



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE UMA TOXINA DE
SERPENTE BRASILEIRA COM AÇÃO NA HEMOSTASIA**

Bruna Barbosa de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

UBERLÂNDIA - MG

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE UMA TOXINA DE
SERPENTE BRASILEIRA COM AÇÃO NA HEMOSTASIA**

Bruna Barbosa de Sousa

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

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

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S725c Sousa, Bruna Barbosa de, 1989-
2013 Caracterização funcional e estrutural de uma toxina de serpente
brasileira com ação na hemostasia / Bruna Barbosa de Sousa. --
2013.
99 p.
Orientador: Fábio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Inclui bibliografia.

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

CDU: 577.1

Palavras-chave: peçonha de serpentes, *Bothrops moojeni*, hemostasia,
agregação plaquetária.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA



**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ESTRUTURAL DE UMA TOXINA DE
SERPENTE BRASILEIRA COM AÇÃO NA HEMOSTASIA**

ALUNO: BRUNA BARBOSA DE SOUSA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Examinadores: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho (UNESP)

Profª Drª Júnia de Oliveira Costa (IFTM)

Data da Defesa: 29/07/2013

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

Prof. Dr. Fábio de Oliveira

*Dedico este trabalho à minha família e amigos, em especial à minha mãe,
meu pai e minha irmã que me deram o apoio necessário
para que eu chegasse até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela proteção e bêncão concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia N-Biofar (INCT-NBiofar), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira, meu orientador e amigo que contribuiu imensamente para minha formação pessoal e profissional. Obrigada pela paciência, confiança e dedicação ao longo de todos esses anos. Você é um exemplo de profissionalismo, sabedoria e responsabilidade para todos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pelas ajudas, conversas e boas risadas. Carla, Mayara, Nádia, Kelly, Déborah, Mariana, Thalita, Thais e Tamires, obrigada pelo companheirismo, amizade, angústias e aprendizado compartilhados.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas por sempre estarem dispostos a me ajudar.

Agradeço aos meus pais, Ana Paula e Luís Henrique, pelo amor, educação, confiança, compreensão e todos os esforços dedicados à minha formação. Vocês são incomparáveis e indispensáveis em minha vida.

À minha irmã, Carolina, pelo companheirismo e amizade, estando ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao Mário, por sempre me apoiar, incentivar, compreender minha ausência e ter paciência com minhas angústias. Com certeza esse caminho seria mais difícil sem você ao meu lado.

Às minhas amigas de longa data, pela torcida, cumplicidade, conversas, risadas e por entenderem minha distância. Espero tê-las para sempre em minha vida.

A toda minha família pelo incentivo e apoio ao meu sucesso. Espero sempre corresponder à expectativa de todos.

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram com a idealização e consolidação desse sonho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	ix
Lista de tabelas	xi
Lista de figuras	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv

Capítulo I: Fundamentação Teórica

1. Serpentes brasileiras	02
2. Acidentes ofídicos	06
3. Peçonha de serpentes	10
4. Hemostasia	11
5. Hemostasia primária	16
5.1 Plaquetas	16
5.2 Adesão plaquetária	19
5.3 Ativação plaquetária	20
5.4 Agregação plaquetária	23
6. Proteínas de peçonha de serpentes e a hemostasia	24
6.1 Metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs)	29
6.2 SVMPs e a hemostasia	32
Referências bibliográficas	38

Capítulo II: Isolation and functional characterization of Bmoo-Agg, a new platelet-aggregation-inhibiting factor from *Bothrops moojeni* snake venom

Resumo	58
Abstract	59
1. Introduction	60

2. Material and Methods	61
2.1 Material	61
2.2 Animals	61
2.3 Human blood	62
2.4 Isolation of Bmoo-Agg	62
2.5 Protein analysis	63
2.6 N-terminal sequencing	63
2.7 Proteolytic activity upon fibrinogen	63
2.8 Proteolytic activity upon azocasein	64
2.9 Hemorrhagic activity	64
2.10 Defibrinating activity	64
2.11 Coagulant activity	64
2.12 Platelet aggregation assay	65
2.13 Evaluation of paw edema formation	65
2.14 Evaluation of hyperalgesia	65
2.15 Statistical analysis	66
3. Results and Discussion	66
Figures	71
References	77
Anexo 1	84
Anexo 2	85

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT** - 5-hidroxitriptamina
- AA** - ácido aracdônico
- ADP** - adenosina difosfato
- AMBIG** - bicarbonato de amônio
- Bis-acrilamida** - N, N'metileno-bis-acrilamida
- DEAE** - dietilaminoetil
- DFP** - diisopropilfluorfosfato
- EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético
- FP3** - Fator Plaquetário 3
- FPA** - fibrinopeptídeo A
- FPB** - fibrinopeptídeo B
- FT** - Fator Tecidual
- FvW** - Fator de von Willebrand
- GP** - glicoproteína
- HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês: High performance liquid chromatography
- IRA** - Insuficiência Renal Aguda
- KGD** - lisina-glicina-aspartato
- LAAO** - L-aminoácido oxidase
- MEC** - matriz extracelular
- MS** - Ministério da Saúde
- MVD** - metionina-valina-aspartato
- NGF** - Fator de crescimento neuronal
- NO** - óxido nítrico
- NTXs** - neurotoxinas
- PAGE** - eletroforese em gel de poliacrilamida
- PARs** - receptores ativados por protease
- PDGF** - fator de crescimento derivado de plaquetas
- PGI₂** - prostaglandina I₂
- PLA₂** - fosfolipase A₂

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPP - plasma pobre em plaquetas

PRP - plasma rico em plaquetas

RGD - arginina-glicina-aspartato

SDS - dodecil sulfato de sódio

SVMPs - metaloproteases de peçonhas de serpente, do inglês: Snake Venom Metalloproteinases

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

TxA₂ - tromboxano A₂

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

VGD - valina-glicina-aspartato

XXCD - aminoácido qualquer-aminoácido qualquer-cisteína-aspartato

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: Fundamentação teórica

Tabela 01: Principais grânulos plaquetários	17
Tabela 02: Principais agonistas, receptores e ligantes envolvidos na função plaquetária	19
Tabela 03: Proteínas de peçonha de serpentes que interferem no sistema hemostático	25

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Fundamentação Teórica

Figura 01: Exemplar da espécie <i>Micrurus filiformis</i>	03
Figura 02: Exemplar da espécie <i>Lachesis muta</i>	04
Figura 03: Exemplar da espécie <i>Crotalus durissus terrificus</i>	05
Figura 04: Exemplar da espécie <i>B. moojeni</i> e sua distribuição geográfica	06
Figura 05: Cascata de coagulação	16
Figura 06: Morfologia de plaquetas humanas	21
Figura 07: Diagrama da hemostasia primária	24
Figura 08: Classificação das SVMPs	31
Figura 09: Receptores plaquetários alvos de SVMPs	34

Capítulo II: Isolation and functional characterization of Bmoo-Agg, a new platelet-aggregation-inhibiting factor from *Bothrops moojeni* snake venom

Figura 01: Purification of Bmoo-Agg from <i>B. moojeni</i> snake venom	71
Figura 02: Sequence alignment of Bmoo-Agg and other metalloproteinases/disintegrins	74
Figura 03: Effect of Bmoo-Agg on ristocetin-induced platelet aggregation in citrated human PRP	75
Figura 04: Effect of Bmoo-Agg on epinephrine-induced platelet aggregation in citrated human PRP	76

Resumo

As serpentes do gênero *Bothrops* são alvos de estudos no Brasil devido à sua distribuição geográfica e causas de acidentes ofídicos. Elas são responsáveis pelos acidentes ofídicos de maior importância epidemiológica no país. Geralmente, o envenenamento botrópico está associado com manifestações locais e sistêmicas complexas, tais como dor, edema, hemorragia local, necrose tecidual, distúrbios hemostáticos, hemorragia sistêmica e alterações cardiovasculares. As peçonhas ofídicas constituem uma mistura complexa de proteínas e peptídeos, compostos orgânicos de baixo peso molecular e compostos inorgânicos. A fração protéica compreende aminotransferases, acetilcolinesterases, hialuronidases, L-aminoácido-oxidases, fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases, lectinas, desintegrinas, entre outros. Alguns desses compostos protéicos, enzimáticos ou não enzimáticos, são capazes de degradar componentes da matriz extracelular, ativar ou inibir fatores de coagulação, bem como interagir com receptores plaquetários, provocando distúrbios hemostáticos, tais como incoagulabilidade sanguínea, hemorragia e trombose. Devido ao seu interesse médico, esses compostos hemostaticamente ativos têm sido isolados de peçonha de serpentes e estudados como potenciais alvos terapêuticos no tratamento e diagnóstico de doenças tromboembólicas. O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar uma toxina da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. A sua caracterização compreendeu: avaliação de seu grau de pureza e de sua massa molecular; sequenciamento de sua região N-terminal; determinação de sua atividade proteolítica sobre o fibrinogênio e azocaseína; caracterização de suas atividades hemorrágica, anticoagulante e coagulante; caracterização de sua ação sobre a agregação plaquetária e indução de dor e edema. Os objetivos foram cumpridos e resultaram no isolamento de um inibidor da agregação plaquetária, denominado Bmoo-Agg. A toxina apresentou um efeito inibitório específico sobre a agregação plaquetária induzida por ristocetina e epinefrina em plasma humano rico em plaquetas.

Palavras-chave: peçonha de serpentes, *Bothrops moojeni*, hemostasia, agregação plaquetária.

Abstract

Bothrops snakes are targets of studies in Brazil due to its geographical distribution and accidents occurrence. They are responsible for the most serious cases of snakebite in the country. *Bothrops* envenomations are often associated with complex local and systemic manifestations, including pain, edema, local hemorrhage, myonecrosis, hemostatic disorders, systemic bleeding and cardiovascular disorders. Snake venoms comprise a complex mixture of proteins and peptides and low molecular mass organic and inorganic components. The protein fraction comprises aminotransferases, acetylcholinesterases, hyaluronidases, L-amino acid oxidases, phospholipases A₂, metalloproteinases, serine proteases, lectins, disintegrins, among others. Some of these protein components, enzymatic or non-enzymatic, are able to hydrolyse components of the extracellular matrix, activate or inhibit blood coagulation factors and interact with platelet receptors, causing hemostatic disorders such as incoagulability, hemorrhage and thrombosis. Due to their medical interest, these hemostatically active components have been isolated from snake venom and studied as potential therapeutic targets for the treatment and diagnosis of thromboembolic diseases. The present study aimed to purify and characterize a toxin from *Bothrops moojeni* snake venom. The characterization included: evaluation of its purity and molecular mass, N-terminal sequencing, determination of its proteolytic activity upon azocasein and fibrinogen, characterization of its hemorrhagic, anticoagulant and coagulant activities, characterization of its activity upon platelet aggregation and induction of pain and edema. The objectives were resolved and resulted in the isolation of a platelet aggregation inhibitor, designated Bmoo-Agg. The toxin showed a specific inhibitory effect on platelet aggregation induced by epinephrine and ristocetin in human platelet-rich plasma.

Keywords: snake venom, *Bothrops moojeni*, hemostasis, platelet aggregation.

Capítulo I

Fundamentação teórica

1. Serpentes brasileiras

As serpentes são classificadas no reino Animalia, filo Chordata, subfilo Vertebrata, classe Reptilia, subclasse Lepdosauria, ordem Squamata, subordem Serpentes. Existem serpentes em quase todos os ambientes do globo terrestre, são animais muito bem adaptados e abundantes, somando aproximadamente 3 mil espécies no mundo, distribuídas em cerca de 465 gêneros e 20 famílias (HICKMAN et al., 2004). No Brasil foram catalogadas 386 espécies de serpentes, das quais cerca de 60 são peçonhentas e despertam interesse na saúde pública (BÉRNILS e COSTA, 2012).

Frey Vogel e Perret (1973) definiram as serpentes peçonhentas como aquelas que produzem substâncias tóxicas biologicamente ativas para outros organismos em glândulas bucais modificadas, inoculando essas toxinas na vítima por meio de presas, localizadas na região anterior da maxila, ligadas à glândula por um ducto. Aquelas que não apresentam o aparato inoculador de peçonha não são peçonhentas, mas podem provocar ferimentos graves por estrangulamento ou infecção (CARDOSO et al., 2003). Acidentes causados por serpentes não peçonhentas são relativamente frequentes, porém não determinam acidentes graves, na maioria dos casos e, por isso, são considerados de menor importância médica (Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, 2009). No Brasil, as serpentes peçonhentas estão distribuídas em duas principais famílias: Elapidae e Viperidae (FUNASA, 2001).

A família Elapidae compreende 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus* (Figura 01), principal representante de importância médica da família Elapidae, com cerca de 34 espécies e subespécies distribuídas por todo o território nacional (BÉRNILS e COSTA, 2012; BUCARETCHI, 2006). São conhecidos popularmente por coral, coral verdadeira ou boicorá, e são animais de pequeno e médio porte com tamanho em torno de 1,0 metro. Apresentam um padrão de cor característico em anéis vermelhos, brancos e pretos em diferentes combinações. Essas serpentes não apresentam fosseta loreal e, além disso, possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos fixos na região anterior da maxila e pequena abertura bucal, característica de dentição proteróglifa (FUNASA, 2001). Devido a essas características e ao seu hábito fossorial (vivem enterradas, habitando, preferencialmente, buracos), os acidentes são mais raros, cerca de 0,7%, e,

geralmente, ocorrem somente quando essas serpentes são manuseadas intencionalmente (Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, 2009). Em todo o país, existem serpentes não peçonhentas (falsas-corais) que mimetizam a coloração das corais verdadeiras (FUNASA, 2001).



Figura 01: Exemplar da espécie *Micrurus filiformis* (Fonte: PARDAL et al., 2010).

A família Viperidae é representada por três sub-famílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae, sendo que todas as espécies de viperídeos presentes na América do Sul pertencem à sub-família Crotalinae (ZUG et al., 2001).

As serpentes da família Viperidae representam o grupo mais importante de serpentes para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados no Brasil (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003). Essas serpentes são facilmente identificadas pela cabeça triangular, recoberta por pequenas escamas de aspecto similar às do corpo, além da presença de fosseta loreal (FUNASA, 2001). A família Viperidae apresenta dentição solenóglifa, caracterizada por presas móveis, muito desenvolvidas e localizadas na região anterior da maxila (que se projetam para frente no momento do ataque). As presas são canaliculadas e ligadas através de ductos a glândulas de peçonha, o que garante maior eficiência na inoculação da mesma (LOPES, 2008).

A subfamília Crotalinae possui 36 espécies e subespécies representadas pelos gêneros *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (BÉRNILS e COSTA, 2012).

O gênero *Lachesis* é representado apenas pela espécie *L. muta* (Figura 02), com duas subespécies predominantes: *L. muta muta* e *L. muta rhombeata* (ZAMUDIO e GREENE, 1997). São popularmente conhecidas por surucucu, surucucu-pico-de-jaca, surucutinga, malha-de-fogo e são as maiores serpentes peçonhentas das Américas, podendo atingir até 3,5 metros. Habitam ambientes florestais como Amazônia, Mata Atlântica e matas úmidas do Nordeste (FUNASA, 2001).



Figura 02: Exemplar da espécie *Lachesis muta* (Fonte: BERNANDE e GOMES, 2012).

As serpentes do gênero *Crotalus* são representadas no Brasil por uma única espécie, *C. durissus* (Figura 03), distribuídas em seis subespécies: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* (Figura 03) (BÉRNILS e COSTA, 2012). Popularmente são conhecidas por cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininha, maracambóia, maracá e outras denominações. São encontradas em campos abertos, áreas secas e raramente na faixa litorânea (FUNASA, 2001). As serpentes do gênero *Crotalus* são facilmente identificadas pela presença de guizo ou chocalho na extremidade caudal (Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, 2009).



Figura 03: Exemplar da espécie *Crotalus durissus terrificus* (Fonte: DA SILVA et al., 1999).

O gênero *Bothrops* (incluindo *Bothrocophias*) representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas brasileiras, com cerca de 30 espécies e subespécies, distribuídas por todo o território nacional (BÉRNILS e COSTA, 2012; Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, 2009). Este gênero possui cauda lisa e suas cores variam muito dependendo da espécie e da região onde vivem (CARDOSO et al., 2003). Popularmente são chamadas de jararaca, jararacuçu, urutu-cruzeira, combóia, caiçaca, dentre outras denominações. Habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, zonas rurais e periferias de grandes cidades, e locais onde haja proliferação de roedores. São serpentes de hábitos noturnos ou crepusculares, apresentam comportamento agressivo quando ameaçadas e atacam sem provocar ruídos (FUNASA, 2001).

A serpente *B. moojeni*, descrita por Hoge (1966), conhecida popularmente como caiçaca, é a principal espécie encontrada no cerrado brasileiro, distribuindo-se desde o Paraná até o Maranhão (Figura 04). São animais de porte médio, com tamanho em torno de 1,5 metro, apresentam comportamento agressivo e são capazes de se adaptar bem a ambientes modificados (áreas alteradas fora da reserva) (Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, 2009). Desempenham função de predador generalista, alimentando-se de pequenos mamíferos, aves, lagartos, serpentes e anfíbios (MARTINS et al., 2002). Habitam preferencialmente campos e cerrados e apresentam hábitos noturnos e terrestres, escondendo-se em tocas e troncos ocos. A espécie é vivípara e possui reprodução sazonal, tendo uma única ninhada por ano, no início da estação chuvosa, entre dezembro e janeiro. Vivem em média 15 anos (ÁVILA, 2003). Na região sudeste do Brasil,

especificamente nos municípios do Triângulo Mineiro, essa espécie é responsável pela maioria dos acidentes botrópicos (DA SILVA et al., 2003).

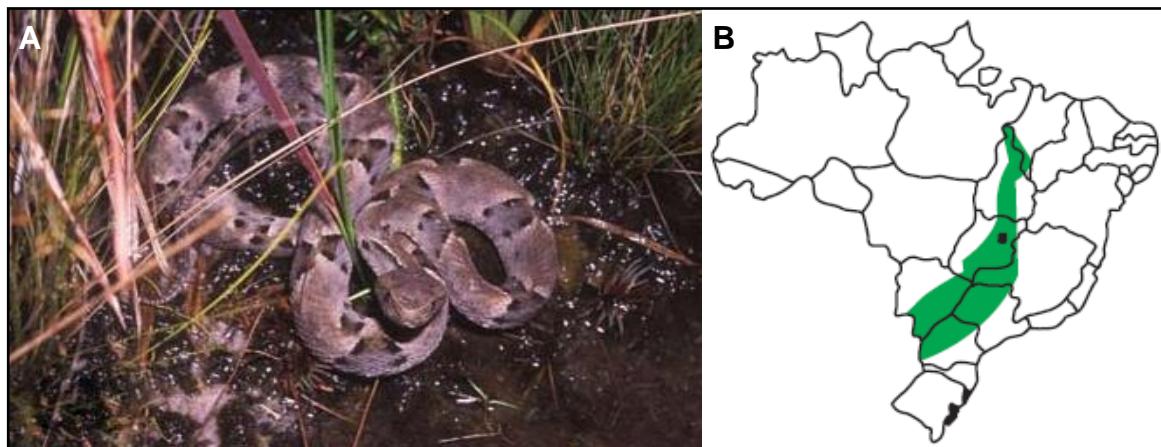


Figura 04: (A) Exemplar da espécie *B. moojeni* (Fonte: SAWAYA et al., 2008). (B) Distribuição geográfica da espécie *B. moojeni* no Brasil (Fonte: FUNASA, 2001).

2. Acidentes Ofídicos

Os acidentes ofídicos representam grave problema de saúde pública, principalmente em regiões tropicais do mundo, devido à alta frequência com que ocorrem (PINHO e PEREIRA, 2001). Em geral, sua ocorrência está relacionada a fatores climáticos e ao aumento da atividade dos trabalhadores no campo. Nas épocas de calor e chuva, que coincide com o período de maior atividade do homem no campo, ocorre um aumento do número de casos. Além disso, o sexo masculino, na faixa etária de 15 a 49 anos, é o mais acometido, o que corresponde ao grupo etário onde se concentra a força de trabalho. Os membros inferiores (pés e pernas) são mais atingidos (FUNASA, 2001; Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, 2009).

Entre os países sul-americanos, o Brasil é o que apresenta maior número de acidentes/ano (MEBS, 1981). No ano de 2012 foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2012) 139.772 envenenamentos por animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 28.645 casos. De acordo com Bochner e Struchiner (2003), desde os trabalhos de Vital Brazil, a média anual é de cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano.

Dos acidentes ofídicos notificados no país em 2012, 20.582 (71,85%) foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 2.233 (7,79%) por serpentes do gênero *Crotalus*, 872 (3,04%) por serpentes do gênero *Lachesis*, 239 (0,83%) por serpentes do gênero *Micrurus*, 1.249 (4,36%) por serpentes não peçonhentas e em 3.470 (12,11%) casos, a serpente não foi identificada (SINAN, 2012). Isso demonstra a importância epidemiológica do acidente botrópico para o país (FUNASA, 2001). Dentre esses acidentes, 125 (0,44%) evoluíram para óbito (SINAN, 2012). O maior índice de letalidade corresponde ao gênero *Crotalus* com 1,87%, e o menor, ao gênero *Bothrops*, que corresponde a 0,31% (FUNASA, 2001). A gravidade do acidente depende da quantidade de peçonha inoculada, espécie e tamanho da serpente envolvida e presença de patógenos na boca da serpente. Idade e tamanho da vítima, região acometida e tratamento recebido também são fatores determinantes (RUSSEL, 1973; Secretaria de Vigilância em Saúde, MS, 2009).

A elevada toxicidade do acidente crotálico é decorrente da atividade neurotóxica da peçonha. Essa atividade neurotóxica provoca o aparecimento de “facies miastênica”, na qual se evidencia, dentro das primeiras horas, ptose palpebral, oftalmoplegia, dificuldade de acomodação (visão turva) ou diplopia (visão dupla), derivadas da paralisia da musculatura extrínseca e intrínseca do globo ocular. Dificuldades respiratórias e de deglutição também podem ocorrer. A neurotoxicidade é atribuída, fundamentalmente, à fração crotoxina, um componente que atua nas terminações nervosas, inibindo a liberação de acetilcolina, principal fator responsável pelo bloqueio neuromuscular, do qual decorrem as paralisações motoras e respiratórias apresentadas pelos pacientes. Além disso, a peçonha crotálica possui uma ação miotóxica, que produz lesões nas fibras musculares (rabdomiólise), levando à liberação de enzimas e mioglobina para o sangue, com posterior excreção urinária, ocasionando mioglobinúria. Não está identificada a fração da peçonha que produz esse efeito miotóxico sistêmico. Uma ação anticoagulante também está presente, sendo responsável por tornar o sangue incoagulável (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; FUNASA, 2001). As lesões musculares, os distúrbios de coagulação, o intervalo de tempo longo entre o acidente e o atendimento médico e a neurotoxicidade

direta decorrentes do envenenamento crotálico são fatores preditivos para insuficiência renal, que é uma das principais causas de óbito (PINHO et al., 2000).

O envenenamento crotálico produz manifestações locais pouco significativas, como ausência de dor ou dor e edema discretos (FUNASA, 2001). Essa peçonha também é capaz de provocar analgesia e tem sido utilizada no tratamento de dores em humanos (BRAZIL, 1950).

O envenenamento laquético gera sintomas locais e sistêmicos semelhantes ao envenenamento botrópico, predominando dor e edema. Manifestações hemorrágicas podem ocorrer no local da picada (FUNASA, 2001).

Os sintomas do acidente elapídico assemelham-se aos sintomas do acidente crotálico. Neurotoxinas (NTXs) presentes na peçonha elapídica atuam na junção mioneural, podendo ser pré-sinápticas (inibindo a liberação de acetilcolina pelos impulsos nervosos) ou pós-sinápticas (competem com a acetilcolina pelos receptores colinérgicos). Estas provocam um quadro de fraqueza muscular progressiva, caracterizado por ptose palpebral, oftalmoplegia e “fácie miastênica”, que podem evoluir para paralisia muscular e respiratória, causas de óbito neste tipo de envenenamento (AZEVEDO-MARQUES et al., 2003; FUNASA, 2001). Estudos recentes têm demonstrado que a peçonha de serpentes da família Elapidae também pode interferir na hemostasia (DU et al., 2002).

O acidente botrópico corresponde ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país (FUNASA, 2001). É caracterizado por efeitos locais e sistêmicos. As manifestações locais mais comuns são dor, edema, hemorragia local, formação de bolhas e necrose tecidual (CARDOSO et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 2009a, 2011). São causadas por alterações patológicas no local da picada, que progridem rapidamente resultando em sequelas permanentes (DART et al., 1992; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989). A peçonha também provoca hemólise, agregação plaquetária, ruptura do endotélio vascular e degradação de componentes da matriz extracelular (GUTIÉRREZ et al., 2009b). A dor local, geralmente imediata, é induzida pela liberação de bradicinina e histamina. A formação de edema, também precoce, ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de proteínas e mediadores inflamatórios. Infecções podem ocorrer devido à contaminação pela flora bacteriana oral da serpente, e também devido à liberação de mediadores

inflamatórios endógenos. A necrose tecidual, provocada pela ação proteolítica da peçonha associada à lesão vascular, pode ser agravada com o uso incorreto de torniquete e demora no tratamento. A necrose pode resultar em perda irreversível da função ou do tecido, havendo possibilidade de amputação do membro afetado (BARRAVIERA, 1993; CARDOSO et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 2009a; PINHO et al., 2008; STÁBELI et al., 2006).

As manifestações sistêmicas mais comuns são distúrbios na coagulação sanguínea, hemorragia sistêmica, alterações cardiovasculares, náuseas, vômitos, hematúria e insuficiência renal aguda (IRA) (GUTIÉRREZ et al., 2009b; WARREL, 2004). A hemorragia sistêmica resulta da ação de frações da peçonha com atividade semelhante à da trombina, as quais formam fibrina devido à degradação de fibrinogênio, induzindo frequentemente a incoagulabilidade sanguínea. A peçonha pode também ativar o fator X da cascata de coagulação, consumindo os fatores V e VII e plaquetas, provocando a formação de microtrombos capilares, os quais contribuem para o desenvolvimento de insuficiência renal aguda (BARRAVIERA, 1993; GUTIÉRREZ et al., 2009b; HERRERA et al., 2013; OTERO-PATIÑO, 2009).

O procedimento terapêutico utilizado no tratamento de acidentes ofídicos é a soroterapia, que consiste na administração, o mais precocemente possível, do soro (anti-veneno) específico para cada tipo de acidente (FUNASA, 2001). O soro antiofídico é formado por fragmentos de imunoglobulinas fracionados a partir do plasma de animais que foram sensibilizados previamente com aplicações sucessivas de pequenas doses da peçonha bruta da serpente ou uma mistura de peçonhas de serpentes (WHO, 2010). Dessa forma, a presença de títulos elevados de anticorpos capazes de neutralizar a toxina, impede o agravamento do envenenamento. A aplicação do soro deve ser feita por via intravenosa e de acordo com a gravidade do envenenamento (FUNASA, 2001).

O soro utilizado depende da espécie envolvida no acidente. Em muitas partes do mundo, soros antiofídicos poliespecíficos estão disponíveis para tratamento de acidentes causados pelas espécies mais comuns (LALLO, 2005; WALKER, 2013). No caso do envenenamento botrópico, utiliza-se o soro antibotrópico e, na falta deste, das associações antibotrópico-crotálico ou antibotrópico-laquético (FUNASA, 2001).

A soroterapia, apesar de reduzir a mortalidade resultante dos acidentes botrópicos, não é considerada um tratamento ideal, pois não reverte os danos locais provocados pelo envenenamento e pode induzir reações de hipersensibilidade (BATTLELLINO et al., 2003; CAMEY et al., 2002; DA SILVA et al., 2007; GUTIÉRREZ et al., 2009a). Outros problemas são a baixa disponibilidade do tratamento em áreas distantes e os atrasos na administração do soro (CRUZ et al., 2009; GUTIÉRREZ et al., 2009c). Além disso, existem variações inter e intra-específica na composição da peçonha de serpentes de mesmas espécies, que interferem nos efeitos patológicos e na neutralização pelo soro antiofídico (CALVETE et al., 2009).

Dessa forma, o tratamento de acidentes ofídicos ainda é um desafio da saúde pública, sendo necessários estudos e incentivos políticos para aumentar a produção de soros antiofídicos mais seguros e eficazes, minimizando os índices de morbidade e mortalidade provocados pelos envenenamentos (GUTIÉRREZ et al., 2010).

3. Peçonhas de serpentes

As peçonhas de serpentes são produzidas por glândulas especializadas, capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas. São capazes de paralisar e matar outros organismos, além de contribuírem para a defesa contra agressores e digestão da presa (AIRD, 2002; MENEZES et al., 2006). As peçonhas podem apresentar variações na composição, diferenciando-se entre famílias, gêneros, espécies, subespécies e variações intra-específicas. Isso ocorre, pois a composição da peçonha pode ser influenciada pelo habitat e origem geográfica da serpente. Além disso, as variações intra-específicas são decorrentes de variações sazonais, sexuais, dietéticas, habitat e idade da serpente (CHIPPAUX et al., 1991).

A composição da peçonha de serpentes é complexa, e as alterações locais e sistêmicas provocadas durante o acidente ofídico dependem das propriedades farmacológicas da peçonha (TU, 1996). Cerca de 90-95% do peso seco da peçonha é constituída por compostos protéicos, como peptídeos, compostos enzimáticos, não-enzimáticos e inibidores enzimáticos. Em menor proporção, a fração não protéica da peçonha é formada por compostos orgânicos de baixo

peso molecular, tais como carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, aminoácidos livres, nucleosídeos e citrato; e compostos inorgânicos, como cálcio, cobalto, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês, sódio e zinco (BJARNASON e FOX, 1994; KOH, 2006; MARLAND, 1998; MATSUI et al. 2000; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Alguns estudos sugerem que o cálcio, manganês e o magnésio são importantes para a estabilização estrutural de certas proteínas, enquanto outros, em particular o zinco, cobre, ferro e cobalto possivelmente atuam nos mecanismos catalíticos de certos componentes enzimáticos, como as metaloproteinases (BJARNASON e FOX, 1994).

As proteínas com ação enzimática encontradas na peçonha são as aminotransferases, acetilcolinesterases, hialuronidases, L-aminoácido-oxidases (LAAOs), fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteases, serinoproteases, dentre outras, as quais são responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos. Os constituintes protéicos não-enzimáticos são as lectinas, os ativadores de proteína C, proteínas ligantes ao fator de Von Willebrand (FvW) e fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e neuronal (NGF), dentre outros. Por sua vez, os peptídeos encontrados são as desintegrinas (inibidores da agregação plaquetária), neurotoxinas, citotoxinas e miotoxinas (ANGULO e LOMONTE, 2009; KANG, 2011; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Alguns desses compostos protéicos, enzimáticos ou não enzimáticos, são capazes de interferir na hemostasia, provocando incoagulabilidade sanguínea e hemorragia ou então induzindo trombose. Por isso, compostos isolados de peçonha de serpentes têm sido estudados como potenciais alvos terapêuticos no tratamento e diagnóstico de doenças tromboembólicas (SAJEVIC et al., 2011).

4. Hemostasia

O termo hemostasia é definido como o resultado de um conjunto de processos fisiológicos mecânicos e bioquímicos que executam duas importantes funções: manter o sangue em um estado fluido e livre de coágulos nos vasos normais, e em caso de lesão vascular, estar pronto para induzir o tampão hemostático rápido e localizado, evitando uma hemorragia (COTRAN, 2000; GALE, 2011). Para que se processe uma hemostasia perfeita, é necessário o funcionamento perfeito de três fatores interligados: a integridade dos vasos

sanguíneos, a presença de plaquetas em número e estado de funcionamento normal e o mecanismo de coagulação do sangue (GARCIA-NAVARRO, 2005).

O vaso sanguíneo é composto por várias camadas: a camada mais interna composta por células endoteliais, uma membrana basal interna, o músculo liso e a membrana adventícia externa (VAN HINSBERGH, 2001). A estrutura dessas células e sua integridade funcional são importantes na manutenção da parede do vaso e na função circulatória (GALLEY e WEBSTER, 2004).

Em condições normais, o endotélio vascular é essencial para evitar a ativação da coagulação sanguínea e formação de trombos, proporcionando uma superfície não-trombogênica, devido à produção de uma variedade de fatores anticoagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários (WU e THIAGARAJAN, 1996), como o sulfato de heparan (cofator da antitrombina III), prostaglandina I₂ (PGI₂) e óxido nítrico (NO). Entretanto, o endotélio também desempenha função ativa na hemostasia durante uma lesão vascular, sintetizando e armazenando vários componentes hemostáticos essenciais, como o FvW e o fator tecidual (FT) que são fatores pró-trombóticos, envolvidos, respectivamente, na adesão de plaquetas e na coagulação (RANG et al., 2007). O equilíbrio entre as atividades endoteliais antitrombótica e pró-trombótica determina criticamente se ocorrerá formação, propagação ou dissolução do trombo (COTRAN, 2000).

Quando ocorre uma lesão vascular, três importantes mecanismos são desencadeados, a fim de controlar a perda de sangue. O primeiro mecanismo é um espasmo ou vasoconstrição, em resposta às endotelinas vasoconstritoras, derivadas das células endoteliais, que resulta na redução do fluxo sanguíneo e da perda de sangue, além de possibilitar uma reação enzimática mais eficaz nos processos de agregação plaquetária e coagulação (CHEVILLE, 2009; COTRAN, 2000). Posteriormente, as plaquetas circulantes são expostas às proteínas subendoteliais, promovendo a aderência e ativação dessas plaquetas com as proteínas subendoteliais (adesão e ativação plaquetária), e posterior adesão de outras plaquetas às já aderidas ao sítio da lesão (agregação plaquetária), fenômenos que dão origem ao tampão plaquetário. Este processo é denominado de hemostasia primária. Finalmente, a coagulação do sangue ocorre através da ativação dos fatores da coagulação, que permite a conversão de fibrinogênio solúvel circulante em fibrina insolúvel. A fibrina polimerizada interage com o

tampão plaquetário, formando um tampão hemostático sólido (coágulo) que previne a continuação da hemorragia. Este processo é conhecido como hemostasia secundária ou coagulação sanguínea (BOZZINI e MOLINAS, 2004; COTRAN, 2000).

A coagulação sanguínea (Figura 05) é o resultado final de uma série de reações entre várias proteínas plasmáticas, que recebem o nome de fatores de coagulação. A maioria dos fatores de coagulação consiste em formas inativas de enzimas proteolíticas (zimogênios) presentes no sangue, que quando ativadas catalisam a formação de quantidades maiores do fator seguinte, provocando reações sucessivas de amplificação. Essa cascata de amplificação é controlada por inibidores, para evitar uma coagulação exacerbada. Um dos inibidores mais importantes é a antitrombina III, que neutraliza alguns fatores da cascata de coagulação, em especial as serinoproteases (fatores XIIIa, XIa, Xa, IXa e trombina). O endotélio vascular também limita a extensão da coagulação devido à expressão de trombomodulina, que é um receptor da membrana endotelial que se liga à trombina. A ligação da trombina com a trombomodulina ativa a proteína C, que atua como um anticoagulante ao inativar os fatores Va e VIIIa (GUYTON e HALL, 2006; RANG et al., 2007).

Didaticamente, a coagulação sanguínea pode ser dividida em duas vias: via intrínseca e via extrínseca, as quais convergem com o objetivo comum de ativar o fator X, que culmina na formação do coágulo de fibrina (DAVIE, 2003). A via extrínseca inicia-se no momento da lesão da parede vascular, quando as células endoteliais lesionadas liberam o FT. O FT, composto por fosfolipídeos da membrana, é o receptor celular para o fator VII, que, na presença de Ca^{2+} , sofre uma transição de sítio ativo devido à clivagem de um peptídeo interno. Isso resulta na ativação autocatalítica do fator VIIa. O complexo FT-VIIa ativa o fator X (GUYTON e HALL, 2006).

A via intrínseca começa no momento do trauma sanguíneo ou da exposição do sangue ao colágeno. O fator XII, a pré-calicreína e o cininogênio de alto peso molecular aderem-se à superfície endotelial negativamente carregada, que resulta na ativação do fator XII. Além disso, o trauma sanguíneo também lesa as plaquetas, devido à sua aderência ao colágeno, provocando a liberação de fosfolipídeos pelas plaquetas, que contêm a lipoproteína chamada fator

plaquetário 3 (FP3). O fator XIIa ativa o fator XI e interage com pré-calicreína para formar calicreína, que interage com o cininogênio de alto peso molecular para formar cininas. O fator XIa, na presença de Ca^{2+} , ativa o fator IX. O fator IXa, então, forma um complexo com os fosfolipídeos plaquetários, FP3 das plaquetas lesionadas, Ca^{2+} e o fator VIII. Após a modificação do fator VIII em VIIIa, pela trombina, o complexo IXa-VIIIa-fosfolipídeos-FP3- Ca^{2+} ativa o fator X (GUYTON e HALL, 2006).

O fator Xa é o momento em que as duas vias se fundem. O fator Xa, combinado com fosfolipídeos liberados pelas plaquetas, fator V e Ca^{2+} , pode, por alguns segundos, clivar a protrombina para formar trombina. À medida que trombina começa a se formar, a ação proteolítica da trombina ativa o fator V. O fator Va acelera a conversão de protrombina em trombina. Portanto, o fator Xa é a verdadeira protease causadora da clivagem da protrombina, entretanto, o fator Va atua como um catalisador dessa reação. A trombina tem como principal função clivar o fibrinogênio solúvel para formar monômeros de fibrina (GUYTON e HALL, 2006). Além disso, a trombina também promove agregação plaquetária, estimula a proliferação celular e modula a contração do músculo liso (RANG et al. 2007).

O fibrinogênio é uma proteína globular de alto peso molecular simetricamente dimérica. Cada unidade do dímero é composta por três cadeias denominadas A α , B β e γ , unidas por pontes dissulfeto (WOLBERG, 2007). A conversão do fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel ocorre em três passos: ação proteolítica, polimerização e estabilização (KORNALIK, 1985).

Para quebrar a cadeia do fibrinogênio, a trombina se liga na região central da molécula clivando as ligações peptídicas arginina-glicina, removendo 4 peptídeos N-terminais de baixo peso molecular nas cadeias A α e B β . Consequentemente, os fibrinopeptídeos A (FpA) composto de 16 resíduos de aminoácidos e os fibrinopeptídeos B (FpB) são liberados, formando então o monômero de fibrina. Cada monômero de fibrina tem capacidade de se polimerizar com outros monômeros de fibrina para formar fibras de fibrina. Os monômeros de fibrina são mantidos unidos por fracas ligações de hidrogênio, e as fibras de fibrina recém-formadas não têm ligações cruzadas entre si; por conseguinte, o coágulo resultante, denominado de coágulo frouxo, é fraco e pode se romper com facilidade. Para fortalecer o coágulo, uma transglutaminase (o

fator XIII), liberada pelas plaquetas retidas no coágulo, é ativada por ação do Ca^{2+} e trombina, introduzindo ligações covalentes entre os monômeros de fibrina, e ligações cruzadas entre as fibras adjacentes de fibrina, formando um coágulo insolúvel e resistente à proteólise. Por fim, o coágulo é formado por redes de fibrina que cursam em todas as direções, retendo células sanguíneas, plaquetas e plasma e se aderem às superfícies lesadas dos vasos sanguíneos; impedindo a continuação da perda de sangue (GUYTON e HALL, 2006; KORNALIK, 1985; WOLBERG, 2007).

Para restabelecer o fluxo sanguíneo, os tecidos lesados e o endotélio vascular liberam lentamente um ativador de plasminogênio tecidual, que após o coágulo interromper o sangramento, converte plasminogênio em plasmina. O plasminogênio circula no plasma como a forma inativa da plasmina. A plasmina é uma enzima proteolítica que digere as fibras de fibrina e algumas outras proteínas coagulantes, como o fibrinogênio, o fator V, fator VIII, a protrombina e o fator XII, removendo restos diminutos do coágulo sanguíneo que poderiam obstruir o fluxo sanguíneo (GUYTON e HALL, 2006).

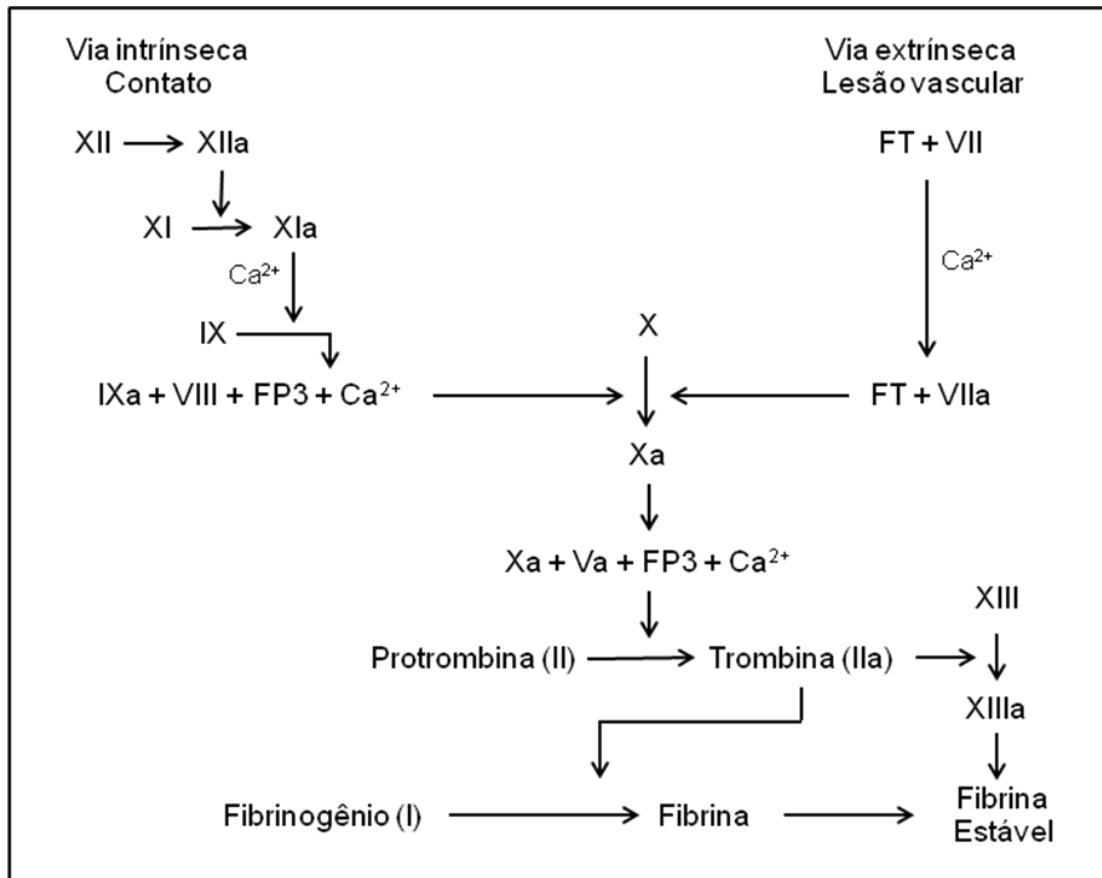


Figura 05: Cascata de coagulação: via intrínseca e extrínseca (Fonte: adaptado de ADAMS E BIRD, 2009).

5. Hemostasia primária

5.1 Plaquetas

As plaquetas desempenham um papel central na hemostasia. São fragmentos anucleados derivadas da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos na medula óssea, com diâmetro variando de 1 a 4 μm . Apresentam meia vida de 8 a 12 dias, sendo eliminadas da circulação por fagocitose mediada por macrófagos (GUYTON e HALL, 2006).

Apesar de serem consideradas células incompletas, as plaquetas apresentam metabolismo próprio devido à presença de organelas como os grânulos α , grânulos densos, mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos. Os grânulos α e os grânulos densos são fundamentais para as funções hemostáticas (Tabela 01). O citoesqueleto das plaquetas é composto por um sistema de microtúbulos e microfilamentos, que servem para manter a sua forma discóide em

estado de repouso e fornecer capacidade contrátil. Além disso, a disposição desse sistema permite a adesão das plaquetas aos vasos sanguíneos lesados, permite a agregação com outras plaquetas, formando um tampão plaquetário, e a estabilização do tampão pela ação local da trombina (COLLER et al., 2010).

Tabela 01: Principais grânulos plaquetários (Fonte: adaptado de COLLER et al., 2010).

Grânulos α	Grânulos densos
Fator Plaquetário 4	ATP
Fibrinogênio	ADP
Fator V	Ca ²⁺
Fibronectina	Serotonina
FvW	GDP
Vitronectina	
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	

A membrana plaquetária consiste de uma bicamada de fosfolipídeos, os quais atuam em múltiplos estágios do processo de coagulação sanguínea. Além disso, em sua superfície existe uma camada de receptores de glicoproteínas (GP) que repelem a aderência das plaquetas ao endotélio normal. Por outro lado, esses receptores, quando ativados, são responsáveis pela mudança de conformação das plaquetas, favorecem a aderência das plaquetas às áreas lesionadas da parede vascular, especialmente às células endoteliais e ao colágeno exposto, e também favorecem a agregação a outras plaquetas. Esses receptores são ativados por diferentes agonistas (GUYTON e HALL, 2006; KAMIGUTI, 2005).

A superfície plaquetária contém integrinas, que são proteínas transmembranas formadas por duas subunidades, α e β, associadas por ligações não-covalentes. Estas proteínas desempenham papéis críticos na adesão celular, conectando a matriz extracelular (MEC) ao citoesqueleto, permitindo interações célula-célula ou célula-matriz. As integrinas permitem a ligação da célula com ligantes extracelulares, como colágeno, laminina e fibronectina, desencadeando vias de sinalização intracelular que regulam a organização do citoesqueleto,

polaridade celular, proteases, migração celular, entre outros (SELISTRE-DE-ARAUJO et al., 2010). Existem cinco tipos de subunidades α (α_2 , α_{IIb} , α_V , α_5 , α_6) e dois tipos de subunidades β (β_1 e β_3) que formam as integrinas plaquetárias $\alpha_{IIb}\beta_3$ (receptor de fibrinogênio), dominante na superfície das plaquetas, $\alpha_V\beta_3$ (receptor de vitronectina), $\alpha_2\beta_1$ (receptor de colágeno), $\alpha_5\beta_1$ (receptor de fibronectina) e $\alpha_6\beta_1$ (receptor de laminina). As integrinas interagem principalmente com a região RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) das moléculas ligantes, podendo interagir também com regiões KGD (lisina-glicina-ácido aspártico), VGD (valina-glicina-ácido aspártico), entre outras (CALVETE et al., 2005; BENNETT et al., 2009; NIESWANDT et al., 2009).

Em condições fisiológicas normais, as plaquetas fluem continuamente dentro do vaso sanguíneo, sem interagir com a parede vascular. Entretanto, quando ocorre o rompimento da integridade vascular, as plaquetas são submetidas a uma resposta em série, altamente regulada, que inclui: adesão das plaquetas circulantes com células endoteliais e estruturas subendoteliais, ativação e agregação plaquetária. Esses eventos são decorrentes da exposição das plaquetas à superfície pró-coagulante. O objetivo é a formação rápida de um tampão hemostático que obstrui o local da lesão, prevenindo a perda de sangue (HARRISON, 2004). As interações plaquetas-células endoteliais (adesão) e plaquetas-plaquetas (agregação) são mediadas por vários receptores celulares posicionados sobre a superfície das plaquetas ou células endoteliais e proteínas adesivas, como FvW, fibrinogênio e colágeno (LÖWENBERG e col., 2010). Os principais agonistas, ligantes e receptores que medeiam essas interações estão listados na tabela 2.

Tabela 02: Principais agonistas, receptores e ligantes envolvidos na função plaquetária (Fonte: adaptado de JURK E KEHREL, 2005).

Função plaquetária	Agonistas, ligantes	Receptores
Adesão plaquetária	FvW	GP Ib/V/IX
	Trombospondina 1	GP Ib/V/IX, CD36
	Colágeno	$\alpha_2\beta_1$, GP VI, CD36
	Fibrinogênio	$\alpha_{IIb}\beta_3$
	Fibronectina	$\alpha_5\beta_1$
	Vitronectina	$\alpha_v\beta_3$
	Laminina	$\alpha_6\beta_1$
	Alta tensão de cisalhamento	GP Ib/V/IX
Ativação e amplificação	Trombina	PAR1, PAR4, GP Ib/V/IX
	ADP	P2Y ₁ , P2Y ₁₂
	TxA ₂	TP α , TP β
	Epinefrina	α_2A
	Serotonina	5-HT2A
Agregação/amplificação e estabilização	Fibrina	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado
	FvW	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado, GP Ib/V/IX
	Trombospondina 1	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado, CD36
	Fibronectina	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ativado

5.2 Adesão plaquetária

Após ruptura da parede do vaso sanguíneo, o colágeno, presente na porção subendotelial vascular, é exposto à corrente sanguínea. O FvW, sintetizado pelas células endoteliais, que está circulante no plasma liga-se ao colágeno exposto, e interage com o receptor GP Ib/V/IX presente na membrana plasmática das plaquetas, intermediando assim, a ligação do colágeno com as plaquetas (JURK E KEHREL, 2005; SIEDECKI et al., 1996). A ligação de FvW à GP Ib/V/IX induz a secreção de adenosina difosfato (ADP), que aumenta a afinidade da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pelo FvW (GAWAZ, 2004). O FvW é uma proteína de alto peso molecular, sintetizada pelas células endoteliais, e parece ser, hemostaticamente, o principal determinante da adesão e agregação plaquetária, pois devido ao seu tamanho, possui vários sítios de ligação que podem interagir

com a parede do vaso, matriz subendotelial e receptores plaquetários. Esses vários sítios de ligação do FvW permitem o primeiro contato do complexo GPIb/V/IX com as plaquetas, levando à formação de ligações firmes e captura de plaquetas. O antibiótico ristocetina é capaz de induzir a interação GPIb/V/IX-FvW *in vitro* (JURK E KEHREL, 2005; SIEDECKI et al., 1996).

A interação da ligação do FvW com estruturas subendoteliais e GPs plaquetárias é dependente da tensão de cisalhamento, pois a alteração do fluxo sanguíneo promove um alongamento do polímero FvW, expondo assim os seus sítios de ligação aos quais as plaquetas e estruturas subendoteliais podem aderir (SIEDECKI et al., 1996). Assim, apenas sob alta tensão de cisalhamento, as plaquetas aderem ao FvW através da GPIb/V/IX. Sob baixa tensão de cisalhamento, as plaquetas aderem predominantemente ao colágeno, através da ligação com o receptor GPVI e integrina $\alpha_2\beta_1$, ou então aderem à fibronectina e laminina, através de integrinas β_1 (JURK E KEHREL, 2005; KAMIGUTI, 2005). Diferentemente da GPIb/V/IX, a GPVI se liga diretamente ao colágeno subendotelial, e é essencial para a adesão e agregação plaquetária em colágeno imobilizado *in vitro* (GAWAZ, 2004). GPVI e GPIb/V/IX são críticos para a adesão de plaquetas à matrix subendotelial no local da lesão vascular e consequente ativação plaquetária (GALE, 2011).

A adesão plaquetária induz uma rápida sinalização intracelular, que desencadeia uma série de eventos, como ativação das plaquetas, reorganização do citoesqueleto das plaquetas, secreção do conteúdo granular e ativação de integrinas que sustentarão a adesão e agregação (ANDREWS e BERNDT, 2004).

5.3 Ativação plaquetária

A interação das GPs da membrana plaquetária com proteínas do subendotélio leva a um aumento rápido na concentração de Ca^{2+} no citosol. O aumento de Ca^{2+} livre desencadeia uma reorganização das proteínas do citoesqueleto das plaquetas (actina e miosina), provocando ativação das mesmas. As plaquetas ativadas sofrem uma mudança conformacional, passando de uma forma discóide para esferas irregulares, com emissão de pseudópodes (JURK E KEHREL, 2005; VARGA-SZABO et al., 2009). A emissão dos pseudópodes facilita a adesão das plaquetas com a parede dos vasos lesionados. A

reorganização do citoesqueleto também provoca contração interna, centralização dos grânulos plaquetários e liberação do conteúdo dos grânulos (Figura 06) (GEORGE, 2000; JURK E KEHREL, 2005).

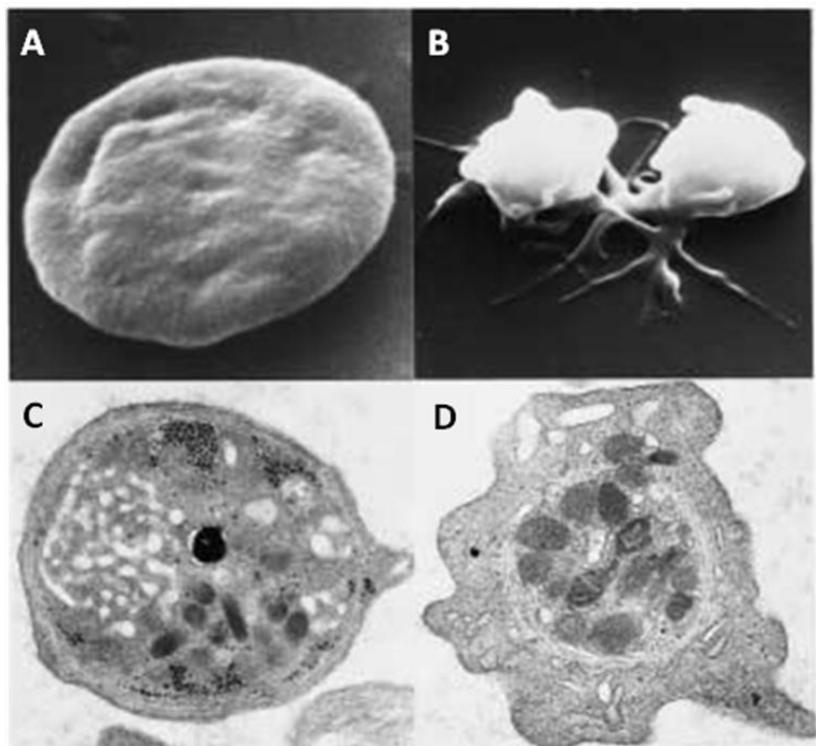


Figura 06: Morfologia de plaquetas humanas. A e C - Plaquetas não ativadas com forma discóide e grânulos distribuídos uniformemente. B e D - Plaquetas ativadas com formação de pseudopôdes e centralização dos grânulos (Fonte: GEORGE, 2000).

Todos os agonistas excitatórios da plaqueta, exceto a epinefrina, induzem o aumento das concentrações citosólicas de Ca^{2+} , tanto através da sua liberação a partir dos estoques internos (sistema tubular denso) quanto a partir do aumento do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular (HOURANI e CUSACK, 1991; VARGA-SZABO et al., 2009). As plaquetas ativadas liberam vários componentes granulares para o meio extracelular, que modulam as funções das interações plaquetárias, estimulando a circulação de plaquetas adicionais para serem recrutadas para formar agregados na parede do vaso danificado. Os grânulos densos contêm importantes agonistas secundários como ADP e serotonina. Acredita-se que o ADP seja o principal responsável pela amplificação da ativação plaquetária. O ADP atua via dois receptores acoplados à proteína G, presentes

na superfície plaquetária, o receptor P2Y₁ e o P2Y₁₂, que potencializam a secreção plaquetária e reforçam a agregação plaquetária, por ativarem a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) para seu estado de mais alta afinidade de ligação. A serotonina é um potente vasoconstritor e amplifica, juntamente com o ADP, a resposta plaquetária. Além disso, a serotonina desempenha um papel pró-coagulante por aumentar a retenção de proteínas pró-coagulantes, como o fibrinogênio, na superfície das plaquetas. Os grânulos densos também contêm Ca²⁺ que são essenciais na ativação, atração e agregação plaquetária (JURK E KEHREL, 2005).

Os grânulos α contêm a maioria dos fatores plaquetários envolvidos na hemostasia, incluindo o fator plaquetário 4, e, os fatores envolvidos na coagulação (fatores V, VII, XI, XIII e fibrinogênio). Além disso possuem moléculas de adesão que atuam na interação plaquetária com a parede vascular, tais como FvW, fibronectina e vitronectina, e também fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (JURK E KEHREL, 2005; MAYNARD et al., 2007).

As plaquetas aderidas e ativadas também formam tromboxano A₂ (TxA₂) a partir de ácido araquidônico (AA), oriundo dos fosfolipídeos localizados na membrana plasmática. Esse agonista reforça o processo de ativação plaquetária, após sua ligação a receptores de superfície específicos (TP α e TP β). O TxA₂ 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 provocar mudança conformacional, levando à liberação de AA endógeno (BERNARDI e MOREIRA, 2004).

A ativação das plaquetas também induz a exposição de fosfolipídeos ácidos sobre a superfície externa da plaqueta, promovendo a formação de trombina (RANG et al., 2007). A trombina gerada promove uma maior ativação das plaquetas causando extensa degranulação e ativação dos mecanismos de coagulação, culminando com intensa deposição de fibrina, que reforçará o tampão plaquetário e promoverá sua retração. Além disso, a trombina tem importante ação sobre as plaquetas, já que inativa a GPIb/V/IX e ativa mais ainda a GPIIb/IIIa, facilitando a transição da adesão para a agregação plaquetária

(COLLER et al., 2010). A trombina inicia sua sinalização, em parte, através dos receptores ativados por protease (PARs) ligados à proteína G. Estes receptores convertem um evento de clivagem proteolítica extracelular em um sinal transmembrana (SAVAGE et al., 2001).

5.4 Agregação plaquetária

A ligação dos agonistas plaquetários, ADP, TxA₂ e trombina aos seus receptores de membrana específicos, desencadeia uma mudança na conformação do complexo GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), convertendo-a para seu estado de mais alta afinidade de ligação com o fibrinogênio e FvW, processo denominado de agregação plaquetária (ISRAELS e RAND, 2013). A integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ normalmente está presente em grande quantidade na membrana plasmática das plaquetas inativas, entretanto sua ativação induz uma mudança conformacional em seus receptores que expõe seus sítios de ligação (GALE, 2011).

A agregação plaquetária envolve a interação plaqueta-plaqueta e é necessária para que ocorra uma hemostasia efetiva após a adesão inicial de plaquetas ao local da injúria (VARGA-SZABO e col., 2009). O principal receptor envolvido na agregação é a GPIIb/IIIa (integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$), uma vez que a interação plaqueta-plaqueta é iniciada pela ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ativada ao fibrinogênio e/ou FvW (sob alta tensão de cisalhamento), ou ligantes contendo a sequência de aminoácidos RGD ativada, que então gera sinais, resultando na formação de várias camadas plaquetárias e, por fim, do tampão plaquetário (ISRAELS e RAND, 2013; JURK e KEHREL, 2005).

Finalmente, a membrana da plaqueta transforma-se em uma superfície rica em fosfolipídeos, negativamente carregada. Essa superfície é necessária para ativação dos fatores de coagulação e geração de trombina. A trombina é essencial para síntese de fibrina insolúvel a partir do fibrinogênio, formando uma malha que é incorporada em torno do tampão de plaquetas. Essa malha serve para fortalecer e estabilizar o coágulo sanguíneo. Esse último processo é a hemostasia secundária e ocorre simultaneamente à hemostasia primária, de modo que ambos estão mecanicamente interligados (GALE, 2011; LÖWENBERG

et al., 2010). A figura abaixo (Figura 07) mostra de forma simplificada o processo de hemostasia primária.

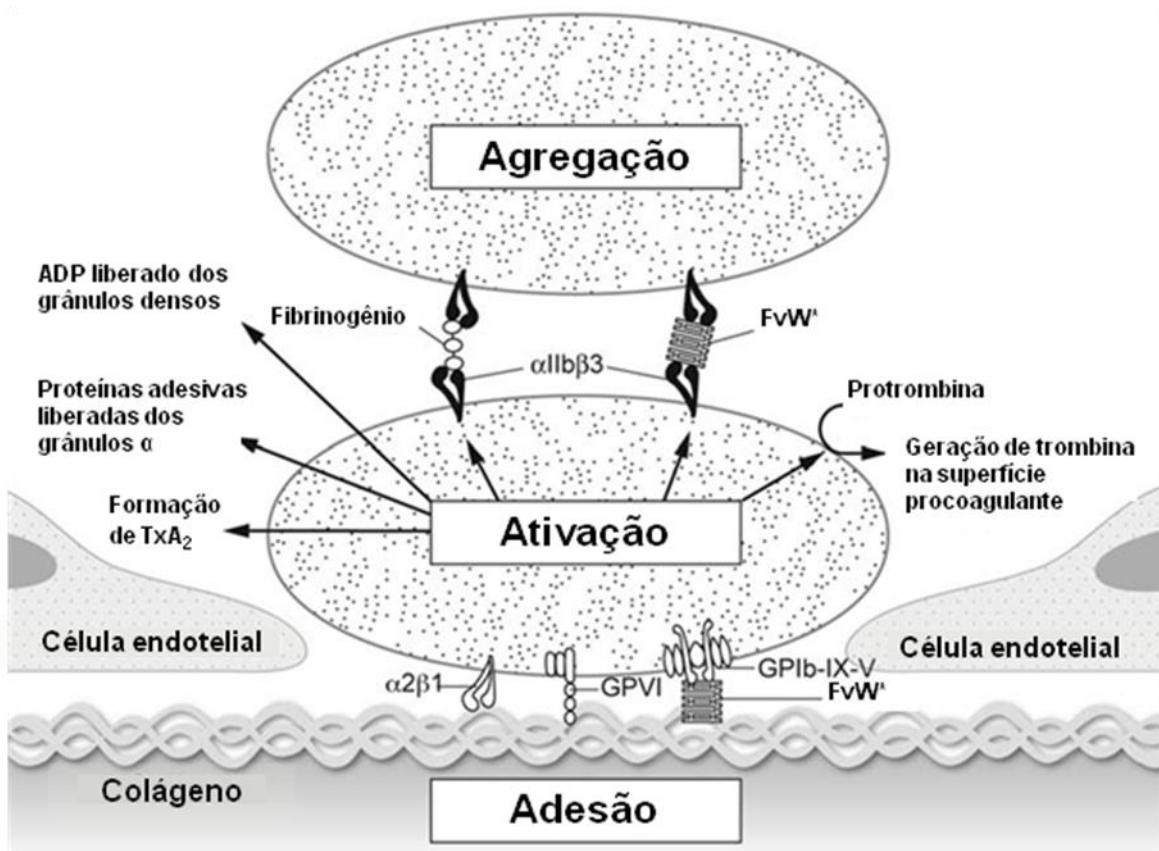


Figura 07 Diagrama simplificado de adesão, ativação e agregação plaquetária em resposta a uma lesão vascular. (*) interações envolvendo FvW ocorrem apenas sob alta tensão de cisalhamento (Fonte: adaptado de ISRAELS et al., 2011).

6. Proteínas de peçonha de serpentes e a hemostasia

Peçonhas de serpentes contêm uma grande variedade de proteínas que afetam o sistema vascular, incluindo as células sanguíneas, fatores de coagulação e componentes da parede vascular. Essas toxinas são capazes de inibir, bem como ativar, uma grande quantidade de fatores de coagulação, como o fibrinogênio, protrombina, fator V, fator IX, fator X e trombina; alteram a atividade das plaquetas e do FvW e também atuam sobre os eritrócitos (DU et al., 2006). A

tabela abaixo (Tabela 03) descreve os principais componentes protéicos, enzimáticos e não-enzimáticos, que interferem na hemostasia.

Tabela 03: Proteínas de peçonha de serpentes que atuam no sistema hemostático (Fonte: adaptado de SAVEJIC et al., 2011).

Proteína	Alvo no sistema hemostático	Efeito
Serinoproteases	Plaquetas	Agregação
	FX, FVII, FV, FII, proteína C	Ativação
	Plasminogênio	Ativação
	Fibrinogênio	Coagulação
	Fibrina/Fibrinogênio	Degradação
	Serpinas	Inativação
Metaloproteases	Células endoteliais, membrana basal	Hemorragia
	Plaquetas	Inibe agregação
	FX, FII	Ativação
	Fibrina/Fibrinogênio	Degradação
	Serpinas	Inativação
PLA ₂	FXa, FIIa, FT/FVII	Inibição
	Plaquetas	Agregação / Inibe agregação
LAAO	Células endoteliais	Hemorragia
	Plaquetas	Agregação / Inibe agregação
5'- Nucleotidases	Plaquetas	Inibe agregação
Desintegrinas	Plaquetas	Inibe agregação
Lectinas-símile do tipo C	FIX, FX, FIIa	Inibição
	FX, FII	Ativação
	Plaquetas	Agregação / Inibe agregação
Three finger toxins	FVIIa	Inibição
	Plaquetas	Inibe agregação

PLA₂ são enzimas que catalisam a hidrólise específica da ligação 2-acil-éster de fosfolipídeos, promovendo a liberação de ácidos graxos e lisofosfatídeos. Os ácidos graxos liberados são precursores de AA, que são mediadores químicos, relacionados ao processo inflamatório (DUNCAN e col., 2008; SCHALOSKE e DENNIS, 2006). PLA₂ são consideradas uma importante classe de proteínas encontradas em peçonhas do gênero *Bothrops*, responsáveis por

diversas propriedades biológicas, incluindo cardio e miotoxicidade, ação hemolítica, anticoagulante e antiplaquetária (KINI, 2003). Sua ação anticoagulante está relacionada à inibição de fatores de coagulação e/ou inibição do complexo FT/FVII, devido à hidrólise de fosfolipídeos, como a fosfatidilserina (KINI e EVANS, 1995). E a ativação ou inibição da agregação plaquetária induzida por PLA₂, provavelmente ocorre devido à liberação de precursores de AA (KINI e EVANS, 1990).

LAAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido, a um α-cetoácido correspondente, com produção de peróxido de hidrogênio e amônia (ZULIANI et al., 2009). Acredita-se que as LAAOs induzem hemorragia, devido a apoptose das células endoteliais provocada pela produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que a adição de catalase atenua esse efeito (TORII et al., 1997). A ativação plaquetária pode ser explicada pela amplificação na síntese de TxA₂, devido à ativação da via das ciclooxigenases provocada pelo peróxido de hidrogênio (LI et al., 1994). E a inibição plaquetária pode ser ocasionada pela redução na síntese de ADP pelas plaquetas expostas a peróxido de hidrogênio (BELISARIO et al., 2000).

A enzima 5'-nucleotidase interfere na agregação plaquetária por degradar ADP, um importante agonista da agregação plaquetária (OYANG e HUANG, 1983).

Three finger toxins são proteínas não enzimáticas com baixa massa molecular, entre 6-14 KDa. Acreditava-se que essas toxinas estavam presentes apenas na peçonha de elapídeos, mas recentemente foi demonstrada sua presença em peçonha de colubrídeos e viperídeos (DOLEY et al., 2008). São caracterizadas por quatro pontes dissulfeto conservadas e um núcleo globular de onde emergem três alças formadas por folhas-β pregueadas (KINI e DOLEY, 2010). Atuam na hemostasia por inibirem a atividade enzimática do fator VIIa e do complexo FVIIa/FT (BANERJEE et al., 2005).

As lectinas-símile do tipo C são moléculas estruturalmente semelhantes às lectinas tipo C, mas são incapazes de se ligar ao carboidrato. São heterodímeros não enzimáticos unidos por pontes dissulfeto e apresentam uma subunidade α de 14-15 KDa e uma subunidade β de 13-14 KDa (MORITA, 2005). Interferem na

agregação plaquetária por se ligarem à GPIb isoladamente ou então à GPIb ligada ao FvW ou receptores de colágeno, $\alpha_2\beta_1$ e GPVI (ZINGALI, 2007).

As serinoproteases são enzimas com uma região catalítica altamente conservada, apresentando os seguintes resíduos de aminoácidos: histidina, aspartato e serina. São inibidas competitivamente por benzamidina e por p-aminobenzamidina, e também por fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e diisopropilfluorofosfato (DFP), que reagem com o resíduo de serina do sítio ativo da protease, inativando-a irreversivelmente (MATSUI et al., 2000; SERRANO e MAROUN, 2005). Essas enzimas atuam de diferentes formas sobre a hemostasia, interferindo na agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise. Já foram descritas também, serinoproteases capazes de ativar a proteína C, protrombina e plasminogênio (SERRANO e MAROUN, 2005). Essas enzimas são capazes de promover agregação plaquetária pela clivagem proteolítica dos receptores PARs (SANTOS et al., 2000) ou através da sua ligação com o receptor GPIb (NISHIDA et al., 1994).

Trombinas-símile são exemplos de serinoproteases de peçonha de serpentes que tem efeito semelhante à trombina plasmática. Entretanto, os monômeros de fibrina gerados pela enzima sofrem polimerização limitada, pois somente um fibrinopeptídeo é clivado. A clivagem do fibrinogênio em apenas uma cadeia leva à formação de monômeros de fibrina anormais, que se polimerizam, porém numa frágil rede que não é reconhecida pelo fator XIII, e consequentemente, é facilmente disperso pela corrente sanguínea e degradado pela plasmina. Esse processo leva, inicialmente, a formação de microcoágulos, podendo desencadear consumo dos fatores de coagulação seguido de hemorragia local e sistêmica. Por esse motivo, essas enzimas despertam interesse para o uso clínico como anticoagulantes e agentes trombolíticos (CASTRO et al., 2004; MATSUI et al., 2000; YOU et al., 2004). Diversas serinoproteases trombina-símile têm sido purificadas de peçonhas de serpentes botrópicas, tais como BthT1 de *B. moojeni* (OLIVEIRA, 2001) e Bhalternin de *B. alternatus* (COSTA et al., 2010).

As desintegrinas são uma família de pequenos polipeptídeos não enzimáticos (40-100 resíduos de aminoácidos) ricos em cisteína, presentes em peçonha de viperídeos. São liberados na peçonha por processamento proteolítico

das metaloproteases da classe P-II ou sintetizados diretamente a partir de mRNAs. Esses polipeptídeos, em sua maioria, apresentam a sequência tripeptídica RGD (arginina-glicina-aspartato), com exceção da Barbourin (SCARBOROUGH et al., 1991) e Ussuristatin 2 (OSHIKAWA e TERADA, 1999), duas desintegrinas que possuem a sequência ativa KGD (lisina-glicina-aspartato), e a Atrolysin E (HITE et al., 1992), que possui o motivo MVD (metionina-valina-aspartato). As desintegrinas são capazes de interagir com integrinas presentes na superfície celular desencadeando inúmeros processos celulares (CALVETE et al., 2005; KINI e EVANS, 1992; OKUDA et al., 2002). O resíduo conservado de aspartato foi apontado como responsável pela ligação às integrinas, enquanto os outros dois resíduos do motivo fornecem especificidade (CALVETE et al., 2003). A atividade das desintegrinas também é influenciada pela sua região C-terminal, interferindo na especificidade e intensidade de ligação com as integrinas. Isso explica o fato de diferentes desintegrinas contendo um mesmo motivo de ligação apresentarem afinidade e seletividade de ligação diferentes para a integrina (CALVETE et al., 2005).

A família das desintegrinas pode ser dividida em cinco grupos diferentes de acordo com o tamanho e o número de pontes dissulfeto (CALVETE et al., 2003). O primeiro grupo inclui desintegrinas pequenas, formadas por 41-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. Desintegrinas de tamanho médio, com cerca de 70 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfeto compõem o segundo grupo. O terceiro grupo inclui as desintegrinas de maior tamanho, com cerca de 84 resíduos e sete pontes dissulfeto. Um quarto grupo é formado pelas desintegrinas-símile originadas pelo processamento proteolítico das metaloproteases da classe P-III. Essas desintegrinas apresentam aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e oito pontes dissulfeto, e possuem sequências alternativas ao motivo RGD, substituindo-o por sequências XXCD (x-x-cisteína-aspartato). Diferentemente dos demais grupos que são moléculas monoméricas, o quinto grupo é composto por homo e heterodímeros (CALVETE et al., 2005).

A capacidade das desintegrinas se ligarem à integrinas afeta vários processos celulares como agregação plaquetária, angiogênese, metástase e crescimento tumoral (SWENSON et al., 2007). Estudos mostraram que a ligação

de desintegrinas-RGD à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, bloqueia sua interação com o fibrinogênio, impedindo a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, AA, entre outros agonistas, contribuindo para os sintomas hemorrágicos do envenenamento (MARCINKIEWICZ et al., 1997; KAUSKOT et al., 2008). A ligação de desintegrinas-RGD ao receptor de vitronectina, $\alpha_v\beta_3$, induz apoptose de células endoteliais por bloquear sua adesão à proteínas da matriz extracelular, também contribuindo para os sintomas hemorrágicos (HONG et al., 2003). *Disintegrin-like* também são capazes de inibir a agregação plaquetária, entretanto o efeito ocorre através da inibição da integrina $\alpha_2\beta_1$, principal receptor para o colágeno (SHIMOKAWA et al., 1997).

6.1 Metaloproteases de peçonha de serpentes (SVMPs)

As SVMPs compreendem cerca de 32% das proteínas que compõem a peçonha de viperídeos, desempenhando um papel significativo nas patologias associadas ao seu envenenamento (CALVETE et al., 2007). São enzimas caracterizadas pela dependência catalítica de íons metálicos (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mg^{2+}) e pela grande diversidade estrutural e funcional (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000). Esses metais desempenham um papel crítico na atividade proteolítica e, consequentemente, na atividade biológica dessas proteases (FOX e SERRANO, 2009). Em geral, as SVMPs são zinco dependentes, pertencentes à família metzincina. O sítio ligante de zinco da família metzincina possui uma sequência de aminoácidos conservada, HEBXHXBGBXHZ, constituindo o domínio catalítico metaloprotease; onde H representa a histidina, E ácido glutâmico, G glicina, B um resíduo hidrofóbico, X um aminoácido qualquer e Z um aminoácido diferente entre as quatro subfamílias, mas conservado entre as mesmas (FOX e SERRANO, 2005; MARKLAND, 1998). A remoção do zinco por agentes quelantes, tais como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1,10-fenantrolina, podem inibir as SVMPs, eliminando completamente sua atividade enzimática (MARKLAND, 1998; MATSUI et al., 2000).

As SVMPs são classificadas em três classes, P-I, P-II e P-III, de acordo com suas massas moleculares e organização de seus multidomínios (Figura 08). O critério para formular essa classificação foi baseado na presença ou ausência de domínios não proteases através de análises de mRNA e proteínas isoladas da

peçonha. A classe P-I das SVMPs apresenta proteínas com massa molecular entre 20 e 30 kDa que contêm apenas o domínio metaloprotease. Essas proteases apresentam uma grande variedade de atividades biológicas, dependentes de suas respectivas estruturas primárias e terciárias. As proteases de 30 a 60 kDa compõem a classe P-II, e apresentam um domínio desintegrina adicionado ao C-terminal do domínio catalítico. A classe P-II foi subdividida em P-IIa a P-IIc de acordo com o processamento para liberação do domínio desintegrina. Na subclasse P-IIa o domínio desintegrina é liberado da forma madura da proteína, enquanto na subclasse P-IIb todos os domínios permanecem após maturação da proteína; a subclasse P-IIc compreende as SVMPs diméricas, sem liberação do domínio desintegrina. As proteases da classe P-IIId originam as desintegrinas homodiméricas liberadas do restante da proteína por um processo proteolítico pós-traducional, enquanto a subclasse P-IIle origina as desintegrinas heterodiméricas, também processadas do restante da proteína (FOX e SERRANO, 2005, 2008).

As SVMPs classe P-III são as mais intrigantes das categorias de SVMPs quanto a sua função e contribuição na complexidade da peçonha. A classe P-III compreende as enzimas com massas moleculares entre 60-100 kDa, que contêm um domínio rico em cisteína (*Cys-rich*) em adição aos domínios metaloprotease e ao domínio semelhante à desintegrina (*Dis-like*). O domínio semelhante à desintegrina (*Dis-like*) apresenta dois resíduos de cisteína a mais, quando comparado com as desintegrinas, e por sua vez, a disposição de suas pontes dissulfeto também é diferente. Além disso, o domínio semelhante à desintegrina (*Dis-like*) não apresenta a sequência RGD (FOX e SERRANO, 2005, 2008).

Assim como a classe P-II, a classe P-III apresenta subclasses. Na subclasse P-IIIa não há liberação dos domínios adicionais após maturação da proteína; enquanto que na subclasse P-IIIb os domínios rico em cisteína (*Cys-rich*) e semelhante à desintegrina (*Dis-like*) são liberados da forma madura da proteína. Na subclasse P-IIIc os precursores originam as SVMPs diméricas sem liberação dos domínios *Cys-rich* e *Dis-like*. A subclasse P-IIId, anteriormente descrita como P-IV (FOX e SERRANO, 2005; HITE et al., 1994), inclui proteases que possuem domínios semelhantes à lectina tipo-C ligadas por pontes dissulfeto

aos outros três domínios característicos das enzimas P-III (FOX e SERRANO, 2005, 2008).

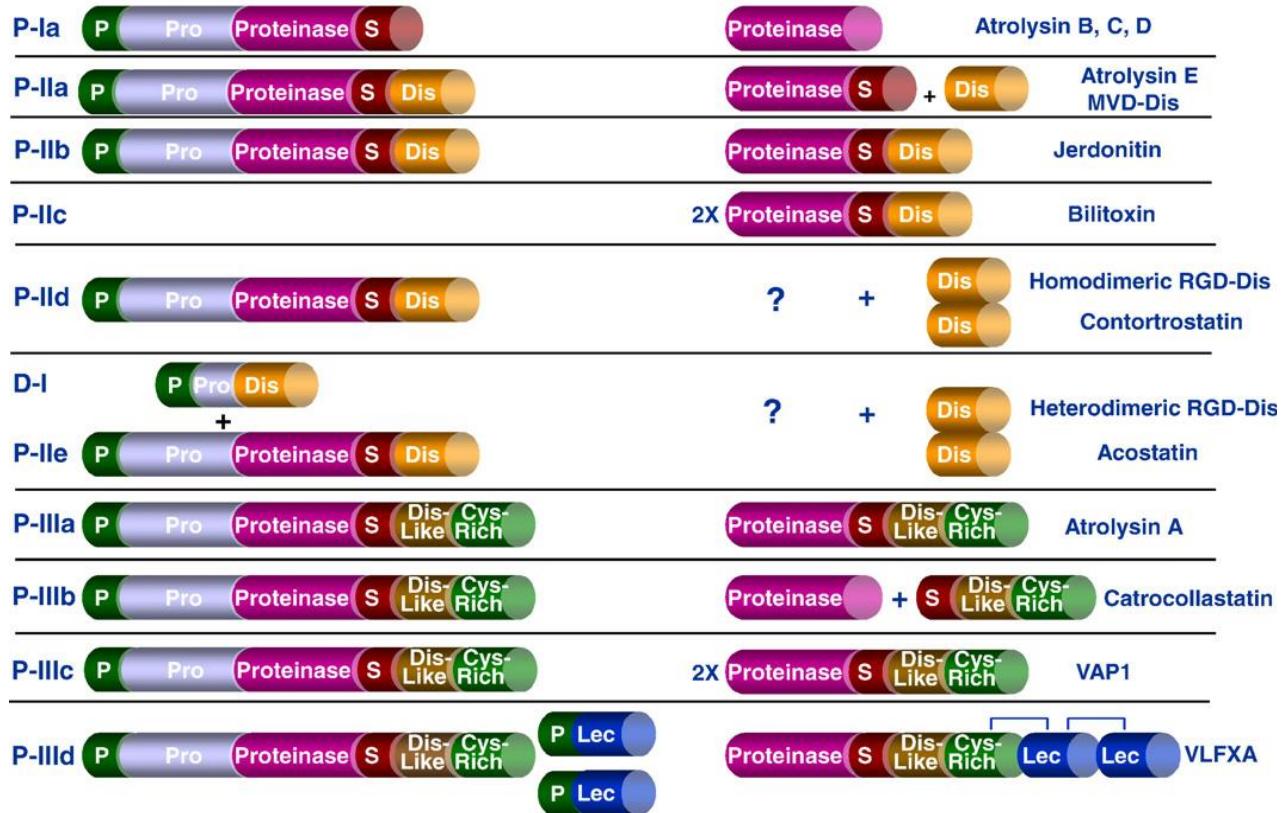


Figura 08: Classificação das SVMPs. P: peptídeo sinalizador; Pro: pró-domínio, removido durante sua ativação; S: sequência HEBXHBGBXH; Dis: domínio desintegrina; *Dis-like*: domínio semelhante à desintegrina; *Cys-rich*: domínio rico em cisteína; Lec: lectina; (?): produto processado, mas não identificado na peçonha (Fonte: FOX e SERANO, 2008).

As SVMPs são sintetizadas e armazenadas na glândula da serpente na forma de zimogênios ou precursores inativos. Possuem multidomínios, incluindo um pró-domínio que interage com o domínio catalítico, bloqueando seu sítio ativo por se ligar ao Zn^{2+} ; esse pró-domínio é responsável pela inativação das proteases antes da secreção. Após serem secretadas, essas enzimas são ativadas por atividade autocatalítica residual ou pela ação de outras proteases presentes na peçonha (SWENSON e MARKLAND, 2005; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Os domínios desintegrina e semelhante à desintegrina (*Dis-like*) interagem fortemente com as integrinas, interferindo em processos biológicos mediados por

esses receptores. Esses domínios, juntamente com o domínio semelhante à lectina tipo-C e o domínio rico em cisteína (*Cys-rich*), possuem importante papel nos efeitos tóxicos das SVMPs (IBA et al., 1999; JIA et al., 1997; SWENSON et al., 2007).

6.2 SVMPs e a hemostasia

As SVMPs têm sido objeto de muito estudo devido à importância que estas desempenham no envenenamento. Estas proteases desempenham um papel significativo nos efeitos sistêmicos do envenenamento, principalmente nos distúrbios na hemostasia (FOX e SERRANO, 2009). Em geral, sua ação está relacionada com a proteólise de componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina), ativação ou degradação de proteínas plasmáticas (fibrina, fibrinogênio, FvW, pró-trombina, fator X) e interação com receptores plaquetários (integrinas e GPs). Esses efeitos promovem diversas alterações patológicas, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, coagulopatia, mionecrose, edema, equimose e resposta inflamatória (GUTIÉRREZ et al., 2005; MOURA-DA-SILVA et al., 2007; WHITE, 2005).

Todas as classes de SVMPs são capazes de provocar hemorragia, entretanto, vários estudos demonstram que a presença dos domínios não enzimáticos direciona e potencializa esse efeito. Dessa forma, as SVMPs classe P-III são as mais hemorrágicas (GUTIÉRREZ et al., 2009b). A alta atividade hemorrágica da classe P-III tem sido atribuída à presença dos domínios semelhante à desintegrina (*Dis-like*) e rico em cisteína (*Cys-rich*). Esses domínios se associam a componentes da membrana basal e integrinas de células endoteliais, posicionando o domínio catalítico em uma posição favorável à proteólise e ruptura da microvasculatura (MOURA-DA-SILVA et al., 2008; SERRANO et al., 2006). Dessa forma, SVMPs classe P-I podem provocar hemorragia local por mecanismos indiretos, como lesão tecidual, e SVMPs classe P-III, geralmente, contribuem com a hemorragia sistêmica (GUTIÉRREZ et al., 2009b). Entretanto, há na literatura SVMPs classe P-III que não apresentam atividade hemorrágica, como o ativador de protrombina Berythraactivase da peçonha de *B. erythromelas* (SILVA et al., 2003).

As SVMPs também têm sido estudadas por sua ação fibrin(ogen)olítica. Essas enzimas são capazes de degradar um coágulo de fibrina ou prevenir a sua formação por degradar o fibrinogênio, provocando incoagulabilidade sanguínea por dissolução do trombo formado ou por esgotamento daquele fator de coagulação, respectivamente (MARKLAND, 1998; SWENSON e MARKLAND, 2005). Essa característica torna as SVMPs fibrin(ogen)olíticas não hemorrágicas como potenciais agentes clínicos para tratamento de pacientes com doenças vasculares tromboembólicas (DEITCHER e TOOMBS, 2006; LEONARDI et al., 2007). As SVMPs podem ser classificadas como α -fibrinogenases ou β -fibrinogenases de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio, sendo que a maioria das enzimas cliva preferencialmente a cadeia A α do fibrinogênio, e lentamente a cadeia B β (MARKLAND, 1998). Como o fibrinogênio é o principal ligante da integrina plaquetária $\alpha_{IIb}\beta_3$, acreditava-se que a sua degradação fosse responsável pela inibição plaquetária provocada por essas enzimas, entretanto, é a cadeia γ que contém o principal sítio de ligação com as plaquetas. Portanto, a degradação das cadeias A α e B β não interfere na agregação plaquetária (KAMIGUTI et al., 1994; KINI E EVANS, 1991).

As SVMPs também são conhecidas por interferirem na agregação plaquetária. Acredita-se que o efeito inibitório da agregação plaquetária provocado por SVMPs ocorra, principalmente, devido à interação de sítios específicos das SVMPs com receptores plaquetários (integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ e GPVI e GPIb) e hidrólise de FvW. A proteólise de proteínas da matriz extracelular (colágeno e fatores de coagulação) exerce um efeito secundário sobre a inibição plaquetária (DU et al., 2006; KAMIGUTI, 2005). A interação das SVMPs com os receptores plaquetários pode ser visualizada na figura 09.

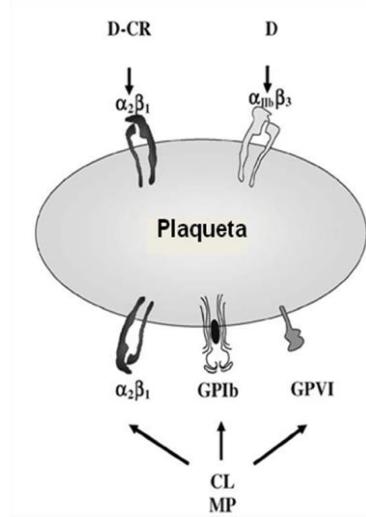


Figura 09: Receptores plaquetários que são alvos das SVMPs. MP: metaloprotease; D: desintegrina; D-CR: *Disintegrin-like/Cys-rich*; CL: lectina tipo-C (Fonte: adaptado de DU et al., 2006).

A última etapa da agregação plaquetária depende da ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ativada ao fibrinogênio. SVMPs são capazes de interferir na ativação plaquetária induzida por colágeno e FvW e também na ligação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ ao fibrinogênio (MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

A maioria das SVMPs investigadas até o momento apresenta atividade inibitória da agregação plaquetária induzida por colágeno. Essa inibição parece ser primariamente induzida pela interação com a integrina plaquetária $\alpha_2\beta_1$ (KAMIGUTI, 2005). Como exemplo temos Atrolysin A (FOX e BJARNASON, 1995) e Jararhagin (DE LUCA et al., 1995). Também, acredita-se que a Jararhagin promova inibição plaquetária por clivar a subunidade β_1 do receptor $\alpha_2\beta_1$ (KAMIGUTI et al., 1996a).

Os efeitos das SVMPs sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno, aparentemente, estão relacionados com SVMPs classe P-III, devido à presença dos domínios *Cys-rich* e *Disintegrin-like* (MOURA-DA-SILVA et al., 2007). Estudos utilizando Jararhagin e Atrolysin A demonstraram que esses domínios adicionais, possuem motivos que interagem, potencialmente, com o receptor de colágeno, a integrina $\alpha_2\beta_1$, bloqueando a adesão do colágeno ao seu receptor, e com isso promovendo um efeito inibitório na agregação plaquetária induzida por colágeno (KAMIGUTI, 2005). O domínio *disintegrin-like* por ser desprovido do motivo RGD não bloqueia a interação entre o fibrinogênio e a

integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, mas sim sua atividade está concentrada na inibição da ligação do colágeno com a integrina $\alpha_2\beta_1$ (MOURA-DA-SILVA et al., 2007).

Recentemente foi relatado efeitos de SVMPs sobre o receptor de colágeno GPVI. Wang (2007) descreveu a purificação de AAV1, uma metaloprotease da classe P-III, capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno por se ligar ao receptor GPVI. Essa inibição plaquetária via GPVI também pode ocorrer por proteólise. Kistomin é uma SVMP classe P-I que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno, devido à degradação proteolítica do receptor plaquetário GPVI provocada pela metaloprotease (HSU et al., 2008).

Outra consideração importante da ação de SVMPs sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno é a sua capacidade de se ligar às fibras de colágeno, como foi observado pela Crovidisin (LIU e HUANG, 1997) e Catrocollastatin (ZHOU et al., 1995), SVMPs classe P-III purificadas da peçonha de serpentes do gênero *Crotalus*. Essas enzimas se ligam a essas fibras bloqueando sua interação com as plaquetas, o que resulta na inibição da agregação plaquetária (LIU e HUANG, 1997; ZHOU et al., 1996). A Jararhagin também é capaz de se ligar ao colágeno com alta afinidade (TANJONI et al., 2003).

SVMPs também são capazes de interferir na agregação plaquetária induzida por FvW e GPIb. Os estudos começaram depois de perceberem que a porção mediana da sequência de algumas SVMPs apresentam homologia com o FvW (TAKEYA et al., 1990). A Jararhagin, além de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno também é capaz de inibir a aglutinação plaquetária induzida por ristocetina, um antibiótico que altera a conformação do FvW, expondo seu domínio que é reconhecido pela GPIb. Como a Jararhagin não cliva a GPIb (KAMIGUTI et al., 1996a), esse efeito inibitório ocorre devido ao seu efeito sobre o FvW. Dessa forma, sugere-se que a Jararhagin hidrolise o FvW em sua região N-terminal, que contém o sítio de ligação para o receptor GPIb (KAMIGUTI et al., 1996b). Outra SVMP classe P-III, Acurhagin, purificada da peçonha de *Agkistrodon acutus*, também inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno e ristocetina por degradar o colágeno e o FvW, respectivamente (WANG e HUANG, 2002). Com relação ao efeito sobre a GPIb, algumas SVMPs, Kistomin e Mocarhagin, demonstram degradar esse receptor plaquetário (HUANG et al.,

1993; WARD et al., 1996). Por sua vez, Crotalin, uma SVMP classe P-I, degrada não apenas o FvW, mas também seu receptor plaquetário GPIb, resultando em inibição plaquetária induzida por ristocetina (WU et al., 2001).

SVMPs classe P-II são, em sua maioria, processadas proteolicamente separando seu domínio catalítico do domínio desintegrina. Como descrito anteriormente, as desintegrinas são inibidores não enzimáticos da agregação plaquetária. SVMPs classe P-II não processadas podem, assim como as desintegrinas, inibir a agregação plaquetária por possuírem a sequência RGD (ZHU et al., 2010). Dentre os inibidores da agregação plaquetária isolados de peçonha de serpentes, as desintegrinas são descritas como as mais potentes (MARKLAND e SWENSON, 2013). Isso ocorre devido à presença do motivo RGD em sua sequência que reconhece e se liga à integrinas da superfície plaquetária, em especial a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, bloqueando a sua interação com o fibrinogênio. Dessa forma, as desintegrinas impedem a última etapa da agregação plaquetária e a formação de coágulos, contribuindo com os sintomas hemorrágicos do envenenamento. Algumas desintegrinas são capazes de se ligar à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ não ativada, enquanto outras requerem ativação prévia (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Como a interação das desintegrinas com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ impede a última etapa da agregação plaquetária, desintegrinas-RGD inibem a agregação por diversos agonistas, incluindo ADP, epinefrina, AA e colágeno (SAVEJIC et al., 2011).

Desintegrinas que possuem o motivo KGD também são capazes de inibir a agregação plaquetária por se ligarem à integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (SCARBOROUGH et al., 1991). A integrina específica capaz de se ligar às desintegrinas com motivo MVD é desconhecida, mas acredita-se que $\alpha_{IIb}\beta_3$ seja um de seus receptores alvos, pois sua inibição ocorre pela ativação plaquetária induzida por ADP e colágeno (SHIMOKAWA et al., 1998).

Inúmeras desintegrinas já foram isoladas de peçonha de serpentes desde que foram caracterizadas por competirem com o fibrinogênio pela $\alpha_{IIb}\beta_3$. Essas moléculas não enzimáticas são potentes drogas para o tratamento de doenças cardiovasculares, devido à sua simplicidade estrutural e mecanismo de interação com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (DU et al., 2006). Algumas delas já estão em avanço clínico, como exemplo temos o medicamento Aggrastat® que têm como princípio ativo a

desintegrina-RGD, Echistatin, utilizado em pacientes com trombose e outras desordens cardiovasculares por ser um potente agente antiplaquetário (MONLEON et al., 2005). As desintegrinas também podem apresentar atividade antitumoral por serem capazes de inibir a migração celular de tumores, a metástase e a angiogênese dependentes de integrinas (COMINETTI, 2004).

Diante deste contexto, as peçonhas de serpentes são ricas em compostos farmacologicamente ativos que interferem no sistema hemostático, em especial as SVMPs, que apresentam vários mecanismos capazes de interferir na função plaquetária, devido à sua alta complexidade estrutural e funcional com múltiplos domínios que sinalizam seus efeitos biológicos. Uma investigação detalhada desses componentes presentes em peçonha de serpentes pode fornecer informações para o desenvolvimento de drogas que podem ser aplicadas nos campos médicos e farmacológicos da hemostasia e trombose.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, v. 14(5), p. 462 - 470, 2009.
- AIRD, S. D. Orchidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, v. 40, p. 335-393, 2002.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v.114, p.447-453, 2004.
- ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v.54, p.949-957, 2009.
- ÁVILA, F. **Guia Ilustrado de Animais do Cerrado de Minas Gerais**. 2^a Ed. Empresa das Artes, 2003.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HENRING, S. E. Envenomation caused by poisonouns animals: Poisonous snakes. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 36, p. 480 – 489, 2003
- BANERJEE, Y.; MIZUGUCHI, J.; IWANAGA, S.; KINI, R. M. Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from *Hemachatus haemachatus* (African Ringhals cobra) venom that inhibits clot initiation and factor VIIa activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 42601 - 42611, 2005.
- BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 65 (4), p. 209 - 250, 1993.
- BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; SILVA, A. M. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. P. Assessment of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 41, p. 583 – 593, 2003.
- BELISARIO, M. A.; TAFURI, S.; DI DOMENICO, C.; SQUILLACIOTI, C.; DELLA MORTE, R.; LUCISANO, A.; STAIANO, N. H₂O₂ activity on platelet adhesion to

fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1495, p. 183-193, 2000.

BENNETT, J. S.; BERGER, B. W.; BILLINGS, P. C. The structure and function of platelet integrins. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.7, p.200-205, 2009.

BERNARDE, P. S.; GOMES, J. O. Venomous snakes and ophidism in Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, State of Acre, Brazil. **Acta Amazônica, Manaus**, v. 42(1) , p. 65 – 72, 2012.

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

BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. (org.). 2012. Brazilian reptiles – List of species. Vesion 2012.2. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <<http://www.sbhherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

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

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19(1), p. 07-16, 2003.

BOZZINI, C. E.; MOLINAS, F. Hemostasia. In: HOUSSAY, A. B.; CIRGOLANI, H. E. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7^a Ed., Porto Alegre: Artmed, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Acidentes por Animais Peçonhentos. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. 7^a Ed. Brasília: 2009. 816 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. **Fundação Nacional de Saúde**, 2^a Ed., Brasília: 2001. 112 p.

BRAZIL, V. Do emprego da peçonha em terapêutica. **Anuais Paulistas de Medicina e Cirurgia**, v. 60(5), p. 398-408, 1950.

BUCARETCHI, F.; HYLOP, S.; VIEIRA, R. J.; TOLEDO, A. S.; MADUREIRA, P. R.; CAPITANI, E. M. B. Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, p.141-145, 2006.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1405 - 1414, 2007.

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

CALVETE, J. J.; MORENO-MURCIANO, M. P.; THEAKSTON, D. G.; KISIEL, D. G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, v.372, p.725-734, 2003.

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

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 4, p. 501 – 509, 2002.

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**. 2^a Edição. São Paulo: Sarvier, 2003.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 843 - 856, 2004.

CHEVILLE, N. F. Hemostasia e trombose. In: CHEVILLE, N. F. **Introdução à patologia veterinária**. 3^a Ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2009, pp. 146 - 151.

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

COLLER, B. S. ITALIANO Jr., J. E.; SMYTH, S. S.; WHITEHEART, S. Platelet morphology, biochemistry and function. In: LITCHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Williams Hematology**. 8^a Edição. The McGraw-Hill Companies, 2010, pp. 1587 - 1664.

COMINETTI, M. R. **Estudo dos efeitos metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica**. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

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

COTRAN, R. S.; MITCHEL, R. N. Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, C. T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. Snakebite Envenomation and Death in the Developing World. **Ethnicity & Disease**, v. 19, p. 42 - 46, 2009.

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

DA SILVA, N. M. V.; ARRUDA, E. Z. MURAKAMI, Y. L. B.; MORAES, R. A. M.; EL-KIK, C. Z.; TOMAZ, M. A.; FERNANDES, F. F. A.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R.; MELO, P. A. Evolution of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venom in mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196 - 205, 2007.

DA SILVA, R. J.; FONTES, M. R. M; RODRIGUES, R. R.; BRUDER, E. M.; STEIN, M. F. B.; SIPOLI, G. P. M.; PINHÃO, R.; DE LOPES, C. A. A report on a case of melanism in a specimen of *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768).

Journal of Venomous Animals and Toxins, v. 5(1), 1999.

DART, R.; McNALLY, J. T.; SPAITE, D. W.; GUSTAFSON, R. The sequelae of pitviper poisoning in the United States. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE JR., E. D. **Biology of the Pitvipers**, Tyler, Texas: Selva, 1992, pp. 395-404.

DAVIE, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 51, p. 50819-50832, 2003.

DE LUCA, M.; WARD, C. M.; OHMORI, K.; ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, alpha2beta1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, p. 570-576, 1995.

DEITCHER, S. R.; TOOMBS, C. F. Non-clinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: alfimeprase. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, p. 215-220, 2006.

DOLEY, R.; PAHARI, S.; MACKESSY, S. P.; KINI, R. M. Accelerated exchange of exon segments in Viperid three-finger toxin genes (*Sistrurus catenatus edwardsii*; Desert Massasauga). **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p. 196 - 207, 2008.

DU, X. Y.; CLEMENTSON, J. M.; NAVDAEV, A.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N.; CLEMENTSON, K. J. Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus Hannah* (King cobra) is a powerfull platelet activator via glycoprotein VI. **The Journal of Chemical Biology**, v. 277, p. 35124 – 35132, 2002.

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

DUNCAN, R. E.; SARKADI-NAGY, E.; JAWORSKI, K.; AHMADIAN, M.; HEI, S. S. Identification and functional characterization of adipose-specific phospholipase A2 (AdPLA). **The Journal of Chemical Biology**, v. 283, p. 25428 - 25436, 2008.

FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. Atrolyns: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 368-387, 1995.

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

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

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

FREY-VOGEL, T. A.; PERRET, B. A. Notes on toxicology. **Experientia**, v. 29(11), p. 1137 - 1452, 1973.

GALE, A. J. Current understanding of hemostasis. **Toxicologic Pathology**, v. 39 (1), p. 273 - 280, 2011.

GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, v. 93 (1), p. 105 - 113, 2004.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K. **Manual de Hematologia Veterinária**. 2^a Edição. São Paulo: Varela, 2005.

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

GEORGE, J. N. Platelets. **The Lancet**, v. 355, p. 1531 - 1539, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976–987, 2009b.

GUTIEÉRREZ, J. M.; FAN, H. W.; SILVERA, C. L. M.; ÂNGULO, Y. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, p. 625 - 630, 2009c.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Venenos de serpientes de la familia Viperidae en América: bioquímica y fisiopatología. In: D'SUZE, G.; CORSO-BURGUETE, G.; PANIAGUA-SOLÍS, J. F. **Emergencias Médicas por Animales Ponzosos en las Américas**. México: 2011, pp. 461-487.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DÍAZ, C.; ESCALANTE, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 958 - 975, 2009a.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; WILLIAMS, D.; FAN, H. W.; WARREL, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223–1235, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hemostasia e coagulação sanguínea. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiología Médica**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, pp. 457 - 470.

HARRISON, P. Measuring platelet function? **The Hematology Journal**, v. 5, p. S164 - S169, 2004.

HERRERA, C.; RUCAVADO, A.; WARREL, D. A.; GUTIÉRREZ, J. M. Systemic effects induced by the venom of the snake *Bothrops caribbaeus* in a murine model. **Toxicon**, v. 63, p. 19 – 31, 2012.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 28, pp. 540-541.

HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA Sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p. 182-191, 1994.

HITE, L. A.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. **Biochemistry**, v. 31, p. 6203-6211. 1992.

HOGE, A. R. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). **Memórias do Instituto de Butantan**, v. 32, p. 109 - 184, 1966.

HONG, S. Y.; LEE, H.; YOU, W. K.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S.; SONG, K. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 302, p. 502 - 508, 2003.

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

HSU, C. C.; WU, W. B.; HUANG, T. F. A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoprotein VI and impairs platelet functions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 6, p. 1578-1585, 2008.

HUANG, T. F.; CHANG, M. C.; TENG, C. M. Antiplatelet protease, kistomin, selectively cleaves human platelet glycoprotein Ib. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1158, p. 293-299, 1993.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **The American Journal of Pathology**, v. 154 (5), p. 1489-1501, 1999.

ISRAELS, S. J.; KAHR, W. H. A.; BLANCHETTE, V. S.; LUBAN, N. L. C.; RIVARD, G. E.; RAND, M. L. Platelet Disorders in Children: A Diagnostic Approach. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 56, p. 975 - 983, 2011.

ISRAELS, S. J.; RAND, M. L. What we have learned from inherited platelet disorders. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 60, p. S2 - S7, 2013.

JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant protein and peptide antagonists. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 373, p. 281-286, 2000.

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

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

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

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

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

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4544-4576, 2011.

KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; RAMOS, O. H.; BECHYNE, I.; RENARD, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; CREPIN, M.; LEGRAND, C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; BONNEFOY, A. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 6604 - 6616, 2008.

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

KINI, R. M.; DOLEY, R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. **Toxicon**, v. 56, p. 855 - 867, 2010.

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

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from *Naja nigricollis* venom is independent of fibrinogen degradation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1095, p. 117-121, 1991.

KINI, R. M., EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265 - 293, 1992

KINI, R. M.; EVANS, H. J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon**, v. 33, p. 1585 - 1590, 1995.

KOH, D. C. I; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63(24), p. 3030-3041, 2006.

KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 353 – 405, 1985.

LALOO, D. Venomous bites and stings. **The Medicine Publishing Company Ltd**, v.33, p.74-76, 2005.

LEONARDI, A.; FOX, J. W.; TRAMPUS-BAKIJA, A.; KRIZAJ, I. Ammodytase, a metalloprotease from *Vipera ammodytes ammodytes* venom, possesses strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 49, p. 833-842, 2007.

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

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

LOPES, P. H. **Alterações locais induzidas pela secreção tóxica de *Philodryas patagoniensis* (Girard, 1857) (Serpentes: Colubridae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências, Fisiologia Geral) – Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LÖWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. M.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 68, p. 242 - 251, 2010.

MARCINKIEWICZ, C.; VIJAY-KUMAR, S.; MCLANE, M. A.; NIEWIAROWSKI, S. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of allbb3 and avb3 integrins and expression of ligandinduced binding site. **Blood**, v. 90, p. 1565 - 1575, 1997.

MARKLAND, F. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36(12), p. 1749 -1800, 1998.

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

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetics correlates of feeding Habits in neotropical pitvipers of the Genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.W.; HÖGGREN, M.; DOUGLAS, M.E.; GREENE, H.W. **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain Publishing, 2002, pp.307-328.

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

MAYNARD, D. M.; HEIJNEN, H. F. G.; HORNE, M. K.; WHITE, J. G.; GAHL, W. A. Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 1945 - 1955, 2007.

MEBS, D. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**. WHO Offset Publication No. 58. Geneva: 1981, 44 pp.

MENEZES, M. C.; FURTADO, M. F.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, p. 304-312, 2006.

MONLEON, D.; ESTEVE, V.; KOVACS, H.; CALVETE, J. J.; CELDA, B. Conformation and concerted dynamics of the integrin-binding site and the C-terminal region of echistatin revealed by homonuclear NMR. **Biochemical Journal**, v. 387, p. 57-66, 2005.

MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet modulating activities. **Toxicon**, v. 45, p. 1099 - 1114, 2005.

MOURA-DA-SILVA, A. M; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2893-2905, 2007.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; RAMOS, O. H. P.; BALDO, C.; NILAND, S.; HANSEN, U.; VENTURA, J. S.; FURLAN, S.; BUTERA, D.; DELLA-CASA, M. S.; TANJONI, I.; CLISSA, P. B.; FERNANDES, I.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; EBLE, J. A. Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Biochimie**, v. 90 (3), p. 484–492, 2008.

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

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H.; OZAKI, Y.; USAMI, Y. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen clotting

serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p. 1843 - 1849, 1994.

OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v. 41, p. 14248 – 14254, 2002.

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

OSHIKAWA, K.; TERADA, S. Ussuristatin 2, a novel KGD bearing disintegrin from *Agkistrodon ussuriensis* venom. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 31-35, 1999.

OTERO-PATIÑO, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops asper* bites. **Toxicon**, v. 54, p. 998 – 1011, 2009.

OUYANG, C.; HUANG, T. F. Inhibition of platelet aggregation by 5'- nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Toxicon**, v. 21, p. 491 - 501, 1983.

PARDAL, P. P. O.; PARDAL, J. S. O.; GADELHA, M. A. C.; RODRIGUES, L. S.; FEITOSA, D. T.; PRUDENTE, A. L. C.; FAN, H. W. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, p. 333-337, 2010.

PINHO, F. M.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47(1), p. 24 - 29, 2001.

PINHO, F. O.; VIDAL, E. C.; BURDMANN, E. A. Atualização em Insuficiência Renal Aguda: Insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22(3), p. 162 - 168, 2000.

PINHO, F. M.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snake bite induced acute kidney injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**, v. 28(4), p. 354–362, 2008.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 142, p. 328–346, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RUSSELL, F. E. Venomous animal injuries. **Current Problems in Pediatrics**, v.3, p.3-47, 1973.

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

SANTOS, B. F.; SERRANO, S. M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS Letters**, v. 477, p. 199 - 202, 2000.

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

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

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

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

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; PONTES, C. L. S.; MONTENEGRO, C. F.; MARTIN, A. C. B. M. Review: Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, v.2, p.2606-2621, 2010.

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

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

SHIMOKAWA, K.; JIA, L. G.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W. Isolation, sequence analysis, and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 354, p. 239-246, 1998.

SHIMOKAWA, K.; SHANNON, J. D.; JIA, L. G.; FOX, J. W. Sequence and biological activity of Catrocollastatin-C: a desintegrin-like/cysteine-rich two domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 343, p. 35-43, 1997.

SIEDIECKI, C. A.; LESTINI, B. J.; KOTTKE-MARCHANT, K. K.; EPPELL, S. J.; WILSON, D. L.; MARCHANT, R. E. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. **Blood**, v. 88 (8), p. 2939 - 2950, 1996.

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

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação. **Acidente por animais peçonhentos.** Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.142, p.371-381, 2006.

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

SWENSON, S.; RAMU, S.; MARKLAND, F. S. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2860 – 2871, 2007.

TAKEYA, H.; ODA, K.; OMORI-SATO, T.; IWANAGA, S. The complete amino acid sequence of high molecular mass hemorrhagic protein HR1B isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 16068-16073, 1990.

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

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with l-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9539 - 9542, 1997.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. Natural toxins II. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 391, p. 37 – 62, 1996.

VAN HINSBERGH, V. W. M. The endothelium: vascular control of haemostasis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 95 (2), p. 198 - 201, 2001.

VARGA-SZABO, D.; BRAUN, A.; NIESWANDT, B. Calcium signaling in platelet. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 1057 - 1066, 2009.

WALKER, J. P.; MORRISON, R.; STEWART, R.; GORE, D. Venomous Bites and Stings. **Current Problems in Surgery**, v. 50, p. 9 - 44, 2013.

WANG, W. J. Purification and functional characterization of AAV1, a novel P-III metalloproteinase, from formosan *Agkistrodon acutus* venom. **Biochimie**, v. 89, p. 105-115, 2007.

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

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

WARREL, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: 2004, pp. 709–761.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**, v. 21, p. 131-142, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines for the production control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. Disponível em: <www.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms>. Acesso em: 11 Jul 2013.

WU, K. K.; THIAGARAJAN, P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. **Annual Review of Medicina**, v. 47, p. 315 - 331, 1996.

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

YOU, W. K.; CHOI, W. S.; KOH, Y. S.; SHIN, H. C.; JANG, Y.; CHUNG, K. H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, v. 571, p. 67 - 73, 2004.

ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster *Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 421-442, 1997.

ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J. B. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, p. 720-726, 1996.

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

ZHU, L.; YUAN, C.; CHEN, Z.; WANG, W.; HUANG, M. Expression, purification and characterization of recombinant jerdonitin, a P-II class snake venom metalloproteinase comprising metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, v. 55, p. 375-380, 2010.

ZINGALI, R. B. Interaction of snake-venom proteins with blood coagulation factors: mechanisms of anticoagulant activity. **Toxin Reviews**, v. 26, 25 - 46, 2007.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology - An introductory biology of amphibians and reptiles**. 2^a ed. San Diego: Academic Press. 2001, 645p.

ZULIANI, J. P.; KAYANO, A. M.; ZAQUEO, K. D.; NETO, A. C.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; STABELI, R. G. Snake venom l-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, p. 908- 912, 2009.

Capítulo II

Isolation and functional characterization of Bmoo-Agg, a new platelet-aggregation-inhibiting factor from *Bothrops moojeni* snake venom

Isolation and functional characterization of Bmoo-Agg, a new platelet-aggregation-inhibiting factor from *Bothrops moojeni* snake venom

Bruna B. de Sousa ^{a,c}, Carla C. Neves Mamede ^{a,c}, Mayara R. de Queiroz ^{a,c}, Nadia C. G. de Moraes ^{a,c}, Kelly C. Fonseca ^{a,c}, Mariana S. Matias ^b, Déborah F. da Cunha Pereira ^b, Thaís M. Migliorini ^b, Leonilda Stanziola ^{b,c}, 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.

*Corresponding author: Tel. (fax): +55-34-3218-2200. E-mail address: foliveira@umuarama.ufu.br

Resumo

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* comprehende uma mistura complexa de proteínas e peptídeos farmacologicamente ativos capazes de interagir com componentes do sistema hemostático humano. Alguns destes componentes são enzimas, tais como metaloproteases que podem interferir na agregação plaquetária, um importante processo celular envolvido na trombose e homeostase. As metaloproteases são proteínas com multidomínios constituídas por um domínio catalítico e um ou vários domínios não-catalíticos. Algumas dessas enzimas podem sofrer autólise durante a secreção liberando seu domínio catalítico. O presente estudo relata a purificação e caracterização funcional de Bmoo-Agg, um fator de inibição da agregação plaquetária isolado da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*. A toxina foi purificada por uma combinação de três passos cromatográficos (cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel, cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 e cromatografia de afinidade em Heparina HiTrap™ HP). Bmoo-Agg apresentou-se como uma proteína de cadeia simples com uma massa molecular aparente de 32 kDa em SDS-PAGE a 14% sob condições redutoras. O sequenciamento de Bmoo-Agg por degradação de Edman mostrou a sequência de aminoácidos LGPDIVPPNELLEVM, a qual apresentou identidade com muitas metaloproteases classe PIII de peçonha de serpentes. Bmoo-Agg mostrou um efeito inibitório bastante específico sobre a agregação plaquetária induzida pela ristocetina e epinefrina em plasma rico em plaquetas humanas de uma maneira dose e tempo de incubação dependentes, mas teve pequeno ou nenhum efeito sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno e adenosina difosfato. A toxina foi desprovida de atividades proteolítica, hemorrágica, coagulante e anticoagulante e não induziu edema e hiperalgesia significativos. Bmoo-Agg pode ser de interesse médico, porque é um inibidor anti-plaquetário, o que poderia, potencialmente, ser desenvolvido como um novo agente terapêutico para a prevenção e tratamento de pacientes com doenças trombóticas.

Palavras-chave: peçonha de serpentes, *Bothrops moojeni*, metaloproteases, fator de inibição da agregação plaquetária.

Abstract

Bothrops snake venom comprises a complex mixture of pharmacologically active proteins and peptides which interact with components of the human hemostatic system. Some of these components are enzymes, such as metalloproteinases, that may interfere in platelet aggregation, an important cellular process in thrombosis and hemostasis. Metalloproteinases are multidomain proteins composed of a catalytic and one or several non-catalytic domains. Some of these enzymes can undergo autolysis during secretion, releasing the catalytic domain. The present study reports the purification and functional characterization of Bmoo-Agg, a platelet-aggregation-inhibiting factor from *Bothrops moojeni* snake venom. The toxin was purified by a combination of three chromatographic steps (ion-exchange on DEAE-Sephacel, molecular exclusion on Sephadex G-75 and affinity chromatography on HiTrap™ Heparin HP). Bmoo-Agg was found to be a single-chain protein with an apparent molecular mass of 32 KDa on 14% SDS-PAGE under reducing conditions. Sequencing of Bmoo-Agg by Edman degradation revealed the amino acid sequence LGPDIVPPNELLEVM, which showed identity with many PIII class snake venom metalloproteinases. Bmoo-Agg showed a rather specific inhibitory effect on platelet aggregation induced by ristocetin and epinephrine in human platelet-rich plasma in a dose- and incubation time-dependent manner, whereas it had little or no effect on platelet aggregation induced by collagen and adenosine diphosphate. The toxin was devoid of proteolytic, hemorrhagic, coagulant or anticoagulant activities and induced no significant edema or hyperalgesia. Bmoo-Agg may be of medical interest because it is an anti-platelet inhibitor, which could potentially be developed as a novel therapeutic agent to prevent and treat patients with thrombotic disorders.

Keywords: Snake venom, *Bothrops moojeni*, metalloproteinase, platelet-aggregation-inhibiting factor.

1. Introduction

Snake venoms comprise pharmacologically active proteins and peptides, both enzymatic or non-enzymatic, such as phospholipases A₂, metalloproteinases, serine proteinases, nucleotidases, L-amino acid oxidase, disintegrins and C-type lectins (Du et al., 2006; Kini and Evans, 1990; Markland, 1998; Sajevic et al., 2011). Several snake venom metalloproteinases (SVMPs) have been isolated and characterized by their biological activities. These proteolytic enzymes have hemorrhagic and fibrin(ogen)olytic activities, act as prothrombin activators, activate blood coagulation factor X, possess apoptotic activity, inactivate blood serine proteinase inhibitors (serpins) and act as platelet aggregation inhibitors (Fox and Serrano, 2009; Gutiérrez and Rucavado, 2000; Markland and Swenson, 2013; Marsh and Williams, 2005; Sajevic et al., 2011).

SVMPs comprise a group of zinc-dependent enzymes of varying molecular mass, widely distributed in Viperidae venoms. They are synthesized as multidomain precursors and stored in the venom gland as inactive zymogens (Calvete et al., 2007; Markland and Swenson, 2013; Moura-da-Silva, 2007; Swenson and Markland, 2005). SVMPs are classified into three major classes, PI, PII and PIII, according to their size (molecular mass) differences and domain organization. PI SVMPs include small metalloproteinases with only the metalloproteinase domain. PII SVMPs comprise medium-size proteinases composed of one metalloproteinase and one disintegrin domain. PIII SVMPs have an additional cysteine-rich domain following the disintegrin region and, in some cases, a lectin domain. PII and PIII SVMPs are divided into several subclasses based on proteolytic processing. PII SVMPs can be processed into a metalloproteinase domain and a non-enzymatic disintegrin, and PIII SVMPs can also be degraded, releasing a stable fragment which corresponds to the disintegrin-like and cysteine-rich domains (Fox and Serrano, 2005, 2008).

Several studies have investigated SVMPs as platelet aggregation inhibitors (Braud et al., 2000; Kamiguti, 2005; Koh and Kini, 2012; Markland and Swenson, 2013; Matsui et al., 2000; Moura-da-Silva et al., 2007; Ramos and Selistre-de-Araujo, 2006; Sajevic et al., 2011). Disintegrin domains usually contain the RGD sequence, which binds to platelet $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin (GPIIb/IIIa), blocking the last

phase of platelet aggregation and clot formation (Calvete et al., 2005; Ramos and Selistre-de-Araújo, 2006). Therefore, disintegrins are considered potent platelet aggregation inhibitors (Markland and Swenson, 2013). On the other hand, disintegrin-like domains possess the XXCD motif, instead of the usual RGD, and are also able to inhibit platelet aggregation by binding to $\alpha_2\beta_1$ integrin (Calvete et al., 2005; Kamiguti et al., 1996).

In the present study, we describe the purification, determination of N-terminal amino acid sequence and functional characterization of Bmoo-Agg, a platelet-aggregation-inhibiting factor from *Bothrops moojeni* snake venom.

2. Material and Methods

2.1 Material

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

2.2 Animals

Swiss male mice (20-25 g) and Wistar male rats (200-250 g) were provided from Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) at the Federal University of Uberlândia (Uberlândia-MG, Brazil). The animals were maintained under conditions of controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity (60-70%) and light/dark cycle (12 hours) with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Committee for Ethics in Animals Experimentation of Federal

University of Uberlândia (CEUA/UFU), Minas Gerais, Brazil (Protocol number 108/12).

2.3 Human blood

The experiments were performed in accordance with current guidelines for research with human, established by the Committee for Ethics in Human Research of Federal University of Uberlândia (CEP / UFU), Minas Gerais, Brazil (Protocol number 055/11). Blood was obtained by blood donation from 10 individuals who were invited to participate in the research as volunteer donors. The criteria for the selection of donor volunteers were no signs or symptoms of disease, malnutrition or dehydration, between 18 and 65 years of age, weight more than 50 kg, no use of any medication that interferes with hemostasis, no use of illicit drugs, no alcohol consumption in the last 24 hours preceding the experiment and no hemostasis disorders.

2.4 Isolation of Bmoo-Agg

Protein isolation was carried out in three steps. The crude venom of *B. moojeni* (200 mg) was dissolved in 2.0 mL of 0.05M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) and clarified by centrifugation at 10,000 x g for 10 min. The supernatant was applied to a DEAE-Sephacel column (2.5 x 20 cm) previously equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8). Chromatography was carried out at a flow rate of 20 mL/h, with a convex concentration gradient of the same buffer (0.05-0.6 M) and fractions of 3.0 mL/tube were collected. All peaks were monitored by measuring absorbance at 280 nm on a spectrophotometer BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech, Japan). The seventh peak, designated D7, was pooled, lyophilized and applied to a Sephadex G-75 column (1.0 x 100 cm) previously equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8). The samples were eluted from this column with the same buffer at a flow rate of 20 mL/h and fractions of 3.0 mL/tube were collected. The second fraction, designated D7S2, was pooled, lyophilized and submitted to the third step of separation using a HiTrap™ Heparin HP column (5 x 1 mL) in an ÄKTApurifier™ HPLC system, previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 5 mM calcium chloride. The samples were eluted with an increasing concentration

gradient of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 2.0 M sodium chloride. Elution was carried out at a flow rate of 30 mL/h, fractions of 1.0 mL/tube were collected and the absorbance was read at 280 nm. Isolated Bmoo-Agg was concentrated in the major peak. To evaluate the degree of purity, isolated Bmoo-Agg was passed through a reverse-phase C2/C18 column (4.6 x 100 mm) using the ÄKTApurifier™ HPLC system. The column was equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid) and eluted with a linear concentration gradient from 0 to 100% of solvent B (70% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) at a flow rate of 0.3 mL/min. Absorbance was monitored at 280 nm.

2.5 Protein analysis

The protein concentration was determined by the microbiuret method (Itzhaki and Gill, 1964), using bovine serum albumin as the standard. Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed as described by Laemmli (1970) using 14% (w/v) gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer (pH 8.3) containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.4 kDa). Gels were stained with Coomassie blue R-250, 0.2% (w/v). The relative molecular mass of Bmoo-Agg was estimated by Kodak 1D image analysis software.

2.6 N-terminal sequencing

The N-terminal sequence of Bmoo-Agg was determined by Edman degradation (Edman, 1950), performed on an automated sequencer (Procise model 494, Applied Biosystems). The identity of the primary sequence of Bmoo-Agg was compared with other proteins using BLAST (Basic Local Alignment Search) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7 Proteolytic activity upon fibrinogen

Fibrinogenolytic activity was assayed as described by Rodrigues et al. (2000), with brief modifications. Samples containing 25 μ L of bovine fibrinogen (3 mg/mL saline) were incubated with 20 μ g of Bmoo-Agg for 120 min at 37°C. The reaction

was stopped by the addition of a denaturing buffer containing 10% (v/v) glycerol, 10% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.2% (w/v) SDS and 0.001% (w/v) bromophenol blue (pH 6.8). Reaction products were analyzed by 14% (w/v) SDS-PAGE.

2.8 Proteolytic activity upon azocasein

Samples of 20 μ g of Bmoo-Agg were supplemented with 200 μ L of saline and incubated for 60 min with 800 μ L of azocasein solution (1 mg/mL). The reaction was stopped by the addition of 200 μ L of 15% trichloroacetic acid to precipitate the undegraded azocasein. The mixture was left standing for 20 min before centrifugation at 10,000 \times g for 10 min. The proteolytic activity was estimated by reading the absorbance of the clear supernatant at 405 nm. One unit of azocaseinolytic activity was defined as the amount of enzyme which produces an absorbance increase of 0.01 units.

2.9 Hemorrhagic activity

Hemorrhagic activity was determined as described by Nikai et al. (1984), with some modifications. Groups of three Swiss male mice were subcutaneously injected into the dorsal skin with 50 μ g of Bmoo-Agg diluted in 25 μ L of saline. After three hours, animals were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine, the skin was removed and the diameter of the hemorrhagic spot was measured on the inner surface. Control animals received the same volume of sterile saline.

2.10 Defibrinating activity

Defibrinating activity was carried out according to the method of Gene et al. (1989), with slight modifications. Groups of three Swiss male mice were intraperitoneally injected with 50 μ g of Bmoo-Agg (50 μ g/100 μ L saline). Control animals received the same volume of sterile saline. After one hour, mice were sacrificed by an overdose of ketamine/xylazine and bled by cardiac puncture. Whole blood was placed in tubes and kept at 25-30°C. Activity was determined by measuring the time until the onset of blood clotting.

2.11 Coagulant activity

Coagulant activity was assayed using bovine plasma. The plasma samples were mixed with 3.8% sodium citrate (9:1, v/v) and centrifuged at 2,500 x g for 15 minutes to obtain platelet-rich plasma (PRP). Bmoo-Agg (25 µg/25 µL) or the same volume of saline (negative control) or 0.2 mol/L calcium chloride (positive control) was added to 200 µL of citrated bovine PRP at 37°C. Clotting activity was determined by measuring the time until fibrin clot onset by a coagulometer (CLO Timer).

2.12 Platelet aggregation assay

Platelet aggregation assays were performed in human PRP and measured using the automatic Aggregometer 4 channels (AggRAM™ version 1.1, Helena Laboratories, USA). Human blood collected in sodium citrate was centrifuged at 100 x g for 12 min at room temperature to obtain PRP. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at 1,000 x g for 15 min. Assays were carried out using 200 µL of PRP maintained at 37°C under continuous stirring in siliconized glass cuvettes. Aggregation was triggered with collagen (10 µg/mL), ADP (20 µM), ristocetin (1.5 mg/mL) or epinephrine (300 µM) after pre-incubation of platelets with Bmoo-Agg in different incubation times (10, 20 and 30 min) at 37°C and different doses of Bmoo-Agg (15, 40 and 80 µg). One hundred percent (100%) aggregation was expressed as the percentage absorbance relative to PPP aggregation. Control experiments were performed using only platelet agonists. All experiments were carried out in triplicate.

2.13 Evaluation of paw edema formation

Groups of three Wistar male rats received an intraplantar injection of Bmoo-Agg (50 µg/100 µL saline) into the subplantar region of one hind paw. An equal volume of sterile saline was injected into the contralateral paw. The volumes of both paws were measured using a plethysmometer (model 7140, Ugo Basile, Italy) before and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours after the injection. Results were calculated as difference between both paws and expressed as the percentage increase in paw volume relative to the initial volume.

2.14 Evaluation of hyperalgesia

Hyperalgesia was measured according to the paw pressure test as described by Randall and Selitto (1957), with slight modifications. Groups of three Wistar male rats received an intraplantar injection of Bmoo-Agg (50 µg/100 µL saline) into the right hind paw. An equal volume of sterile saline was injected into the left hind paw for control. The weight in grams (g) required to elicit a nociceptive response, i.e. paw flexion, was determined as the nociceptive threshold. A cut-off value of 300 g was used to prevent damage to the paws. The nociceptive threshold was measured before and 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours after Bmoo-Agg injection using a Randall-Selitto apparatus (EFF-440 model, Insight, Brazil). Results were calculated as the difference between both paws and expressed as the percentage of decrease in nociceptive threshold relative to the initial threshold. To reduce stress, the rats were habituated to the apparatus one day before the experiments.

2.15 Statistical analysis

The statistical analyses were carried out by ANOVA using the GraphPad prism program version 5.01. Differences with p-values of less than 5% ($p < 0.05$) were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

The snake *B. moojeni*, popularly known as “caíçaca”, is distributed in central and southeastern Brazil and adjacent countries, including Paraguay and Argentina (Nogueira et al., 2003). This species is responsible for the majority of snakebite accidents registered in Hospital of Clinics of the Federal University of Uberlândia, MG, Brazil (Da Silva et al., 2003). In this work, we report the purification and functional characterization of Bmoo-Agg, a platelet-aggregation-inhibiting factor from *B. moojeni* snake venom.

The toxin was purified by a three-step procedure including ion-exchange, gel filtration and affinity chromatographies. Some toxins have been fractionated using similar procedures, such as Bmoo FIBMP-I (Torres et al., 2012) and BmooMP α -1 (Bernardes et al., 2008) both from *B. moojeni* snake venom. Crude *B. moojeni* venom (200 mg) was applied to an ion-exchange chromatography DEAE-Sephacel column and produced eight main protein peaks designated D1 to D8 (Fig. 1A). The D7 fraction represented around 5.5% (w/w) of the crude venom and

it was submitted to gel filtration chromatography on a Sephadex G-75 column, resulting in four peaks, designated D7S1 to D7S4 (Fig. 1B). The D7S2 fraction (~3.3%) was further fractionated over an affinity chromatography HiTrap™ Heparin HP column using the ÄKTApurifier™ HPLC system (Fig. 1C). The non-adsorbed fraction (~1.7%), designated Bmoo-Agg, was devoid of proteolytic, hemorrhagic, defibrinating and coagulant activities but it was able to interfere with platelet aggregation. The homogeneity of this fraction was demonstrated by SDS-PAGE, showing a single protein band around 32 kDa in the presence or absence of the reducing agent β -mercaptoethanol (Fig. 1E). The degree of purity of isolated Bmoo-Agg was confirmed by reverse-phase HPLC chromatography on a C2/C18 column, revealing a unique major peak (Fig. 1D).

The Bmoo-Agg yield was similar to the enzyme Bhalternin (1.85%) from *B. alternatus* venom (Costa et al., 2010). On the other hand, the Bmoo-Agg yield was lower than several purified enzymes from *Bothrops* sp. venom, such as Bmoo FIBMP-I (Torres et al., 2012), BthMP (Gomes et al., 2009) and BmooMPa-1 (Bernardes et al., 2008), which represent 2.9%, 2.3% and 8.7% of *B. moojeni* venom, respectively. Interestingly, Sanchez and colleagues (2007) purified an enzyme, designated Leucurolysin-B, which represents 24.5% of *B. leucurus* venom.

Bmoo-Agg was subjected to N-terminal sequencing by Edman degradation. The first 15 amino-acid residues from N-terminal sequencing were determined to be LGPDIVPPNELLEVM and submitted to BLAST. The primary sequence of the Bmoo-Agg shared similarity with some PIII SVMPs and disintegrin peptides. Bmoo-Agg closely resembles Moojenin, a fibrinogenolytic metalloproteinase PIIIb subclass from *B. moojeni* (Morais et al., 2012) and showed homology with Bothropasin (Mandelbaum et al., 1982), Jararhagin (Paine et al., 1992), Jarastatin (Coelho et al., 1999) and Jararhagin-C (Usami et al., 1994) from *B. jararaca*, Leucurolysin-B (Sanchez et al., 2007) and Leucurogin (Higuchi et al., 2011) from *B. leucurus*, Brevilysin-H6 (Terada et al., 1991) from *Agkistrodon halys brevicaudus*, AaH-IV (Zhu et al., 1997) from *Agkistrodon acutus*, Atrolysin-A (Bjarnason and Tu, 1978) from *Crotalus atrox* and Salmosin (Kang et al., 1998) from *Agkistrodon halys brevicaudus* (Fig. 2).

PIII SVMPs comprises high molecular mass proteinases composed of a disintegrin-like and a cysteine-rich domain (DC domain) following the proteinase domain. Some PIII SVMPs have an additional lectin-like domain linked to the other domains through a disulfide bond (Fox and Serrano, 2005, 2008). SVMPs play an important role in hemostatic disorders. They are the primary factors responsible for hemorrhage. PIII SVMPs are more active at inducing hemorrhage than PI and PII classes. The additional DC domain contributes to the proteolytic specificity of these PIII SVMPs by targeting them to bind to critical protein substrates (Serrano et al., 2006; Jia et al., 1997).

Although Bmoo-Agg showed high homology with many PIII SVMPs, it showed no hemorrhagic activity. These data suggest that this toxin had undergone autolysis and comprises only the DC domain, which is a non-catalytic domain. For this reason, we suggest that Bmoo-Agg is not able to induce hemorrhage due to the absence of the proteinase domain, preventing proteolysis of the protein components of the capillaries. Indeed, subclass PIIIb SVMPs can undergo proteolysis/autolysis during secretion or under non-physiological conditions *in vitro* such as alkaline pH, low calcium or the presence of reducing agents (Fox and Serrano, 2008). SVMPs can be cleaved, generating intact biologically active polypeptides of about ~30 kDa which correspond to the DC domain (Assakura et al., 2003). Bothropasin (Mandelbaum et al., 1982), Brevilysin-H6 (Terada et al., 1991), Leucurolysin-B (Sanchez et al., 2007), AaH-IV (Zhu et al., 1997) and Jararhagin (Paine et al., 1992) are PIII SVMPs comprised of a metalloproteinase domain associated with the DC domain which can be degraded through autoproteolytic events.

Bmoo-Agg is similar to Acucetin (30 kDa) (Zang et al., 2003) and Jararhagin C (28 kDa) (Usami et al., 1994), toxins containing both disintegrin-like and cysteine-rich domains released through auto-proteolysis of AaH-IV from *Agkistrodon acutus* (Zhu et al., 1997) and Jararhagin from *B. jararaca* (Paine et al., 1992), respectively; both are PIII SVMPs. Like Acucetin and Jararhagin C, Bmoo-Agg did not induce hemorrhage. For this reason, we believe that Bmoo-Agg can be included into subclass PIII SVMPs, as proposed by Fox and Serrano (2008), in which the DC domain has been processed from the proteinase domain.

Platelets play a central role in hemostasis (Andrews and Berndt, 2000; Kamiguti, 2005). During vascular injury, platelets are recruited from the blood circulation to bind to the sub-endothelial matrix, forming a hemostatic plug to stop the bleeding. The first reaction of platelets in a damaged vessel is their interaction with adhesive proteins, such as von Willebrand factor (vWF) and collagen via GPIb-IX-V and GPVI glycoprotein receptors and $\alpha_2\beta_1$ integrin. The binding of platelets to collagen is stabilized by vWF. The activated platelets secrete, among other things, their granule contents, which include secondary agonists such as ADP, serotonin, thromboxane A₂ (TxA₂) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) (Koh and Kini, 2012; Rang et al., 2007). ADP acts via G protein-coupled receptors, enhancing the platelet aggregation related to $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin. When bound to platelets, ADP favors the appearance of the glycoprotein IIb/IIIa complex, a site-specific binding to fibrinogen (Jurk and Kehrel, 2005; Zucker and Nachmias, 1985). Then, the GPIIb/IIIa complex becomes active, allowing the formation of bridge platelets by the binding of fibrinogen molecules. This interaction is regulated by Ca²⁺ (Bennet and Vilaire, 1979; Salzman and Merril, 1987). After the first stimulus, platelets release TxA₂, a derivative of arachidonic acid. This molecule amplifies platelet activation by a type of positive feedback. Epinephrine acts as an agonist of platelet aggregation by activating platelets without the initial change in conformation, leading to the release of endogenous arachidonic acid, TxA₂ formation and platelet secretion (Bernardi and Moreira, 2004; Gawaz, 2004).

In this work, Bmoo-Agg was tested for its effect on platelet aggregation. Interestingly, our results showed that Bmoo-Agg inhibited platelet aggregation induced by ristocetin and epinephrine in a dose-dependent manner (Figs. 3 and 4). Bmoo-Agg (40 μ g) inhibited approximately 53% and 62% of platelet aggregation induced by ristocetin and epinephrine, respectively, after pre-incubation with PRP for 30 min. Our results showed no inhibition of ADP- or collagen-induced platelet aggregation by Bmoo-Agg, although some PIII SVMPs present an effect on ADP- or collagen-induced platelet aggregation.

It is possible that Bmoo-Agg has a disintegrin-like domain, as seen in some SVMPs. This domain binds to integrins and thus inhibits platelet aggregation. However, more studies are needed to elucidate the mechanism of how Bmoo-Agg inhibits platelet aggregation. According to Kamiguti and colleagues (1996),

ristocetin is an antibiotic that induces the binding *in vitro* of vWF to GPIb/IX. These same authors suggest that the inhibition of ristocetin-induced platelet aggregation by Jararhagin occurs due to a catalytic effect of the toxin on vWF. Since Bmoo-Agg has no catalytic effect, we suggest that the inhibition of ristocetin-induced platelet aggregation by Bmoo-Agg occurs via binding of the toxin to the GPIb receptor. Similarly, we can suggest that the inhibition of epinephrine-induced platelet aggregation also occurs due to the binding of Bmoo-Agg to epinephrine receptors.

The inflammatory response is a major characteristic of envenomation by *Bothrops* snakes. This reaction involves the release of potent pro-inflammatory mediators that cause vasodilation and extravasation of plasma into the extracellular space. These events are accompanied by the activation of nociceptors, resulting in edema and hyperalgesia (Fernandes et al., 2006; Gutiérrez et al., 2009; Nascimento et al., 2010; Teixeira et al., 2009). Our results show that statistically Bmoo-Agg did not cause hyperalgesia and edematogenic responses in the hind paw when rats received an intraplantar injection of 50 µg of the toxin (data not shown). Thus, Bmoo-Agg does not contribute to edema and hyperalgesia caused by *B. moojeni* envenomation.

In conclusion, we describe a procedure for purifying Bmoo-Agg (32 kDa), a toxin comprised of disintegrin-like and cysteine-rich domains and originated from autolysis/proteolysis of SVMPs from *B. moojeni*. Bmoo-Agg may be of medical interest because it is an anti-platelet inhibitor, and could potentially be developed as a novel therapeutic agent to prevent and treat patients with thrombotic disorders.

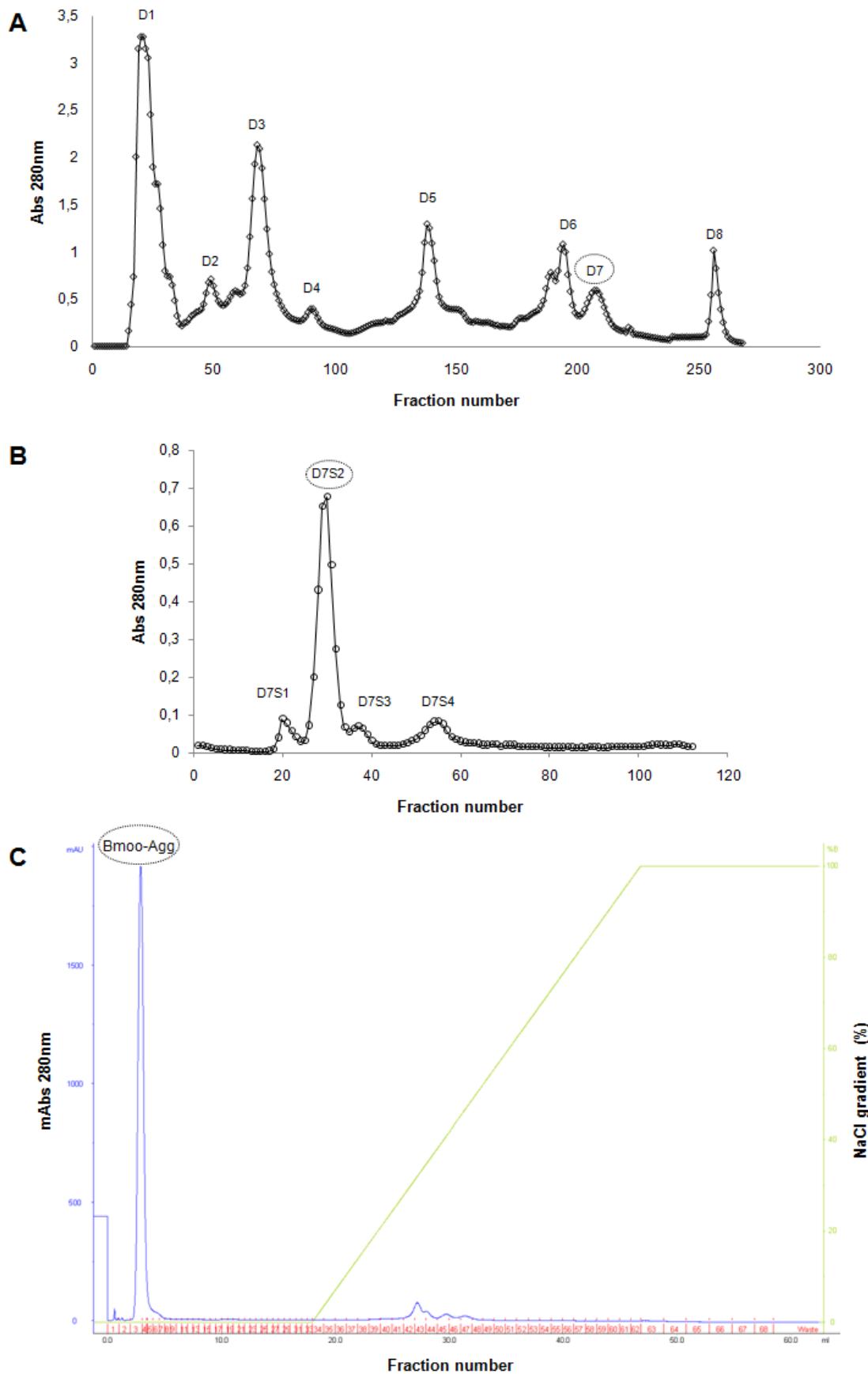
Acknowledgements

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

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Figures



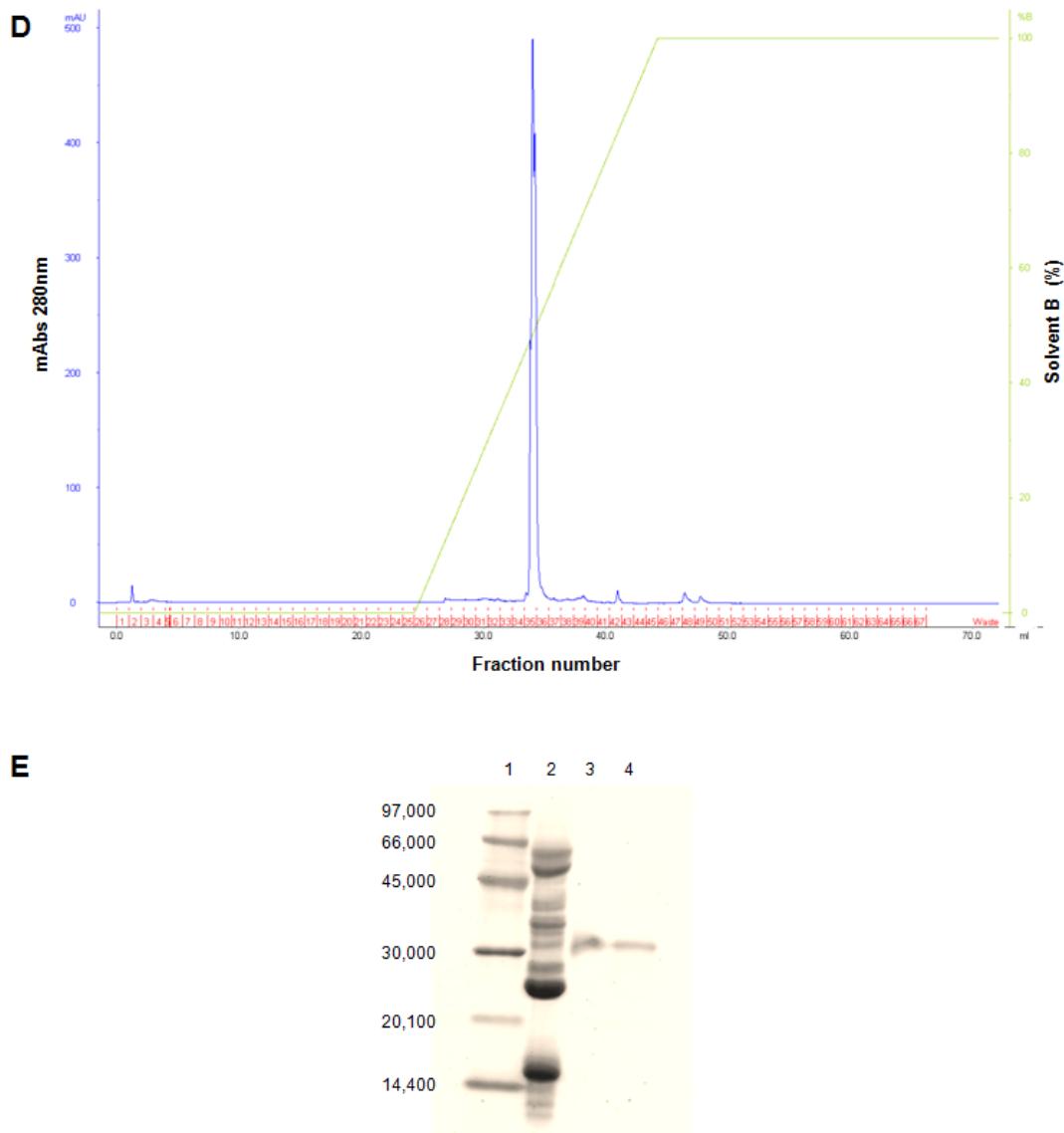


Fig. 1. Purification of Bmoo-Agg from *B. moojeni* snake venom. (A) Separation on DEAE-Sephadex ion-exchange chromatography: crude venom (200 mg) was applied to the column (2.5 x 20 cm) and elution was carried out at a flow rate of 20 mL/h with ammonium bicarbonate (Ambic) gradients buffer, pH 7.8, from 0.05 M to 0.6 M. Fractions of 3.0 mL/tube were collected and the absorbance was read at 280 nm. (B) Separation on Sephadex G-75 molecular exclusion chromatography: fraction D7 was applied to the column (1.0 x 100 cm) and elution with 0.05 M ammonium bicarbonate was achieved at a flow rate of 20 mL/h. Fractions of 3.0 mL/tube were collected and the absorbance was read at 280 nm. (C) Separation by affinity chromatography on a HiTrap™ Heparin HP column using the ÄKTApurifier™ HPLC system: fraction D7S2 was applied to the column (5 x 1 mL), previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 5 mM calcium chloride. The samples were eluted with an increasing concentration gradient of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 2.0 M sodium chloride and the absorbance of the fractions was monitored at 280 nm. Fractions of 1.0 mL/tube were collected at a flow rate of 30 mL/h. (D)

Reverse phase on a C2/C18 column using the ÄKTApurifier™ HPLC system: Bmoo-Agg was applied to the column (4.6 x 100 mm), previously equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid). Adsorbed proteins were eluted with a linear concentration gradient from 0 to 100% of solution B (70% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid) at a flow rate of 0.3 mL/min. Absorbance was monitored at 280 nm. (E) SDS-PAGE in 14% (w/v) polyacrylamide, Tris-glycine buffer, pH 8.3, and 20 mA. Lanes: 1- standard proteins; 2- reduced crude venom of *B. moojeni*; 3- reduced Bmoo-Agg; 3- non-reduced Bmoo-Agg. The gel was stained with Coomassie blue R-250.

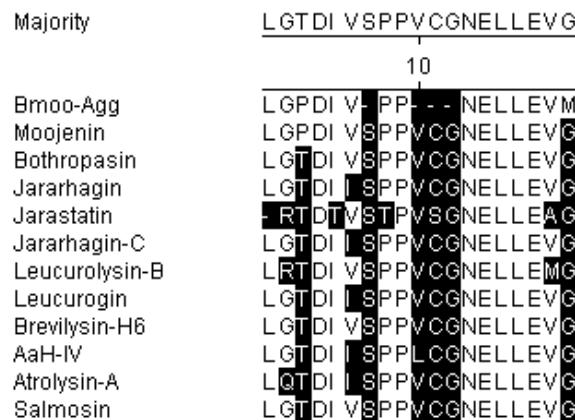


Fig. 2. Sequence alignment of Bmoo-Agg and other metalloproteinases/disintegrins: Moojenin (GI: P0DKR0.1), Bothropasin (GI: 209870468), Jararhagin (GI: P30431.1), Jarastatin (GI: Q0NZX5.1), Jararhagin-C (GI: P30431.1), Leucurolysin-B (GI: P86092.1), Leucurogin (GI: P0DJ87.1), Brevilysin-H6 (GI: P0C7B0.2), AaH-IV (GI: 255917952), Atrolysin-A (GI: Q92043.1) and Salmosin (GI: O93518.1). The non-conserved residues are shown in black frames. The alignment and figure were generated by the MegAlign program from Lasergene (DNAStar Inc., Madison, WI, USA).

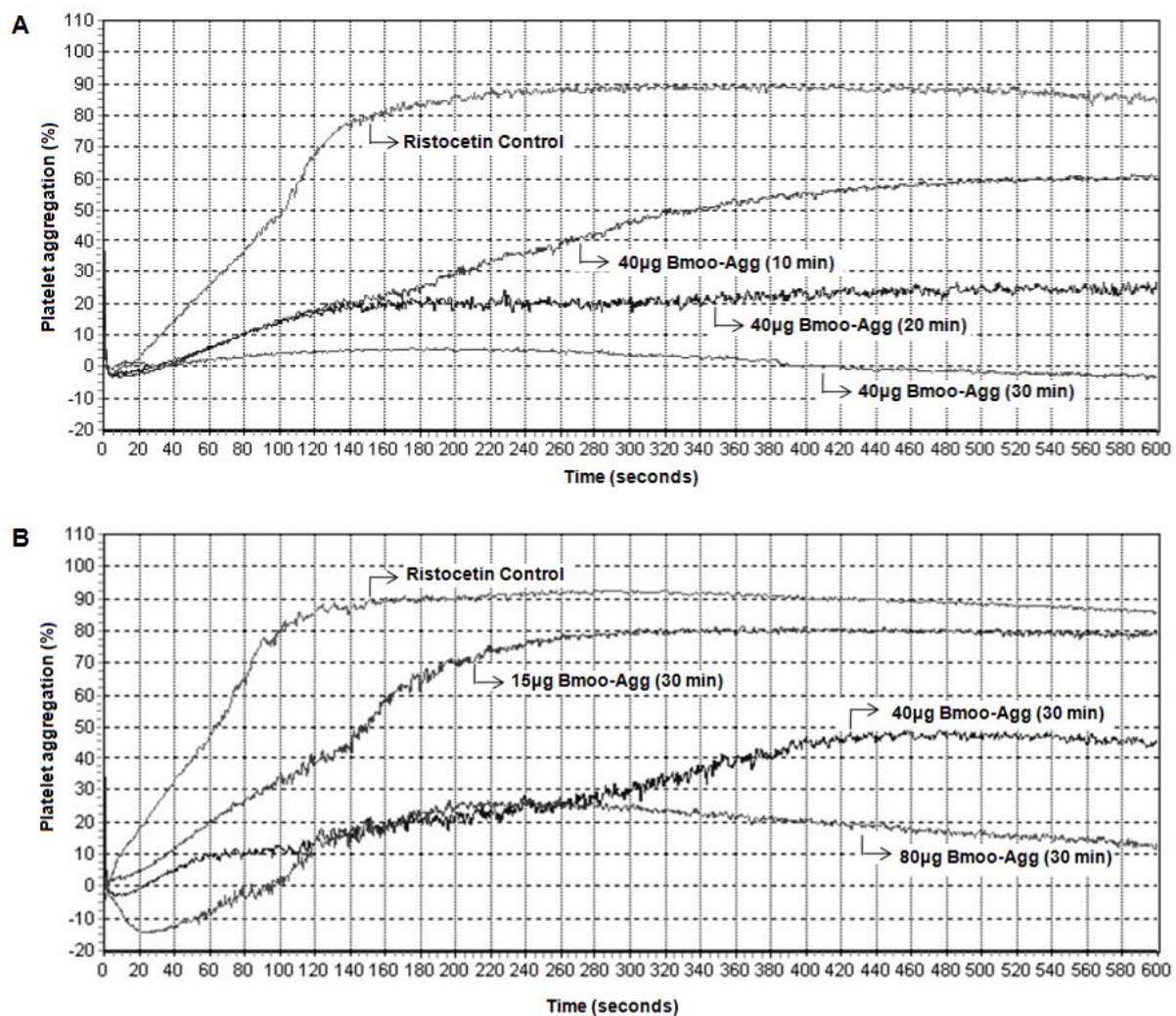


Fig. 3. Effect of Bmoo-Agg on ristocetin-induced platelet aggregation in citrated human PRP. (A) PRP was pre-incubated for different times (10, 20 and 30 min) at 37°C without (control) or in the presence of Bmoo-Agg (40 µg) before the addition of ristocetin (1.5 mg/mL). (B) PRP was pre-incubated for 30 min at 37°C without (control) or in the presence of Bmoo-Agg at various concentrations (15, 40 and 80 µg) before the addition of ristocetin (1.5 mg/mL).

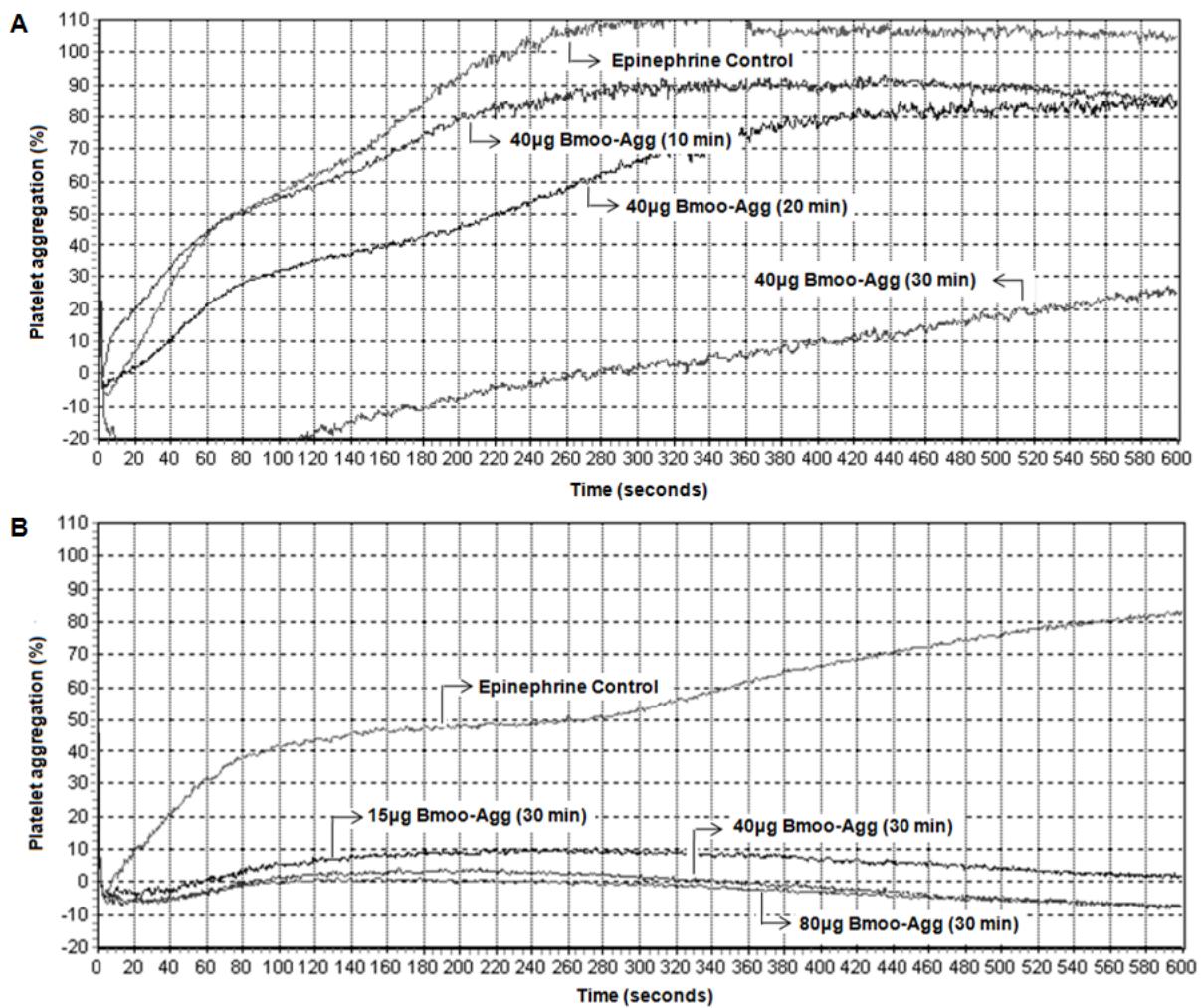


Fig. 4. Effect of Bmoo-Agg on epinephrine-induced platelet aggregation in citrated human PRP. (A) PRP was pre-incubated for different times (10, 20 and 30 min) at 37°C without (control) or in the presence of Bmoo-Agg (40 μ g) before the addition of epinephrine (300 μ M). (B) PRP was pre-incubated for 30 min at 37°C without (control) or in the presence of Bmoo-Agg at various concentrations (15, 40 and 80 μ g) before the addition of epinephrine (300 μ M).

References

- Andrews, R., Berndt, M.C., 2000. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligants. *Toxicon* 38, 775-791.
- Assakura, M.T., Silva, C.A., Mantele, R., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T., 2003. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 41, 217-227.
- Bennett J.S., Vilaire G.O., 1979. Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine. *Journal of Clinical Investigation* 64, 1393-1401.
- Bernardes, C.P., Santos-Filho, N.A., Costa, T.R., Gomes, M.S.R., Torres, F.S., Costa, J., Borges, M.H., Richardson, M., dos 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* 51, 574-584.
- Bernardi, P.S., Moreira, H.W., 2004. Analysis of the waves and aggregation patterns in patients with cardiovascular diseases in using acetylsalicylic acid compared blood donors. *Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia* 26, 239-244.
- Bjarnason, J.B., Tu, A.T., 1978. Hemorrhagic toxins from western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxine. *Biochemistry* 17, 3395-3404.
- Braud, S., Bon, C., Wisner, A., 2000. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie* 82, 851-859.
- Calvete, J.J., Juarez, P., Sanz, L., 2007. Snake venomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry* 42, 1405-1414.
- 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* 45, 1063-1074.

Coelho, A.L.J., Freitas, M.S., Oliveira-Carvalho, A.L., Moura-Neto, V., Zingali, R.B., Barja-Fidalgo, C., 1999. Effects of Jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on Neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. *Experimental Cell Research* 251, 379-387.

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* 55, 1365-1377.

Da Silva, C.J., Jorge, M.T., Ribeiro, L.A., 2003. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon* 41, 251-255.

Du, X.Y., Sim, D.S., Lee, W.H., Zhang, Y., 2006. Blood cells as targets of snake toxins. *Blood cells, Molecules & Diseases* 36, 414-421.

Edman, P., 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinavica* 4, 283-293.

Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Rucavado, A., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2006. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon* 47, 549-559.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotoxin family of metalloproteinases, *Toxicon* 45, 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* 275, 3016-3030.

Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2009. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of Proteomics* 72, 200-209.

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

Gene, J.A., Roy, A., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L., 1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27, 841-848.

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* 53, 24-32.

Gutiérrez, J.M., Escalante, T., Rucavado, A., 2009. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 54, 976-987.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841-850.

Higuchi, D.A., Almeida, M.C., Barros, C.C., Sanchez, E.F., Pesquero, P.R., Lang, E.A.S., Samaan, M., Araújo, R.C., Pesquero, J.B., Pesquero, J.L., 2011. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. *Toxicon* 58, 123-129.

Itzhaki, R.F., Gill, D.M., 1964. A micro-biuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry* 9, 401-410.

Jia, L.G., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1997. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. *The journal of Biological Chemistry* 272, 13094-13102.

Jurk, K., Kehrel, B. E., 2005. Platelets: Physiology and Biochemistry. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 31, 381-392.

Kamiguti, A.S., 2005. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 45, 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 jarararhagin. *Biochemical Journal* 320, 635-641.

Kang, I.C., Chung, K.H., Lee, S.J., Yun, Y., Moon, H.M., Kim, D.S., 1998. Purification and molecular cloning of a platelet aggregation inhibitor from the snake (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom. *Thrombosis Research* 91, 65-73.

Kini, R.M., Evans, H.J., 1990. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 28, 1387-1422.

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

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

Mandelbaum, F.R., Reichel, A.P., Assakura, M.T., 1982. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon* 20, 955-972.

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

Markland, F., Swenson, S., 2013. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon* 62, 3-18.

Marsh, N., Williams, V., 2005. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon* 45, 1171-1181.

Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1477, 146-156.

Morais, N.C.G., Mamede, C.C.N., Fonseca, K.C., Queiroz, M.R., Gomes-Filho, S.A., Santos-Filho, N.A., Bordon, K.C.F., Beletti, M.E., Sampaio, S.V., Arantes, E.C., Oliveira, F., 2012. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active,

anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Toxicon* 60, 1251-1258.

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. *Current Pharmaceutical Design* 13, 2893-2905.

Nascimento, N.G., Sampaio, M.C., Olivo, R.A., Teixeira, C., 2010. Contribution of mast cells to the edema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon* 55, 343-352.

Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H., Tu, A. T., 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. *Arch. Biochemical and Biophysical Research* 321, 309–319.

Nogueira, C., Sawaya, R.J., Martins, M., 2003. Ecology of the Pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 37, 653-659.

Paine, M.J., Desmond, H.P., Theakston, R.D., Crampton, J.M., 1992. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *Journal of Biological Chemistry* 267, 22869-22876.

Ramos, O.H.P., Selistre-de-Araújo, H.S., 2006. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology* 142, 328-346.

Randall, L.O, Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie* 111, 409-419.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., 2007. *Pharmacology*, 6th edition, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, PA.

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 381, 213-224.

Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. Toxicon 57, 627 - 645.

Salzman, E.W., Merril, E.D., 1987. Interaction of blood with artificial surfaces. In: Colman, R.W., Hirsh, J., Marder, V.J., Salzman, E.W. (Eds.), Hemostasis and Thrombosis, 2nd edition, pp. 1335-1347, Philadelphia, PA.

Sanchez, E.F., Gabriel, L.M., Gontijo, S., Gremski, L.H., Veiga, S.S., Evangelista, K.S., Eble, J.A., Richardson, M., 2007. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. Archives of Biochemistry and Biophysics 468, 193-204.

Serrano, S. M. T., Kim, J., Wang, D., Dragulev, B., Shannon, J. D., Mann, H. H., Veit, G., Wagener, R., Koch, M., Fox, J. W., 2006. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. Journal of Biological Chemistry 281, 39746-39756.

Swenson, S., Markland Jr., F. S., 2005. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. Toxicon 45, 1021-1039.

Teixeira, C., Cury, Y., Moreira, V., Picolo, G., Chaves, F., 2009. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. Toxicon 54, 67-76.

Terada, S., Kimoto, E., Kawasaki, H., Hao, W.X., Li, H.W., 1991. Purification of a metalloprotease from Chinese Mamushi (*Agkistrodon halys brevicaudus*) venom. Fukuoka Univ. Sci. Rep. 21, 147-153.

Torres, F.S., Rates, B., Gomes, M.T.R., Salas, C.E., Pimenta, A.M.C., Oliveira, F., Santoro, M.M., de Lima, M.E., 2012. Bmoo FIBMP-I: A New Fibrinogenolytic Metalloproteinase from *Bothrops moojeni* Snake Venom. ISRN Toxicology 10, 1-10.

Usami, Y., Fujimura, Y., Miura, S., Shima, H., Yoshida, E., Yoshioka, A., Hirano, K., Suzuki, M., Titani, K., 1994. A 28kDa-protein with disintegrin-like structure

(jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. Biochemical and Biophysical research Communications 201, 331-339.

Zang, J., Zhu, Z., Yu, Y., Teng, M., Niu, L., Huang, Q., Liu, Q., Hao, Q., 2003. Purification, partial characterization and crystallization of acucetin, a protein containing both disintegrin-like and cysteine-rich domains released by auto-proteolysis of a P-II-type metalloproteinase AaH-IV from *Agkistrodon acutus* venom. Biological Crystallography 59, 2310-2312.

Zhu, Z., Gong W., Zhu, X., Teng, M., Niu, L., 1997. Purification, characterization and conformational analysis of a haemorrhagin from the venom of *Agkistrodon acutu*. Toxicon 35, 283-292.

Zucker, M.B., Nachmias, V.T., 1985. Platelet activation. Arteriosclerosis 5, 2-18.

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 028/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 108/12

Projeto Pesquisa: “Caracterização funcional, biológica e estrutural de proteases purificadas de peçonhas de serpentes brasileiras”.

Pesquisador Responsável: Fábio de Oliveira

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A – sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 564/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU 055/11

Projeto Pesquisa: "Purificação e caracterização de toxinas de serpentes do gênero Bothrops com ação na hemostasia".

Pesquisador Responsável: Fábio de Oliveira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

Entrega de Relatório Parcial: **Abril de 2012.**

Entrega de Relatório Final: **Dezembro de 2012.**

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 09 de setembro de 2011.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU