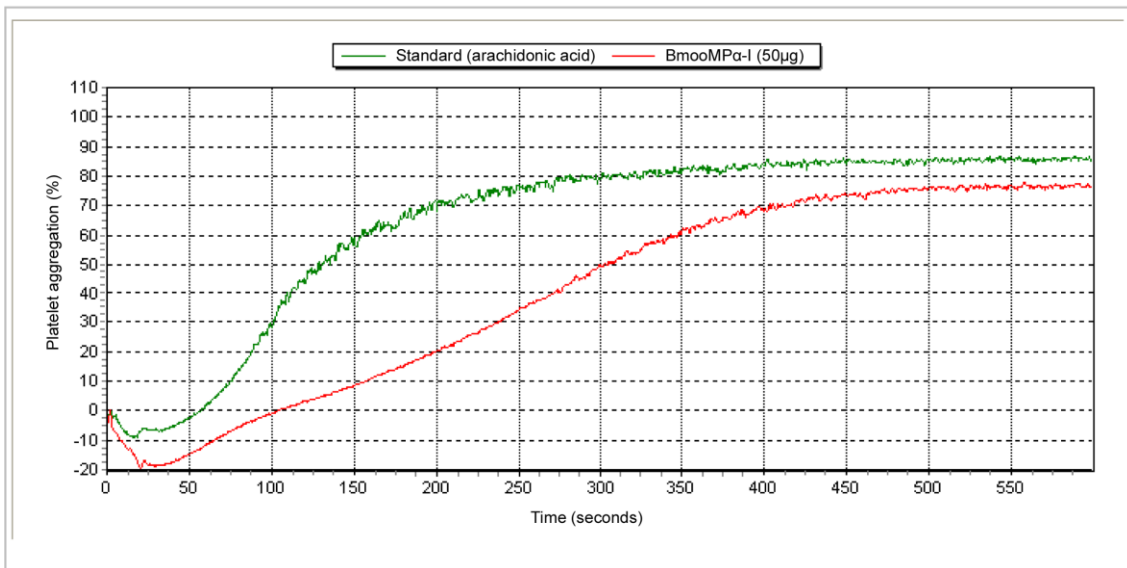
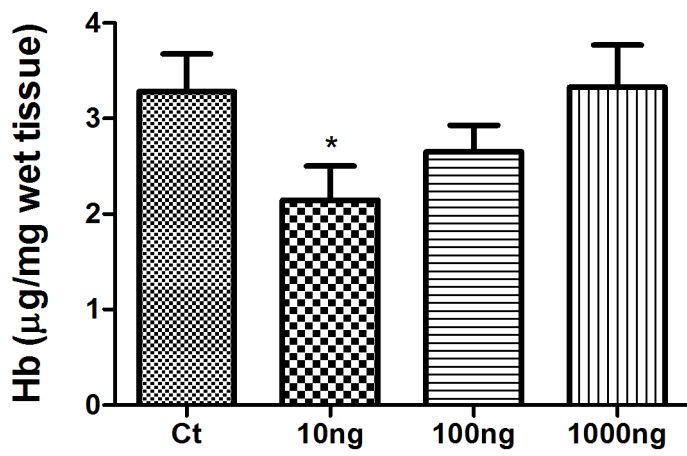


Figure 3: Arachidonic acid-induced platelet aggregation inhibition by BmooMPα-I. Green curve: standard of platelet aggregation induced by arachidonic acid. Red curve: 50µg of BmooMPα-I. Assays done with 20min pre-incubation of BmooMPα-I with PRP.

A



B

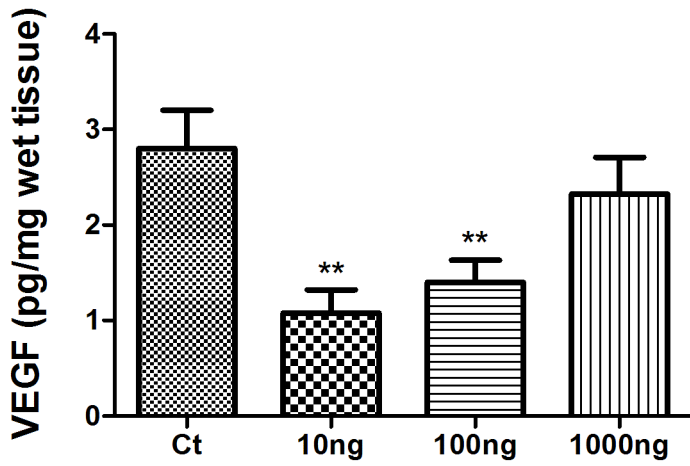


Figure 4: Effects of BmoMP α -I on angiogenesis in sponge implants. (A) Hemoglobin content of the tissue decreased after treatment with 10ng dose of the enzyme. (B) VEGF levels were reduced by the treatment with 10ng and 100ng doses. Values shown are the means \pm standard error from groups of 13–15 animals. * $p < 0.05$ versus control group.

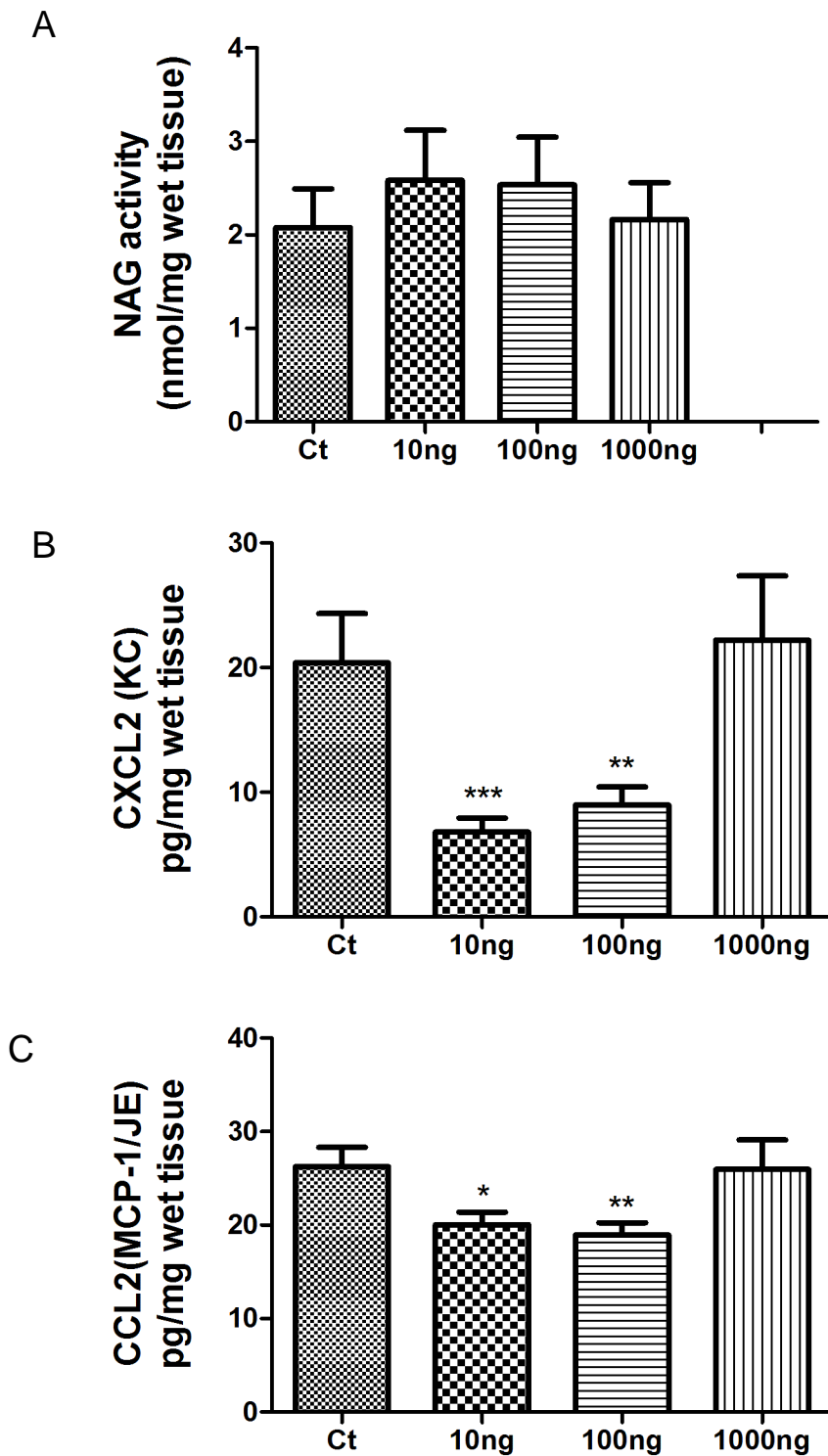


Figure 5: Effects of BmooMP α -I on inflammatory parameters: macrophage accumulation (A), CXCL2/KC (B) and CCL2/MCP-1/JE levels (C) in sponge implants. Except for macrophage number (NAG activity) significant decreases were attained by the treatment for CXCL2/KC and CCL2/MCP-1/JE levels. Values shown are the means \pm standard error from groups of 13–15 animals. * $p < 0.05$ versus control group; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.