

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Bioquímica Médica

Viviane Guimarães Gomes

**Identificação, caracterização e expressão de uma lectina
tipo-C do veneno da serpente *Bothrops insularis***

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lombada

VIVIANE GUILMARÃES GOMES

IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
EXPRESSION DE UMA LECTINA TIPO-C DO
VENENO DA SERPENTE *BOTHROPS*
INSULARIS

UFRJ

Viviane Guimarães Gomes

**Identificação, caracterização e expressão de uma lectina
tipo-C do veneno da serpente *Bothrops insularis***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de Doutor em Química biológica

Orientação: Dr^a. Russolina Benedeta Zingali

Coorientação: Dr. Didier Jean Jacques Salmon

Rio de Janeiro

2008

Ficha Catalográfica

Guimarães-Gomes, Viviane

Identificação, caracterização e expressão de uma lectina tipo-C do veneno da serpente

Bothrops insularis / Viviane Guimarães Gomes. Rio de Janeiro, 2008. 170 f.

Tese (Doutorado em Química Biológica) -

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2008.

Orientadora: Russolina Benedeta Zingali

Coorientador: Didier Jean Jacques Salmon

1. Lectina tipo-C. 2. Mapeamento Imunoquímico. 3. Expressão Heteróloga.

Banca Examinadora

Viviane Guimarães Gomes

Identificação, caracterização e expressão de uma lectina tipo-C do veneno da serpente *Bothrops insularis*

Tese submetida à pós-graduação em Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de doutor em química biológica.

Rio de Janeiro, 28 de agosto de 2008.

Dr.^a. Russolina Benedeta Zingali
Prof.^a. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ
Orientadora

Dr. Didier Jean Jacques Salmon
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ
Coorientador

Dr. Paulo César de Carvalho Alves
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ
Revisor e Suplente Interno

Dr.^a. Monica Montero Lomeli
Prof.^a. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ
Examinadora Interna

Dr. Paulo Mascarello Bisch
Prof. Titular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ
Examinador Externo

Dr.^a. Eliana Barreto Bergter
Prof.^a. Titular do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Goés - UFRJ
Examinadora Externa

Dr. Cristian Follmer
Prof. Adjunto do Instituto de Química - UFRJ
Suplente Externo

Agradecimentos

Aos meus pais Rose e Augusto e à minha irmãzinha Tati pelo incentivo.

A todos os ex, atuais e novos integrantes do laboratório que tive a oportunidade de conviver e que me ajudaram muito.

À Dr^a Célia Carlini que me recebeu no seu laboratório na UFRGS, onde pude realizar alguns experimentos desta tese, financiada pelo Programa PROCAD.

Aos colegas do Instituto de Bioquímica Médica, pelos constantes empréstimos de reagentes e equipamentos.

À Rede Proteômica do Estado do Rio de Janeiro pelo uso dos espectrômetros de massas.

À Dr^a. Lina Zingali pela orientação e ao Dr. Didier Salmon pela coorientação ímpares, sem a qual esta tese não seria possível.

Esta tese foi realizada no “Laboratório de Hemostase e Venenos” (LabHemoVen) do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). A doutoranda foi bolsista do CNPq durante toda a realização da tese.



O antigo símbolo uroboro (a serpente que enrolada em um círculo, morde a própria cauda) está presente milenarmente em várias culturas em todo o mundo. Este símbolo personifica os poderes renovadores da natureza, ou a natureza cíclica e interminável da vida. O seu significado pode ser entendido também como o centro do mundo, que se localiza entre os pares de opostos e a união dos princípios contrários.

O uroboro representa o tempo e a continuidade da vida, como símbolo da autofecundação; ou a idéia primitiva de uma natureza que provê a si própria e continuamente volta, dentro de um padrão cíclico, ao seu próprio início.

Chevalier, J. e Gheerbrant, A. **Dicionário de símbolos (mitos, sonhos, costumes, gestos, formas, figuras, cores, números)**. 12 ed, Rio de Janeiro: José Olympio, 1998 (adaptado).

Resumo

Lectinas são proteínas com a propriedade de ligarem-se à açúcares de modo específico e reversível, mediando vários processos biológicos. Uma lectina tipo-C (BiL) foi purificada a partir do veneno da serpente *Bothrops insularis* por técnicas cromatográficas, como um homodímero de 32 kDa. BiL liga-se preferencialmente à galactose de maneira dependente de cálcio. A estrutura primária desta lectina foi determinada a partir do seqüenciamento do N-terminal e de um peptídeo interno por degradação de Edman, além do mapa tríptico analisado por espectrometria de massas. O modelo teórico de BiL utilizou como molde a estrutura cristalina da lectina da serpente *Crotalus atrox*, identificando-se os aminoácidos que interagem diretamente com galactose e cálcio. A comparação imunoquímica utilizando anticorpos policlonais de coelho gerados contra a proteína nativa ou desnaturada, revelou uma reação cruzada de BiL com lectinas purificadas de plantas da ordem Fabales. A região de BiL localizada entre os aminoácidos Gli62-Lis73 foi identificada como um epítopo comum entre esta e a lectina da leguminosa *Lens culinaris*. A proteína foi expressa utilizando o vetor pET-14b na bactéria hospedeira *E. coli* BL21 (DE3) em meio contendo glicose 2 %. A lectina recombinante (BiLr) foi purificada a partir dos corpos de inclusão e re-enovelada sob um gradiente decrescente de uréia na presença de galactose, tendo preservado sua capacidade hemaglutinante. Finalmente, soro humano foi aplicado a uma coluna de afinidade contendo BiLr imobilizada e foi revelada a presença de bandas de proteínas séricas, sugerindo que estas interagem com a lectina recombinante.

LECTINA TIPO-C, MAPEAMENTO IMUNOQUÍMICO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA.

Abstract

Lectins are proteins that specifically and reversibly bind sugars, mediating some biological processes. A C-type lectin (BiL) was purified from *Bothrops insularis* snake venom using chromatographic techniques, as a homodimer of 32 kDa. BiL binds preferentially galactose in a calcium dependent manner. The primary structure of this lectin was determined from N-terminal and internal peptide by Edman sequencing degradation and mass spectrometry fingerprint. The theoretical model of BiL using the crystal structure of *Crotalus atrox* snake lectin as model, allowed the identification of the amino acids residues that directly interact with galactose and calcium. The immunochemical comparison using polyclonal rabbit antibodies against either native or denatured protein, revealed a cross reaction of BiL with lectins purified from plants of the Fabales order. The region of BiL extending from the Gly62 to the Lys73 amino acids residues showed an epitope common with the lectin from common lentil (*Lens culinaris*). The protein was expressed using a pET-14b vector in *E. coli* BL21 (DE3) in a medium containing 2 % of glucose. The recombinant lectin (BiLr) purified from inclusion bodies and refolded by decreased urea gradient in presence of galactose, still possessed hemagglutination activity. Finally, human serum applied to a BiLr affinity column revealed the presence of several seric proteins bands, suggesting that seric proteins might interact with the recombinant lectin.

C-TYPE LECTIN, IMMUNOCHEMICAL MAPPING, HETEROLOGOUS EXPRESSION.

Lista de Figuras e Tabelas

FIGURAS

- Figura 01.** Espécies brasileiras da família Viperidae pertencentes ao gênero *Bothrops*, *B. insularis* e ilha da Queimada Grande..... Pág. 23
- Figura 02.** Composição protéica e peptídica dos venenos viperídicos..... Pág. 28
- Figura 03.** Número de artigos que utilizam anticorpos gerados contra proteínas purificadas de venenos botrópicos..... Pág. 41
- Figura 04.** Localização dos oligonucleotídeos sintéticos na seqüência de cDNA de BiL..... Pág. 93
- Figura 05.** Vetores utilizados..... Pág. 94
- Figura 06.** Géis de eletroforese de agarose e poliacrilamida..... Pág. 100
- Figura 07.** Segunda etapa de purificação da lectina recombinante e hemaglutinação..... Pág. 101
- Figura 08.** Eletroforese das proteínas séricas que se ligam a BiLr..... Pág. 104

TABELAS

- Tabela 01.** Distribuição dos acidentes ofídicos, segundo o gênero da serpente envolvido..... Pág. 20
- Tabela 02.** Classificação estrutural das lectinas em famílias..... Pág. 31
- Tabela 03.** Lectinas tipo-C “verdadeiras” descritas em serpentes botrópicas..... Pág. 36

Lista de Siglas e Abreviaturas*

ACN - Acetonitrila	kDa - Quilo Dalton
BiL - <i>Bothrops insularis lectin</i>	LB - Luria Bertani
CAPS - 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid	m/z - razão massa/carga
cDNA - <i>Complementary DNA</i>	MALDI-TOF - <i>Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight</i>
CNBr - <i>Cyanogen bromide</i>	nm - Nanômetro
CRD - <i>Carbohydrate recognition domain</i>	Pb - Pares de bases
CTBS - <i>Calcium-tris buffered saline</i>	PBS - <i>Phosphate buffered saline</i>
Da - Dalton	PCR - <i>Polymerase chain reaction</i>
DNA - <i>Deoxyribonucleic acid</i>	PDB - <i>Protein data bank</i>
dNTP - <i>Dexyribonucleoside triphosphate</i>	PVDF - <i>Polyvinylidene fluoride</i>
DTT - Ditioneitol	Rpm - Rotações por minuto
EDTA - <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	SDS - <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
ELISA - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	SDS PAGE - <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
EST - <i>Expressed sequence tag</i>	TBS - <i>Tris buffered saline</i>
FPLC - <i>Fast performance liquid chromatography</i>	TDG - <i>Thiodigalactose</i>
HPLC - <i>High performance liquid chromatography</i>	TFA - <i>Trifluoroacetic acid</i>
IgG - <i>Imunoglobulina</i>	Tris - <i>Tris-hidroximetil-aminometano</i>
IPTG - <i>Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo</i>	VEGF - <i>Vascular endothelial growth factor</i>

(*) No texto as abreviaturas estão mantidas sempre em inglês, do modo como são mais conhecidas; com a respectiva tradução para o português, quando necessário.

Aminoácidos

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cis, Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato (Ácido aspártico)	P	Pro	Prolina
E	Glu	Glutamato (Ácido glutâmico)	Q	Gln	Glutamina (Glutamida)
F	Fen, Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gli, Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	The, Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lis, Lys	Lisina	W	Tri, Trp	Triptofano (Triptofana)
L	Leu	Leucina	Y	Tir, Tyr	Tirosina

Sumário

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e identificação das serpentes peçonhentas brasileiras.....	Pág. 18
1.2 O gênero <i>Bothrops</i> e a espécie <i>Bothrops insularis</i>	Pág. 21
1.3 Quadro clínico e composição do veneno botrópico.....	Pág. 24
1.4 A superfamília das lectinas.....	Pág. 29
1.4.1 Considerações gerais.....	Pág. 29
1.4.2 Lectinas tipo-C de venenos de serpentes botrópicas.....	Pág. 32
a) <i>Estrutura</i>	Pág. 32
b) <i>Atividade biológica</i>	Pág. 33
c) <i>Imunoreatividade</i>	Pág. 37
d) <i>Expressão heteróloga</i>	Pág. 42

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos I.....	Pág. 46
2.1.1 Objetivos gerais I.....	Pág. 46
2.1.2 Objetivos específicos I.....	Pág. 46
2.2 Objetivos II.....	Pág. 47
2.2.1 Objetivos gerais II.....	Pág. 47
2.2.2 Objetivos específicos II.....	Pág. 47
2.3 Objetivos III.....	Pág. 48
2.3.1 Objetivos gerais III.....	Pág. 48
2.3.2 Objetivos específicos III.....	Pág. 48

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das lectinas.....	Pág. 51
3.1.1 Purificação da BiL.....	Pág. 51
3.1.2 Lectinas de plantas.....	Pág. 52
3.2 Eletroforese.....	Pág. 52
3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	Pág. 52
3.2.2 Eletroforese em gel de agarose.....	Pág. 52
3.3 Atividade hemaglutinante.....	Pág. 53
3.3.1 Aglutinação de eritrócitos de coelho.....	Pág. 53
3.4 Análise da estrutura primária.....	Pág. 54
3.4.1 Seqüência N-terminal.....	Pág. 54
3.4.2 Clivagem enzimática de BiL.....	Pág. 54
3.4.3 Espectrometria de massas.....	Pág. 55
3.5 Análise da estrutura tridimensional.....	Pág. 56
3.5.1 Modelagem molecular de BiL.....	Pág. 56
3.6 Experimentos imunoquímicos.....	Pág. 57
3.6.1 Obtenção de anticorpos policlonais anti-BiL.....	Pág. 57
3.6.2 ELISA.....	Pág. 58
3.6.3 Imunoreatividade utilizando IgG _d	Pág. 58
3.6.4 <i>Western blots</i>	Pág. 59
3.7 Experimentos de biologia molecular.....	Pág. 59
3.7.1 Preparo de bactérias competentes.....	Pág. 59
3.7.2 Transformação.....	Pág. 60
a) <i>Choque térmico</i>	Pág. 60
b) <i>Eletroporação</i>	Pág. 60

3.7.3 Desenho dos oligonucleotídeos	Pág. 61
3.7.4 Amplificação e purificação do DNA.....	Pág. 61
3.7.5 Clonagem no vetor pGEM-T <i>easy</i>	Pág. 62
3.7.6 Análise de restrição do plasmídeo pGEM-T <i>easy</i> recombinante e clonagem do gene BiL no vetor pET-14b.....	Pág. 63
3.7.7 Confirmação nucleotídica da sequência de BiLr.....	Pág. 64
3.7.8 Expressão.....	Pág. 64
<i>a) Protocolo inicial de indução da expressão</i>	Pág. 64
<i>b) Protocolos testados</i>	Pág. 65
3.7.9 Coluna de afinidade à histidina.....	Pág. 65
<i>a) Protocolo inicial</i>	Pág. 65
<i>b) Modificações do protocolo de purificação</i>	Pág. 66
3.7.10 Coluna de afinidade à BiLr.....	Pág. 67

4. RESULTADOS

4.1 Resultados I.....	Pág. 70
4.2 Resultados II.....	Pág. 82
4.3 Resultados III.....	Pág. 91

5. DISCUSSÃO

5.1 Discussão.....	Pág. 106
--------------------	----------

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusões.....	Pág. 117
---------------------	----------

REFERÊNCIAS

Referências Pág. 120

ANEXO

Capítulo do livro “*ANIMAL TOXINS: STATE OF THE ART. Perspectives in Health and Biotechnology*” Pág. 145

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e identificação das serpentes peçonhentas brasileiras

As serpentes são os mais comuns animais peçonhentos que causam acidentes, constituindo grave problema de saúde pública para os países em desenvolvimento devido a incidência, gravidade e seqüelas deixadas nos acidentados, além do prejuízo econômico por atingir a população economicamente ativa. Os dados sobre acidentes com animais peçonhentos mais recentemente publicados (Fundação Nacional de Saúde, 2001) revelam que, entre os anos de 1990 e 1993, os acidentes ofídicos com o gênero *Bothrops* corresponderam a aproximadamente 73,1 % dos casos, outros 6,2 % referem-se ao gênero *Crotalus*, 1,1 % são relativos ao *Lachesis* e apenas 0,3 % referem-se às serpentes do gênero *Micrurus* (Tabela 01).

Os cuidados necessários ao paciente picado por serpente peçonhenta têm caráter emergencial e específico, devendo o paciente obter assistência em locais que são referência neste tipo de atendimento para receber a assistência adequada por profissionais de saúde capacitados (Fundação Nacional de Saúde, 2001). São variáveis para determinar a gravidade do acidente ofídico, características do paciente (como idade e rapidez no atendimento) e da serpente (como idade, tamanho e espécie). A espécie do animal causador do acidente é fundamental para determinar o tipo de cuidado e o tratamento que o paciente acidentado vai necessitar (Fundação Nacional de Saúde, 2001). Essa identificação fica facilitada se preservados os critérios clínicos (sintomatologia do paciente) e pelo reconhecimento da espécie causadora do acidente a partir da morfologia externa. A importância da correta identificação é a dispensa imediata dos pacientes picados por serpentes não-peçonhentas, além de viabilizar o reconhecimento das espécies de importância para a saúde regional, levando à indicação mais precisa do antiveneno a ser administrado.

A herpetofauna brasileira possui apenas duas famílias reconhecidamente peçonhentas, a família Elapidae e a Viperidae. A família Elapidae engloba apenas o gênero *Micrurus*, com serpentes conhecidas popularmente como corais. O Brasil possui como representantes principais desta família, as espécies *Micrurus corallinus*, *Micrurus frontalis* e a *Micrurus lemniscatus* (Fundação Nacional de Saúde, 2001), sendo animais de pequeno e médio porte (até 1,2 m de comprimento), com anéis vermelhos, pretos e brancos em qualquer tipo de combinação. A família Viperidae é constituída pelos gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops*. O gênero *Crotalus* no Brasil é representado pela espécie *Crotalus durissus*, conhecida comumente por cascavel, sendo animais que denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho na extremidade distal do corpo. O gênero *Lachesis* possui a espécie *Lachesis muta*, sendo os animais deste gênero conhecidos popularmente como surucucus e caracterizando-se por ter grande porte (chegando até 3,5 m de comprimento), sendo a maior serpente peçonhenta das Américas (Fundação Nacional de Saúde, 2001). Finalmente, o gênero *Bothrops* engloba as serpentes conhecidas popularmente como jararacas (ver Figura 01 - Painel A, as serpentes brasileiras deste gênero), com coloração que varia do cinza ao verde (Fundação Nacional de Saúde, 2001). A maior gravidade do acidente ofídico é causada por serpentes elapídicas, seguidas pelas crotálicas, botrópicas e laquéticas.

Tabela 01. Distribuição dos acidentes ofídicos, segundo o gênero da serpente envolvido.

Brasil, 1990-1993

Distribuição	nº de acidentes	%
<i>Bothrops</i>	59.619	73,1
<i>Crotalus</i>	5.072	6,2
<i>Lachesis</i>	939	1,1
<i>Micrurus</i>	281	0,3
Não informados	13.339	16,3
Não peçonhentos	2.361	3,0

Fonte: Fundação Nacional de Saúde, 2001.

1.2 O gênero *Bothrops* e a espécie *Bothrops insularis*

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 30 espécies, sendo algumas delas distribuídas por todo território nacional (Figura 01, Painel A), o que explica a maioria de acidentes no Brasil serem causados por este gênero. As serpentes desta família habitam principalmente zonas rurais e periferias de grandes cidades, ambientes úmidos como matas e campos cultivados, locais onde haja facilidade para proliferação de roedores, que constituem sua alimentação básica, além de lagartos e anfíbios (Fundação Nacional de Saúde, 2001).

A espécie *Bothrops insularis* (Figura 01, Painel B), também conhecida como jararaca ilhoa, foi descrita pela primeira vez em 1921 pelo herpetólogo Afrânio do Amaral (1894-1982), sendo restrita à uma ilha chamada Queimada Grande localizada no litoral sul de São Paulo (Figura 01, Painel C). Apesar de possuir a maior concentração de serpentes por metro quadrado do mundo, o isolamento geográfico enquadra esta serpente em risco crítico de extinção.

O veneno de *B. insularis* apresenta variação quali-quantitativa nas substâncias que o compõem, quando comparada com os seus parentes no continente. Diferentemente de outras espécies botrópicas, que predam roedores, esta serpente se alimenta principalmente de aves migratórias (Duarte *et al*, 1995). Em várias espécies botrópicas do continente, incluindo a *Bothrops jararaca*, os indivíduos jovens têm hábitos arborícolas, mas os adultos são quase exclusivamente terrestres. Já os adultos da *Bothrops insularis* são predominantemente arborícolas (portanto de tamanho de menor), além de terem hábitos diurnos, o que estaria relacionado à sua alimentação, sendo o seu veneno cinco vezes mais potente para matar uma ave e três vezes mais potente para matar um mamífero que a *Bothrops jararaca*.

O modelo aceito atualmente para explicar a diferenciação desta espécie com as outras jararacas do continente é a especiação alopátrica (Mayr, 1963), onde duas populações separadas por alguma barreira geográfica podem sofrer diferenciação ao longo do tempo, tornando-se espécies distintas. Desta forma, as características particulares do veneno desta serpente tornam o estudo do seu veneno muito valioso não só do ponto de vista biológico como do ponto de vista do estudo de novos princípios ativos de interesse biotecnológico.

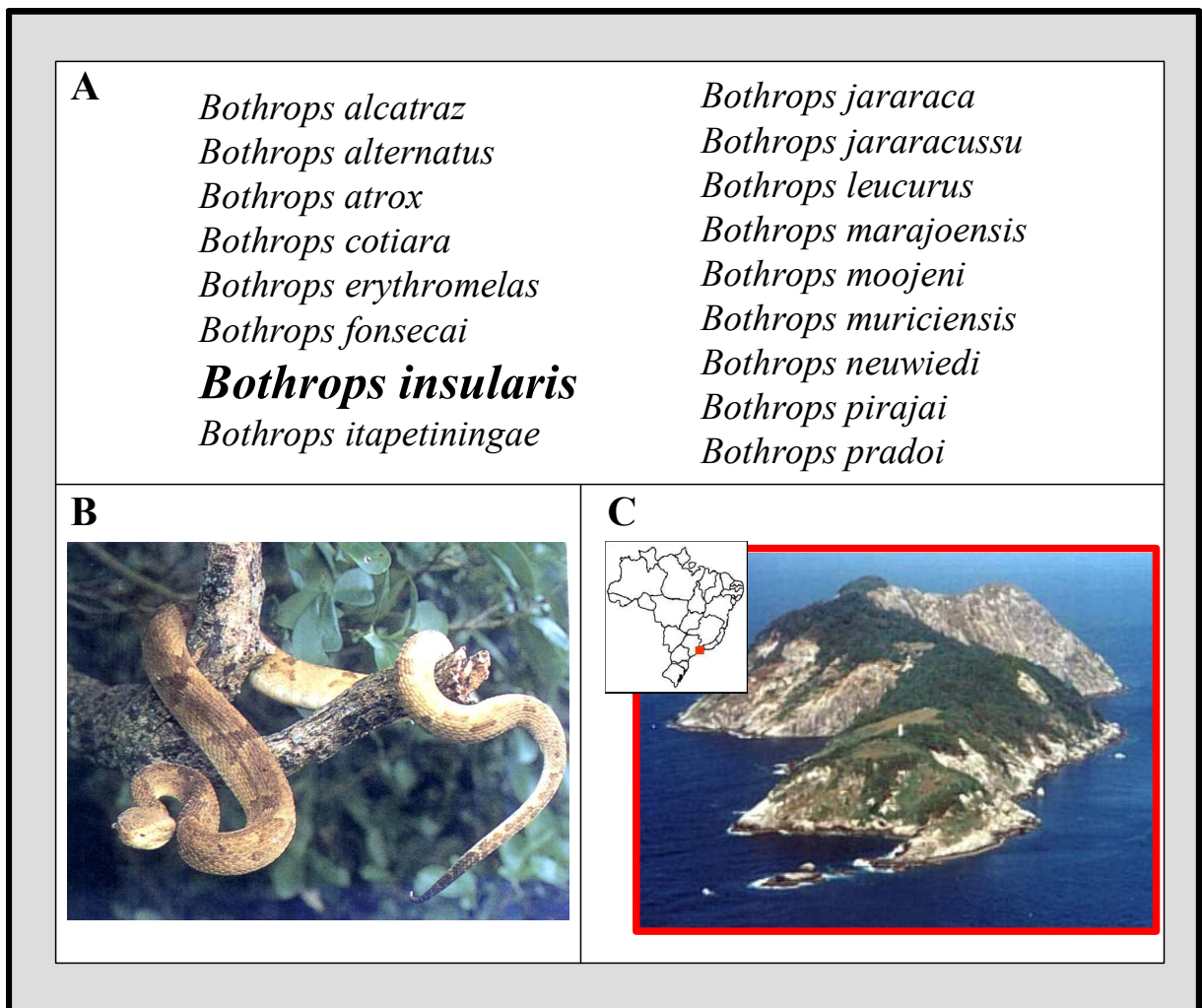


Figura 01. Espécies brasileiras da família Viperidae pertencentes ao gênero *Bothrops*, *B. insularis* e ilha da Queimada Grande. Em negrito no painel A está destacada a espécie brasileira, cujo veneno foi utilizado nesta tese. No painel B, a serpente *B. insularis* (crédito: Sherman A. Milton) e em C, localização geográfica da ilha da Queimada Grande. O detalhe no painel C indica a região aproximada que estaria localizada a ilha (retângulo vermelho) e na fotografia maior pode ser observada a cobertura de Mata Atlântica e ao centro um farol sinalizando a ilha da Queimada Grande (disponível em <<http://www.itanhaem.sp.gov.br/>>).

1.3 Quadro clínico e composição do veneno botrópico

O quadro clínico dos empeçonhamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, envolve efeitos sistêmicos que incluem sangramento generalizado (como epistaxe e gengivorragia) e a alteração no tempo de coagulação (devido à ação coagulante deste veneno), cefaléia, diarreia, náuseas, vômitos, sudorese e hipotensão arterial; podendo ter como complicações o choque e a insuficiência renal aguda. Todavia, o veneno botrópico caracteriza-se principalmente por manifestações locais (o que explica a baixa mortalidade no acidente com serpentes deste gênero). Estas manifestações locais são ocasionadas pelos efeitos: proteolítico e hemorrágico. A ação proteolítica caracteriza-se por edema, dor, bolhas, necrose e abscesso locais; já a ação hemorrágica manifesta-se por hemorragias devido a lesões vasculares e equimoses. Estes efeitos locais podem ter como complicações a infecção local e a síndrome compartimental no local da lesão, podendo levar a perda do membro afetado (Fundação Nacional de Saúde, 2001).

Estas manifestações clínicas ocasionadas por picadas de serpentes deste gênero, são causadas por uma composição química altamente complexa, tratando-se de um conjunto rico de elementos que variam não apenas com a espécie, mas também, dentro da espécie com a idade, estado metabólico do animal, estação do ano e outros fatores (Cardoso *et al*, 2003). De um modo geral, os venenos de serpentes contêm cerca de 90 a 95 % de proteínas e peptídeos (Figura 02). Os outros 5 % são compostos por aminoácidos e lipídeos livres, carboidratos sob a forma de glicoproteínas, aminas biogênicas, nucleotídeos e cátions metálicos (principalmente o sódio), além do cálcio e o zinco como cofatores de proteínas do tipo metaloproteases (Russel, 1980; Tu, 1988). O citrato (e outros ácidos orgânicos) também está presente em venenos de serpentes, sendo importante por quelar metais divalentes, como o cálcio e o zinco, que seriam necessários

para a atividade de algumas enzimas, representando um importante mecanismo de proteção para as serpentes contra os componentes do seu próprio veneno (Francis *et al*, 1992).

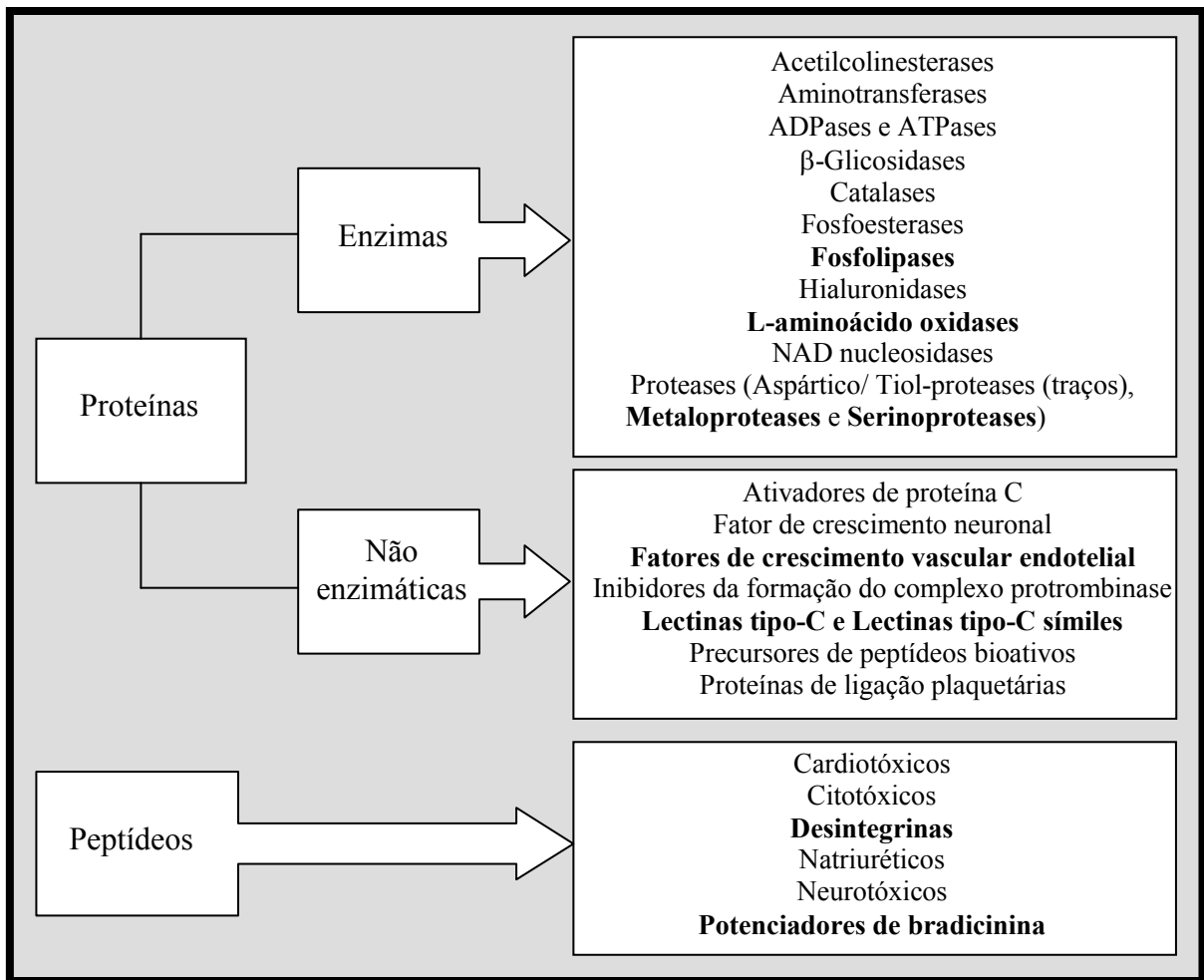
As proteínas encontradas nos venenos de serpentes da família Viperidae podem ser divididas em 5 classes principais (Braud *et al*, 2000): serinoproteases, metaloproteases, fosfolipases A₂ (PLA₂), lectinas do tipo-C e as desintegrinas. As três primeiras classes apresentam geralmente atividade enzimática (também apresentam esta atividade outros componentes protéicos como fosfoesterases, hialuronidasas, L-aminoácidos oxidases, NAD nucleotidasas e acetilcolinesterases), enquanto as desintegrinas e as lectinas tipo-C são desprovidas de atividade hidrolítica (Russel, 1980; Tu, 1988). Muitos constituintes protéicos dos venenos apresentam multidomínios (como as metaloproteases), isto quer dizer que, além do domínio catalítico, possuem um ou mais domínios não catalíticos que exercem papel importante na função da molécula. As metaloproteases podem ter o domínio catalítico associado ou não a outros domínios, como: desintegrina, domínio rico em cisteína e lectina tipo-C (Chen *et al*, 2003; Kamiguti *et al*, 1998). Outros componentes predominantes nos venenos são os peptídeos, que podem apresentar atividades neurotóxica, miotóxica, cardiotoxica, citotóxica ou atuar como inibidores da agregação plaquetária (Russel, 1980; Tu, 1988; Stocker *et al*, 1990; Niewiarowski *et al*, 1994).

Evidentemente, para as ações desencadeadas pelo envenenamento botrópico (coagulante, proteolítica e hemorrágica) as famílias de toxinas podem atuar sinergicamente induzindo um efeito no empeçonhamento por este gênero. Todavia, apesar da complexidade do veneno, cada família possui componentes que já foram identificados e tem função provável atribuída a cada uma destas ações. No veneno da serpente botrópica *Bothrops insularis*, as serinoproteases (Selistre e Giglio, 1987) estão

armazenadas na glândula de veneno na forma inativa de zimogênio e quando injetadas na circulação são convertidas a enzimas ativas e utilizam como substrato preferencial o fibrinogênio e a fibrina, similar a enzima fisiológica trombina, porém de maneira exacerbada. Este efeito consome consideravelmente o fibrinogênio circulante, tornando o sangue incoagulável. As serinoproteases têm sido descritas também como indutoras da secreção de insulina e possuem efeito nefrotóxico (Machado-Braga *et al*, 2007). Já as metaloproteases (Selistre *et al*, 1990) - principalmente as que possuem os domínios desintegrina e rico em cisteína adicionais - e os fatores de crescimento (Junqueira-de-Azevedo *et al*, 2001) agem diretamente na vasculatura, seja destruindo as células ou aumentando a permeabilidade. As metaloproteases podem ainda ter efeito fibrino(geno)lítico e ativador de protrombina independente do complexo protrombinase (Modesto *et al*, 2005), contribuindo também para o sangramento local e sistêmico característico dos acidentes com este gênero de serpentes.

Ainda na descrição dos componentes do veneno de *B. insularis*, as proteínas da família das fosfolipases A₂, além da já descrita ação miotóxica e causadora de edema (da Cruz *et al*, 2001; Cogo *et al*, 2006), demonstraram também efeito nefrotóxico (Braga *et al*, 2008b) e de bloqueio da sinapse neuromuscular (Cogo *et al*, 1998; Cogo *et al*, 2006). Outra enzima deste veneno que também tem efeito nefrotóxico é a L-aminoácido oxidase (Braga *et al*, 2008a). Proteínas que compõem a família das lectinas do tipo-C possuem já descritas a capacidade de se ligarem a açúcares (Guimarães-Gomes *et al*, 2004, publicado a partir deste presente estudo), efeitos nefrotóxicos (Braga *et al*, 2006) e de inibição da coagulação por inibir a atividade da trombina (Oliveira-Carvalho *et al*, 2008). A presença de moléculas da família das desintegrinas (presentes como domínios de metaloproteases), foi demonstrada a partir do sequenciamento sistemático da biblioteca de cDNA (estudo do transcriptoma), que foi construída a partir da glândula de um espécime da serpente *B.*

insularis, um tecido altamente especializado na produção de toxinas (Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2002). Finalmente, em *B. insularis* também foram identificados peptídeos (Cintra *et al*, 1990; Wermelinger *et al*, 2005), reconhecidamente causadores das ações sistêmicas descritas em venenos de serpentes peçonhentas de modo geral, como a hipotensão arterial e o choque, devido à potencialização do efeito fisiológico da bradicinina.



Fonte: Ramos, 2001 (adaptado).

Figura 02. Composição protéica e peptídica dos venenos viperídicos. Em negrito, as moléculas já purificadas do veneno da serpente *Bothrops insularis*.

1.4 A superfamília das lectinas

1.4.1 Considerações gerais

Lectinas são proteínas descritas inicialmente em 1954 por Boyd e Slaughter, definidas como proteínas ligantes de carboidratos, que reconhecem especificamente diversas estruturas de açúcares e são mediadoras de uma variedade de processos biológicos, como interações célula-célula e célula-patógenos, *turnover* de glicoproteínas séricas e resposta imune inata (Vijayan e Nagasuma, 1999). Como estas proteínas apresentam em sua estrutura mais de um sítio de reconhecimento de carboidratos (CRDs), carboidratos de células diferentes podem se ligar a elas, causando um efeito conhecido como aglutinação (ou hemaglutinação no caso de eritrócitos). Para a maioria das lectinas, esta capacidade é dependente de íons cálcio.

Os carboidratos exercem reconhecidamente um importante papel estrutural como componentes do glicocálix, estrutura de glicoproteínas, endereçamento de proteínas para exportação (Vijayan e Nagasuma, 1999) e também no reconhecimento célula-célula e célula-matriz celular (Drickamer, 1988; Kimura *et al*, 1995; Kimura *et al*, 2000). Todavia, as lectinas por não terem a sua função biológica elucidada a sua classificação muitas vezes é confusa e incompleta, por ser demasiadamente ampla (Tabela 02). De acordo com a conformação estrutural e a seqüência primária adotada pelo CRD, as lectinas podem ser divididas em famílias (Arason, 1996): lectinas de legume, de cereal, tipo-P, tipo-S (ou galectinas), pentaxinas e as lectinas do tipo-C. As famílias de lectinas diferem no número e tamanho das subunidades, número de CRD por subunidades, no requerimento de íons e na especificidade por carboidratos, tendo em comum pelo menos um CRD por molécula (Tabela 02).

Do ponto de vista estrutural, lectinas são comumente compostas de oligômeros com um número variável de subunidades mantidas unidas por pontes dissulfetos ou associações não covalentes, como é o caso das lectinas da família das leguminosas e das tipo-S (Arason, 1996). As estruturas resolvidas já disponíveis têm mostrado uma grande diversidade estrutural entre as moléculas das diferentes famílias. As lectinas de legumes, por exemplo, não possuem α -hélices e contêm uma abundância de folhas- β antiparalelas. De outra maneira, o CRD das lectinas tipo-C possui duas α -hélices e duas folhas- β , além de algumas regiões variáveis (*loops*), sendo que o sítio de interação a carboidratos está localizado em um desses *loops* e estreitamente relacionado com o sítio de ligação ao cálcio. Dessa maneira, as diferentes especificidades ao açúcar ligante (Tabela 02) são explicadas por mínimas variações estruturais, próximas ao sítio de ligação ao carboidrato.

Como já dito anteriormente esta superfamília de proteínas não tem função biológica totalmente esclarecida. Todavia, das quatro famílias de lectinas identificadas no reino Metazoa (tipo-P, tipo-S, pentaxinas e tipo-C), duas famílias (pentaxinas e lectinas tipo-C) são apontadas por terem moléculas com a capacidade de reconhecer moléculas próprias ou não-próprias do organismo ao qual pertencem, ou resposta imune inata (Arason, 1996). Um exemplo é a colectina, uma proteína solúvel e disposta no espaço extracelular bastante estudada, que participa do mecanismo de defesa contra patógenos, através da ativação do sistema complemento. De outra maneira, as selectinas são proteínas transmembranas envolvidas na interação adesiva entre leucócitos (L-selectinas) e células do endotélio vascular (E- e P- selectinas), constituindo um importante passo para a migração de leucócitos durante o processo inflamatório.

Tabela 02. Classificação estrutural das lectinas em famílias.

Famílias	Nº de subunidades	Massa molecular das subunidades (kDa)	CRDs por subunidade	Dependente de Ca ⁺²	Especificidade por açúcar
LEGUME	2 ou 4	25-30	1	+	Diversa
CEREAL	2	18	2	-	N-acetilglucosamina, Ácido N-acetilneuramínico
TIPO-P	1-4*	46 ou 275	1 ou 15	-	Manose-6-fosfato
TIPO-S	1 ou 2	14-35	1 ou 2	-	Galactose
PENTRAXINA	5 ou 6	20-25	1	+	Diversa
TIPO-C					
- Receptores endocíticos					
- Colectinas					
- Selectinas					
- Lectinas de linfócitos	Variável	14-165**	1 ou 8	+	Diversa
- Proteoglicanos					
- Lectinas de invertebrados					
- Lectinas virais					
- Lectinas de venenos de serpentes					

Fonte: Arason, 1996 (adaptado).

(*). Especula-se que lectinas tipo-P são monoméricas ou associadas em membranas na forma dimérica ou tetramérica.

(**). As subunidades de lectinas tipo-C são compostas de CRDs de ~ 120 aminoácidos que podem estar desde isoladas (~ 14 kDa em invertebrados) até ligados a outros domínios (~ 165 kDa em mamíferos e aves).

1.4.2 Lectinas tipo-C de venenos de serpentes botrópicas

Dentro da superfamília das lectinas, as lectinas tipo-C de venenos de serpentes são uma grande subfamília de toxinas, que possuem homologia em seqüência primária e domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) bastante conservado. A primeira lectina tipo-C caracterizada foi a trombolectina (Gartner *et al*, 1980), purificada do veneno da serpente *Bothrops atrox*. Desde então, as lectinas tipo-C vêm sendo isoladas e estudadas nos venenos de outras serpentes botrópicas (Tabela 03) e de outros gêneros.

Também pertencem a esta subfamília, proteínas com estrutura similar a lectinas tipo-C “verdadeiras”, porém com apenas parte do CRD conservado, adquirindo novas funções biológicas, em detrimento da capacidade de se ligar a açúcares. Estas lectinas são conhecidas como lectinas tipo-C símiles.

Uma descrição abrangente desta família de proteínas de venenos de serpentes encontra-se no capítulo em anexo nesta tese intitulado “*Snake venom C-type lectins and C-type lectins-like proteins: Conserved structural scaffold, multiple activities*” que faz parte do livro “*ANIMAL TOXINS: STATE OF THE ART. Perspectives in Health and Biotechnology*” que aguarda publicação em breve.

a) Estrutura

Com relação às lectinas tipo-C “verdadeiras” (que possuem a capacidade de se ligarem a açúcares), sabe-se que estas proteínas são diméricas como as lectinas botrópicas já descritas (Gartner *et al*, 1980; Lomonte *et al*, 1990c; Ozeki *et al*, 1994; de Carvalho *et al*, 2002; Havt *et al*, 2005) ou decaméricas, como a lectina tipo-C purificada do veneno da serpente crotálica *Crotalus atrox* (Walker *et al*, 2004). Suas subunidades têm ~ 14kDa de massa molecular, com um CRD por subunidade, o que lhes permite aglutinar células ligando-

se preferencialmente a galactose na presença de cálcio. O íon cálcio não está envolvido diretamente na ligação com o carboidrato, mas contribui para a manutenção estrutural do domínio CRD, sendo essencial para sua atividade (Kimura *et al*, 1995; Kimura *et al*, 2000).

As lectinas tipo-C símiles são heterodiméricas, com suas subunidades ligadas por ponte dissulfeto. Estas lectinas apresentam homologia estrutural com as lectinas tipo-C “verdadeiras”, sendo em sua maioria também dependentes de cálcio. No tocante à elucidação da estrutura terciária, as lectinas símiles botrópicas vêm sendo estudadas por análise da difração de raios-X (Sen *et al*, 2001) e por modelagem molecular com a construção de um modelo teórico (Oliveira-Carvalho *et al*, 2008; Monteiro *et al*, 2003), em detrimento das lectinas “verdadeiras” botrópicas que não possuem estrutura elucidada. As características que distinguem estas classes de moléculas botrópicas (lectinas “verdadeiras” e lectinas símiles) ainda não estão esclarecidas, principalmente pela pouca informação em nível estrutural.

Os escassos trabalhos disponíveis que identificaram as estruturas de lectinas tipo-C “verdadeiras” são de serpentes que não pertencem ao gênero *Bothrops*: o das serpentes *Crotalus atrox* (Walker *et al*, 2004) e *Deinagkistrodon acutus* ou *Agkistrodon acutus* (Xu *et al*, 2004). Estes trabalhos indicam que a interface entre as subunidades, podem levá-las à torções específicas e favorecer determinadas interações moleculares. Neste sentido, se torna fundamental aumentar o número de informações relativas à estrutura tridimensional das lectinas “verdadeiras”, a fim de compará-las com as estruturas já elucidadas das lectinas símiles e dessa maneira, entender melhor a diferença na atividade biológica entre elas.

b) Atividade biológica

Lectinas tipo-C estão presentes no veneno bruto de vários gêneros de serpentes, inclusive o *Bothrops* (Tabela 03) e por possuírem um CRD por subunidade, os açúcares se ligam a sua estrutura na presença de íons cálcio. Sousa *et al*, em 2001 demonstraram que a

atividade hemaglutinante de *B. jararaca* pode ser degradada pela presença de diversas proteases presentes no próprio veneno. Quando o veneno bruto foi submetido à pré-incubação em pH 5,0 não ocorreu perda da capacidade de causar a hemaglutinação, independente do tempo de incubação. Entretanto, quando o pré-tratamento foi feito em pH 8,8 a perda gerada da capacidade hemaglutinante já nas primeiras 24 h foi de 93 %. Este fato se deve a uma redução alta (cerca de 90 %), mas não total da capacidade proteolítica do veneno em pHs mais baixos quando comparadas a faixas mais elevadas de pHs.

Além da capacidade hemaglutinante dependente de cálcio, outras atividades têm sido identificadas no veneno botrópico. A lectina do veneno de *B. atrox* (Ogilvie *et al*, 1989) é capaz de induzir a agregação de plaquetas humanas, sendo este efeito inibido por lactose. Efeitos nefrotóxicos foram encontrados para as lectinas de *B. insularis* (Braga *et al*, 2006) e *B. pirajai* (Havt *et al*, 2005). Ambas lectinas alteraram os parâmetros renais, por um mecanismo ainda não esclarecido. A lectina purificada da serpente botrópica *B. jararacussu* é a mais estudada quanto ao entendimento da atividade biológica destas proteínas. Um experimento *in vivo* usando a lectina purificada desta serpente produziu uma leve hipotensão em ratos (Panunto *et al*, 2006), que rapidamente retornou ao nível pressórico basal. Esta mesma lectina (Panunto *et al*, 2006) produziu um efeito edematogênico, causando um edema discreto, porém persistente quando injetada na pata de camundongos de maneira similar a lectina da serpente *B. godmani* (Lomonte *et al*, 1990c). A lectina de *B. jararacussu* apresentou também, um efeito inibitório do crescimento e proliferação de várias células de linhagens tumorais (Pereira-Bittencourt *et al*, 1999; de Carvalho *et al*, 2001). Apesar de não interferir na adesão das células tumorais à matriz extracelular, esta lectina impede a progressão do tumor por um mecanismo também ainda não esclarecido.

Do ponto de vista de animais invertebrados, tem sido relatado que as lectinas presentes no soro ou extrato corporal total destes animais poderiam funcionar como uma

molécula de defesa (Arason, 1996). Esta função ainda não foi correlacionada a lectinas de venenos de serpentes. De outra maneira, lectinas tipo-C de serpentes botrópicas são desprovidas de atividade hemorrágica e fosfolipásica (Lomonte *et al*, 1990c; Panunto *et al*, 2006), miotóxica, mitogênica (Lomonte *et al*, 1990c), hemolítica ou proteolítica (Panunto *et al*, 2006). Apesar das várias atividades descritas para estas proteínas purificadas de venenos de serpentes botrópicas, o papel de lectinas tipo-C no envenenamento ainda não está elucidado. O que tem sido proposto é que estas proteínas juntamente com as lectinas tipo-C símiles - que inibem trombina e outros fatores da coagulação (Castro *et al*, 1999) - ajudam a causar a desordem hematológica típica do acidentado por serpente peçonhenta, desordem esta particularmente evidente nos acidentes com as serpentes do gênero *Bothrops*.

Tabela 03. Lectinas tipo-C “verdadeiras” descritas em serpentes botrópicas.

Espécie	Nome da proteína	Seqüência	Estrutura	Atividade biológica	Referências
<i>B. atrox</i>	BaL ou Trombolectina	+	-	- Hemaglutinação - Induz a agregação plaquetária	Gartner <i>et al</i> , 1980; Ogilvie <i>et al</i> , 1989
<i>B. godmani</i>	BgL	-	-	- Hemaglutinação - Induz o edema	Lomonte <i>et al</i> , 1990c
<i>B. insularis</i>*	BiL	+	+	- Hemaglutinação - Nefrotóxica	Braga <i>et al</i> , 2006
<i>B. jararaca</i>	BjL	+	-	- Hemaglutinação	Ozeki <i>et al</i> , 1994
<i>B. jararacussu</i>	Bjcul	+	-	- Hemaglutinação - Hipotensora - Inibe tumores - Induz o edema	de Carvalho <i>et al</i> , 2001; de Carvalho <i>et al</i> , 2002; Panunto <i>et al</i> , 2006; Pereira-Bittencourt <i>et al</i> , 1999
<i>B. pirajai</i>	BpL	-	-	- Hemaglutinação - Nefrotóxica	Havt <i>et al</i> , 2005

(*) Em negrito, a serpente *B. insularis*, cuja lectina tipo-C é objeto de estudo desta presente tese, será descrita com mais detalhes posteriormente.

c) Imunoreatividade

Vários pesquisadores têm realizado estudos imunoquímicos utilizando o veneno bruto ou as proteínas purificadas de venenos de serpentes na produção de anticorpos. De um modo geral, as reações cruzadas são geralmente encontradas entre espécies do mesmo gênero (Ménez, 1985; Berger e Bhatti, 1989). Para identificar quais proteínas de venenos de serpentes têm sido mais utilizadas como antígenos para a produção de anticorpos, a serem usados em experimentos imunoquímicos, foi realizado um levantamento bibliográfico no *Pubmed* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>). Para tal, foram utilizadas *<bothrops antibody>* ou *<bothrops antibodies>* como palavras chaves a serem encontradas no título ou resumo. No caso dos trabalhos com serpentes do gênero *Bothrops*, uma das primeiras publicações encontradas foi feita por Theakston *et al* (1983) realizando estudos imunoquímicos com o veneno bruto. Publicações posteriores foram identificadas, onde os venenos brutos das serpentes botrópicas têm sido estudados para entendimento da reação cruzada entre as espécies e da capacidade inibitória *in vivo* e *in vitro* dos antisoros contra os efeitos dos venenos totais. Até o ano de 2008, foram publicados e estão disponibilizados no *Pubmed*, 41 trabalhos com esta temática (Gutiérrez *et al*, 1985; Chippaux e Theakston, 1987; Gutiérrez *et al*, 1988a; Gutiérrez *et al*, 1988b; Estrada *et al*, 1989; da Silva *et al*, 1990; Domingos *et al*, 1990; Rocha *et al*, 1992; Ferreira *et al*, 1992; Cardoso *et al*, 1994; Morais *et al*, 1994; Alonso *et al*, 1995; Bogarín *et al*, 1995; Barbosa *et al*, 1995; Rucavado e Lomonte, 1996; Rucavado *et al*, 1996; Otero *et al*, 1996; Almeida *et al*, 1998; León *et al*, 1998; Maria *et al*, 1998; Heneine *et al*, 1998; Gutiérrez *et al*, 1998; Rodríguez-Acosta *et al*, 1998; Heneine *et al*, 1999; Fernandes *et al*, 2000; Muniz *et al*, 2000; Colombini *et al*, 2001; Maria *et al*, 2001; Saravia *et al*, 2001; Sousa *et al*, 2001; Picolo *et al*, 2002; Battellino *et al*, 2003; de Roodt *et al*, 2003; León *et al*, 2005; Serrano *et al*, 2005; Morais e Massaldi, 2005; Thomas *et al*, 2006; de Roodt, 2006; Lira *et al*, 2007; Chaves *et al*, 2007;

Zychar *et al*, 2008). Este constante interesse é explicado pela já comentada importância epidemiológica dos acidentes com serpentes deste gênero. Desta maneira, há o constante interesse no melhoramento e na escolha mais adequada dentre os antisoros disponíveis, de maneira que este neutralize de maneira completa e eficiente os venenos das várias espécies de serpentes botrópicas.

Nos experimentos que utilizam como objeto de estudo os anticorpos gerados contra as proteínas purificadas, as **fosfolipases** (Lomonte *et al*, 1985; Lomonte *et al*, 1987a; Lomonte *et al*, 1987b; Lomonte e Kahan, 1988; Lomonte *et al*, 1990a; Lomonte *et al*, 1990b; Moura-da-Silva *et al*, 1991; Lomonte *et al*, 1991; Francis *et al*, 1991; Lomonte *et al*, 1992; Lomonte *et al*, 1994a; Lomonte *et al*, 1994b; Díaz *et al*, 1994; Díaz *et al*, 1995; Calderón e Lomonte, 1998; Calderón e Lomonte, 1999; Soares *et al*, 2000a; Soares *et al*, 2000b; Andrião-Escarso *et al*, 2000; Angulo *et al*, 2001; Kanashiro *et al*, 2002; Andrião-Escarso *et al*, 2002; Núñez *et al*, 2004; Soares *et al*, 2004; Tamarozzi *et al*, 2006) e as **metaloproteases** (Mandelbaum *et al*, 1989; Barros *et al*, 1998; Moura-da-Silva *et al*, 1999; Kamiguti *et al*, 2000; Franceschi *et al*, 2000; Harrison *et al*, 2000; Rodrigues *et al*, 2001; Souza *et al*, 2001; Corrêa *et al*, 2002; Harrison *et al*, 2002; Maruyama *et al*, 2002; Tanjoni *et al*, 2003a; Tanjoni *et al*, 2003b; Harrison *et al*, 2003b; Mazzi *et al*, 2004; Bello *et al*, 2006; Rafael *et al*, 2008; Moura-da Silva *et al*, 2008) são as proteínas mais bem estudadas. Além destas duas famílias de proteínas de venenos, os experimentos imunoquímicos foram realizados em menor quantidade com outras moléculas purificadas de serpentes botrópicas: as **serinoproteases tipo trombina** (Nishimura *et al*, 1983; Claus and Mebs, 1989; Petretski *et al*, 2000; Sant'Ana *et al*, 2007), os **peptídeos potenciadores de bradicinina** (Tsuruta *et al*, 2006) e as **L-aminoácido oxidases** (Stábeli *et al*, 2005). As **lectinas tipo-C** também receberam pouca atenção nestes estudos. Apenas cinco artigos foram publicados até a presente data utilizando

estas proteínas botrópicas (Figura 03). Para entender melhor do que tratam tais artigos eles serão comentados com mais detalhes a seguir.

Com a finalidade de comparar e estabelecer uma relação entre estrutura e função de lectinas tipo-C de venenos botrópicos, anticorpos gerados contra a lectina símile botrojaracina (um inibidor de trombina purificado do veneno da serpente *B. jararaca*) foram usados em experimentos para identificar uma imunoreatividade com outras lectinas símiles de venenos botrópico (botrocetina, proteína ligante dos fatores IX e X da coagulação) e crotálico (convulxina) e com a lectina tipo-C “verdadeira” de *Bothrops jararaca* (Monteiro *et al*, 1998; Castro *et al*, 2003). A reação contra a lectina tipo-C não foi bem reconhecida pelos anticorpos, apesar de ambas pertencerem à mesma espécie. Este resultado demonstra que existem diferenças na superfície de lectinas tipo-C e lectinas tipo-C símiles que afetam o reconhecimento por anticorpos e poderiam estar relacionadas às diferentes atividades biológicas entre estes grupos de proteínas. Utilizando anticorpos contra a mesma lectina símile botrojaracina, outras lectinas tipo-C símiles foram identificadas nas serpentes *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *Lachesis muta* (Castro *et al*, 1998; Castro *et al*, 1999).

A reação cruzada de anticorpos dirigidos contra lectinas tipo-C com diferentes classes de proteínas do mesmo veneno, também foi demonstrado (Gomes *et al*, 2007). Desta maneira, anticorpos contra a lectina de *B. jararacussu* foram imobilizados a uma resina. Após ser aplicado o veneno bruto nesta coluna de afinidade a esta lectina, duas frações majoritárias foram identificadas como sendo: a própria lectina de *B. jararacussu* e a fosfolipase A₂ - PLA₂. Esta última teve sua identificação através da reação cruzada com anticorpos anti-crotoxina (uma PLA₂ de *C. durissus terrificus*). Além disso, anticorpos gerados contra esta fração majoritária foram capazes de proteger camundongos contra o efeito letal dos venenos de *B. jararacussu* e *C. durissus terrificus*.

De outro modo, experimentos adicionais foram feitos utilizando anticorpos contra lectinas de outros gêneros de serpentes, modulando a atividade de lectinas botrópicas. Nestes experimentos, a capacidade da lectina do veneno de *B. atrox* em induzir a agregação de plaquetas humanas foi aumentada pela presença de anticorpos contra a lectina de *L. muta* (Ogilvie *et al*, 1989) e sua atividade hemaglutinante foi inibida por anticorpos gerados contra uma lectina de também outro gênero de serpente: a *A. p. leukostoma* (Gartner e Ogilvie, 1984). Todavia, o mecanismo da potencialização ou inibição dos anticorpos sob a atividade das lectinas, ou ainda as regiões envolvidas nesses efeitos, ainda não foram esclarecidos.

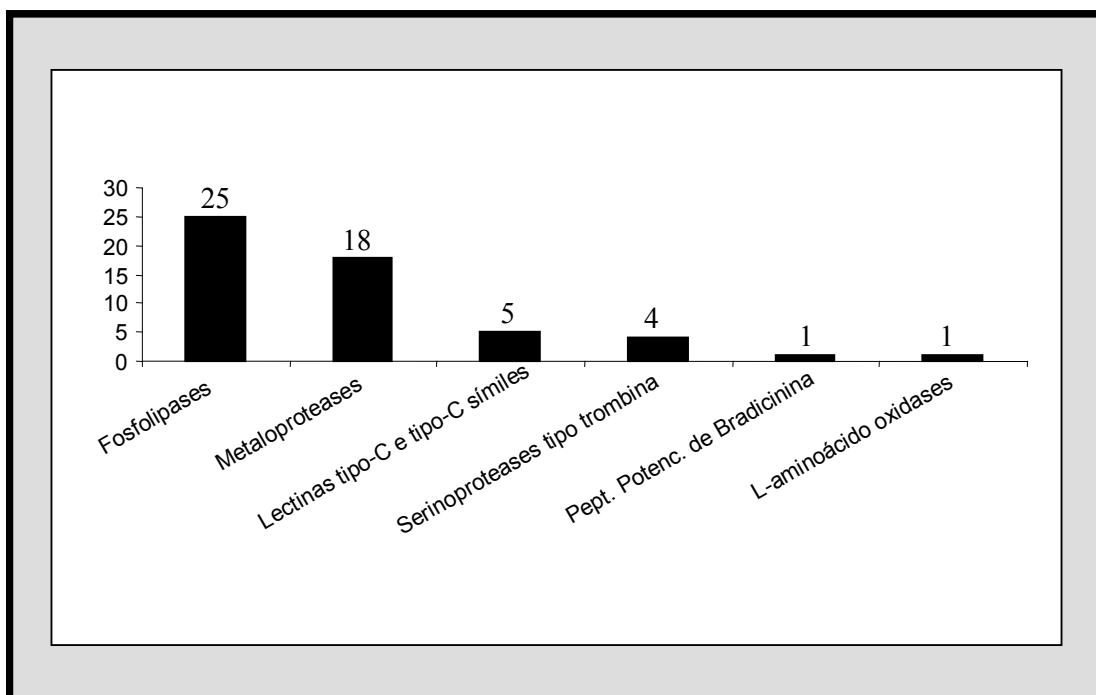


Figura 03. Número de artigos que utilizam anticorpos gerados contra proteínas purificadas de venenos botrópicos.

d) Expressão heteróloga

As proteínas da família das lectinas tipo-C são pouco abundantes no veneno bruto (menos de 1 % dentre o conteúdo protéico), o que prejudica a realização de experimentos estruturais e biológicos *in vivo*. Desta maneira, técnicas de biologia molecular são necessárias para aumentar de maneira satisfatória a concentração destas proteínas, além de facilitar estudos futuros da relação estrutura-atividade por mutagênese sítio-dirigida. A produção de uma biblioteca de cDNA permite a geração de clones para a posterior expressão das proteínas de interesse que estão pouco presentes no veneno. Seguindo a tendência geral e também neste contexto, mais lectinas tipo-C similares tiveram suas seqüências deduzidas por seqüenciamento de cDNA que lectinas tipo-C verdadeiras (Leduc e Bon, 1998; Chung *et al*, 1999; Chen *et al*, 2000; Shin, *et al*, 2000; Koh, 2000; Wei *et al*, 2002; Koo *et al*, 2002; Lee *et al*, 2003; Okuda *et al*, 2003; Zhong *et al*, 2006; Arpijuntarangkoon *et al*, 2007). Estas lectinas desprovidas de capacidade de se ligar a açúcares, também vêm sendo mais expressas em sistemas heterólogos. As lectinas tipo-C similares têm sido expressas utilizando *Pichia pastoris* (Hu *et al*, 2005), *Escherichia coli* (Zha *et al*, 2004) ou COS (Arocas *et al*, 1997) como vetores.

A primeira publicação de seqüência de cDNA de uma lectina verdadeira foi a do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* (Xu *et al*, 1999). Outras serpentes também tiveram as seqüências de suas lectinas tipo-C determinadas pelo seqüenciamento dos nucleotídeos do cDNA, como as serpentes *Echis ocellatus*, *E. pyramidum leakeyi*, *E. carinatus sochureki* e *B. arietans* (Harrison *et al*, 2003a). Em serpentes elapídicas, as bibliotecas de cDNAs construídas a partir das glândulas de veneno das serpentes *Bungarus fasciatus* e *Bungarus multicinctus*, revelaram as primeiras lectinas tipo-C desta família, sendo chamadas de BFL-1, BFL-2 e BML, respectivamente (Zha *et al*, 2001). Após estes experimentos iniciais, a clonagem dos genes e expressão em *E. coli* de dois clones de *Bungarus multicinctus* (BML-1 e BML-2), com seqüência similar a outras lectinas tipo-C de venenos de serpentes (Lin *et al*,

2007), produziram lectinas recombinantes com as suas capacidades hemaglutinantes preservadas.

Ainda nos experimentos de biologia molecular para o estudo de lectinas tipo-C verdadeiras, as seqüências *tags* expressas (ESTs) da biblioteca de cDNA construída com a glândula de veneno de um espécime da serpente *B. jararaca*, geraram 8,3 % de transcritos para lectinas (Cidade *et al*, 2006). Todavia, este resultado foi diferente ao apresentado para as serpentes *Agkistrodon acutus* (Qinghua *et al*, 2006) e *Bitis arietans* (Juárez *et al*, 2006), onde os ESTs seqüenciados corresponderam a 5,22 % e 13,2 % de *clusters* para lectinas, respectivamente. Outra serpente botrópica, a *Bothrops jararacussu* teve os transcritos expressos da sua glândula de veneno seqüenciados e alguns clones de cDNA foram identificados (Kashima *et al*, 2004). Foram encontrados 5 % de transcritos que codificam seqüências de lectinas, inclusive a que liga-se a galactose. Um clone correspondente a uma lectina tipo-C de *Bothrops jararacussu* foi expresso utilizando *E. coli* como vetor heterólogo, a partir de sua purificação em corpos de inclusão (Kassab *et al*, 2004). O homodímero desta lectina foi utilizado para experimentos estruturais e ensaios biológicos, tendo conservado a sua capacidade hemaglutinante.

Análises da glândula de veneno de um espécime de outra serpente botrópica, a *B. insularis*, identificaram seqüências *tags* expressas (ESTs) que foram agrupadas em *clusters*. A partir da análise dos *clusters* referentes às proteínas tóxicas, 14,5 % foram identificados como proteínas da família das lectinas tipo-C (Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2002). Posteriores experimentos de clonagem, seqüenciamento e expressão foram realizados utilizando alguns clones da biblioteca de cDNA desta serpente. A expressão de uma proteína similar ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Junqueira-de-Azevedo *et al*, 2001) e uma proteína ligante de cálcio denominada calglandulina, (Junqueira-de-Azevedo *et al*, 2003) foram realizadas utilizando *E. coli* como vetor de expressão heterólogo. Além destas proteínas, uma

lectina tipo-C desta serpente também foi subclonada e expressa. Esta lectina é o objeto de estudo desta tese, que está organizada em três partes e cujos objetivos estão descritos a seguir.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos I

2.1.1 Objetivos gerais I

Devido à presença da família das lectinas tipo-C na biblioteca de cDNA da glândula de veneno da serpente *Bothrops insularis*, visamos nesta tese aprofundar o estudo deste veneno através de duas abordagens:

a) Isolar e caracterizar uma lectina verdadeira tipo-C do veneno da serpente *Bothrops insularis*.

2.1.2 Objetivos específicos I

a) Purificar uma lectina verdadeira tipo-C de *Bothrops insularis* (BiL) utilizando técnicas cromatográficas de purificação de proteínas.

b) Caracterizar a proteína isolada quanto às suas propriedades físico-químicas e a sua capacidade hemaglutinante.

c) Determinar sua estrutura primária, comparando-a com a seqüência deduzida do clone obtido a partir da biblioteca de cDNA.

d) Construir um modelo teórico da estrutura terciária desta lectina.

2.2 Objetivos II

2.2.1 Objetivos gerais II

A lectina da planta *Lens culinaris* foi utilizada como controle negativo em um experimento de *Western blot*, porém foi reconhecida pelo soro de um coelho imunizado com BiL. Diante da constatação deste reconhecimento inesperado, foram definidos os objetivos de:

- a) Realizar um estudo imunoquímico utilizando anticorpos anti-BiL.
- b) Comparar o reconhecimento imunoquímico entre BiL e lectinas de plantas.

2.2.2 Objetivos específicos II

- a) Obter e purificar anticorpos anti-lectina (classe IgG) através da imunização de coelhos com a lectina BiL em estado nativo e desnaturado.
- b) Identificar a imunoreatividade cruzada em lectinas de diferentes ordens de plantas utilizando IgGs anti-BiL.
- c) Identificar por espectrometria de massas peptídeos comuns imunoreativos entre BiL e a lectina da leguminosa *Lens culinaris*.

2.3 Objetivos III

Ampliar os estudos biológicos e estruturais de BiL é complicado dadas a dificuldade de obtenção do veneno bruto de *B. insularis* e a sua baixa concentração neste veneno. Sendo assim, para obter quantidade suficiente desta lectina superando tais entraves, experimentos de expressão heterolôga são necessários. Para tal, foram definidos os objetivos descritos abaixo:

2.3.1 Objetivos gerais III

- a) Expressar BiL em sistema procarioto.
- b) Identificar proteínas séricas que interagem com BiLr.

2.3.2 Objetivos específicos III

- a) Transformar bactérias *E. coli* XL1-Blue com o clone pGEM11Zf que contém a seqüência nucleotídica de BiL.
- b) Amplificar por PCR, purificar o inserto de BiL e subclonar em vetor de seqüenciamento pGEM-T *easy* para confirmar a sua seqüência.
- c) Clonar o inserto em vetor pET-14b utilizando bactéria *E. coli* BL21 (DE3) como vetor de expressão procarioto.
- d) Purificar a proteína recombinante utilizando as técnicas cromatográficas de afinidade e filtração em gel.
- e) Re-novelar a lectina gerando um homodímero com capacidade hemaglutinante.

f) Identificar glicoproteínas do soro humano que interagem com a lectina recombinante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das lectinas

3.1.1 Purificação da BiL

O veneno bruto da serpente *Bothrops insularis* que foi utilizado nesta tese foi doado por pesquisadores do Instituto Butantan (São Paulo/Brasil) e corresponde a uma reunião de venenos de vários indivíduos coletados na ilha da Queimada Grande, SP – Brasil. O veneno (53 mg) foi aplicado na coluna de afinidade thiodigalactose TDG-*Sepharose*, equilibrada com solução CTBS.

Para a montagem da coluna de afinidade (TDG)-*Sepharose*, um grama da resina *Epoxy-activated Sepharose 6B* (GE Healthcare) foi hidratada (3 ml) por 30 min e incubada com uma solução de TDG (10 mg/ml de resina) diluída em hidróxido de sódio 0,1 N (pH 10). Em seguida, foram realizadas lavagens sucessivas com água deionizada, hidróxido de sódio 0,1 M, bicarbonato de sódio 0,1 M e acetato de sódio 0,1 M (pH 4). Finalmente, foi realizada uma incubação com etanolamina 0,5 M *overnight* a 4° C, seguida por uma lavagem com uma solução de equilíbrio TBS (tampão tris 20 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) contendo cálcio 5 mM (CTBS).

O material retido foi eluído em uma única fração com o mesmo tampão adicionado de lactose 100 mM, dializado contra Tris 5 mM e aplicado em uma coluna de filtração em gel *Superdex G-75* (coluna HR 10/300) (Pharmacia Biotech) em sistema de cromatografia líquida de rápida eficiência (FPLC) (GE Healthcare) e eluída com solução TBS sob um fluxo contínuo de 1 ml/min (por 30 min). O conteúdo de proteínas nas frações foi medido por absorvância a 214 e 280 nm e por método colorimétrico de dosagem (Lowry *et al*, 1951) usando a albumina sérica bovina como padrão.

3.1.2 Lectinas de plantas

As lectinas purificadas de plantas das ordens Fabales (*Lens culinaris*, *Cratylia floribunda*, *Phaseolus vulgaris*, *Parkia platycephala*, *Cicer arietinum*, *Canavalia ensiformis*, *Vicia macrocarpa*) Rosales (*Artocarpus integrifolia*), Brassicales (*Moringa oleifera*), Solanales (*Solanum tuberosum*) e Dipsacales (*Sambucus nigra*) foram doadas pela Dr^a Célia R. Carlini (Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Brasil). O conteúdo de proteínas foi medido por método colorimétrico de dosagem (Lowry *et al*, 1951) usando a albumina sérica bovina como padrão.

3.2 Eletroforese

3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel de eletroforese de poliacrilamida (12 % ou 15 %) em condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio 0,1 % (SDS-PAGE) foi realizado como descrito por Laemmli (1970). O tempo total de corrida foi de 1,2 h (nas condições ajustadas para 120 v e 40 mA). O gel foi corado *overnight* com uma solução de ácido fosfórico 2 %, contendo metanol 20 %, sulfato de amônio 20 % e corante azul brilhante de *Comassie* 0,1 %.

3.2.2 Eletroforese em gel de agarose

Os DNAs foram submetidos a eletroforese em um gel de agarose 0,85 % (Invitrogen) em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 7,9) em fonte de eletroforese (Life Technologies) com voltagem fixa de 70 v. Foi utilizado 1 kb *plus* DNA *ladder* (Invitrogen) como padrão de

peso. Para que pudessem ser visualizadas as moléculas de DNA, o gel foi incubado por 10 min em uma solução de brometo de etídio (100 µg/ml) e as bandas de DNA foram reveladas utilizando o transluminador de luz ultravioleta em câmara escura. A ação do brometo de etídio como corante se deve a sua capacidade de se intercalar entre as bases de ácidos nucleicos e fluorescer sob luz ultravioleta.

3.3 Atividade hemaglutinante

3.3.1 Aglutinação de eritrócitos de coelho

Uma alíquota de sangue de coelho foi coletada da artéria central da orelha por punção e adicionada 6,4 mM de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante. Os eritrócitos foram extensivamente lavados por centrifugação (5 min - 1.000 rpm) com solução salina de fosfato (PBS) contendo KCl 1,3 mM (PBS-KCl) ou CTBS. Os ensaios foram realizados a partir de uma diluição seriada 1:2 da lectina purificada com PBS-KCl em microplacas (volume final de 50 µl). Em seguida, uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2 % (tripsinizados ou não) foi adicionada (50 µl). Após incubação por 60 min à temperatura ambiente, uma unidade foi determinada como a concentração mínima de proteína que consegue provocar uma hemaglutinação visível.

Da mesma forma, um ensaio competitivo foi realizado, onde foi determinada a concentração mínima de inibidores (açúcares), que ao se ligarem preferencialmente à lectina, conseguem deslocar a ligação de BiL ao açúcar presente na superfície do eritrócito; impedindo desta maneira, a aglutinação das hemácias. Neste experimento, BiL (1 µg) foi submetida à presença de diferentes açúcares diluídos seriadamente (200 a 0,05 mM). Os açúcares utilizados foram: thiodigalactose, lactose, D-galactose, D-fucose, N-acetil-D-

galactosamina, D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, maltose, D-manose ou sacarose. Nas mesmas concentrações foi testada também a inibição da hemaglutinação na presença do quelante de cálcio EDTA.

3.4 Análise da estrutura primária

3.4.1 Seqüência N-terminal

A seqüência N-terminal de BiL (ambas subunidades simultaneamente), foi obtida por degradação de Edman em um sistema de microseqüenciamento automático (Porton - modelo PI2090). A lectina foi eletrotransferida (Matsudaira, 1993) para uma membrana de 0,45 µm de polivinil difluoreto (PVDF *Immobilon-P*) a partir de um gel de poliacrilamida 12 % contendo SDS (SDS-PAGE) através de um sistema *Semi-Dry Transfer Cell* (Biorad) por 2 h (200 mA). A transferência foi realizada utilizando uma solução de CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanesulfônico) 10 mM em metanol 10 % (pH 11). Os derivados de aminoácidos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.4.2 Clivagem enzimática de BiL

A proteína BiL purificada e liofilizada (350 µg) foi dissolvida em solução de bicarbonato de amônio 0,4 M (pH 8,0) contendo uréia 8 M e ditiotretitol (45 mM) e a amostra foi incubada a 50 °C por 15 min. Em seguida, iodoacetamida (100 mM) foi então adicionada à amostra reduzida e esta mistura foi mantida em temperatura ambiente por 15 min no escuro. Por último, foi adicionado 14 µg de tripsina (Sigma), sendo a lectina carbamidometilada submetida a uma hidrólise enzimática durante 5 h a 37 °C. Os peptídeos gerados foram

separados em coluna de fase reversa em sistema HPLC (Shimadzu) usando uma coluna *Sephasil C-18 HR 4/100* (Pharmacia Biosystems) com um sistema de eluição: solvente A (0,1 % de ácido trifluoroacético/TFA em água ultra pura) e solvente B (TFA 0,1 % em acetonitrila/ACN). Um gradiente linear de 5 a 60 % do solvente B por 60 min a um fluxo de 0,5 ml/min foi utilizado para a eluição da amostra. Alguns peptídeos mais intensos foram seqüenciados por degradação de Edman em um sistema de microseqüenciamento automático (modelo PI2090 - Porton).

3.4.3 Espectrometria de massas

As proteínas foram analisadas nas formas dimérica e monomérica. O dímero intacto (0,17 µg) ou o monômero de BiL em 0,5 µl (0,17 µg de BiL fervida com 17 µg de DTT por 5 min) e a lectina BiL recombinante (BiLr) foram tratadas ou não com *ZipTip_{C4}* (Millipore), que corresponde a uma ponteira de 10 µl com um microvolume de uma resina de fase reversa em sua extremidade usada para desalinizar e concentrar a amostra, aumentando a sensibilidade e resolução do espectro de massas. A amostra foi misturada com 0,5 µl de solução matriz (10 mg/ml de ácido sinapínico diluído em solução de ACN 50 % e TFA 0,1 %). Posteriormente, 1 µl desta mistura foi aplicada na placa do MALDI e seco à temperatura ambiente. A determinação das massas foi feita em um espectrômetro de massas tipo MALDI-TOF, ou Ionização/dessorção de matriz assistida por laser - Tempo de vôo, modelo Voyager DE-Pro (Applied Biosystems). Os espectros resultantes foram visualizados utilizando o programa Data Explorer (Applied Biosystems).

Uma alíquota do extrato da lectina digerida (1 µl) descrito no ítem 2.4.2 foi tratado com *ZipTip_{C18}* (Millipore). Em seguida, os peptídeos retidos foram eluídos do *ZipTip_{C18}* com uma solução de ACN 50 %, TFA 0,1 % e foram misturados com a solução matriz de α -ciano

(10 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluído em solução de ACN 50 % e TFA 0,1 %). A lista das massas obtidas a partir do espectro (*fingerprint*) foram analisadas pelo programa *Find Mod* (disponível em <http://www.expasy.ch/tools/findmod/>) para comparação com o *fingerprint* teórico obtido pela hidrólise *in silico* da seqüência de BiL.

As matrizes utilizadas são formadas por soluções saturadas de pequenos compostos orgânicos que promovem a cristalização da amostra. As matrizes de ácido sinapínico e α -ciano são indicadas para amostras com massas moleculares superiores e inferiores à 10 kDa, respectivamente. Os calibrantes e os parâmetros utilizados para obtenção de cada espectro nos espectrômetros de massas utilizados (MALDI-TOF e MALDI-TOF/TOF) estão nas legendas das respectivas figuras.

3.5 Análise da estrutura tridimensional

3.5.1 Modelagem molecular de BiL

Para a construção do modelo teórico de BiL, o banco de dados PDB (disponível em <http://www.rcsb.org/pdb/>) foi utilizado para a obtenção das estruturas secundárias. O alinhamento e a comparação da estrutura primária e a análise da estrutura secundária foram realizados utilizando os programas BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), *Swiss model* (disponível em <http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) e *Swiss PDB viewer* (disponível em <http://www.ca.expasy.org/spdbv/>). A modelagem de BiL por homologia foi baseada na estrutura cristalina da única lectina “verdadeira” tipo-C de veneno de serpente depositada em banco de dados: a lectina de *Crotalus atrox* (CaL) (PDB: 1MUQ), que possui 90 % de identidade em seqüência primária com BiL. Os aminoácidos com as regiões estruturalmente

conservadas foram identificados na seqüência primária, para que fosse possível o alinhamento entre as duas moléculas. As coordenadas de todos os resíduos foram transferidas de CaL para BiL, onde vários ciclos para minimização de energia foram realizados (utilizando o campo de força GRASP), para regularizar a estrutura e os parâmetros geométricos. Paralelamente a este processo, o modelo foi validado utilizando o programa *WHAT IF* (disponível em <http://biotech.ebi.ac.uk:8400/>).

3.6 Experimentos imunoquímicos

3.6.1 Obtenção de anticorpos policlonais anti-BiL

Dois coelhos foram imunizados *s.c.* (10-20 microinoculações) no dorso com 200 µg de BiL nativa em solução ou da BiL desnaturada contida em banda de SDS-PAGE 12 % triturada, ambas emulsificadas com adjuvante de Freund's completo (Castro *et al.*, 1999). Após 20 dias, o protocolo foi repetido em uma dose de reforço e o sangue das artérias centrais das orelhas dos coelhos foi coletado em 7 dias. Os soros foram obtidos e as IgGs (IgG_n e IgG_d para a BiL nativa ou desnaturada, respectivamente) foram purificadas utilizando a coluna de afinidade *Protein-A* (Pharmacia Biotech), usando o protocolo recomendado pelo fabricante. O pico de eluição foi monitorado a 214 e 280 nm e o conteúdo de proteínas foi determinado usando um ensaio imuno-enzimático (ELISA).

3.6.2 ELISA

Para a realização deste ensaio, placas de microtitulação (Dynatech) foram incubadas *overnight* a 4 °C com BiL ou lectinas de plantas (5 µg/ml) em tampão salino contendo fosfato (PBS) pH 7,2. Adicionais sítios de ligação na superfície da placa foram bloqueados com leite desnatado 5 % por 1 h, a 37 °C. Diluições seriadas (1:10¹ a 1:10⁸) das IgGs (IgG_n e IgG_d) foram adicionadas como anticorpo primário. Em seguida, foi adicionado anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA, 1:5.000) como anticorpo secundário. A cor foi gerada utilizando um substrato cromogênico (nitro-blue tetrazolium e bromo-cloro-indol-fosfato) e os títulos foram definidos como a maior diluição com absorbância superior a 0,3 a 450 nm em um leitor de placas (Thermomax).

3.6.3 Imunoreatividade utilizando IgG_d

Outro protocolo de hidrólise foi realizado, no qual bandas de SDS-PAGE 12 % de BiL e da lectina *Lens culinaris* foram incubadas com ACN 50 %, bicarbonato de amônio 25 mM; pH 8. Após serem incubadas em ACN 100 %, as bandas foram reidratadas para uma digestão *in gel* com tripsina 100 ng/µl (Promega) por 12 h, a 37 °C. Uma alíquota da solução peptídica resultante foi concentrada e incubada diretamente com IgG_d anti-BiL (1:1, por 2 h a 4 °C). O TFA não foi adicionado e nenhum método foi utilizado para remover os anticorpos, conforme protocolo já descrito (Kiselar e Downard, 1999). Uma alíquota da reação peptídeo-IgG_d (1 µl) ou do controle sem anticorpos foram misturadas a uma solução de matriz (ácido α-cyano-4-hydroxycinnamic) em ACN 50 % e submetida a análise no espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF.

3.6.4 *Western blots*

As proteínas foram eletrotransferidas (200 mA; 2 h) do gel de eletroforese para uma membrana PVDF (0,45 μm) por um sistema de transferência eletroforética (*Semi-Dry Transfer Cell* - BioRad) como descrito por (Matsudaira, 1993). A membrana foi bloqueada por uma hora com tampão tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5 (TBS) contendo leite desnatado 5 % e Tween-20 0,1 % (tampão TTBS-leite). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário IgG_n de coelho anti-lectina BiL 1:500 por uma hora. Após lavagem da membrana com TTBS-leite, esta foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:30.000). Nos experimentos com BiL recombinante foram utilizados anticorpos monoclonais anti-His *tag* (1:5.000) e anti-IgG de camundongo (1:10.000) como anticorpos primário e secundário, respectivamente. Em ambos os casos, a revelação foi realizada de acordo com instruções do fabricante usando substratos cromogênicos (nitro-blue tetrazolium e bromo-cloro-indol-fosfato).

3.7 Experimentos de biologia molecular

3.7.1 Preparo de bactérias competentes

A bactéria *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) foi plaqueada pela técnica de esgotamento de alça em placa contendo meio Luria Bertani (LB) ágar 15 g/l (Invitrogen), adicionada do antibiótico tetraciclina 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Após uma incubação *overnight* em estufa a 37 °C, uma colônia foi selecionada e pré-inoculada em 5 ml de meio LB contendo o mesmo antibiótico por 18 h a 37 °C sob agitação constante. Este pré-inóculo foi adicionado a 500 ml de meio LB e incubado a 37 °C sob agitação constante por ~ 3 h até a fase de crescimento exponencial ($\text{DO}_{550\text{nm}} = 0,5 - 0,6$). A cultura foi resfriada no gelo por 15 min e centrifugada a

3.000 rpm por 15 min a 4 °C. A bactéria foi ressuspensa em 5 ml de água ultra pura estéril gelada e os *pellets* resultantes da centrifugação foram lavados repetidamente, com 450 ml e 250 ml de água ultra pura estéril gelada. A última lavagem foi realizada com 5ml de uma solução de glicerol 10 % e o sedimento ressuspendido em 1 ml da mesma solução. As bactérias foram guardadas em alíquotas de 100 µl, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a - 70 °C. Todo o protocolo foi realizado em condições assépticas com bico de bunsen em câmara de fluxo laminar manipulado por materiais e soluções autoclavadas a 120 °C por 20 min.

3.7.2 Transformação

a) Choque térmico

Uma alíquota da bactéria competente XL1-Blue (100 µl) foi descongelada em gelo e misturada com 10 ng do clone (cDNA da lectina clonado no vetor pGEM11Zf) em tubo de polipropileno e incubado por 20 min em gelo. Em seguida, a mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 50 segundos e novamente incubada em gelo por 2 minutos. A esta mistura foi adicionado 900 µl de LB, sendo agitada a 225 rpm por 1 hora a 37 °C. Uma alíquota (100 µl) foi plaqueada em LB ágar contendo o antibiótico ampicilina 50 µg/ml e incubada *overnight* em estufa a 37 °C. Da mesma maneira, o vetor de expressão escolhido pET-14b (Novagen) foi inserido na bactéria.

b) Eletroporação

Para a inserção de pGEM-T/BiLr em *E. coli*, foi utilizada a técnica de eletroporação (Dower *et al*, 1988). Primeiramente uma alíquota de bactérias competentes (100 µl), foi misturada cuidadosamente ao produto da ligação (1 µl) no gelo por 1 min. As células foram

transferidas para uma cubeta de 0.2 cm e submetidas ao eletroporador (Gene Pulser II, Bio-Rad) nas condições de 25 μ F, 200 Ω e 2,5 KV. Imediatamente foi adicionado 1 ml de LB, sendo as bactérias transferidas para um tubo de polipropileno e incubadas a 37 °C por 1 h. Após este tempo 100 μ l das células foi plaqueada em placa LB ágar contendo ampicilina. Uma colônia foi selecionada, feito um pré-inóculo e o DNA foi purificado.

3.7.3 Desenho dos oligonucleotídeos

A fim de amplificar por PCR o gene codificante para BiL e cloná-lo num vetor de expressão pET-14b, o mapa de restrição de BiL foi visualizado com auxílio do programa pDRAW 3.2 (disponível em <<http://www.acaclone.com/>>), sendo selecionadas algumas enzimas que não cortam a seqüência do cDNA de BiL. Dentre estas enzimas, *XhoI*, *NdeI* e *BamHI* foram escolhidas para que pudessem ser acrescentados sítios de restrição para elas nos oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) (Dialab) que foram desenhados, a saber: 5'-CCC TCG AGC ATA TGA ATA ATT GTC CCC AGG ATT-3' e 5'-CCG GAT CCA AAG AGC AAT GTG CGC TAG AAT TT-3'. A estratégia usada foi de não amplificar a região hidrofóbica correspondente ao peptídeo sinal de BiL, para evitar problemas durante as purificações posteriores, como por exemplo, a insolubilidade da proteína recombinante. A identificação dos sítios de restrição para as enzimas citadas nos dois *primers* está indicada na Figura 04.

3.7.4 Amplificação e purificação do DNA

Após o crescimento do clone contendo BiL, o DNA foi purificado utilizando um *kit* (*Wizard plus SV minipreps DNA purification system* - Promega) para ser amplificado por PCR. Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado um termociclador (Applied

Biosystems) ajustado para 30 ciclos nas temperaturas de 94 °C por 30 s, 64 °C por 30 s e 72 °C por 30 s (desnaturação, anelamento e polimerização, respectivamente), após um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por 2 min. Ao final da reação, a amostra foi submetida a 72 °C por 5 min e mantida a 25 °C. A amplificação foi realizada em reação contendo: 1 µg de DNA purificado, 100 pmols de cada *primer*, dNTPs (Promega) 0,25 mM, enzima Taq DNA polimerase 10 µl com seu respectivo tampão recomendado pelo fabricante e água ultra pura para um volume final de 50 µl. O produto amplificado foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose e a banda correspondente a ~ 405 pb contendo o gene inteiro de BiL foi cortada e o DNA purificado utilizando o método de lise alcalina com o *kit Wizard SV gel and PCR clean-up system* (Promega).

3.7.5 Clonagem no vetor pGEM-T *easy*

Com a finalidade de afastar a possibilidade de existirem erros durante a amplificação de BiLr, vários clones transformados com o produto de PCR foram seqüenciados. Sendo assim, o produto de PCR foi digerido (conforme descrito adiante na seção 2.7.6) e submetido a um gel de agarose, no qual a sua banda foi purificada. Em seguida, esta foi primeiramente ligada a um vetor pGEM-T *easy* de 3.015 pb (Promega) utilizando o *kit* recomendado pelo fabricante contendo a enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação com esta enzima ocorreu por 1 h à temperatura ambiente. A junção vetor/inserto (pGEM-T *easy*/BiLr) foi dialisada em membrana *Type VS* 0,025 µm (Millipore) contra água ultra pura estéril por 10 min e, finalmente, foi inserida em bactérias por eletroporação. Em seguida, foram semeadas em placas com meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/ml), sendo espalhadas 35 µl de X-gal (50 mg/ml) e 20 µl de IPTG (20 mM) na sua superfície, para identificar os clones positivos contendo o inserto. Após uma incubação *overnight* em estufa a 37 °C foram selecionados

vários clones de coloração branca para serem sequenciados. Após a confirmação da seqüência (ver seção 2.7.7), a clonagem a partir de pGEM-T/BiLr no vetor pET-14b foi iniciada.

3.7.6 Análise de restrição do plasmídeo pGEM-T *easy* recombinante e clonagem do gene BiL no vetor pET-14b

O DNA plasmidial purificado (1 µg) do vetor pGEM-T/BiLr foi submetido a reações de digestão enzimática com várias endonucleases de restrição para confirmar a inserção correta do gene no vetor. A digestão de pGEM-T/BiLr foi realizada com duas enzimas usadas na construção dos *primers*: 10 U da enzima de restrição *Bam*HI (GE Healthcare), seguida pela incubação com 10 U da enzima *Nde*I (Invitrogen) com seus respectivos tampões de reação recomendados pelos fabricantes. Cada incubação foi realizada a 37 °C por 2 h. Os produtos hidrolizados (10 µl) foram submetidos a um gel analítico de eletroforese de agarose. De maneira paralela, o DNA purificado do vetor escolhido para expressão pET-14b (4.671 pb) também foi digerido com as mesmas enzimas e submetido a um gel preparativo (80 µl), no qual a banda correspondente foi cortada e o DNA linear foi purificado com um protocolo de extração do gel *GFX* PCR DNA *and gel band purification kit* (GE Healthcare), para a ligação da banda de DNA ao vetor pET-14b (utilizando um protocolo similar à ligação ao vetor pGEM-T *easy*).

3.7.7 Confirmação da seqüência nucleotídica de BiLr

Ao DNA purificado (300 ng) foram acrescentados: 4,5 µl de BigDye (Applied Biosystems) contendo nucleotídeos marcados com fluorescência, enzima taq DNA polimerase e 3,2 pmols de *primers* universal ou reverso M13. O DNA foi amplificado por PCR utilizando um termociclador (25 ciclos nas temperaturas de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min, após um ciclo inicial de 96 °C por 2 min). Posteriormente, este DNA foi enviado para seqüenciamento automático (Genome Express), sendo confirmada a identidade com a seqüência nucleotídica de BiLr.

3.7.8 Expressão

Com a finalidade de expressar BiLr, foi realizada a transformação bacteriana em bactérias *E. coli* BL21 (DE3), por choque térmico utilizando pET-14b/BiLr e as células transformadas foram plaqueadas.

a) Protocolo inicial de indução da expressão

Uma colônia de *E. coli* contendo pET-14b/BiLr foi selecionada da placa LB ágar e inoculada em 50 ml de LB acrescido de ampicilina (50 µg/ml) e incubada *overnight* a 37 °C. A este pré-inóculo foi adicionado 1 l de meio LB e incubado por 2 h a 37 °C até $DO_{660nm} = 0,4 - 0,7$. Em seguida, foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM e incubado por 4 horas a 37 °C. A cultura foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 min e o *pellet* ressuspenso em tampão de ressuspensão (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM; pH 8,0). A solução foi sonicada em gelo com 10 pulsos de 15 segundos, potência de 40 % (sonicador modelo: CV26 *Ultrasonic processor*) e centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. Foi adicionado tampão de isolamento (uréia 2 M, Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM; pH

8,0) para purificar os corpos de inclusão. Finalmente, foi adicionado tampão de solubilização (uréia 6M, Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM; pH 8,0) ao *pellet* e a solução foi agitada por 60 min a 4 °C. Em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 min e o sobrenadante recolhido para ser aplicado na coluna de afinidade à histidina, sendo conservado a - 20 °C.

b) Protocolos testados

Com o objetivo de tornar solúvel a proteína, vários protocolos foram testados. Desta maneira, o protocolo inicial foi alterado, sendo utilizando IPTG 0,1 mM após a temperatura de indução ser alterada para 28 °C. Outra modificação foi acrescentar glicose a 2 % no LB em todas as etapas de expressão. Estas modificações foram incorporadas ao protocolo, sendo este utilizado atualmente.

Foi realizado também um teste com uma etapa adicional antes da adição do tampão de ressuspensão, utilizando uma solução de lavagem contendo Triton (Triton X100 0,5 %, Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, azida sódica 0,1 %; pH 8,0), contudo esta alteração não foi incorporada ao protocolo atualmente utilizado.

3.7.9 Coluna de afinidade à histidina

a) Protocolo inicial

A coluna de afinidade (1 ml) HiTrap (GE Healthcare) foi equilibrada utilizando fluxo de 1ml/min em bomba peristáltica, com 5 ml de tampão de ligação (uréia 6 M; fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM, imidazol 20 mM; pH 7,4), sendo este o protocolo recomendado pelo fabricante. A amostra foi aplicada e a coluna foi lavada com tampão de ligação até que a absorbância a 280 nm atingisse valores constantes (geralmente 10-15 ml). O re-enovelamento

da proteína foi realizado com um gradiente decrescente (5 ml) de remoção da uréia em tampão de ligação (6; 3; 1,5; 0,75; 0,19; 0,095 e 0M de uréia). A proteína recombinante foi eluída com 5 ml de tampão de eluição (fosfato de sódio 20 mM; NaCl 500 mM; imidazol 500 mM; pH 7,4) e estocada -20 °C.

b) Modificações do protocolo de purificação

Várias novas tentativas para a purificação da proteína recombinante foram realizadas e incluíram a troca do tampão de equilíbrio / lavagem para o mesmo tampão que foi utilizado na solubilização dos corpos de inclusão (uréia 6 M, tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM; pH 8,0). Seguida pela substituição deste por CTBS acrescido de uréia 6 M, imidazol 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM; pH 8,0. Finalmente o tampão foi padronizado com a substituição de cálcio pela galactose (uréia 6 M, tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, imidazol 10mM, 2-mercaptoetanol 1mM, 5mM galactose; pH 8,0) sendo que este último é o que vem sendo utilizado atualmente. Utilizando este protocolo, a amostra foi re-enovelada na própria coluna e utilizando tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, imidazol 500 mM; pH 8,0 para a sua eluição.

Em todas as alterações de protocolos, o tampão de re-enovelamento foi o mesmo utilizado para o equilíbrio / lavagem sendo crescentemente substituído pelo mesmo tampão sem uréia e 2-mercaptoetanol. Também foi realizado um teste para melhorar o protocolo de re-enovelamento (Selistre-de-Araújo *et al*, 2000), no qual a amostra foi eluída diretamente da coluna , diluída com tampão redutor (uréia 6 M, tris-HCl 20 mM, DTT 10 mM; pH 7,5) e incubada a temperatura ambiente por 30 min. Esta solução foi diluída novamente com tampão oxidante (uréia 3 M, tris-HCl 50 mM, cisteína 5 mM, cistina 1 mM, D-galactose 5 mM, CaCl₂ 5mM; pH 7,5) e em seguida, foi submetida a ciclos de diálise (12 h), onde utilizando membrana de diálise com poro de 1 kDa, a uréia foi lentamente retirada da amostra em um

gradiente decrescente (3; 1,5; 0,75; 0,19; 0,095 e 0M de uréia). Este protocolo de renovelamento por diálise não foi eficiente na formação do homodímero e não foi incorporado ao protocolo atualmente utilizado.

3.7.10 Coluna de afinidade à BiLr

BiLr foi ligada a uma resina formada de *Sepharose* ativada por brometo de cianogênio (CNBr-*activated Sepharose* 4B - GE Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante. A ligação da proteína recombinante à resina foi avaliada pela atividade hemaglutinante da fração não-retida, como descrito na seção 2.3. O plasma humano de um doador (6 ml) foi separado por centrifugação (10.000 rpm por 5 min) após ter sido coletado por punção venosa utilizando tubo de vácuo contendo anticoagulante (EDTA K₂ 1,2-2,0 mg/ml de sangue) e conservado a - 20 °C. O cálcio foi recolocado a uma concentração final de 50 mM e o soro foi submetido à coluna de afinidade à BiLr após serem depletados os IgGs, utilizando a coluna *Protein A agarose CL4B* (Sigma) e a albumina, utilizando a coluna *Cibacron Blue 3G-A agarose 3000 CL* (Sigma), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

A coluna contendo BiLr foi equilibrada com tampão CTBS e a fração retida após 1 h de incubação com o soro foi lavada com o mesmo tampão e eluída com lactose 0,1 M seguida por uma nova eluição com a substituição da lactose por EDTA 1 mM (1 ml em cada eluição) e concentrado pela metade por liofilização. O eluído foi submetido a um gel de poliacrilamida (50 µl) e algumas bandas foram selecionadas para hidrólise por tripsina para posterior identificação das proteínas em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF. Uma coluna

apenas com a resina (sem proteína ligada) e outra com a lectina nativa (BiL) foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados I

O conjunto de dados obtidos para conseguir cumprir os objetivos I (seção 2.1) foi reunido em um manuscrito, apresentado a seguir, publicado no periódico *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 432, n. 1, p. 1-11, 2004.



Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom

Viviane Guimarães-Gomes^a, Ana Lúcia Oliveira-Carvalho^a,
Inácio de L. M. Junqueira-de-Azevedo^b, Denis L. S. Dutra^a, Mariana Pujol-Luz^c,
Helena C. Castro^c, Paulo Lee Ho^{b,d}, Russolina B. Zingali^{a,*}

^a Rede Proteômica do Rio de Janeiro and Laboratório de Hemostase e Venenos (LabHemoVen), Departamento de Bioquímica Médica—ICB, Universidade Federal do Rio de Janeiro, CEP 21941-590, Rio de Janeiro/RJ, Brazil

^b Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan—IBU, CEP 05503-900, São Paulo/SP, Brazil

^c Laboratório de Bioquímica e Modelagem Molecular (LaBioMol)¹, Departamento de Biologia Celular e Molecular—IB/CEG, Universidade Federal Fluminense, CEP 24001-970, Niterói/RJ, Brazil

^d Instituto de Biociências and Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brazil

Received 13 May 2004, and in revised form 16 August 2004

Available online 8 October 2004

Abstract

Lectins are carbohydrate-binding molecules that mediate a variety of biological processes. In this work, we identify and characterize a lectin from *Bothrops insularis* venom, with respect to its biochemical properties and theoretical structure. Initially, from a venom gland cDNA library, we cloned and sequenced a cDNA encoding a protein with high identity to snake venom lectins. A lectin molecule was purified to homogeneity from the venom by affinity column and gel filtration. This protein named BiL displayed hemagglutinating activity that was inhibited by galactose, lactose, and EDTA. Mass spectrometry analysis and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis showed that BiL is a disulfide-linked dimeric protein consisting of monomers with 16,206 *m/z*. The amino acid sequence, deduced from its cDNA sequence, was confirmed by Edman sequencing and by peptide mass fingerprint analysis. BiL shows similarity to other C-type lectin family members. Modeling studies provide insights into BiL dimeric structure and its structural determinants for carbohydrate and calcium binding.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Snake venom; C-type lectin; Modeling; 3D structure; Toxins

Bothrops insularis is a snake from Ilha da Queimada Grande, an island located about 20 miles from the Southeastern coast of Brazil. Unlike other *Bothrops* species, it feeds on migratory birds and invertebrates [1].

For this reason, *B. insularis* venom may differ in some aspects from venoms of continental species. On the other hand, the suggested phylogeny of this animal places it close to *Bothrops jararaca* [2], a pit viper responsible for most of the snake envenomations in Brazil. Thus, its venom would be expected to contain toxins that are related to those of *B. jararaca*.

During the preliminary analysis of ESTs generated from a cDNA library of venom glands from the snake *B. insularis*, a number of new uncharacterized venom gland transcripts were identified, including a new toxin

* Corresponding author. Fax: +55 21 2270 8467.

E-mail addresses: ijuncaze@butantan.gov.br (I. de L. M. Junqueira-de-Azevedo), hcastrorangel@vm.uff.br (H. C. Castro), hoplee@butantan.gov.br (P. L. Ho), lzingali@bioqmed.uff.br (R. B. Zingali).

¹ (<http://www.uff.br/labiomol>).

similar to vascular endothelial growth factor [3,4], as well as venom gland proteins [5]. Clusters of C-type lectins (CTLs)² were abundant, comprising 15% of all transcripts related to toxins. Two CTL clusters (BITL04A and BITL05A) showed extensive similarities with galactose-binding lectins isolated from other venoms.

Lectins are ubiquitous molecules found in nature. The first animal lectin activity was probably found in snakes. An agglutination activity was first described by Sir Weir Mitchell for the crude venom from the snake *Crotalus durissus* in the late 1800s [6]. However, only in 1980 was a lectin (thrombolectin) isolated and fully characterized, from *Bothrops atrox* snake venom [7]. Since then, many other lectins have been purified and characterized [8,9]. The CTLs consist of a large family of structurally homologous proteins. These proteins are dimers of about 30 kDa composed of similar disulfide-linked monomers containing the CTL motif with a saccharide-binding activity. They have been isolated from snake venoms of *Crotalus atrox* [10], *Lachesis muta stenophrys* [11], *B. jararaca* [12], *Bothrops jararacussu* [13], *Bothrops godmani* [14], *Dendroaspis jamesonii* [15], *Agkistrodon p. piscivorus* [16], and *Bitis arietans* [17]. More recently, similar CTLs were isolated and cloned from *Trimeresurus stejnegeri* [18], *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus* [19]. The CTL family presents also a second group of proteins with C-type lectin-like domain. These proteins are functionally distinct and do not appear to recognize saccharide structures and therefore are not true lectins. The structures of these related CTLs, which exhibit distinct biological activities, have been solved in the last few years: factor IX/X-binding protein [20], factor IX-binding protein [21], the von Willebrand factor modulator botrocetin [22], bitiscetin [23], the platelet glycoprotein Ib-binding protein flavocetin [24,25], mannose-binding protein [26], and the macrophage mannose receptor [27].

In an effort to identify CTLs that may be involved in the process of envenomation by *B. insularis*, we first identified a clone and then purified and characterized the protein. We also present a structural model for the lectin based on its similarity with the galactose-binding CTL from the venom of *C. atrox* [28].

² Abbreviations used: CTL, C-type lectin; TDG, thiodigalactoside; CTBS, calcium Tris-buffered saline; FPLC, fast performance liquid chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PBS, phosphate-buffered saline; TFA, trifluoroacetic acid; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionization-time of flight; SCR, structurally conserved region; CRD, carbohydrate-recognition domain.

Materials and methods

cDNA library construction

One specimen of *B. insularis* was collected from Queimada Grande island, off the coast of São Paulo state coast (Brazil). The snake was milked to stimulate the production of mRNAs in the venom glands. After 5 days, the animal was sacrificed by CO₂ and two venom glands were dissected and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, and mRNA was purified on a column of oligo (dT)-cellulose (Amersham Pharmacia Biotech). The cDNAs were synthesized from 5 µg of mRNA using the Superscript plasmid system for cDNA synthesis and cloning (Invitrogen), linked to EcoRI adapters (Amersham Pharmacia Biotech), selected by size (350–600 bp and greater than 600 bp) in agarose gel electrophoresis, and directionally cloned in pGEM11Zf₊ plasmid (Promega) at EcoRI/NotI sites. *Escherichia coli* DH5α cells were transformed with the cDNA library plasmids and then plated on a 2YT agarose plate containing 100 µg/mL ampicillin [29].

BiL sequence identification

ESTs were generated from the *B. insularis* venom gland cDNA library as described [3]. Briefly, random colonies were inoculated in the liquid culture medium, grown overnight, and the plasmidial DNA purified and sequenced on an ABI 377 or 3100 sequencer using BigDye2 dideoxyterminators (Applied Biosystems). The primers used for sequencing were M13 forward and M13 reverse. Generated ESTs were compared with GenBank nucleotide and protein databases using Blastn and Blastx programs at NCBI to identify putative gene products. The complete DNA sequence was obtained by primer walking and deposited in GenBank under accession number AY522720.

Purification of BiL

Pooled *B. insularis* crude venom (53 mg) from Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) was loaded onto a thiodigalactoside (TDG)-Epoxy Sepharose column equilibrated with Tris-buffered-saline solution containing 5 mM calcium (CTBS). The retained material was eluted with the same buffer containing 100 mM lactose and further fractionated on a Superdex G-75 HR (10/30) using a fast performance liquid chromatography (FPLC) system (Amersham/Stockholm, Sweden). The protein peak was eluted with CTBS at a retention volume of ~18 mL. Protein concentrations were determined [30] using bovine serum albumin as the standard.

Electrophoresis

Polyacrylamide gel (12%) electrophoresis in the presence of 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS–PAGE) was performed as described [31]. Pore-limiting native PAGE also was done [32], using 5–22.5% acrylamide gradient gel performed for 20 h. The standards used were apoferritin (443 kDa), transferrin (81 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and the proteins were stained with Coomassie brilliant blue 0.1%.

Hemagglutination activity

Fresh rabbit blood was collected with 6.4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and erythrocytes were extensively washed by centrifugation (12 min at 1000 rpm) with phosphate-buffered saline solution containing 1.3 mM KCl (PBS-KCl). Assays were performed by serial twofold dilution of crude venom or purified protein in V-microtiter plates. The hemagglutination induced by 10 µg/mL of BiL was also assayed in the presence of 0.05–200 mM of different sugars (thiodigalactoside, lactose, D-galactose, D-fucose, N-acetyl-D-galactosamine, D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine, maltose, D-mannose, sucrose) or EDTA. A suspension of 2% rabbit erythrocytes (trypsinized or not) was added and allowed to stand for 60 min at room temperature; the end-point showing hemagglutination was identified. One unit was defined as the minimum concentration of protein needed to cause detectable hemagglutination in this assay.

N-terminal sequence

The N-terminal sequence of BiL (both subunits simultaneously) was obtained by automated Edman degradation on a Porton Integrated Microsequencing System (Model PI2090). The protein was electrotransferred to a polyvinylidene difluoride membrane (0.45 µm) (Immobilon-P/Millipore) from 12% SDS–PAGE using a Semi-Dry Transfer Cell (BIORAD) [33]. Phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified by on-line reverse-phase HPLC.

Carbamidomethylation and enzymatic cleavage of the lectin

The purified and lyophilized protein (350 µg) was dissolved in 0.4 M ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0) containing 8 M urea. Dithiothreitol (45 mM) was added and the sample was incubated at 50 °C for 15 min. Iodoacetamide (100 mM) was then added to the reduced sample and the mixture was stirred at room temperature for 15 min in the dark. The carbamidomethylated lectin was digested with trypsin (protein ratio of 4:100 w/w) (Sigma), for 5 h at 37 °C. The generated peptides were

separated by reversed-phase HPLC using a Sephasil C-18 Pharmacia column (4 cm × 100 cm) with the following eluent system: solvent A (0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultra pure water) and solvent B (0.1% TFA in acetonitrile). A 60 min linear gradient from 5 to 60% B at a flow rate of 0.5 mL/min was applied onto the column and some peptides were sequenced by automated Edman degradation.

Mass spectrometry analysis of BiL

The intact dimer (0.17 µg) or monomer (0.17 µg BiL boiled with 17 µg DTT for 15 min) in 0.5 µL was mixed with 0.5 µL matrix solution (10 mg/mL sinapinic acid in 0.1% TFA and 50% acetonitrile solution). Thereafter, this mixture (1 µL) was applied on the plate and allowed to dry at room temperature. Mass profiles of BiL were obtained on matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Voyager DE-Pro/Applied BioSystem, USA). For tryptic peptides, BiL was digested with trypsin (as described in the previous section) an aliquot of the extract (1 µL) was mixed with 1 µL of matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and treated with C-18 zip tip (Millipore). The conditions used are given in the respective figure legends. The obtained fingerprint peptides were analyzed by the Find Mod Software (available on the Internet web site: <http://us.expasy.org/tools/find-mod/>).

Computer analysis and modeling

The primary structural analysis was performed using the software BLAST (available on the Internet web site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) for comparison of sequences and Swiss Model/Swiss PDB viewer for BiL homology modeling. The set of structurally conserved regions (SCRs) was based on the crystal structure of a galactose-specific CTL from *C. atrox* venom (PDB entry code 1JZN). This protein was elected as the reference structure because it presents all necessary features to serve as a template for BiL (homology = 90% and similar biological activity). Blocks of structurally conserved regions were identified by sequence in order to establish the alignment of BiL with *C. atrox*. Coordinates for all residues were transferred to BiL and loops were constructed in a single round. Several cycles of constrained energy minimization regularized the structural and geometric parameters. In subsequent runs, the full model was energy-minimized and validated by using the program WHAT IF (available on the Internet web site: <http://biotech.ebi.ac.uk:8400/>). We also constructed two docking complexes (BiL homodimer and BiL–galactose–Ca²⁺ complex) using the *C. atrox* lectin–galactose complex as template (PDB entry code 1JZN). Initially, the crystal structure template was

superposed with BiL on the Swiss PDB viewer, guided by the structurally conserved regions, using the C α atoms. Then, the original protein from the crystal (lectin of *C. atrox*) was deleted and the BiL–ligand complex was searched for notable steric overlaps. The docking complexes were subjected to subsequent energy minimization using the GRASP force field. Important interactions were analyzed as hydrogen bonds and electrostatic interactions, hydrophobic effects, and complementarity of shapes. All docking complexes were constructed using the procedures already described [34].

Results

Identification of BiL by cDNA cloning

A cDNA library was constructed from the venom glands of *B. insularis* in order to characterize abundant ESTs from this specialized tissue. The ESTs obtained from 5' and/or 3' ends were searched with Blastn and Blastx programs for similar sequences in DNA and protein databases. Among the 610 clones analyzed, 50 clones revealed significant similarity in the primary sequence with CTLs from different sources. Four of these clones were assembled into cluster BITL04A; the deduced protein showed its highest similarity score with a lectin (GenBank accession no. AAB49518.1, [11]) from *Lachesis muta*, followed by other snake venom lectins.

Since the longest cDNA accessed by restriction analysis contained about 900 bp, an internal primer (5'-CGAA GTTTGGATCGGACTG-3') was designed based on the EST end to extend and close the sequence. The complete nucleotide sequence (Fig. 1) was 927 bp and revealed an ORF of 158 amino acids with an ATG start codon at position 75 and the TGA stop codon at position 549.

Purification and characterization of BiL

Bothrops insularis lectin was purified by two steps: affinity chromatography of the crude venom on a TDG-Epoxy Sepharose column (Fig. 2A) followed by gel filtration on Superdex G-75 in a FPLC system (Fig. 2B). The yield of the purified protein was approximately 0.5% of crude venom protein (not shown). The purified lectin showed a single band of about 30 kDa on unreduced SDS-PAGE and a single band of 15 kDa under reduced conditions (Fig. 2C—lanes 1 and 2, respectively). In order to verify the oligomerization state of BiL a pore-limiting native PAGE was performed. Fig. 2C (lane 3) shows that BiL migrates with a apparent molecular weight lower than 66 kD (lane 4) indicating that in native conditions BiL is a dimer. Fig. 3 shows the analysis of the purified protein by MALDI-TOF. The intact protein has a molecular mass of ~32,372, corresponding to the expected molecular mass for the dimer. Treatment with DTT, enhanced a peak corresponding to the monomer (~16,206 m/z).

1	GAGTTTCCTCTGAGCAGACTTGCTAGCTGTGGAGGCCGAGGAACAGTTTCTCTCTGCAGGGAAGGAAGGAAGACC
75	ATG GGG CGA TTC ATC TTC GTG AGC TTC GGC TTG CTG GTC GTG TTC CTC TCC CTG AGT GGA
-23	Met Gly Arg Phe Ile Phe Val Ser Phe Gly Leu Leu Val Val Phe Leu Ser Leu Ser Gly
135	GCC AAA GGC AAT AAT TGT CCC CAG GAT TGG CTC CCC ATG AAT GGG CTG TGC TAC AAG ATC
3	Ala Lys Gly Asn Asn Cys Pro Gln Asp Trp Leu Pro Met Asn Gly Leu Cys Tyr Lys Ile
195	TTC GAT GAA CTG AAG GCC TGG AAG GAT GCA GAG ATG TTC TGC AGG AAA TAC AAG CCA GGC
18	Phe Asp Glu Leu Lys Ala Trp Lys Asp Ala Glu Met Phe Cys Arg Lys Tyr Lys Pro Gly
255	TGC CAC CTC GCC TCC TTT CAC CTC TAT GGA GAA TCA CCT GAG ATT GCT CAG TAC ATC TCT
38	Cys His Leu Ala Ser Phe His Leu Tyr Gly Glu Ser Pro Glu Ile Ala Glu Tyr Ile Ser
315	GAC TAT CAC AAA GGT CAG AGC GAA GTT TGG ATC GGA CTG TGG GAT AAG AAG AAA GAC TTC
58	Asp Tyr His Lys Gly Gln Ser Glu Val Trp Ile Gly Leu Trp Asp Lys Lys Lys Asp Phe
375	TCC TGG GAG TGG ACC GAC AGA TCT TGC ACC GAC TAT CTA AGC TGG GAC AAA AAT CAG CCC
78	Ser Trp Glu Trp Thr Asp Arg Ser Cys Thr Asp Tyr Leu Ser Trp Asp Lys Asn Gln Pro
435	GAT CAC TAC CAG AAC AAA GAA TTC TGC GTT GAG CTT GTG TCC GAT ACA GGG TAT CGC CTG
98	Asp His Tyr Gln Asn Lys Glu Phe Cys Val Glu Leu Val Ser Asp Thr Gly Tyr Arg Leu
495	TGG AAT GAT CAG GTG TGC GAG TCC AAG AAC GCT TTT CTC TGC CAG TGC AAA TTC TAG
118	Trp Asn Asp Gln Val Cys Glu Ser Lys Asn Ala Phe Leu Cys Gln Cys Lys Phe ***
552	CGCACATTGCTCTTTCTCCCACTCCGGAAGGAGAGAAGCACCTAGTGATGTCTGGAGAAGCAACGAAGCTCTGTGCGAAA
631	TCTCTGCTCTGCACCCCTTCGCTCAATGGATGCTCTCTGTAGCTGCGATCTGATTTTGGCTGCTCCTGATGGGCCAGAACC
710	TCTGATAAATCTGCCTAGCCCTGACTGGCCCTTTTATTCCGAGAGCCACTGTTGTTGTTTTTTAATATAAAGAT
789	GTTATTGATTTCCCCCCCAATAACATATGTTAATTTTCCCAATCAACGAGTTGCTGGGATTAGCTATGCTAATACA
868	TATTCAAATCCCTTCAATCTTCTTCTCTAATCAAC (AATAAATAAA) TCTCAAGTTTAAAAA

Fig. 1. Complete sequence of *Bothrops insularis* lectin cDNA and its deduced protein. The signal peptide is indicated by dotted underline and the superimposed double polyadenylation signal is between parentheses. Solid underlines indicate the mature N-terminal sequence of mature protein and an internal sequence obtained by Edman degradation of the purified protein and of a tryptic peptide.

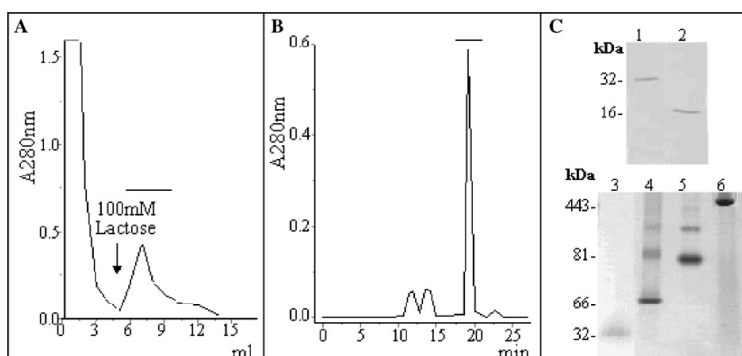


Fig. 2. Purification of BiL: (A) Crude venom (53 mg weight) was dissolved in TBS and applied to a TDG-Epoxy Sepharose column equilibrated with CTBS. The unabsorbed fraction was eluted with CTBS and the lectin fraction was then eluted with 100 mM lactose (arrow). (B) The eluted lectin was applied to a Superdex G-75 column on a FPLC system with TBS buffer and fractions containing hemagglutinating activity were pooled (horizontal bar). (C) Subsequently, 30 μ g of the purified lectin was subjected to SDS-PAGE 12% under unreduced (lane 1) and reduced conditions (lane 2). Moreover, BiL (10 μ g) was analyzed by a pore-limiting native PAGE 5–22.5% (lane 3), using bovine serum albumin (66 kDa), transferrin (81 kDa), and apoferritin (443 kDa) as standards (lanes 4–6, respectively). In both electrophoresis, the proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue 0.1%.

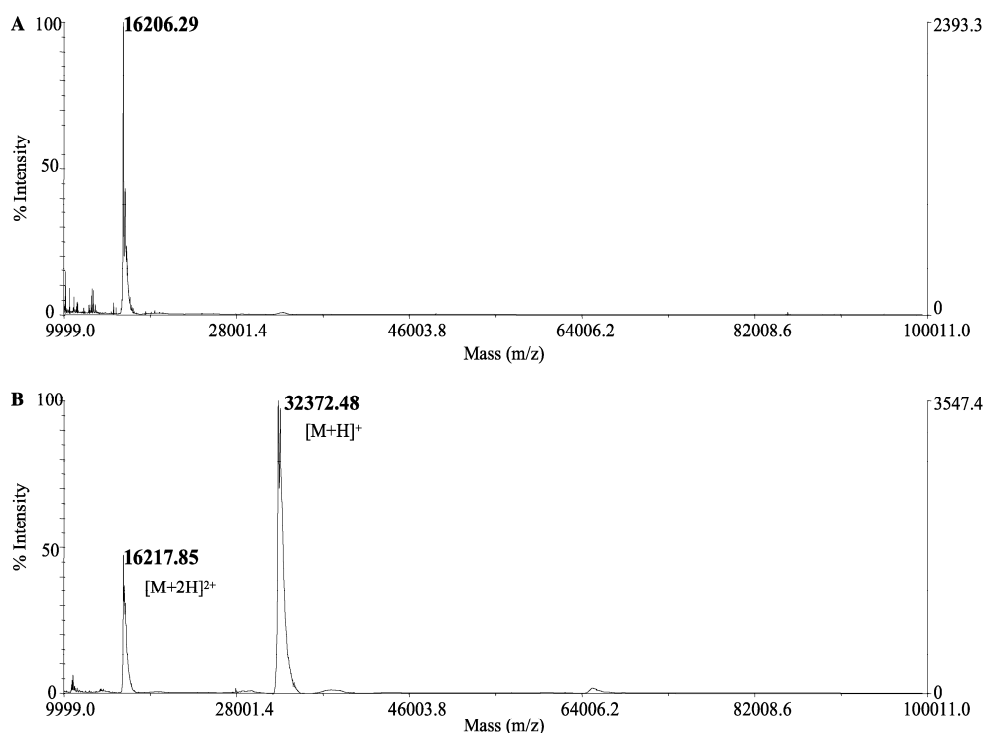


Fig. 3. MALDI-TOF mass spectrometry of BiL: (A) Monomer of BiL. The sample (0.17 μ g in 0.5 μ L of TBS) was boiled with 17 μ g DTT for 5 min, and added to 0.5 μ L the matrix solution (sinapinic acid) and 0.1% TFA in 50% acetonitrile. (B) Intact dimer of BiL. The sample (0.17 μ g) was mixed with the matrix solution (sinapinic acid) and 0.1% TFA in 50% acetonitrile solution. The conditions used were: linear mode of operation, accelerating voltage of 25 kV, extraction delay time of 500 ns, acquisition mass range from 10 to 100 kDa, and external calibration was run with bovine serum albumin.

This value corresponds to the theoretical mass for the mature protein, as deduced from DNA sequence. These results indicate that BiL has a homodimeric structure that is probably stabilized by disulfide bridges like the other members of this protein family (Fig. 5).

Hemagglutination activity

The purified BiL (1 µg in 100 µL final volume) strongly agglutinated trypsin sensitized and intact rabbit erythrocytes in the presence of CaCl₂. The treatment of rabbit erythrocytes with trypsin increased the agglutinating ability of BiL, so that, the minimum concentration required for hemagglutination was ~19 ng/mL. The minimum inhibitory concentration determined for carbohydrates were 8 mM for lactose, 16 mM for D-galactose, and 18 mM for D-fucose (Table 1). The activity was not affected by N-acetyl-galactosamine, D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine, maltose, D-mannose, or sucrose. EDTA blocked the activity of BiL in a concentration-dependent manner (Table 1) showing a Ca²⁺-depending activity.

Sequencing and mass spectrometry analysis

In order to verify whether the purified protein corresponded to the molecule predicted from the sequenced cDNA, we undertook the partial sequencing and the mass fingerprint analysis of the purified lectin. The N-terminal sequence obtained by Edman degradation was identical to that deduced from the cloned cDNA (Figs. 1 and 5). For the identification of internal peptides and of the peptide mass fingerprint, BiL was submitted to hydrolysis with trypsin. Fig. 4A shows separation of the peptides on a C-18 column in a HPLC system. The analysis of an internal peptide by Edman degradation provided a sequence of 23 amino acid residues that matches the deduced sequence (Figs. 1 and 4A). Fig. 4B shows the peptide masses achieved by

proteolysis with trypsin. Again, analysis of the peptide mass fingerprint corresponds to that predicted from the cloned molecule (Table 2). Interestingly, the only peptide that was not identified by mass spectrometry was the one sequenced by Edman degradation.

Comparison of BiL sequence with other snake venom lectins

The sequence alignment of BiL with other snake venom lectins is shown in Fig. 5. The greatest similarities were observed for lectins from *B. jararacussu* (sequence identity 96%), *Lachesis muta stenophrys* (93%), puff adder, *Bitis arietans* (93%), rattlesnake/*C. atrox* (90%), *Trimeresurus stejnegeri* (82%), and *Bungarus fasciatus* (63%). The residues responsible for the carbohydrate-recognition domain (CRD) are present in this molecule and residues important in coordinating a Ca²⁺ ion are also observed (Fig. 5). The functional importance of these ligands is confirmed by the biological experiments (Table 1).

Modeling of BiL

Modeling of the spatial structure of the BiL monomer showed that the globular core is comprised of two α-helices and an eight-stranded β-sheets, similar to *C. atrox* lectin and other CTLs (Fig. 6A). The superimposition of BiL monomer with other CTLs confirms this highly conserved folding, including the arrangement of its intrachain disulfide bonds topologically equivalent to that of factor IX binding protein (Fig. 6A) [21]. The main difference between BiL and these proteins is located at the position of an extended 70' loop (76–100 residues), which seems to be directly implicated in its distinctive capacity of binding sugar (Fig. 6A). An unusual spatial arrangement is observed for this loop in both BiL model and *C. atrox* lectin crystal structure, ensuring the formation of a different dimer from CTLs [20–25]. Our modeling studies predict an extensive, though not complete, surface complementarity between the BiL monomers, which allows a high density of van der Waals contacts to form the complex. The BiL homodimer is stabilized not only by the disulfide bond between the Cys86 residues of both monomers, but also by intermolecular hydrogen bonds and hydrophobic interactions (Fig. 6C).

The model of the hypothetical complex involving the CRD of BiL, galactose and calcium ion revealed several van der Waals contacts and also other interactions (Fig. 6B). The analysis of the predicted structure shows that the ligands for the Ca²⁺ ion are side chain oxygen atoms of Gln96, Asp98, Glu104, Asn119 as well as the main chain carbonyl oxygen of Asp120. Similar to that observed for CaL crystal structure, galactose 3- and 4-hydroxyl oxygen atoms not only complete calcium

Table 1
Inhibition of BiL-induced hemagglutination by saccharides and EDTA

Inhibitor	Minimum inhibitory concentration (mM) ^a
EDTA	0.2
Thiodigalactoside	4
Lactose	8
D-Galactose	16
D-Fucose	18
N-Acetyl-D-Galactosamine	>100
D-Glucose	>100
N-Acetyl-D-Glucosamine	>100
Maltose	>100
D-Mannose	>100
Sucrose	>100

^a Hemagglutination of rabbit trypsinized erythrocytes was assayed with lectin (1 µg in 100 µL final volume) in the presence of different sugars diluted serially as described in Materials and methods section.

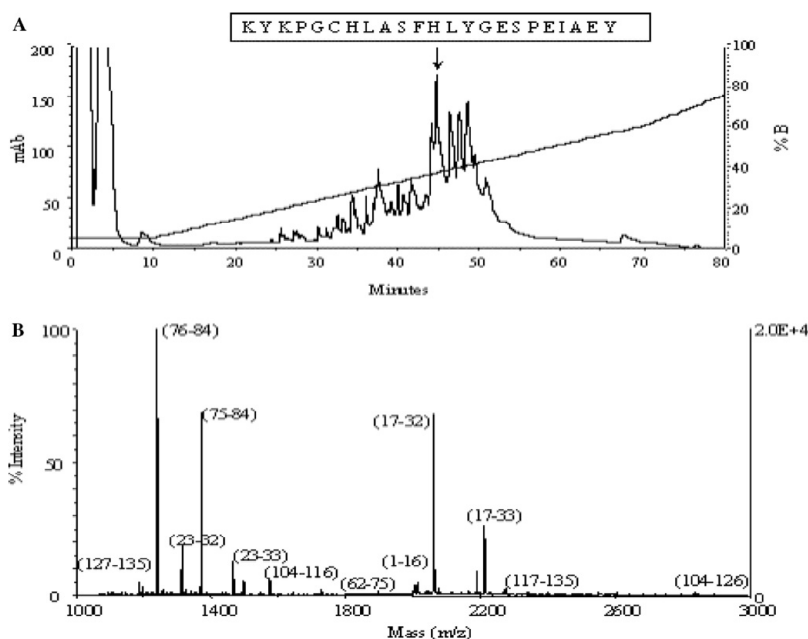


Fig. 4. Peptide analysis. (A) Primary separation of peptides from carbamidomethylated lectin digested with trypsin. The digest was separated on a Sephasyl C-18 column using HPLC with a 60 min linear gradient from 5 to 60% B at a flow rate of 0.5 mL/min (solvent A: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in ultra pure water and solvent B: 0.1% TFA in acetonitrile). Box shows the internal sequence obtained by Edman degradation of the peak indicated by the arrow. (B) Peptide fingerprint obtained by MALDI-TOF mass spectrometry: BiL (350 µg) was lyophilized and digested with trypsin (protein ratio of 4:100 w/w) for 5 h at 37 °C. An aliquot of the extract (1 µL) was mixed with the matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and treated with C-18 *ziptip*. The conditions used were: reflector mode of operation, accelerating voltage of 20 kV, extraction delay time of 150 ns, acquisition mass range from 0.8 to 4 kDa, and external calibration was used with Calmix2 (Applied Biosystem). The obtained fingerprint peptides were analyzed using Find Mod software and the amino acid positions based on the BiL sequence are given in parentheses.



Fig. 5. Alignment of the amino acid sequence of BiL monomer with other proteins. Conserved amino acids are denoted in gray and the cysteine residues in black. In bold, the sequence 108–120 and the position of the Gln–Pro–Asp (QPD) sequence (96–98), described as essential region for calcium and galactose interactions, respectively. The N-termini of the mature lectins are located at position +1. *B. insularis* lectin (BiL), *C. atrox* lectin (CaL) (PDB Accession No. P21963), *B. jararacussu* lectin (BJcuL) [12], *Lachesis muta stenophrys* lectin (LmsL) (NCBI Accession No. AAB49518), *Bitis arietans* lectin (BaL) (NCBI Accession No. AAB36170), *Trimeresurus stejnegeri* lectin (TsL) (NCBI Accession No. AAD17252), *Bungarus fasciatus* lectin (BfL) (NCBI Accession No. AF354270), alpha subunit of coagulation factor IX-binding protein (FIX-bp) from habu snake venom (PDB entry code 1BJ3) and beta subunit of macrophage mannose receptor (MMR) (PDB Accession No. 1EGG).

Table 2
MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the peptides from *B. insularis* purified lectin

Position in the complete sequence	Measured mass ^a	Theoretical mass ^b
1–16	2010.90	2009.87
17–33	2187.06	2187.07
34–61	^c	3311.55
62–75	1674.03	1673.90
76–84	1241.57	1241.52
85–103	2399.04	2399.04
104–126	2834.31	2834.28
127–135	1187.60	1187.53

^a Measured mass after hydrolysis of BiL with trypsin.

^b Theoretical mass using the ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.org/>).

^c This peptide was obtained by Edman degradation.

coordination, but also form hydrogen bonds with Gln96, Asp98, Glu104, Asn119 side chains, within BiL carbohydrate recognition site. Water molecules also seem to play a role in BiL–galactose–calcium complex since the indirect carbohydrate–protein interaction mediated by a single water molecule, between the 2-hydroxyl group of galactose and Gln121, is also clearly noticed. The substitution at position 112 in BiL (Asp instead of Leu) is also participating in this type of interaction, when a thiodigalactoside is placed there (not shown). Additional stabilization of the BiL–galactose–calcium complex is achieved through hydrophobic stacking of the side chain of Tyr100 with the apolar side of D-galactose moiety.

Discussion

In the present study, we identified a cDNA sequence in the *B. insularis* venom gland library that showed significant similarity with true lectins. The cDNA revealed the presence of a putative CRD, a highly conserved feature in the CTL family, and other domains that are thought to be involved in calcium binding and protein–galactoside interactions. We used an affinity column to isolate this lectin (BiL) from *B. insularis* snake venom and characterized it experimentally. To obtain an idea of the structure, we developed a 3D model of BiL monomer using as a template the structure of a lectin from *C. atrox* venom.

The galactoside-inhibitable lectins have been found in a variety of vertebrate organisms and tissues including snakes [7]. For most of them, calcium ions [35,36] are essential for its agglutination activity, as described for BiL in the present paper and for other true CTLs from snake venoms [10–14]. Hence, the biological features of BiL clearly place it in the CTL family.

The structure of BiL is related to proteins that contain a C-type CRD, since it possesses the conserved amino acid residues characteristic of this domain [26].

Classically, C-type CRDs are characterized by a sequence motif of 32 conserved amino acids that include two disulfide bonds and occur at fixed intervals distributed over approximately 120 amino acids. The conserved residues appear to form a general calcium-dependent and carbohydrate-binding framework. Specificity for particular sugars is presumably encoded by conserved residues that determine affinity for distinct carbohydrate ligands [26]. Primary structure analysis of conserved residues in the true CTLs of snake venoms has identified the conserved residues in the CRDs [10,13,16,17]. BiL possesses 16 of these invariant residues (see Fig. 5). Similar to CaL, the structural analysis of BiL revealed that residues Gln96, Asp98, Tyr100, Glu104, and Asn119 interact directly with the galactose molecule, while the residue Gln121 interacts through a water molecule [28]. Interestingly, BiL presents an additional water-mediated interaction involving the substitution at position 112 (Asp112Leu). Two aspects of the structure can account for the galactose selectivity of BiL that is observed experimentally: distribution of hydrogen-bond acceptors and donors around sugar hydroxyl groups 3 and 4, and the presence of the Tyr100 side chain close to the binding site. Additional stabilization of the lectin–carbohydrate complex is achieved through solvent molecules. This interaction may account for the slightly higher binding affinity of BiL for thiodigalactoside than for D-galactose (Table 1). The model also revealed that the sugar binding in BiL probably occurs indirectly through a Ca²⁺ ion, as observed in the *C. atrox* lectin structure.

Snake venom CTLs consist of a homologous group of proteins that are functionally distinct [8,37,38]. BiL primary structure exhibited a high degree of sequence identity (ranging from 62 to 96%) when compared with galactose-binding lectins from different snake venoms (BjuL, LmsL, BaL, CaL, TsL, BfL, and BjL) and a low degree when compared with CTL-like proteins (see Fig. 5). Comparison of BiL with the α subunit of Factor IX bp from habu snake venom and with the β subunit of MMR reveals interesting differences among them. FIX-bp is a disulfide-linked heterodimer of CTL-like subunit. It binds to γ -carboxyglutamic acid (Gla)-containing domains of coagulation factor IX in the presence of calcium ions [21]. The macrophage mannose receptor, like other receptors of this group, requires Ca²⁺ for ligand binding, and mannose and fucose are the most potent monosaccharide ligands [27]. BiL contains the QPD sequence (residues 96–98), absent from both MMR and FIX-bp, as expected due to their biological activities [39,40]. However, two Ca²⁺-binding sites can be found in these proteins structures, including BiL and CaL (Gln96, Asp98, Glu104, Asn119, and Asp120) and MMR (positions 108, 118, and 119) (Fig. 5) [28,21]. Unlike BiL, FIX-bp has only one Ca²⁺-binding site, located in its α subunit [20,21].



Fig. 6. Three dimensional-model of the BiL homodimer carried out in the Swiss-Model and Swiss-PDB Viewer programs. (A) Superimposition of the BiL monomer model and C-type lectin family members purified from snake venoms. The theoretical BiL model (pink) was superposed with the crystal structure of *C. atrox* lectin (white; RMS = 0.36 Å), the coagulation Factor IX-binding protein (red; RMS = 1.06 Å), flavocetin (green; RMS = 1.04 Å), and botrocetin (blue; RMS = 1.04 Å), on the Swiss-PDB Viewer module. The most conserved regions are shown in the secondary structure diagram and the most variable regions are shown in tube-plot representation (boxed in white). The secondary structures indicated in the 3D structure are: extended region represented in blue, helix in red, and β -strand in light green. (B) Carbohydrate-recognition and calcium-binding domain. Galactose is represented in red, calcium in gray, and BiL residues in blue. (C) Secondary structure diagram of final 3D model of the BiL homodimer complexed with calcium and galactose. The interchain disulfide bridge is indicated in white, calcium in gray, and residues at the interface environment represented in blue and yellow. The atoms and bonds of galactose are color coded according to atom type (red for oxygen and white for carbon). Inset: top view of BiL dimer, revealing the opposite position of the CRDs.

Superimposition of the structure of monomeric BiL on the structure of the CTLs shows a C^z rmsd between 1.04 Å (botrocetin) and 1.06 Å (Factor IX binding protein) (Fig. 6A). This demonstrates that in spite of the sequence divergence of BiL relative to these proteins (sequence identity is 34% for botrocetin and 30% for Factor IX binding protein), the overall structure is

highly conserved. In general, the structural diversity of the different CTLs is greater in the loop regions, mainly due to insertions or deletions. However, the structure of part of 70' loop (residues 76–100) in BiL shows a significant divergence (deviations of more than 5 Å) from all other CTLs, similar to *C. atrox* lectin (CaL). Since this loop is important in the formation of the dimeric inter-

face, it suggests a different dimeric structure for BiL and CaL, in accordance with the theoretical model of the dimeric form of BiL (Fig. 6C).

An important conserved feature observed in this group is the presence of nine cysteine residues. The large number of disulfide bridges should make this lectin extremely resistant to proteolytic enzymes present not only in the venom but also in the blood and tissue fluids of the prey animals [10]. Based on sequence homology and the known patterns of disulfide bridges in CTLs of snake venoms, we predict four intrachain bridges for BiL: Cys3 to 14, Cys31 to 131, Cys38 to 133, and Cys106 to 123 as shown in the structural model. Lectins also require the interchain disulfide bond for maintenance of hemagglutination activity [9]. Accordingly, the purified lectin was shown to be a homodimer with Cys86 forming the disulfide link between its monomers [10,13]. Similar to other true lectins, BiL hemagglutination activity is dependent on inter- and/or intra-chain disulfide bonds, since reducing agents abolish its activity (data not shown).

CTL domains generally adopt a typical fold: one-half of the molecule consists of a long two-stranded beta-sheets and two alpha-helices, while the second half contains the calcium and carbohydrate-binding site(s) and is mostly formed of non-repetitive loop structures. This fold is conserved in all known examples of CTL structures, including the human serum mannose-binding proteins [41], E-selectin [42], tetranectin [43], and rat liver mannose-binding protein [44]. The human lithostathine [45] also adopts the typical CTL fold, although it does not have any sugar-binding activity. The coagulation factors-IX/X binding protein from *B. jararaca* venom is another CTL homologue without lectin activity, which shows a similar fold, as well as a unique loop that projects into the other subunit of the heterodimer [20]. Our modeling studies revealed that the lectin from *B. insularis* adopts a typical CTL fold with differences in structure from other CTLs mainly in the diverse loop regions, including 70' loop which is involved in the formation of the dimeric interface (Fig. 6C). BiL dimer is stabilized by both intermolecular hydrogen bonds and hydrophobic interactions. The elements of the BiL dimeric interface include: (1) an extensive, although not complete, surface complementarity between the monomers, which allows a high density of van der Waals contacts; (2) a close contact between the 70's loop from each monomer that forms hydrogen interactions, involving Lys74, Asp76, Phe77 residues; (3) salt bridge interactions including those similar to CaL (Lys74–Asp76), and the additional interaction between Arg84 and Asp88; and (4) the interchain disulfide bridge. These are distinctly visible in the 3D dimer model (Fig. 6C). These elements, however, are arranged in a very different way from that seen in the coagulation factors-IX/X binding protein and other members of the CTL family

from snake venoms, which are unable to bind carbohydrates. Therefore, the CTL structures described so far, such as BiL, factors-IX/X binding protein, and Convulxin, and their wide distribution in animals may reflect an ability of the lectin fold to evolve to a very different binding specificities.

Crotalus atrox lectin structure is described as an oligomer presenting a decameric form composed of two pseudo-5-fold symmetric pentamers [10,28]. Although highly similar to CaL, the pore-limiting native PAGE indicated that BiL does not form a decameric oligomerized structure (Fig. 2C). According to our theoretical analysis, these experimental results could be explained by the fact that the residues 88 and 89 of CaL are involved in a important intrapentameric interaction between the monomers not disulfide-linked [28]. In contrast in BiL model, this interaction is prevented since the residue 88 is involved in hydrogen bonds and a salt bridge with residue 84, within its two monomers disulfide-linked. In addition, Leu5, which forms an important hydrophobic cluster with Phe135, Tyr34, and Trp7 in the intrapentameric interface of CaL, is replaced by Gln in BiL structure. Therefore, since a hydrophobic residue (Leu) is substituted by a hydrophilic one (Gln), this substitution would probably impair the formation of this particular cluster and consequently of BiL pentameric structure, as pointed by our experimental data.

In conclusion, this paper shows the cloning, characterization, and structural analysis of a CTL (BiL) from the venom of *B. insularis*, an endangered species. Most of all, this paper raises the question about the oligomerization state of snake venom lectins, and their possible influence upon lectin biological activity. This model provides a basis for the rational design of experiments to study the structural features of snake venom lectins that do not present an oligomeric form, such as BiL, as well as a logical starting point for understanding activities other than the binding of carbohydrates.

Acknowledgments

We thank the “Rede Proteômica do Estado do Rio de Janeiro” for use of the mass spectrometry facility and the Instituto Butantan (São Paulo, Brazil) for providing snake venom. We also thank Mr Hugo R.O.B. Filho and Dione M. Silva for their technical assistance and Dr Martha M. Sorenson for critical reading of the manuscript and Dr. Debora Foguel for the use of HPLC columns.

This research was supported in part by the International Foundation of Science (Stockholm, Sweden) grant to R.B.Z. (contract F/3156-1). Additional support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Financiadora de Estudos e Projetos do Brasil (FINEP); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho (FAPERJ); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Fundação Butantan and Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB).

References

- [1] M.R. Duarte, G. Puorto, F.L. Franco, *Neotrop. Fauna Environ.* 30 (1995) 1–13.
- [2] S.D. Werman, in: J.A. Campbell, E.D. Brodie Jr. (Eds.), *Biology of the Pitvipers*, Selva Tyler, Texas, 1992, pp. 21–40.
- [3] I.L. Junqueira-de-Azevedo, P.L. Ho, *Gene* 16 (2002) 279–291.
- [4] I.L. Junqueira-de-Azevedo, S.H. Farsky, M.L. Oliveira, P.L. Ho, *J Biol. Chem.* 43 (2001) 39836–39842.
- [5] I.L. Junqueira-de-Azevedo, T. Pertinhez, A. Spisni, F.R. Carreno, C.S. Farah, P.L. Ho, *Biochim. Biophys. Acta* 1648 (2003) 90–98.
- [6] W. Mitchell, in: D.C. Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 1572 (2002) 187–197.
- [7] T.K. Gartner, K. Stocker, D.C. Williams, *FEBS Lett.* 117 (1980) 13–16.
- [8] M.L. Ogilvie, T.K. Gartner, *J. Herpetol.* 18 (1984) 258–290.
- [9] T.K. Gartner, M.L. Ogilvie, *Biochem. J.* 224 (1984) 301–307.
- [10] J. Hirabayashi, T. Kusunoki, K. Kasai, *J Biol. Chem.* 226 (1991) 2320–2326.
- [11] F. Aragón-Ortiz, R. Mentele, E.A. Auerswald, *Toxicon* 34 (1996) 763–769.
- [12] Y. Ozeki, T. Matsui, J. Hamako, M. Suzuki, Y. Fujimura, E. Yoshida, S. Nishida, K. Titani, *Arch. Biochem. Biophys.* 308 (1994) 306–310.
- [13] D.D. de Carvalho, S. Marangoni, J.C. Novello, *J. Protein Chem.* 21 (2002) 43–50.
- [14] B. Lomonte, G. Rojas, J.M. Gutierrez, G. Ramirez, *Toxicon* 28 (1990) 75–81.
- [15] M.L. Ogilvie, M.E. Dockter, L. Wenz, T.K. Gartner, *J Biochem. (Tokyo)* 100 (1986) 1425–1431.
- [16] Y. Komori, T. Nikai, T. Tohkai, H. Sugihara, *Toxicon* 37 (1999) 1053–1064.
- [17] T. Nikai, J. Suzuki, Y. Komori, M. Ohkura, Y. Ohizumi, H. Sugihara, *Biol. Pharm. Bull.* 18 (1995) 1620–1622.
- [18] Q. Xu, X. Wu, Q. Xia, K. Wang, *Biochem. J.* 341 (1999) 733–737.
- [19] H.G. Zha, W.H. Lee, Y. Zhang, *Toxicon* 39 (2001) 1887–1892.
- [20] H. Mizuno, Z. Fujimoto, M. Koizumi, H. Kano, H. Atoda, T. Morita, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 438–441.
- [21] H. Mizuno, Z. Fujimoto, M. Koizumi, H. Kano, H. Atoda, T. Morita, *J. Mol. Biol.* 28 (1999) 103–112.
- [22] U. Sen, S. Vasudevan, G. Subbarao, R.A. Mc Clintock, R. Celikel, Z.M. Ruggeri, K.I. Varughese, *Biochemistry* 40 (2001) 342–352.
- [23] S. Hirotsu, H. Mizuno, K. Fukuda, M.C. Qi, T. Matsui, J. Hamako, T. Morita, K. Titani, *Biochemistry* 40 (2001) 13592–13597.
- [24] K. Fukuda, H. Mizuno, H. Atoda, T. Morita, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55 (1999) 1911–1913.
- [25] K. Fukuda, H. Mizuno, H. Atoda, T. Morita, *Biochemistry* 39 (2000) 1915–1923.
- [26] W.I. Weis, R. Khan, R. Fourme, K. Drickamer, W.A. Hendrickson, *Science* 254 (1991) 1608–1615.
- [27] H. Feinberg, S. Park-Snyder, A.R. Kolatkar, C.T. Heise, M.E. Taylor, W.I. Weis, *J Biol. Chem.* 275 (2000) 21539–21548.
- [28] J.R. Walker, B. Nagar, N.M. Young, T. Hiram, J.M. Rini, *Biochemistry* 43 (2004) 3783–3792.
- [29] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- [30] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [31] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [32] P.J. Blanche, E.L. Gong, T.M. Forte, A.V. Nichols, *Biochim. Biophys. Acta* 665 (1981) 408–409.
- [33] P.T. Matsudaira, *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, San Diego, 1993, pp. 75–80.
- [34] H.C. Castro, D.M. Silva, C. Craik, R.B. Zingali, *Biochim. Biophys. Acta* 1547 (2001) 183–195.
- [35] A.R. Kolatkar, W.I. Weis, *J Biol. Chem.* 271 (1996) 6679–6685.
- [36] W.I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 441–473.
- [37] K. Drickamer, *Prog. Nucleic Acids. Res. Mol. Biol.* 45 (1993) 207–232.
- [38] R.M. Kini, *Toxicon* 34 (1996) 1287–1294.
- [39] T. Himeshima, T. Hatakeyama, N. Yamasaki, *J. Biochem. (Tokyo)* 115 (1994) 689–692.
- [40] S.F. Poget, G.B. Legge, M.R. Proctor, P.J. Butler, M. Bycroft, R.L. Williams, *J. Mol. Biol.* 290 (1999) 867–879.
- [41] S. Sheriff, C.Y. Chang, R.A. Ezekowitz, *Nat. Struct. Biol.* 1 (1994) 789–794, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 103 (Erratum).
- [42] B.J. Graves, R.L. Crowther, C. Chandran, J.M. Rumberger, S. Li, K.S. Huang, D.H. Presky, P.C. Familletti, B.A. Wolitzky, D.K. Burns, *Nature* 367 (1994) 532–538.
- [43] J.S. Kastrup, B.B. Nielsen, H. Rasmussen, T.L. Holtet, J.H. Graversen, M. Etzerodt, H.C. Thogersen, I.K. Larsen, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54 (1998) 757–766.
- [44] K.K. Ng, K. Drickamer, W.I. Weis, *J Biol. Chem.* 271 (1996) 663–674.
- [45] J.A. Bertrand, D. Pignol, J.P. Bernard, J.M. Verdier, J.C. Dagorn, J.C. Fontecilla-Camps, *EMBO J.* 15 (1996) 2678–2684.

4.2 Resultados II

O conjunto de dados obtidos para conseguir cumprir os objetivos II (seção 2.2) foi reunido em um manuscrito, apresentado a seguir, sendo submetido para publicação no periódico *Toxicon*.

Identification of correlated epitopes from plant and snake venom lectins

Viviane Guimarães-Gomes^a, Helena C. Castro^b, Jorge A. Guimarães^c, Célia R. Carlini^d and
Russolina B. Zingali^{a*}

^a Laboratório de Hemostase e Venenos, Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

^b Laboratório de Antibióticos, Bioquímica e Modelagem Molecular. Instituto de Biologia. Universidade Federal Fluminense. Niterói/RJ, Brasil.

^c Laboratório de Proteínas e Peptídeos com ação na Hemostasia. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, Brasil.

^d Laboratório de Proteínas Tóxicas. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre/RS, Brasil.

*Correspondence should be addressed to: Dr^a. Russolina B. Zingali. Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde. Bloco H - 2º andar, sala 08 - Ilha do Fundão. Rio de Janeiro/RJ CEP: 21940-590, Brasil.

Fax: + 55 21 2270 8647

Email: lzingali@bioqmed.ufrj.br

Abstract

Polyclonal antibodies raised against BiL, a C-type lectin from *Bothrops insularis* snake venom, were showed to cross react with some lectins especially from order Fabales. Epitopic peptides were identified from a direct comparison of mass spectra of BiL tryptic peptides before and after anti-BiL incubation. The results indicate the existence of homologous regions that are shared with snake and plant lectins, although they do not present an important primary sequence and sugar binding similarities.

Keywords: Snake venom, C-type lectin, Antibody.

Bothrops genera (Viperidae family) comprising a large number of species which are responsible for the majority of snakebite envenomations and for more human morbidity in the Brazil than any other genus of venomous snakes (Fundação Nacional de Saúde, 2001). *Bothrops insularis* is a threatened with extinction snake, geographic isolated in Queimada Grande, an isle in South littoral of São Paulo state. The venom gland transcriptomes revealed the presence of lectin family proteins (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002). Thereafter, *B. insularis* C-type lectins have been isolated from venom and showed to bind galactose residues and present nephrotoxic activity (Guimarães-Gomes, *et al* 2003; Braga, *et al*, 2006).

In case of immunochemical experiments using antibodies against bothropic venom molecules: L-amino acid oxidase (Stábeli *et al*, 2005), phospholipase (Moura-da-Silva *et al*, 1991), BPPs (Tsuruta *et al*, 2006), thrombin-like (Claus and Mebs, 1989) and metalloproteinases (Mandelbaum *et al*, 1989) are the proteins generally used. In general, antibodies against lectin family have been only produced (Su *et al*, 2007) and used to identify their inhibitory effect against lectin-like activities (Ogilvie *et al*, 1989; Matsui *et al*, 2002), to investigate the structure-function relationship with different proteins as phospholipase (Gomes *et al*, 2007) or other lectins (Castro *et al*, 1998; Monteiro *et al*, 1998;

Du *et al*, 2002; Castro *et al*, 2003) from snake venoms and finally to screen the presence of lectin (Birrell *et al*, 2006; Birrell *et al*, 2007).

Meanwhile, plant lectins represent the largest and most comprehensively studied family of these sugar-bind proteins. Over 100 members of this family are known, almost all isolated from seed of the plant (Sharon and Lis, 1990; Loris *et al*, 1998) and, differently from snake venom C-type lectins, the biological function of plant lectins is known (Peumans and Van Damme, 1995; Peumans and Van Damme, 1998; Rüdiger and Gabius, 2001). In this study, an immunochemical approach was used to verify the presence of conformational and linear common epitopes, making a qualitative comparison among snake and plant lectins using polyclonal antibodies anti-BiL.

In previous experiments comparing the immunochemical properties of BiL, a C-type lectin from *B. insularis* venom, we have notice that antibodies cross reacted with some plant lectins. Although their divergent origin, the antigenic structure of the members of the lectin family may share many conformational (for native, folded protein) and linear (for denatured, unfolded protein) epitopes, made respectively of spatial and adjacent association of amino acid residues, possibly due to convergent evolution. Two rabbits were immunized *s.c.* with native or denatured BiL in polyacrylamide gel band and emulsified with Freud's complete adjuvant as described by Castro *et al*, 1999. After an additional booster, sera were separated and IgGs (IgG_n and IgG_d for native and denatured BiL, respectively) were purified using protein-A affinity chromatography (Pharmacia Biotech). The cross-reactivity was tested by ELISA. Figure 1 shows that anti-BiL antibodies presented reactivity with some lectins of plants particularly from Fabales order. IgGs cross-reacted with lectins from *Lens culinaris* > *Cratylia floribunda* > *Phaseolus vulgaris* > *Parkia platycephala* > *Cicer arietinum* > *Canavalia ensiformis* > *Vicia macrocarpa* leguminosae. However tested lectins derived of plants from other orders: Rosales (*Artocarpus integrifolia*), Brassicales (*Moringa oleifera*),

Solanales (*Solanum tuberosum*) and Dipsacales (*Sambucus nigra*) did not react with anti-BiL IgGs (Figure 1). It is interesting to note that different between BiL (a galactose binding lectin that belongs to C-type family) and these lectins that belongs to legume family (Arason, 1996) bind D-mannose and D-glucose sugars in the presence of manganese (or other transition metal) and calcium ions (Sharon and Lis, 1990).

We then decided to identify common epitopes in these lectins using the method described by Kiselar and Downard, 1999. For that purpose we used *L. culinaris* lectin that presented the higher immunological identity to BiL. Both lectins were submitted to SDS-PAGE and in-gel digestion with trypsin (Promega) at 37°C for 12h. A portion of the resulting tryptic peptide solution was concentrated and reacted directly with purified IgG_d_anti-BiL (1:1, 2h at 4°C). The IgG_d was used for identify the common linear epitopes, to adjacent association of amino acids residues, indicated in figure 1. No trifluoroacetic acid was added and no attempt was made to remove antibody as previously described. Tryptic peptides from lectins pretreated or not with BiL antibodies were added to a matrix solution (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) and submitted to MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) mass spectrometer (ABI 4700 model, Applied Biosystems-AB). The spectra were visualized using Data Explorer software (AB) and each sample in the presence and absence of IgG_d was compared. A rigorous criterion select only the 100% suppress lectin peptide. The total obtained peptides of BiL were 21 in the acquisition mass range from 1 to 3 kDa. After IgG_d incubation, 90% of these peptides were completely suppressed. The 1417.7318 peptide corresponds to 62-73 amino acid position, precede the 76-100 loop, an important region for homodimeric integrity and sugar bind preservation (Guimarães-Gomes, *et al* 2004). This peptide was selected for further analysis because the equivalent epitopes suppressed in *L. culinaris* lectin, 1095.6829 and 1471.7883 m/z (138-147 and 44-55 amino acid positions, respectively) (Figure 2 - C, E) have similar

primary sequence to this BiL epitope (Figure 2 - A, B). The sequences were confirmed by peptide fragmentation (Figure 2 – B, D, F). The peptide with 1380.8 m/z of *L. culinaris* lectin also was suppressed, but its MS/MS confirmation was not possible.

The lectin studies are limited by a lack of structural understanding. This methodology utilized is an interesting tool to identify common peptides among lectins from different families as C-type snake venom and legume lectins. Surprisingly, the cross-reaction exhibited by *B. insularis* lectin and some plant lectins suggests important sites of common antigenicity, not previously shown. Further advances may be made in the near future to identify evolutionary, structural and functional relationships in this class of toxins.

Acknowledgements

This research was supported by CAPES (PROCAD-Program), CNPq and FAPERJ. We thank also the Rede Proteômica do Estado do Rio de Janeiro for use of mass spectrometry equipment and Ana Lúcia Oliveira-Carvalho, Dione M. Silva and Patrícia R. Guimarães for their technical assistance.

References

- Arason, G.J., 1996. Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*. 6 (4), 277-289.
- Berger, B.J. and Bhatti, A.R., 1989. Snake venom components and their cross-reactivity: a review. *Biochem Cell Biol*. 67 (9), 597-601.
- Birrell, G.W., Earl, S., Masci, P.P., de Jersey, J., Wallis, T.P., Gorman, J.J., Lavin, M.F., 2006. Molecular diversity in venom from the Australian Brown snake, *Pseudonaja textilis*. *Mol Cell Proteomics*. 5 (2), 379-389.
- Birrell, G.W., Earl, S.T., Wallis, T.P., Masci, P.P., de Jersey, J., Gorman, J.J., Lavin, M.F., 2007. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Mol Cell Proteomics*. 6 (6), 973-986.
- Braga, M.D., Martins, A.M., Amora, D.N, de Menezes D.B., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Marangoni, S., Barbosa, P.S., de Sousa Alves, R., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S., 2006. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*. 47 (8), 859-867.
- Castro, H.C., Dutra, D.L., Oliveira-Carvalho, A.L., Zingali, R.B., 1998. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. 36 (12), 1903-1912.
- Castro, H.C., Fernandes, M., Zingali, R.B., 1999. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon*. 37 (10), 1403-1416.
- Castro, H.C., Lemos, M.G.J., Bon, C., Zingali, R.B., 2003. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. *Toxicon*. 41 (4), 525-528.
- Claus, I. and Mebs, D., 1989. Cross-neutralization of thrombin-like enzymes in snake venoms by polyvalent antivenoms. *Toxicon*. 27 (12), 1397-1399.

- Du, X.Y., Clemetson, J.M., Navdaev, A., Magnenat, E.M., Wells, T.N., Clemetson, K.J., 2002. Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. *J Biol Chem.* 277 (38), 35124-35132.
- Fundação Nacional de Saúde, 2001. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos, 2 ed. Brasília, pp. 09-12.
- Gomes, P.C., Machado de Avila, R.A., Selena Maria, W., Richardson, M., Fortes-Dias, C.L., Chávez-Olórtegui, C., 2007. The co-purification of a lectin (BJcuL) with phospholipases A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom by immunoaffinity chromatography with antibodies to crotoxin. *Toxicon.* 49 (8), 1099-1108.
- Guimarães-Gomes, V., Oliveira-Carvalho, A.L., Junqueira-de-Azevedo I.L., Dutra, D.L.S., Pujol-Luz, M., Castro, H.C., Ho, P.L., Zingali, R.B., 2004. Cloning, characterization and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 432 (1), 1-11.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M. and Ho, P.L., 2002. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of Expressed Sequence Tags (ESTs). *Gene.* 299 (1-2), 279-291.
- Kiselar, J.G. and Downard, K.M., 1999. Direct identification of protein epitopes by mass spectrometry without immobilization of antibody and isolation of antibody-peptide complexes. *Anal Chem.* 71 (9), 1792-1801.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., 1998. Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta.* 1383 (1), 9-36.
- Mandelbaum, F.R., Serrano, S.M., Sakurada, J.K., Rangel, H.A., Assakura, M.T., 1989. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the Crotalinae and Viperinae subfamilies. *Toxicon.* 27 (2), 169-177.
- Matsui, T., Hamako, J., Matsushita, T., Nakayama, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2002. Binding site on human von Willebrand factor of bitiscetin, a snake venom-derived platelet aggregation inducer. *Biochemistry.* 41 (25), 7939-7946.
- Monteiro, R.Q., Yamanouye, N., Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Bon, C., Zingali, R.B., 1998. Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principles in individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions. *Toxicon.* 36 (1), 153-163.
- Moura-da-Silva, A.M., Cardoso, D.F., Tanizaki, M.M., Mota, I., 1991. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. *Toxicon.* 29 (12), 1471-1480.
- Ogilvie, M.L., Byl, J.W., Gartner, T.K., 1989. Platelet-aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. *Thromb Haemost.* 62 (2), 704-707.
- Peumans, W.J. and Van Damme, E.J., 1998. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 33 (3), 209-258.
- Pneumans W.J. and Van Damme E.J.M., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109 (2), 347-352.
- Rüdiger, H. and Gabius, H.J., 2001. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J.* 18 (8), 589-613.
- Sharon N. and Lis H., 1990. Legume lectins--a large family of homologous proteins. *FASEB J.* 4 (14), 3198-3208.
- Stábeli, R.G., Magalhães, L.M., Selistre-de-Araujo, H.S., Oliveira, E.B., 2005. Antibodies to a fragment of the *Bothrops moojeni* l-amino acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent protein. *Toxicon.* 46 (3), 308-317.
- Su, L.J., Xiao, L., Zhan, T., Chen, L., Dong, Y.Q., Fang, L., Cheng, L.S., Liu, J., 2007. Preparation and identification of monoclonal antibodies against snake venom C-type lectin like protein Agkisacutacin. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 23 (11), 1031-1033.
- Tsuruta, L.R., Hayashi, M.A., Konno, K., Tambourgi, D.V., Assakura, M.T., Camargo, A.C., Sant'Anna, O.A., 2006. A natural carrier effect and the generation of specific antibodies to biologically active peptides. *Anal Biochem.* 353 (2), 174-180.

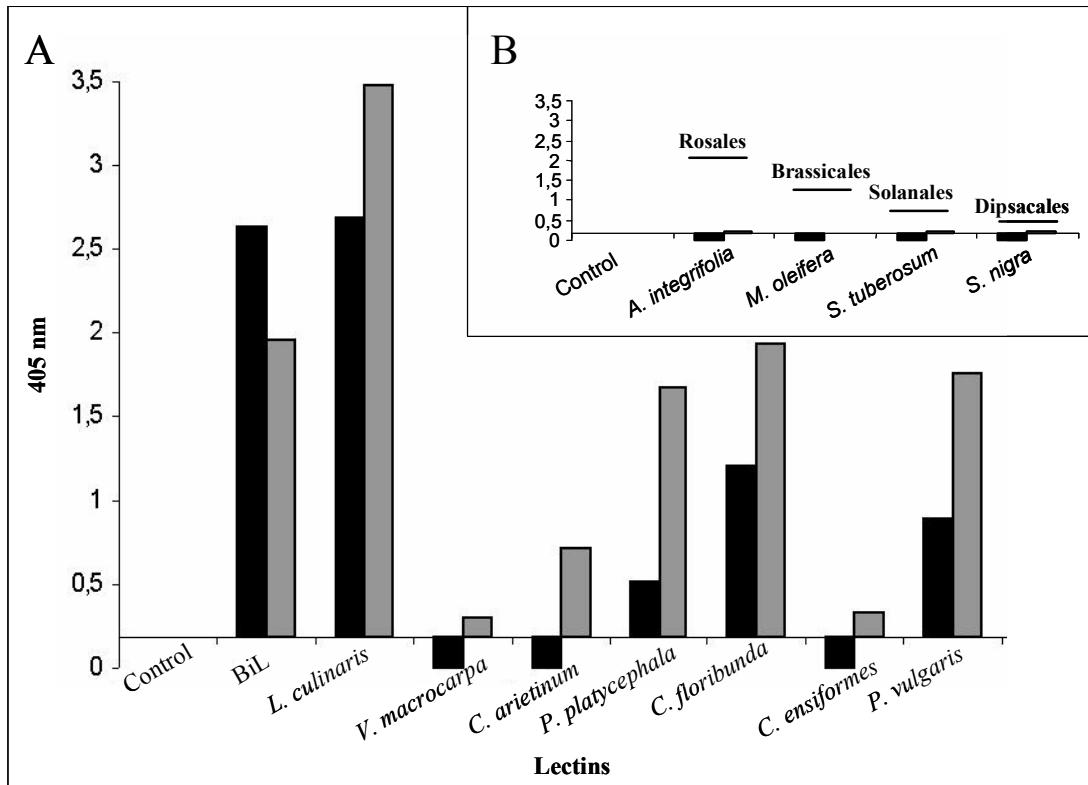


Figure 1. Immunochemical reactivity of BiL or plant lectins (5 $\mu\text{g/ml}$) with polyclonal IgGs directed against native (IgG_n 1:10³, black bar), or denatured BiL (IgG_d 1:500, gray bar). The lectins were purified from Fabales (A) or Rosales, Brassicales, Solanales and Dipsacales (Insert B) plant orders. Anti-IgG conjugated to alkaline phosphatase (SIGMA, 1:5000) was used as the secondary antibody and color was developed with chromogenic substrates (nitro-blue tetrazolium and bromo-chloro-indol-phosphate). Values are medium of the absorbance (405 nm) of two independent experiments after 1 h reaction in a microplate reader (Thermomax). A non immunized rabbit serum was tested in parallel and subtract (control).

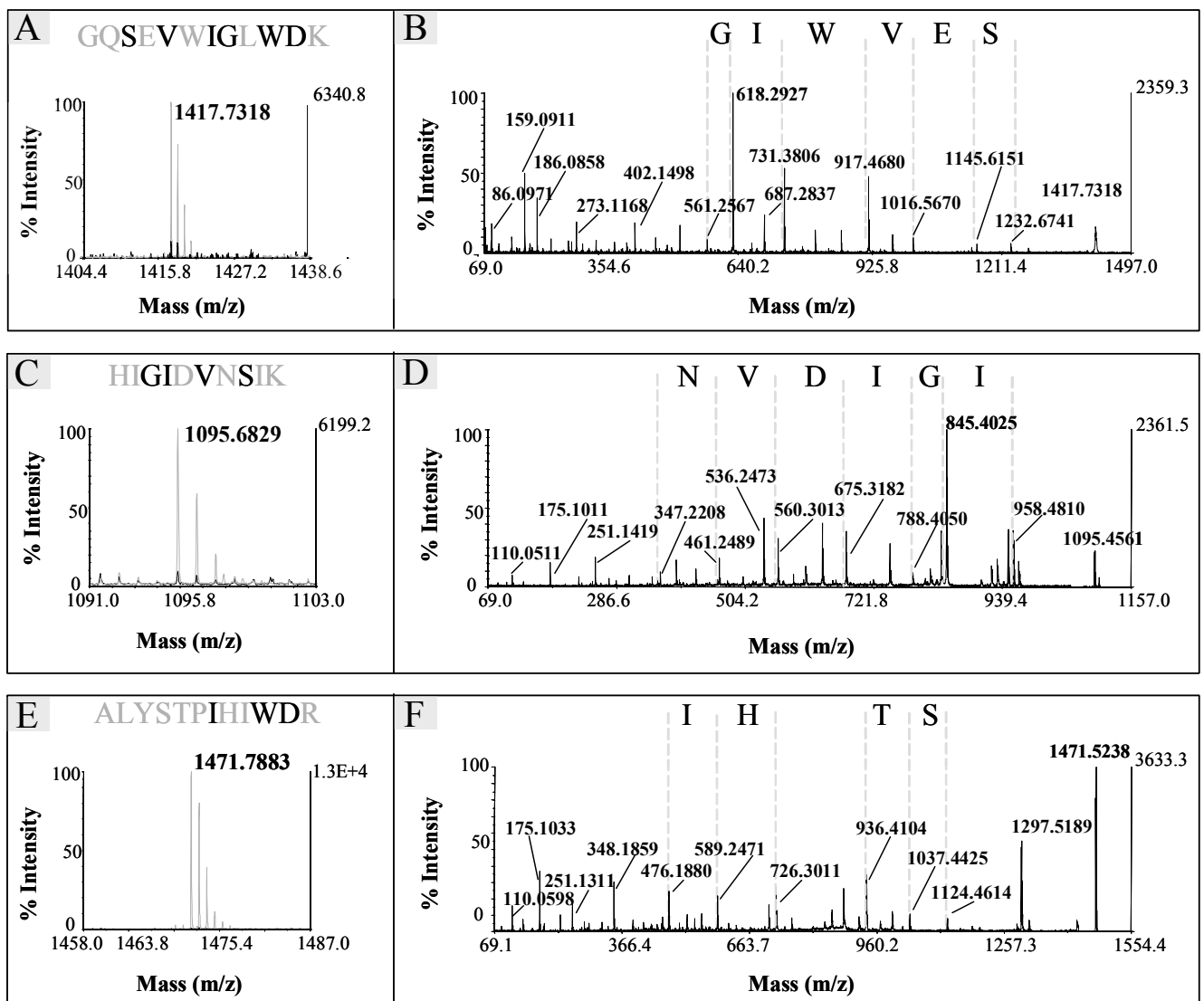


Figure 2. MS and MS/MS spectra of peptides suppressed by anti BiL antibodies. Comparison of the one peptide sequence of BiL (A) and two of *Lens culinaris* lectin (C and E) identified using the PeptideMass software (available in <http://au.expasy.org>) that were suppressed after (black line) versus before (gray line) IgG₄ reaction. The identical amino acids are indicated in black. The mass fragmentation (B, D and F) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry confirms the peptide sequence. The Calmix2 (AB) was used to automatic external calibration in the reflector mode of operation.

4.3 Resultados III

Os dados obtidos para cumprir os objetivos III (seção 2.3) são apresentados a seguir e serão reunidos em um manuscrito a ser submetido em breve a um periódico internacional.

Para dar início aos experimentos de biologia molecular, primeiramente foi selecionada a célula hospedeira. A bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* foi escolhida por já ter sido utilizada anteriormente na expressão da lectina tipo-C botrópica de *B. jararacussu* (Kassab *et al*, 2004). Além disso, este é um organismo bastante conhecido, de manipulação barata e principalmente de crescimento rápido em curto tempo de geração.

O clone gerado na biblioteca de cDNA da glândula da serpente *B. insularis* foi inserido por choque térmico em bactérias competentes *E. coli* XL1-Blue. Estas células cresceram em meio LB e o DNA plasmidial foi purificado. O fragmento de DNA que codifica BiLr foi amplificado por técnica de PCR (utilizando os *primers* que foram desenhados para a seqüência de nucleotídeos de BiL) (Figura 04). Os *primers* que foram desenhados para anelar as regiões codificantes N e C - terminais de BiLr, incluíram sítios de clivagem para enzimas que foram selecionadas a partir de seu mapa de restrição. Em seguida, este inserto de BiLr foi cortado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I, purificado a partir de um gel de agarose 0,85 %, sendo inserido em um vetor de seqüenciamento pGEM-T *easy* para conferir por seqüenciamento se houveram erros durante a amplificação por PCR.

O vetor pGEM-T *easy* (Figura 05, Painel A) possui como marcador de seleção um gene de resistência à ampicilina e o gene que codifica a enzima β -galactosidase, onde está localizado um sítio múltiplo de clonagem. Este vetor possui extremidades coesivas

constituídas por timidinas que facilitam a ligação do inserto pela T4 DNA ligase, já que a maioria das Taq DNA polimerases terminam a polimerização pela adição de bases adenina nas terminações 3' do fragmento amplificado. Além disso, não há a necessidade de que o DNA deste vetor seja digerido com enzimas de restrição. Em seguida, o DNA plasmidial recombinante foi inserido na bactéria hospedeira XL1-Blue por transformação pelo método de eletroporação. Nesse método, a bactéria hospedeira é submetida a um choque elétrico, durante um período curto de tempo, o qual torna a parede celular permeável à entrada do plasmídeo. Em placa LB-ágar ampicilina/X-gal/IPTG, a seleção dos clones recombinantes foi feita pela análise dos clones com coloração branca, indicando a inativação do gene de β -galactosidase (*LacZ*) pela inserção do fragmento amplificado.

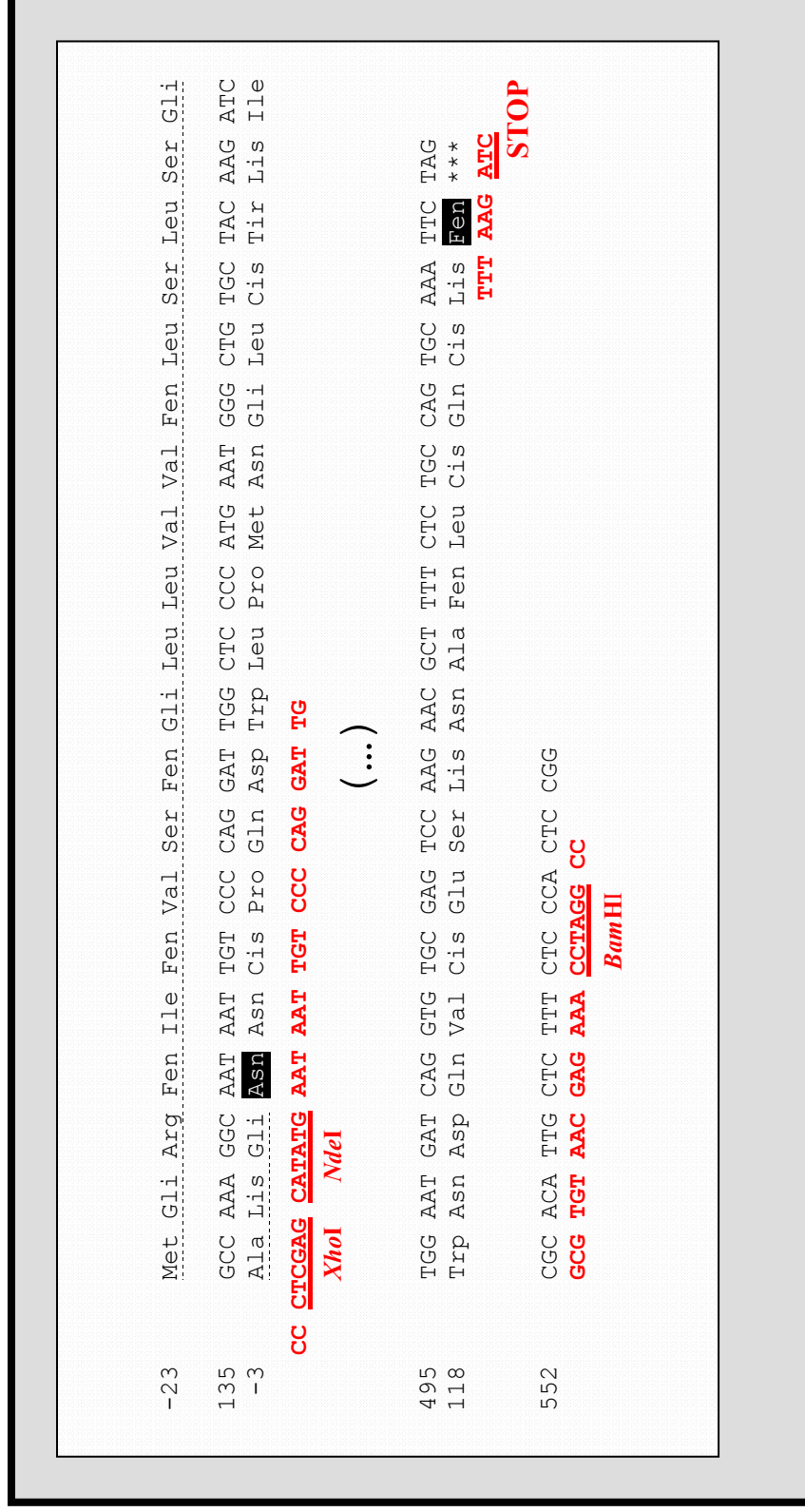


Figura 04. Localização dos oligonucleotídeos sintéticos na sequência de cDNA de BiL. No painel A, estão destacados: o peptídeo sinal (sublinhado pontilhado), o primeiro e último aminoácidos da proteína madura (caixas escuras) e os dois *primers* (em vermelho) com seus respectivos sítios de restrição nas regiões N- (*XhoI*, *NdeI*) e C- (*BamHI*) terminais.

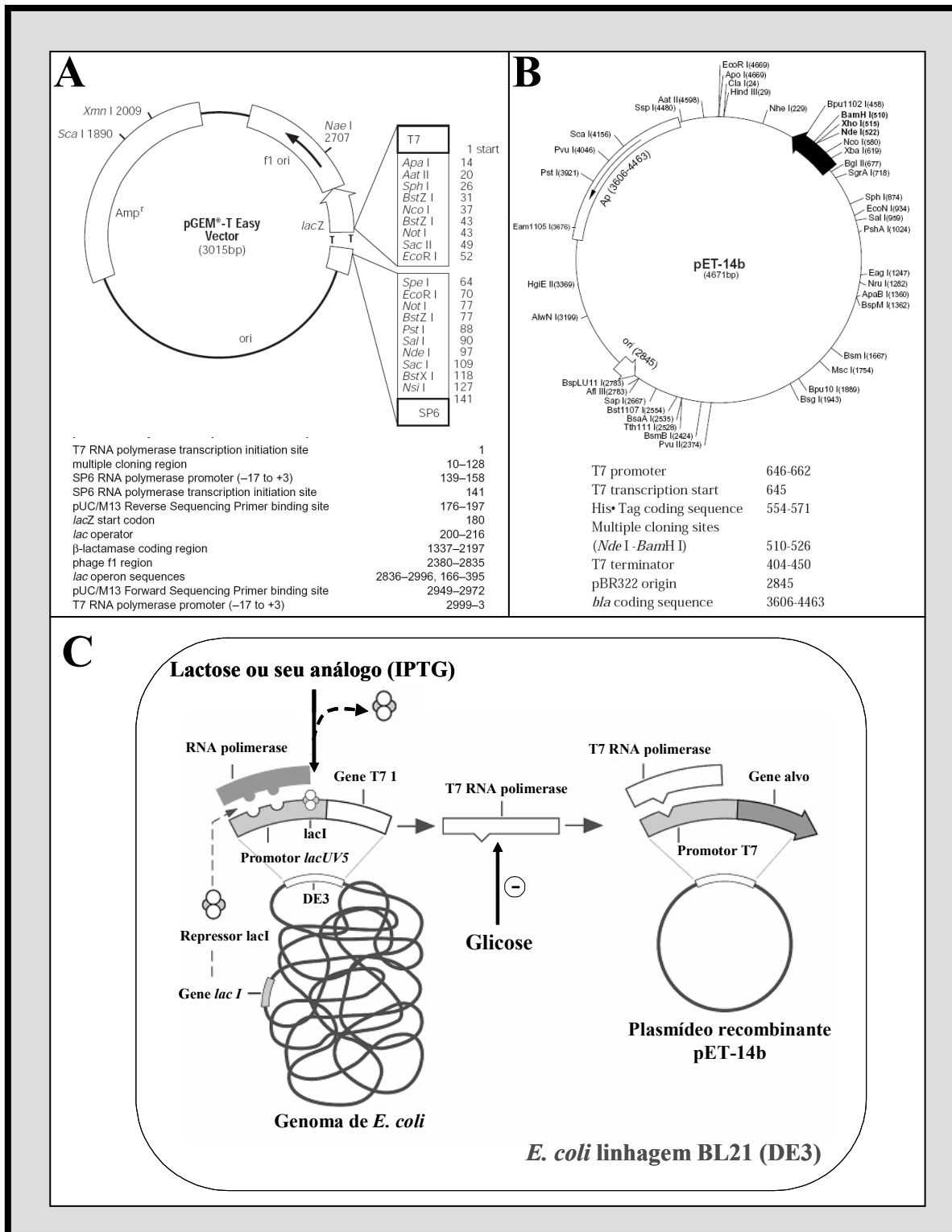


Figura 05. Vetores utilizados. Mapas e seu pontos de referência nas sequências dos vetores de sequenciamento pGEM-T *easy* e de expressão pET-14b (painéis A e B). Em C, está ilustrado o esquema resumido da expressão do gene alvo em vetor pET-14b.

A seqüência do inserto foi confirmada depois de amplificação por PCR e análise em seqüenciador automático de nucleotídeos. Diante da confirmação da seqüência correta da lectina, esta foi clonada em um vetor de expressão pET-14b (Figura 05, Paineil B) e o DNA plasmidial foi transformado por choque térmico em bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3). O vetor pET-14b possui 4.671 pb e foi escolhido por carregar uma seqüência (His)₆ ou His *tag* na sua região N-terminal o que facilita uma posterior purificação da proteína recombinante, além disso o plasmídeo pET-14b possui o gene *bla* que confere resistência à ampicilina e um promotor T7 na qual a T7 RNA polimerase se liga, após ter sua ser expressão induzida por IPTG. Este clone foi inserido em células da linhagem BL21 (DE3) que é reconhecidamente a mais utilizada para expressão de genes alvo, por ser deficiente na protease *lon* e na protease de membrana externa *ompT* que podem degradar proteínas durante a purificação (Grodberg e Dunn, 1988).

A lectina não foi facilmente expressa em grandes quantidades em *E. coli*, muito provavelmente devido a sua toxicidade celular, sendo este fato observado já nos primeiros experimentos piloto de expressão. Desse modo, consistiu um desafio identificar condições ideais para expressar esta proteína em grande quantidade, já que o protocolo utilizado para a lectina de *B. jararacussu* não se mostrou eficiente, ou seja, não foi observada uma banda de super-expressão em gel de poliacrilamida, apesar do monômero de BiLr ter presença confirmada por *Western blot* (Figura 06, Paineil B).

Para então melhorar o rendimento de BiLr, algumas alterações no protocolo original foram feitas. Em uma delas, a temperatura durante a indução foi alterada para de 37 °C para 30 °C ou 28 °C na tentativa de diminuir a síntese de proteínas bacterianas, controlando a produção da proteína recombinante que parece ser tóxica, além de minimizar a perda do plasmídeo recombinante e tentar aumentar a solubilização de BiLr. Esta

mudança no protocolo surtiu um efeito discreto no aumento da intensidade da banda eletroforética (dado não mostrado) e a mudança da temperatura de indução para 28 °C foi incorporada ao novo protocolo. A alteração que causou um efeito drástico na expressão foi a adição de glicose 2 % ao meio LB, que diminuiu a expressão de BiLr e aumentou a estabilidade do vetor recombinante.

Quando as culturas com células hospedeiras atingem a fase estacionária (*overnight*) como foi o caso destes experimentos, ou quando o gene alvo codifica uma proteína tóxica; a glicose disponível é rapidamente consumida e outra fonte de carbono como o glicerol é utilizada. O metabolismo da fonte alternativa de carbono causa aumento dos níveis de AMP cíclico (cAMP), o que estimula a transcrição do promotor *lacUV5* e subsequente expressão da enzima T7 RNA polimerase e do gene alvo de interesse (Figura 05, Painel C). Todavia, se a atividade basal da T7 RNA polimerase é alta demais, a transcrição do DNA alvo no plasmídeo induzida pelo promotor T7 é desestabilizada. Como descrito por Grossman *et al* em 1998, a minimização dos níveis de expressão basal da T7 RNA polimerase é necessária para manter a estabilidade do vetor pET e pode ser mantida suplementando o meio com glicose. Sendo assim, uma significativa diminuição da transcrição basal do promotor *lacUV5* é observada quando o meio é suplementado com glicose, na fase estacionária de crescimento bacteriano.

Após várias concentrações de glicose ter sido testadas 2-10 %, sem alteração substancial no aumento da expressão, acompanhada pela visualização da banda em gel de poli-acrilamida da fração insolúvel (dado não mostrado); a concentração de 2 % de glicose foi incorporada ao protocolo. A concentração de IPTG para a indução foi também modificada, sendo reduzida de 1 mM para 0,1 mM sem prejuízo da expressão proteica, sendo a concentração adotada no novo protocolo. Os monômeros da lectina foram

expressos como agregados insolúveis em corpos de inclusão (Figura 06, Painel B, Coluna 5) que foram reconhecidos pelo anticorpo anti-His *tag*. Estas associações de proteínas na fração insolúvel são devido à associação com lipídios bacterianos e podem ser convertidos à fração solúvel se adicionado ao tampão de lise, detergentes não iônicos ou zwitteriônicos (Brennan e Lin, 1996). Contudo, a inclusão de uma etapa adicional contendo o detergente não iônico Triton X100 ao protocolo de purificação dos corpos de inclusão, não afetou de maneira positiva a solubilização das proteínas dos corpos de inclusão e foi descartada. A presença do His *tag* foi identificada por reconhecimento do anticorpo (Figura 06, Painel B) na fração insolúvel, sendo solubilizada utilizando uma alta concentração de uréia.

Como carrega no N-terminal o His *tag*, a lectina recombinante foi purificada utilizando a coluna de cromatografia de afinidade com níquel (íon Ni^{+2}) imobilizada na qual a histidina se liga, sendo eluída em tampão contendo imidazol (Figura 06, Painel C, coluna 6). Como observado no gel de poliacrilamida, mesmo com otimização do protocolo de re-enovelamento aproximadamente metade da quantidade de lectina não foi dimerizada corretamente (banda de 16 kDa). A etapa seguinte de purificação em cromatografia de filtração em gel foi necessária para eliminar os contaminantes como a proteína em estado monomérico que não foi corretamente re-enovelada (Figura 07, Painel A).

Várias alterações de protocolos foram necessárias para gerar um homodímero ativo. O desafio foi purificar um homodímero com capacidade hemaglutinante preservada. O protocolo contendo fosfato de sódio que foi recomendado pelo fabricante da resina foi rapidamente abandonado por causar maciça precipitação da proteína, de maneira que ao ser novamente solubilizada não possuía capacidade hemaglutinante. A substituição do fosfato pelo tampão tris-salino e tris-salino contendo cálcio que já foi utilizado anteriormente (Kassab *et al*, 2004) melhorou significativamente este efeito, porém continuava a gerar um

homodímero sem atividade. Um protocolo de re-enovelamento por diálise utilizando um protocolo oxidante (Selistre-de-Araújo *et al*, 2000) utilizado com sucesso para outras toxinas recombinantes de venenos, as metaloproteases, também foi testado. Este protocolo além de oneroso foi bastante demorado. Após uma semana de várias trocas de diálise a proteína recombinante teve testada sua capacidade hemaglutinante. Este protocolo não foi considerado satisfatório porque apenas uma pequena fração da amostra formou o dímero, sendo observado um pico referente ao monômero bem mais intenso (sem atividade hemaglutinante) em cromatografia de filtração em gel (dado não mostrado), sendo a proporção dímero/monômero observada na cromatografia bem menor que a esperada.

O melhor protocolo, dentre as muitas variações de concentrações de sais utilizados para favorecer as interações moleculares, foi com a utilização de galactose durante o processo de re-enovelamento com gradiente decrescente de uréia na própria coluna de afinidade. Açúcares têm sido descritos como importantes no re-enovelamento correto de lectinas, formando proteínas com capacidade hemaglutinante preservada (Campana *et al*, 2002). A galactose é o monossacarídeo ligante preferencial de BiL e foi utilizada no processo de re-enovelamento para favorecer a formação correta da lectina homodimérica recombinante. Porém, não foi suficiente para re-envovelar completamente a amostra (Figura 06, Painel C, Coluna 6) a um homodímero de 32 kDa, sendo que esta banda desaparece após uma pré-incubação com DTT (dado não mostrado) confirmando a ponte inter-cadeia.

A proteína recombinante foi então eluída utilizando-se este protocolo e submetida a uma nova etapa de purificação por cromatografia de filtração em gel em sistema HPLC (Figura 07, Painel A). O pico contendo a lectina recombinante dimérica foi monitorado a 280 nm e o volume de retenção da proteína recombinante foi de ~ 24 ml, tendo a proteína

nativa um volume de retenção de ~ 18 ml. Não é possível estimar o tamanho por este método, pois como também observado para a proteína nativa, o volume de retenção está fora da curva de calibrantes (albumina 45 kDa 11 ml, tripsinogênio 24 kDa 13 ml e lisozima 14 kDa 17 ml), muito provavelmente este fato se deve a interação com a matriz *Superdex* G-75 (formada de agarose e dextran), retardando o tempo de retenção destas lectinas. O dímero (carga + 2) foi identificado também por espectrômetria de massas. A diferença observada no painel C da figura 07, entre as massas de BiL nativa (16.217,85 m/z) e recombinante (18.475,58 m/z) é referente à massa de seis histidinas adicionais (103,01 Da de cada uma) por cadeia que compõem o (His)₆ tag, além do sítio de clivagem para a enzima trombina (peptídeo Leu-Val-Pro-Arg-Gli-Ser) presentes na porção N-terminal de BiLr (Figura 07, Painel D).

A atividade hemaglutinante da proteína recombinante foi recuperada, porém foi pelo menos duas vezes menor que a da proteína purificada do veneno de *B. insularis*, sendo esta atividade também inibida na presença de EDTA ou galactose (Figura 07, Painel B). O rendimento da proteína como homodímero ativo foi de ~ 6 mg por litro de meio de cultura.

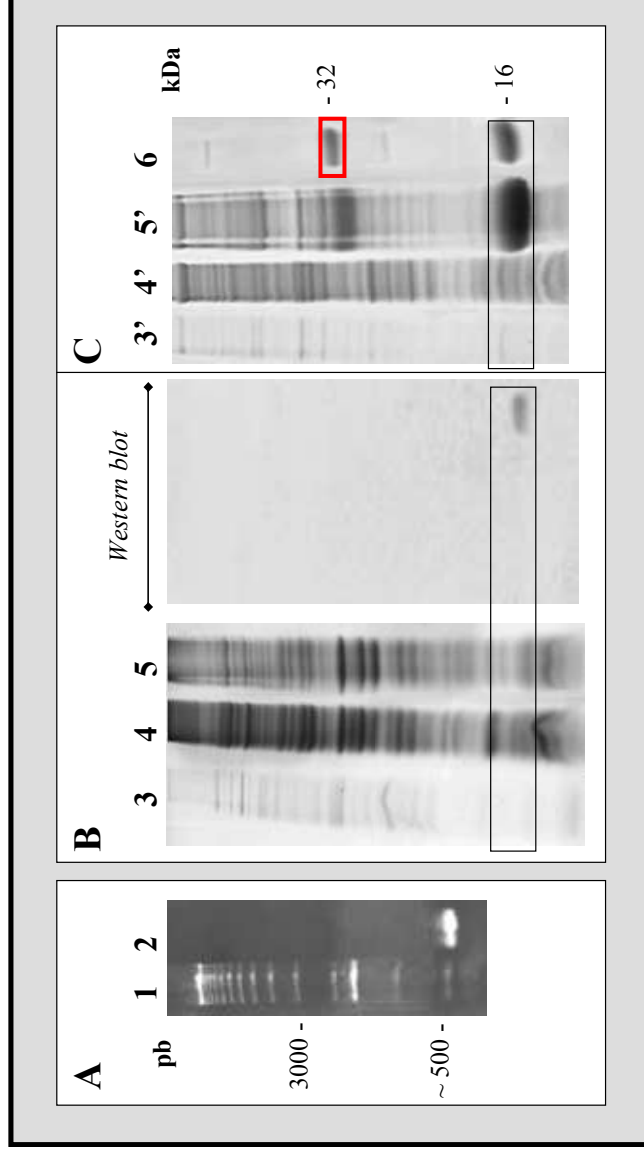


Figura 06. Géis de eletroforese de agarose e poliacrilamida. No painel A, fotografia de gel de agarose 0,85 %, utilizando 1 kb *plus* DNA *ladder* como padrão de DNA (6.000-500 pb) (coluna 1) e o produto de PCR de BiLr após incubação com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I (coluna 2). Esta banda foi purificada para ser inserida nos vetores. Em B e C, gel de poliacrilamida 15 % do meio de cultura (3), sobrenadante solúvel após lise bacteriana (4) e corpos de inclusão insolúveis solubilizados (5), antes (3, 4, 5) e depois (3', 4', 5') das mudanças no protocolo de expressão. O painel B apresenta também o resultado de um *Western blot* utilizando anticorpo anti-His *Tag*, evidenciando um reconhecimento nos corpos de inclusão (coluna 5). Na coluna 6 do painel C, BiLr após o re-enovelamento. O quadrado preto mostra a região do gel que corresponde ao monômero da BiL e o quadrado vermelho, a região do dímero.

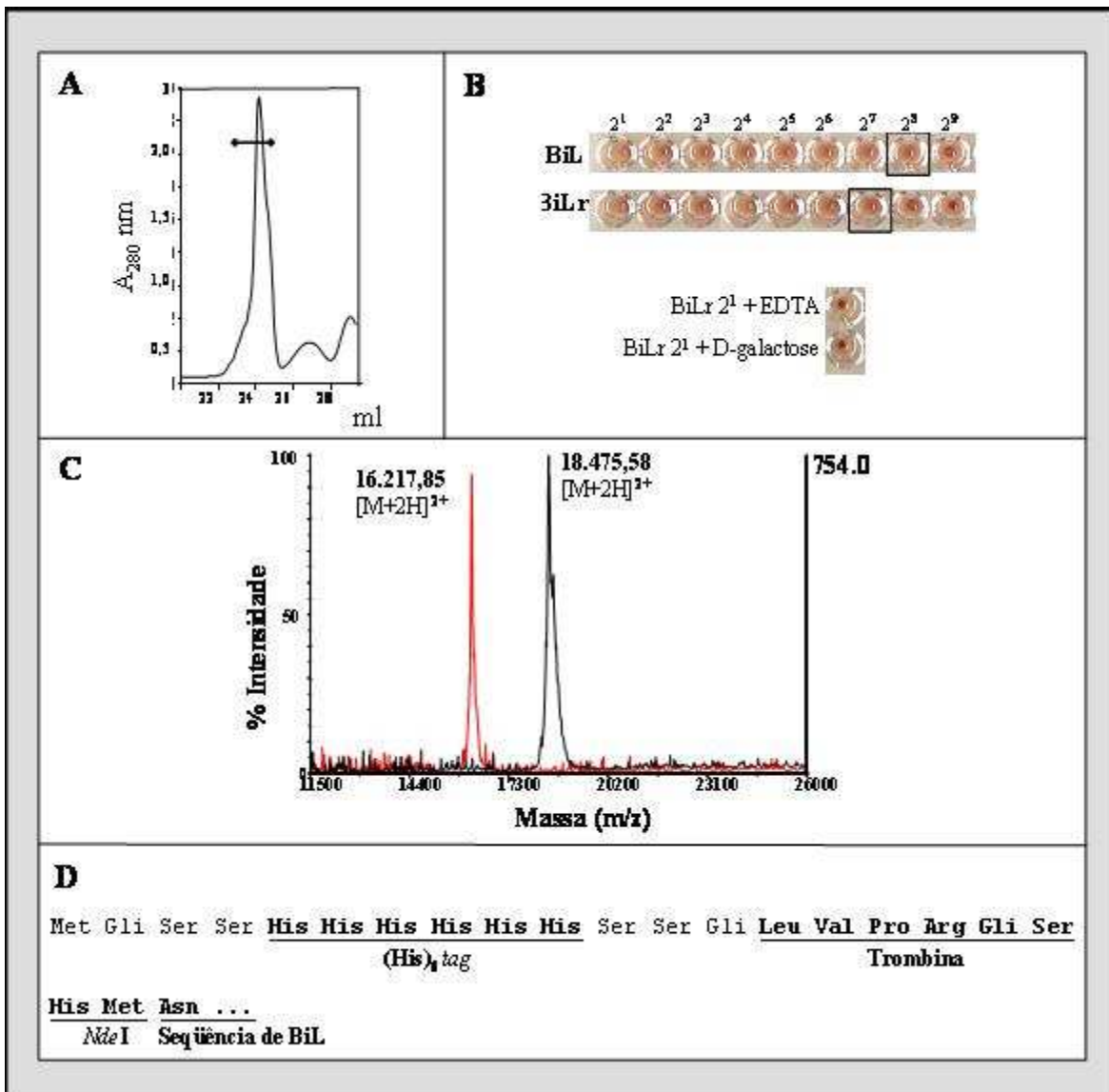


Figura 07. Segunda etapa de purificação da lectina recombinante e hemaglutinação. A lectina recombinante purificada utilizando coluna *Superdex G-75* em sistema HPLC (painel A) foi incubada por 1 h com hemácias de coelho a 2 % (painel B). Foram utilizadas diluições seriadas de 5 μg de BiL e BiLr ($5/2^1$ - $5/2^9$) em tampão CTBS. No painel B está mostrado também, a inibição da hemaglutinação na presença de EDTA (1 mM) e galactose (20 mM), utilizando a menor diluição da lectina BiLr. Uma alíquota do pico purificado (10 μl) foi submetida a um espectrômetro de massas MALDI-TOF (linha preta, painel C), utilizando os seguintes parâmetros: modo de operação linear,

voltagem de 25 kV, tempo de extração de 500 ns, faixa de aquisição das massas de 9 a 50 kDa e calibração interna utilizando as massas 16.217,85 (linha vermelha, painel C) e 32.372,48 m/z de BiL. No painel D, está destacada a porção N-terminal da proteína recombinante, com seus 21 aminoácidos adicionais (2.311,02 Da), contendo: o His tag, os sítios de restrição para trombina e *NdeI* e o início da seqüência de BiL (sublinhados).

A atividade biológica e o papel durante o processo de envenenamento das lectinas de veneno ainda constitui uma questão relevante a ser respondida cientificamente. Uma vez que o veneno ofídico entra em contato com as proteínas plasmáticas resolvemos identificar *in vitro* glicoproteínas séricas que interajam com a BiL. Esperamos assim poder, inferir possíveis funções biológicas desta lectina durante o empoçonhamento. Assim, uma resina de cromatografia de afinidade contendo BiLr foi submetida à interação com soro humano. As proteínas que interagem com esta lectina recombinante foram eluídas em duas etapas: utilizando lactose 0,1 M, seguida de uma eluição com EDTA 1 mM e os retidos foram submetidos a um gel de poliácridamida (Figura 08). De maneira paralela, uma resina contendo a lectina nativa (CNBr-BiL) e outra vazia (CNBr-Ø), foram usadas como controles.

Conforme já descrito anteriormente, as lectinas tipo-C verdadeiras se ligam a açúcares de maneira reversível na presença de cálcio. A eluição com o açúcar lactose demonstrou a eluição de pelo menos quatro proteínas que interagem com BiL e apenas 3 com a lectina recombinante. Uma das bandas de ~ 25 kDa foi eluída da coluna contendo BiLr, apenas quando esta foi submetida a um tampão contendo EDTA, sugerindo uma interação mais forte com a proteína recombinante, necessitando de uma eluição de forma

mais drástica, quelando os íons divalentes. As proteínas identificadas por setas (Figura 08) foram hidrolizadas utilizando o protocolo de digestão *in gel* com a enzima tripsina para futura identificação utilizando espectrômetro de massas.

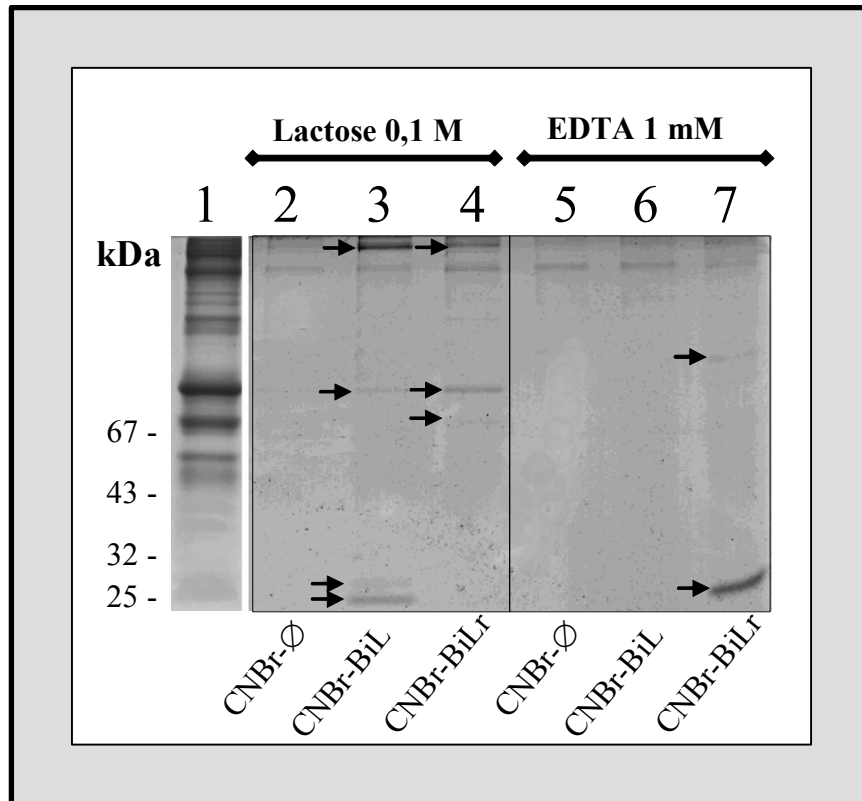


Figura 08. Eletroforese das proteínas séricas que se ligam a BiLr. A amostra eluída (500 μ g) contendo atividade hemaglutinate foi reunida após várias purificações e imobilizada em resina CNBr-activated *Sepharose 4B*, no qual 1 ml de plasma humano depletado de IgGs e albumina foi aplicado (10 μ l, coluna 1) e analisado por SDS-PAGE 12 %. Na coluna 4, alíquota das proteínas que se ligam a BiLr (50 μ l) sendo eluídas utilizando lactose 0,1 M e na coluna 7, alíquota (50 μ l) utilizando EDTA 1 mM. Em paralelo, o mesmo protocolo foi utilizado com a resina vazia (colunas 2 e 5) e com lectina nativa (colunas 3 e 6).

5. DISCUSSÃO

5.1 Discussão

A partir da biblioteca de cDNA construída por pesquisadores do Butantan para a glândula de veneno de um espécime de *Bothrops insularis* (Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2002), um clone de 927 pares de bases (*GenBank*: AY522720) foi identificado como pertencente à família das lectina tipo-C. Este clone teve confirmado sua presença no veneno bruto desta serpente por técnicas de espectrometria de massas e sequenciamento automático. Em seguida, passou-se a purificação desta proteína denominada lectina de *Bothrops insularis* (BiL) a partir do veneno bruto em duas etapas cromatográficas: afinidade e filtração em gel. O rendimento da proteína purificada foi de aproximadamente 0,5 %, sendo este dado compatível com os obtidos com as lectinas de venenos de outras serpentes, como: *Agkistrodon p. piscivorus* 0,5 % (Komori *et al*, 1999), *Bothrops jararaca* 0,4 % (Ozeki *et al*, 1994) e *Trimeresurus okinavensis* 0,4 % de rendimento (Nikai *et al*, 2000). BiL foi submetida a um gel de eletroforese de poliacrilamida desnaturante sob condições redutoras, caracterizando-se como uma proteína homodimérica de subunidades de ~ 16 kDa ligadas por uma ponte dissulfeto. Estas características são similares as lectinas botrópicas descritas em *B. atrox*, *B. godmani*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. pirajai* (Gartner *et al*, 1980, Lomonte *et al*, 1990c, Ozeki *et al*, 1994, Pereira-Bittencourt *et al*, 1999 e Havt *et al*, 2005; respectivamente).

Um ensaio competitivo, onde inibidores foram testados quanto à sua capacidade de impedir a hemaglutinação induzida por BiL, revelou que esta proteína se liga preferencialmente à lactose, D-galactose e D-fucose (concentrações mínimas requeridas de

8 mM, 16 mM e 18 mM, respectivamente). A atividade não foi afetada por N-acetil-galactosamina, D-glicose, N-acetil-D-glucosamina, maltose, D-manose e sacarose. O EDTA bloqueou fortemente a atividade hemaglutinante da lectina de *Bothrops insularis*. Podemos observar que o açúcar glicose sozinho não afetou a hemaglutinação, ainda quando associado com outra molécula de glicose (maltose). Porém, a associação entre glicose e galactose (lactose) inibiu fortemente a aglutinação dos eritrócitos. O açúcar preferencial de uma dada lectina é definido como o monossacarídeo com o qual esta se liga mais eficazmente, sendo este a galactose no caso de BiL. Diante disso, a lectina purificada (BiL) é claramente pertencente à família das lectinas do tipo-C, da mesma forma que outras integrantes já citadas desta família ligam-se à galactose na presença de cálcio. Todavia, no estudo das proteínas expressas na glândula de veneno das serpentes *Bungarus fasciatus* e *Bungarus multicinctus* também foram reconhecidas lectinas ligantes de manose (Zha *et al*, 2001). Esta observação foi confirmada quando na mesma posição do tripeptídeo Gln-Pro-Asp, que está conservado nas lectinas que ligam-se à galactose, houve uma substituição para o tripeptídeo Glu-Pro-Asn, característico das lectinas que ligam-se à manose (Weis *et al*, 1991; Feinberg *et al*, 2000).

A seqüência primária de BiL foi identificada após o seqüenciamento por degradação de Edman dos 16 resíduos do N-terminal. Além disso, foi realizada uma digestão enzimática com tripsina que possibilitou o isolamento de um peptídeo interno (resíduos 33 a 56) em coluna de fase reversa, para que também fosse seqüenciado. Adicionalmente, também foi possível confirmar a identidade da lectina purificada (ou clonada) através da análise de mapa peptídico. Assim foi possível comparar as massas dos peptídeos obtidos por hidrólise triptica com uma hidrólise virtual da lectina clonada.

Apenas um dos peptídeos esperados não foi encontrado devido às condições da análise: apesar da aquisição dos espectros ter sido realizada em faixa de massas de até 4 kDa, a massa referente à posição dos aminoácidos 34 a 61 na seqüência de aminoácidos de BiL não foi observada. Este fato poderia ser explicado por uma baixa capacidade de ionização deste peptídeo citado dado o seu tamanho (3.311,55 Da), porém modificações nas condições experimentais poderiam tornar possível a obtenção desta massa. Entretanto, isto não inviabilizou a cobertura de identificação de BiL, já que este peptídeo corresponde ao que foi obtido por seqüenciamento químico interno.

O veneno da serpente *Bothriechis lateralis* é um outro exemplo da utilização da ferramenta de espectrometria de massas para o estudo de lectinas. Este veneno foi fracionado em coluna de fase reversa, sendo as frações hidrolizadas *in gel* com tripsina para análise do *fingerprint* e para o seqüenciamento dos peptídeos por espectrômetro de massas. Esse procedimento foi complementado pela identificação imunológica e resultou na identificação de moléculas da família das lectinas tipo-C (Lomonte *et al*, 2008). Utilizando um protocolo parecido, lectinas tipo-C foram identificadas pela primeira vez em venenos de serpentes elapídicas australianas (Birrell *et al*, 2007). E finalmente, em uma comparação entre as massas intacta e de-glicosilada da lectina de *Trimeresurus stejnegeri* e analisando o seu *fingerprint* em espectrômetro de massas, o aminoácido Asn5 foi identificado como o sítio de N-glicosilação (Zeng *et al*, 1999).

As lectinas tipo-C de venenos de serpentes consistem em um grupo de proteínas que são funcionalmente diferentes (Drickamer, 1993; Kini, 1996). A comparação da seqüência de BiL com outras lectinas descritas foi realizada e as maiores porcentagens de identidade foram identificadas com outras lectinas tipo-C que ligam-se à galactose como a

de *Bothrops jararacussu* (96 %), *Lachesis muta stenophrys* (93 %), *Bitis arietans* (93 %), *Crotalus atrox* (90 %), *Trimeresurus stejnegeri* (82 %) e *Bungarus fasciatus* (63 %). Uma menor porcentagem de identidade foi observada para lectinas tipo-C símiles (30 % com a proteína ligante do fator IX da coagulação e 24 % com o receptor de manose em macrófago), que também necessitam de cálcio, mas não ligam-se à galactose (Mizuno *et al*, 1999; Feinberg *et al*, 2000).

BiL possui em sua seqüência primária resíduos de aminoácidos que interagem com a galactose e com o cálcio (Gln96, Asp98, Glu104, Asn 119, Tir 100, Asp112 e Asp120). Estes resíduos que interagem com a molécula de galactose são idênticos aos da lectina de *Crotalus atrox*, sendo que esta interação ocorre indiretamente através de íons cálcio (Walker *et al*, 2004). A interação entre lectinas e íons é um tema explorado em outras lectinas do tipo-C como por exemplo, a proteína ligante de manose (Weis *et al*, 1991). Esta lectina é bastante estudada e possui 32 resíduos formando o CRD. Desta maneira, a especificidade de ligação a açúcares é determinada pela presença de resíduos conservados que identificam uma molécula como sendo pertencente à família das lectinas (Drickamer, 1993).

O modelo teórico da estrutura tridimensional de BiL foi construído utilizando a lectina tipo-C da serpente *Crotalus atrox* (CaL) como modelo, com a qual tem identidade em seqüência primária de 90 %. Este modelo teórico foi construído conforme metodologia já descrita para uma enzima trombina símile (Castro *et al*, 2001) e o complexo formado entre BiL-galactose-cálcio foi construído. Cada subunidade de BiL apresenta um corpo globular formado por duas α hélices e oito folhas β , semelhante à outras lectinas símiles da

família tipo-C com estruturas já determinadas por cristalografia, tais como a proteína ligante do fator IX/X da coagulação (Mizuno *et al*, 1997), a proteína ligante do fator IX da coagulação - FIX-bp (Mizuno *et al*, 1999), a botrocetina (Sen *et al*, 2001), a bitiscetina (Hirotsu *et al*, 2001), a flavocetina (Fukuda *et al*, 1999) além do receptor de manose em macrófago - MMR (Feinberg *et al*, 2000).

A sobreposição da subunidade de BiL com algumas destas lectinas, confirmou seu arranjo conservado, incluindo a ponte dissulfeto entre as cadeias (Cis86). Uma forma de exemplificar este arranjo conservado seria na descrição da subunidade α da proteína ligante do fator IX da coagulação (PDB: 1BJ3) e da subunidade β do receptor de manose em macrófago (PDB: 1EGG). Estas duas proteínas compreendem 30 % e 24 % de homologia estrutural com a seqüência primária de BiL, respectivamente. Já a organização das estruturas secundárias destas duas moléculas reunidas, apresenta regiões conservadas estruturalmente, que compreendem mais de 70 % de todos os resíduos de BiL. Este exemplo confirma os dados já descritos em literatura que dentro de uma família de proteínas a estrutura terciária de suas moléculas integrantes está mais conservada que a estrutura primária.

Outra diferença entre as duas famílias de lectinas (lectinas tipo-C e tipo-C símiles), diz respeito à torção do *loop* (aminoácidos 76 a 100 na seqüência de BiL) que possui a cisteína responsável pela ligação entre as subunidades (Cis86), acarretando uma diferenciação na formação da interface entre as subunidades. Esta diferenciação está diretamente relacionada à posição das subunidades ao formar o complexo homodimérico e, conseqüentemente, a capacidade de se ligar à açúcares ou não.

Para estender os estudos estruturais desta família de proteínas, foram gerados anticorpos policlonais em coelhos contra a lectina nativa (anticorpos conformacionais) e desnaturada (anticorpos lineares). A idéia inicial era realizar uma comparação imunológica entre os gêneros de serpentes, dessa maneira, em um experimento de *Western blot* lectinas de plantas foram utilizadas como controle negativo. Diante do inesperado reconhecimento cruzado de lectinas destas plantas usando anticorpo soro de coelho imunizado com a lectina nativa, foram iniciados experimentos de comparação imunológica para identificar epítomos comuns entre as famílias de lectinas. A lectina purificada da leguminosa *Lens culinaris* foi escolhida por ser a mais representativa ao apresentar uma maior reação cruzada quando comparada a lectinas purificadas de plantas de outras ordens.

O peptídeo de massa 1.417,7318 (posições 62-73 na sequência) é uma região que precede o *loop* 76-100, uma região importante em BiL para a preservar a integridade do dímero e do sítio de reconhecimento à açúcares. Este peptídeo foi selecionado porque tem sequência similar às massas 1.095,6829; 1.471,7883 e 1.380,8 m/z da lectina de *L. culinaris* que também foram suprimidas, tendo os dois primeiros peptídeos sequência confirmada por MS/MS. Desta forma, a reatividade cruzada exibida entre estas lectinas, indica importantes sítios de antigenicidade comum, que não foram anteriormente demonstrados.

Para ampliar os estudos estruturais e biológicos, a expressão heteróloga de BiL se fazia necessária, diante da sua pouca abundância e dificuldade de obtenção do veneno de *B. insularis*, já comentados. Diante disso, foi realizada a expressão do clone de BiL utilizando *E. coli* como vetor de expressão procarioto. A proteína foi clonada em vetor pET-14b e

expressa com um *tag* de histidina na sua região N-terminal para facilitar a posterior purificação e identificação utilizando anticorpo anti-His *tag*.

Várias tentativas foram feitas para expressar quantidade satisfatória de amostra, sendo que a adição de glicose ao meio de cultura e a diminuição da temperatura na fase estacionária de crescimento causaram a super-expressão de BiL (observada em experimentos de eletroforese) e foram consideradas alterações positivas no protocolo inicialmente utilizado. A lectina foi identificada no agregado insolúvel dos corpos de inclusão (muito provavelmente devido o seu caráter tóxico), sendo desnaturada com uréia e re-enovelada na própria coluna onde foi purificada, ao ser ligada à resina contendo níquel pelo *tag* de histidina; com a retirada decrescente de uréia. A presença do açúcar ligante galactose foi fundamental para o re-enovelamento do homodímero ativo (com capacidade hemaglutinante preservada) com um rendimento de 6 mg/l.

A lectina tipo-C símile do veneno da serpente *Agkistrodon acutus*, a akitonina beta, foi expressa em vetor pBADTOPO transformado em células *E. coli* TOP10, sendo identificada nos corpos de inclusão (Zha *et al*, 2004). Utilizando este sistema, o rendimento da proteína foi alto e correspondeu a 40 % do total das proteínas celulares (150 mg/l). Esta proteína foi re-enovelada por diálise e preservou a capacidade de inibir a agregação de plaquetas induzidas por ADP. Por outro lado, as lectinas tipo-C BML-1 e BML-2 de *Bungarus multicinctus* (Lin *et al*, 2007) foram clonadas em vetor pET-His e transformadas em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) plysS. Estas lectinas foram, como a lectina de *B. insularis*, re-enoveladas na coluna que foi purificada e as lectinas também recuperaram a atividade hemaglutinante, tendo o dímero ativo um rendimento de ~ 1,75 e 3,0 mg/l (BML-1 e BML-2, respectivamente). Finalmente a outra lectina tipo-C descrita é uma lectina botrópica de *B.*

jararacussu (Kassab *et al*, 2004) que serviu como base para a expressão da lectina de *B. insularis* por terem seqüência primária com identidade alta (96 %). Esta lectina foi frequentemente abordada nesta tese, tendo um rendimento de 2.5–3.0 mg/l ao ser expressa em vetor pET-15b utilizando bactérias BL21 (DE3). Esta lectina foi também re-enovelada formando um dímero ativo com capacidade hemaglutinante. Não foram descritas adições de açúcares durante a expressão ou o re-enovelamento no protocolo utilizado para expressar estas lectinas tipo-C símile e tipo-C “verdadeiras” descritas.

Em seguida, o homodímero recombinante de BiLr foi aplicado a uma coluna cromatográfica de filtração em gel e a fração purificada foi submetida à interação com proteínas de soro humano. O soro utilizado teve depletado dois grupos de proteínas (a albumina e as imunoglobulinas) que por serem muito abundantes interferem na interação com BiLr de moléculas menos abundantes no soro. O material retido na coluna de afinidade foi eluído com galactose e em seguida por EDTA, duas substâncias que impedem a interação de BiL com açúcares. Uma banda de ~ 25 kDa chama atenção por ser eluída apenas após a incubação com um tampão contendo EDTA. Este fato sugere uma interação mais forte com esta proteína, necessitando de uma eluição de forma mais drástica (quelando os íons divalentes). As bandas que correspondem a proteínas que interagem com BiLr foram recortadas do gel de poliacrilamida, hidrolizadas com tripsina e aguardam identificação por espectrometria de massas.

Em um levantamento bibliográfico no Pubmed (disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>>), utilizando <*snake lectin plasma*>, <*snake lectin serum*> como palavras chaves a serem encontradas no título ou resumo, nenhum artigo foi encontrado com este tema. Várias lectinas tipo-C botrópicas já foram descritas

por interagirem com proteínas plasmáticas purificadas, seja inibindo a atividade da trombina, como a botrojaracina (*B. jararaca*), botroalternina (*B. alternatus*) e outras botrojaracina-símiles (*B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) (Castro *et al*, 1999), seja induzindo a agregação plaquetária, como a botrocetina ao se ligar ao fator de *von Willebrand* (Sen *et al*, 2001). Todavia, um estudo utilizando amostra bruta de plasma ou de soro, identificando as glicoproteínas que se ligam à lectinas de venenos de serpentes é uma interessante questão que ainda não foi estudada.

Podemos destacar que o estudo do veneno da serpente *Bothrops insularis* é relevante, já que por conta de seu isolamento geográfico, ocorreu uma seleção natural e este animal teve as suas características anatômicas e as propriedades do seu veneno selecionadas como resposta adaptativa às condições locais. O estudo da lectina tipo-C presente no veneno desta serpente em questão é interessante para o reconhecimento de diferenças entre a lectina de uma serpente isolada em uma ilha com as lectinas das serpentes residentes no continente.

Os estudos estruturais são de extrema importância para ajudar na elucidação da relação entre a estrutura e a função desta classe de proteínas. As estruturas obtidas experimentalmente de lectinas tipo-C disponíveis em literatura são em sua maioria de moléculas que apesar da similaridade na seqüência dos aminoácidos e no arranjo estrutural, apresentam atividade biológica bastante diversa; além de não se ligarem aos carboidratos e muitas vezes não dependerem de cálcio. Entender como e porque as proteínas adotam um enovelamento específico, entre todos os possíveis, e só neste têm atividade biológica é uma questão bastante interessante. O conhecimento da estrutura tridimensional de um grande número de proteínas mostra que estas podem adotar o mesmo enovelamento com

seqüências muito diferentes. Isso implica que, o entendimento do enovelamento de uma proteína de certa família auxilia no entendimento do enovelamento dos demais membros.

Nos estudos sobre mecanismos de enovelamento/re-enovelamento de proteínas são utilizados métodos bioquímicos, biofísicos e teóricos, sendo que este estudo em particular empregou um método *in vitro* de re-enovelamento de BiL. A proteína recombinante BiLr está disponível para ser objeto de estudo com foco no entendimento da dinâmica da interação entre proteína-cálcio e proteína-açúcar e nos arranjos entre os aminoácidos que possibilitam a dimerização e a agregação de proteínas. Podendo para isso mutar aminoácidos considerados cruciais em cada um destes eventos e estudar os seus efeitos. Estudos adicionais utilizando esta lectina recombinante que já se encontram em andamento, possibilitarão esclarecer melhor em um futuro próximo a relação entre estrutura e função desta família de proteínas de venenos de serpentes.

6. CONCLUSÕES

6.1 Conclusões

- Uma nova lectina tipo-C no veneno de *Bothrops insularis* (BiL) foi purificada utilizando técnicas cromatográficas, sendo um homodímero de 32 kDa, com suas subunidades ligadas por uma ponte dissulfeto.
- BiL teve sua seqüência completa de cDNA confirmada por degradação de Edman e espectrometria de massas.
- A mínima concentração de BiL capaz de hemaglutinar uma suspensão de eritrócitos de coelhos tripsinizados foi de ~19 ng/ml, esta capacidade foi inibida por EDTA e galactose é o seu ligante preferencial.
- Foi construído um modelo teórico para a estrutura tridimensional de BiL, utilizando a lectina da serpente *Crotalus atrox* como molde. Assim foram identificados sítios de interação com galactose e cálcio e a importância do *loop* 76-100 para a integridade do dímero e a manutenção do CRD nas lectinas “verdadeiras”.
- Anticorpos gerados contra BiL na conformação nativa ou desnaturada foram capazes de reconhecer lectinas de plantas da ordem Fabales.

- Foi identificado em BiL o peptídeo 62-73 (1.417,7318 Da) como um peptídeo imunoreativo com a lectina da lentilha *Lens culinaris*.
- BiLr foi clonada em vetor pET-14b utilizando bactéria *E. coli* BL21 (DE3) em corpos de inclusão em meio LB contendo 2 % de glicose.
- A lectina recombinante foi re-enovelada com a retirada decrescente de uréia na própria coluna de afinidade contendo níquel, na presença de galactose como um homodímero de ~ 32 kDa.
- BiLr possui atividade hemaglutinante dependente de cálcio, sendo esta metade da proteína purificada do veneno bruto.
- Foram visualizadas bandas em eletroforese de gel de poliacrilamida de proteínas séricas que se ligam à BiL, sendo eluídas com galactose ou EDTA.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. M.; KANASHIRO, M. M.; RANGEL FILHO, F. B.; MATA, M. F.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D. Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **The Veterinary Record**, v. 143, n. 21, p. 579-584, 1998.

ALONSO, A.; SCAVINI, L. M.; MARINO, G. A.; RODRÍGUEZ, S. M. IgE antibodies against snake venoms. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 5, n. 1, p. 31-34, 1995.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; CORRÊA, F. M.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 723-732, 2002.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.

ANGULO, Y.; NÚÑEZ, C. E.; LIZANO, S.; SOARES, A. M.; LOMONTE, B. Immunochemical properties of the N-terminal helix of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A(2) from *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 879-887, 2001.

ARASON, G. J. Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 6, n. 4, p. 277-289, 1996.

AROCAS, V.; CASTRO H. C.; ZINGALI, R. B.; GUILLIN, M. C.; JANDROT-PERRUS, M.; BON, C.; WISNER, A. Molecular cloning and expression of bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, n. 2, p. 550-557, 1997.

ARPIJUNTARANGKON, J.; ROJNUCKARIN, P.; MUANPASITPORN, C.; KAEOTHIP, S.; SANGVANICH, P.; INTRAGUMTORNCHAI, T. Molecular cloning and sequence analysis of alboaggregin B. **Platelets**, v. 18, n. 4, p. 266-272, 2007.

BARBOSA, C. F.; RODRIGUES, R. J.; OLORTEGUI, C. C.; SANCHEZ, E. F.; HENEINE, L.G. Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunoassay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 10, p. 1077-1080, 1995.

BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 5, p. 339-346, 1998.

BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; DA SILVA, A. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 583-593, 2003.

BELLO, C. A.; HERMOGENES, A. L.; MAGALHAES, A.; VEIGA, S. S.; GREMSKI, L. H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 189-200, 2006.

BERGER, B. J. e BHATTI, A. R., Snake venom components and their cross-reactivity: a review. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 67, n. 9, p. 597-601, 1989.

BIRRELL, G. W.; EARL, S. T.; WALLIS, T. P.; MASCI, P. P.; DE JERSEY, J.; GORMAN, J. J.; LAVIN, M. F. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 6, n. 6, p. 973-986, 2007.

BOGARÍN, G.; SEGURA, E.; DURÁN, G.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M. Evaluation of neutralizing ability of four commercially available antivenoms against the venom of *Bothrops asper* from Costa Rica. **Toxicon**, v. 33, n. 9, p. 1242-1247, 1995.

BOYD, W. C. e SLAPEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N., DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 859-867, 2006.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N., DE MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; ALVES, C. D.; BARBOSA, P. S.; DE SOUSA ALVES, R.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 199-207, 2008a.

BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; DE MENEZES, D.B.; BARBOSA, P. S.; EVANGELISTA, J. S.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. Purification and renal effects of phospholipase A(2) isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 181-190, 2008b.

BRAUD, S.; BOM, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, 2000.

BRENNAN, W. A. e LIN, S. H. **Strategies for protein purification and characterization, a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.

CALDERÓN, L. e LOMONTE, B. Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 358, n. 2, p. 343-350, 1998.

CALDERÓN, L. e LOMONTE, B. Inhibition of the myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II in mice by immunization with its synthetic 13-mer peptide 115-129. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 683-687, 1999.

CAMPANA, P. T.; MORAES, D. I.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; BELTRAMINI, L. M. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 3, p. 753-758, 2002.

CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. Suppression of the antivenom antibody response by serum therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 1, p. 33-41, 1994.

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

CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; ZINGALI, R. B. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1903-1912, 1998.

CASTRO, H. C.; LEMOS, M. G. J.; BON, C.; ZINGALI, R. B. Comparative evaluation of immunological and structural similarities of snake venom C-type lectin proteins. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 525-528, 2003.

CASTRO, H. C.; SILVA, D. M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R. B. Structural features of snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1547, n. 2, p. 183-195, 2001.

CASTRO, H.C.; FERNANDES, M.; ZINGALI, R.B. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. **Toxicon**, v. 37, n. 10, p. 1403-1416, 1999.

CHAVES, F.; CHACÓN, M.; BADILLA, B.; ARÉVALO, C. Effect of *Echinacea purpurea* (Asteraceae) aqueous extract on antibody response to *Bothrops asper* venom and immune cell response. **Revista de Biología Tropical**, v. 55, n. 1, p. 113-119, 2007.

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

CHEN, Y. L.; TSAI, K. W.; CHANG, T.; HONG, T. M.; TSAI, I. H. Glycoprotein Ib-binding protein from the venom of *Deinagkistrodon acutus*--cDNA sequence, functional characterization, and three-dimensional modeling. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 83, n. 1, p. 119-126, 2000.

CHIPPAUX, J. P. e THEAKSTON, R. D. Epidemiological studies of snake bite in French Guiana. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 301-304, 1987.

CHUNG, C. H.; AU, L. C.; HUANG, T. F. Molecular cloning and sequence analysis of aggretin, a collagen-like platelet aggregation inducer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 723-727, 1999.

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

CINTRA, A. C.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 221-227, 1990.

CLAUS, I. e MEBS, D. Cross-neutralization of thrombin-like enzymes in snake venoms by polyvalent antivenoms. **Toxicon**, v. 27, n. 12, p. 1397-1399, 1989.

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, G. H.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, n. 12, p. 1947-1959, 2006.

COGO, J. C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; GIGLIO, J. R.; CORRADO, A. P.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; DONATO, J. L.; LEITE, G. B.; RODRIGUES-SIMIONI, L. An unusual presynaptic action of *Bothrops insularis* snake venom mediated by phospholipase A₂ fraction. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1323-1332, 1998.

COLOMBINI, M.; FERNANDES, I.; CARDOSO, D. F.; MOURA-DA-SILVA, A. M. *Lachesis muta muta* venom: immunological differences compared with *Bothrops atrox* venom and importance of specific antivenom therapy. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 711-719, 2001.

CORRÊA, M. C. JR.; MARIA, D. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIZZOCARO, K. F.; RUIZ, I. R. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 739-748, 2002.

DA CRUZ, M. A. H.; PARONETTO, C. C.; COGO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; D'ABREU, A. C. Histopathological changes in avian kidney caused by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) venom and a phospholipase A₂-containing fraction. **Histology and Histopathology**, v. 16, n. 1, p. 185-195, 2001.

DA SILVA, A. M.; LIMA, M. R.; NISHIKAWA, A. K.; BRODSKYN, C. I.; DOS SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F.; DA SILVA, W. D.; MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon**, v. 28, n. 2, p. 181-188, 1990.

DE CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 43-50, 2002.

DE CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1471-1476, 2001.

DE ROODT, A. R.; ESTÉVEZ, J.; DOLAB, J. A.; MANZANELLI, M. V.; PIÑEIRO, N.; PANIAGUA, J. F.; VOGT, A. U. Biological and immunological characteristics of the poison of *Bothrops cotiara* (Serpentes: Viperidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 54, n. 3, p. 889-901, 2006.

DE ROODT, A. R.; LITWIN, S.; ANGEL, S. O. Hydrolysis of DNA by 17 snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology**, v. 135, n. 4, p. 469-479, 2003.

DÍAZ, C.; ALAPE, A.; LOMONTE, B.; OLAMENDI, T.; GUTIÉRREZ, J.M. Cleavage of the NH₂-terminal octapeptide of *Bothrops asper* myotoxic lysine-49 phospholipase A₂ reduces its membrane-destabilizing effect. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, n. 2, p. 336-339, 1994.

DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; ZAMUDIO, F.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of myotoxin IV, a phospholipase A₂ variant, from *Bothrops asper* snake venom. **Natural Toxins**, v. 3, n. 1, p. 26-31, 1995.

DOMINGOS, M. O.; CARDOSO, J. L.; DA SILVA, A. M.; MOTA, I. The humoral immune responses of patients bitten by the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 28, n. 6, p. 723-726, 1990.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 13, 6127-6145, 1988.

DRICKAMER, K. Evolution of Ca(2+)-dependent animal lectins. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 45, p. 207-232, 1993.

DRICKAMER, K. J. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9557-9560, 1988.

DUARTE, M. R.; PUERTO, G.; FRANCO, F. L. A biological survey of the pitviper *Bothrops insularis* Amaral (Serpentes, Viperidae): an endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, n. 1, p. 1-13, 1995.

ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M.; ALVARADO, J.; ROBLES, A.; AVILA, C.; GONZÁLEZ, N. The development of the anti-phospholipase A₂ antibody response in horses inoculated with venom for the production of polyvalent antsnake serum in Costa Rica. **Revista de Biología Tropical**, v. 37, n. 2, p. 187-191, 1989.

FEINBERG, H.; PARK-SNYDER, S.; KOLATKAR, A. R.; HEISE, C. T.; TAYLOR, M. E.; WEIS, W. I. Structure of a C-type carbohydrate recognition domain from the macrophage mannose receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21539-21548, 2000.

FERNANDES, I.; LIMA, E. X.; TAKEHARA, H. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; TANJONI, I.; GUTIÉRREZ, J. M. Horse IgG isotypes and cross-neutralization of two snake antivenoms produced in Brazil and Costa Rica. **Toxicon**, v. 38, n. 5, p. 633-644, 2000.

FERREIRA, M. L.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1591-1602, 1992.

FRANCESCHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J. M. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 38, n. 1, p. 63-77, 2000.

FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; KAISER, I. I. Myotoxin II from *Bothrops asper* (Terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 284, n. 2, p. 352-359, 1991.

FRANCIS, B.; SEEBART, C.; KAISER, I. I. Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1239-1246, 1992.

FUKUDA, K.; MIZUNO, H.; ATODA, H.; MORITA, T. Crystallization and preliminary X-ray studies of flavocetin-A, a platelet glycoprotein Ib-binding protein from the habu snake venom. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 55 (Pt 11), p. 1911-1913, 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Manual de diagnóstico de tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

GARTNER, T. K. e OGILVIE, M. L. Isolation and characterization of three Ca^{2+} -dependent beta-galactoside-specific lectins from snake venoms. **The Biochemical Journal**, v. 224, p. 301-307, 1984.

GARTNER, T. K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D. C. Thrombolectin, a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Letters**, v. 117, n. 1, p. 13-16, 1980.

GOMES, P. C.; MACHADO DE AVILA, R. A.; SELINA MARIA, W.; RICHARDSON, M.; FORTES-DIAS, C. L.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. The co-purification of a lectin (BJcuL) with phospholipases A_2 from *Bothrops jararacussu* snake venom by immunoaffinity chromatography with antibodies to crotoxin. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1099-1108, 2007.

GRODBERG, J. e DUNN, J. J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 3, p. 1245-1253, 1988.

GROSSMAN, T. H.; KAWASAKI, E. S.; PUNREDDY, S. R.; OSBURNE, M. S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, v. 209, n. 1-2, p. 95-103, 1998.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; DUTRA, D. L. S.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B. Cloning, characterization and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, n. 1, p. 1-11, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988a.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; ROJAS, E.; ELIZONDO, J.; AVILA, C.; CERDAS, L. Production of monovalent anti-*Bothrops asper* antivenom: development of immune response in horses and neutralizing ability. **Revista de Biología Tropical**, v. 36, n. 2B, p. 511-517, 1988b.

GUTIÉRREZ, J. M.; GENÉ, J. A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 23, n. 6, p. 887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1529-1538, 1998.

HARRISON, R. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; WU, Y.; RICHARDS, A.; BROADHEAD, A.; BIANCO, A. E.; THEAKSTON, R. D. Antibody from mice immunized with DNA encoding the carboxyl-disintegrin and cysteine-rich domain (JD9) of the haemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, inhibits the main lethal component of viper venom. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 121, n. 2, p. 358-363, 2000.

HARRISON, R. A.; OLIVER, J.; HASSON, S. S.; BHARATI, K.; THEAKSTON, R. D. Novel sequences encoding venom C-type lectins are conserved in phylogenetically and geographically distinct *Echis* and *Bitis* viper species. **Gene**, v. 315, p. 95-102, 2003a.

HARRISON, R. A.; RICHARDS, A.; LAING, G. D.; THEAKSTON, R. D. Simultaneous GeneGun immunisation with plasmids encoding antigen and GM-CSF: significant enhancement of murine antivenom IgG1 titres. **Vaccine**, v. 20, n. 13-14, p. 1702-1706, 2002.

HARRISON, R. A.; WÜSTER, W.; THEAKSTON, R. D. The conserved structure of snake venom toxins confers extensive immunological cross-reactivity to toxin-specific antibody. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 441-449, 2003b.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C.; MARTINS, A. M.; BARBOSA, P. S.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 1, p. 130-141, 2005.

HENEINE, L. G.; ARAÚJO DOS SANTOS, M. R.; DUTRA DE CARVALHO, A. Jr.; DA SILVA GONTIJO, S. A capture enzyme-linked immunosorbent assay for species-specific detection of *Bothrops* venoms. **Journal of Immunoassay**, v. 20, n. 1-2, p. 91-101, 1999.

HENEINE, L. G.; CARVALHO, A. D. Jr.; BARBOSA, C. F.; ARÁVJO DOS SANTOS, M. R. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antithrombotic antivenom. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1363-1370, 1998.

HIROTSU, S.; MIZUNO, H.; FUKUDA, K.; QI, M. C.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; MORITA, T.; TITANI, K. Crystal structure of bitiscetin, a *von Willebrand* factor-dependent platelet aggregation inducer. **Biochemistry**, v. 40, n. 45, p. 13592-135927, 2001.

HU, S.; LI, W.; CHEN, L.; LIU, J. Expression of a recombinant anticoagulant C-type lectin-like protein ACFI in *Pichia pastoris*: heterodimerization of two subunits is required for its function. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 716-724, 2005.

JUÁREZ, P.; WAGSTAFF, S. C.; OLIVER, J.; SANZ, L.; HARRISON, R. A.; CALVETE, J. J. Molecular cloning of disintegrin-like transcript BA-5A from a *Bitis arietans* venom gland cDNA library: a putative intermediate in the evolution of the long-chain disintegrin bitistatin. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, n. 1, p. 142-152, 2006.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. e HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v. 299, n. 1-2, p. 279-291, 2002.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; FARSKY, S. H.; OLIVEIRA, M. L.; HO, P. L. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39836-39842, 2001.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; PERTINHEZ, T.; SPISNI, A.; CARRENO, F. R.; FARAH, C. S.; HO, P. L. Cloning and expression of calglandulin, a new EF-hand protein from the venom glands of *Bothrops insularis* snake in *E. coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1648, n. 1-2, p. 90-98, 2003.

KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; SHERMAN, N.; FOX, J. W. Mass spectrophotometric evidence for P-III/P-IV metalloproteinases in the venom of the Boomslang (*Dispholidus typus*). **Toxicon**, v. 38, n. 11, p. 1613-1620, 2000.

KAMIGUTI, A. S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R. D. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 7, p. 853-862, 1998.

KANASHIRO, M. M.; DE CÁSSIA, M.; ESCOCARD, R.; PETRETSKI, J. H.; PRATES, M. V.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L.; DA SILVA, W. D.; KIPNIS, T. L. Biochemical and biological properties of phospholipases A(2) from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, n. 7, p. 1179-1186, 2002.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA, M. Jr.; XAVIER, M. A.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-219. 2004.

KASSAB, B. H.; DE CARVALHO, D. D.; OLIVEIRA, M. A.; BAPTISTA, G. R.; PEREIRA, G. A.; NOVELLO, J. C. Cloning expression and structural analysis of recombinant BJcuL, a C-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. **Protein Expression and Purification**, v. 35, n. 2, p. 344-352, 2004.

KIMURA, T.; HOSOI, T.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, N.; IMAI, Y.; IRIMURA, T. Epitope mapping of monoclonal antibodies specific for a macrophage lectin: a calcium-dependent epitope is in the carbohydrate recognition domain. **Molecular Immunology**, v. 37, n. 3-4, p. 151-160, 2000.

KIMURA, T.; IMAI, Y.; IRIMURA, T. Calcium-dependent conformation of a mouse macrophage calcium-type lectin. Carbohydrate binding activity is stabilized by an antibody specific for a calcium-dependent epitope. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 27, p. 16056-16062, 1995.

KINI, R. M. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? **Toxicon**, p. 34, n. 11-12, p. 1287-1294, 1996.

KISELAR, J. G. e DOWNARD, K. M., Direct identification of protein epitopes by mass spectrometry without immobilization of antibody and isolation of antibody-peptide complexes. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 9, p. 1792-1801, 1999.

KOH, Y.; CHUNG, K.; KIM, D. Purification and cDNA cloning of salmorin that inhibits fibrinogen clotting. **Thrombosis Research**, v. 99, n. 4, p. 389-398, 2000.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TOHKAI, T.; SUGIHARA, H. Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p. piscivorus* (Eastern cottonmouth). **Toxicon**, v. 37, n. 7, p. 1053-1064, 1999.

KOO, B. H.; SOHN, Y. D.; HWANG, K. C.; JANG, Y.; KIM, D. S.; CHUNG, K. H. Characterization and cDNA cloning of halyxin, a heterogeneous three-chain anticoagulant protein from the venom of *Agkistrodon halys brevicaudus*. **Toxicon**, v. 40, n. 7, p. 947-957, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEDUC, M. e BON, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. **The Biochemical Journal**, v. 333, n. 2, p. 389-393, 1998.

LEE, W. H.; DU, X. Y.; LU, Q. M.; CLEMETSON, K. J.; ZHANG Y. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 90, n. 4, p. 662-671, 2003.

LEÓN, G.; ESTRADA, R.; CHAVES, F.; ROJAS, G.; OVADIA, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; Inhibition by CaNa_2EDTA of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) venom: application in horse immunization for antivenom production. **Toxicon**, v. 36, n. 2, p. 321-331, 1998.

LEÓN, G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Anticomplementary activity of equine whole IgG antivenoms: comparison of three fractionation protocols. **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 123-128, 2005.

LIN, L. P.; LIN, Q.; WANG, Y. Q. Cloning, expression and characterization of two C-type lectins from the venom gland of *Bungarus multicinctus*. **Toxicon**, v. 50, n. 3, p. 411-419, 2007.

LIRA, M. S.; FURTADO, M. F.; MARTINS, L. M.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M. L.; BARBARO, K. C. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 982-994, 2007.

LOMONTE, B. e KAHAN, L. Production and partial characterization of monoclonal antibodies to *Bothrops asper* (terciopelo) myotoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 675-689, 1988.

LOMONTE, B.; ESCOLANO, J.; FERNÁNDEZ, J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 6, p. 2445-2457, 2008.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. Equine antibodies to *Bothrops asper* myotoxin II: isolation from polyvalent antivenom and neutralizing ability. **Toxicon**, v. 28, n. 4, p. 379-384, 1990a.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P.; VARGAS, O.; CARMONA, E.; ROVIRA, M. E. Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v. 28 n. 10, p. 1137-1146, 1990b.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MATA, E. Isolation from a polyvalent antivenom of antibodies to a myotoxin in *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 23, n. 5, p. 807-813, 1985.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MORENO, E.; CERDAS, L. Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 25, n. 4, p. 443-449, 1987a.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; RAMÍREZ, M.; DÍAZ, C. Neutralization of myotoxic phospholipases A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 30, n. 3, p. 239-245, 1992.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; CALDERÓN, L. Quantitation by enzyme-immunoassay of antibodies against *Bothrops* myotoxins in four commercially-available antivenoms. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 695-702, 1991.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J. M. Detection of proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxin in crotaline snake venoms. **Toxicon**, v. 25, n. 9, p. 947-955, 1987b.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A.; MACCARANA, M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29867-29873, 1994a.

LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J. M.; RAMIREZ, G. Isolation of a galactose binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon**, v. 28, n. 1, p. 75-81, 1990c.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A. Broad cytolytic specificity of myotoxin II, a lysine-49 phospholipase A₂ of *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1359-1369, 1994b.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACHADO-BRAGA, M. D.; COSTA-MARTINS, A. M.; ALVES, C. D.; DE MENEZES, D. B.; MARTINS, R. D.; FERREIRA-BARBOSA, P. S.; DE SOUSA-OLIVEIRA, I. M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO, E. B.; RAMOS-FAGUNDES, F. H.; FONTELES, M. C.; AZUL-MONTEIRO, H. S. Purification and biological activity of the thrombin-like substance isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 49, n. 1, p. 329-338, 2007.

MANDELBAUM, F. R.; SERRANO, S. M.; SAKURADA, J. K.; RANGEL, H. A.; ASSAKURA, M. T. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the Crotalinae and Viperinae subfamilies. **Toxicon**, v. 27, n. 2, p. 169-177, 1989.

MARIA, W. S.; CAMBUY, M. O.; COSTA, J. O.; VELARDE, D. T.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antithrotoppic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. **Toxicon**, v. 36, n. 10, p. 1433-1439, 1998.

MARIA, W. S.; PACHECO, B. G.; BARBOSA, C. F.; VELARDE, D. T.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Determination of the neutralizing potency of horse antithrombotic and anticrotalic antivenoms in blood samples collected on filter paper. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1607-1609, 2001.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; ANAI, K.; YOSHIDA, E. N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1223-1226, 2002.

MATSUDAIRA, P. T. **A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing**. San Diego: Academic Press, 1993.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1963.

MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; STÁBELI, R. G.; FRANCO, J. J.; TICLI, F. K.; CINTRA, A. C.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v. 44, n. 2, p. 215-223, 2004.

MÉNEZ, A. Molecular immunology of snakes toxins. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 91-113, 1985.

MIZUNO, H.; FUJIMOTO, Z.; KOIZUMI, M.; KANO, H.; ATODA, H.; MORITA, T. Crystal structure of coagulation factor IX-binding protein from habu snake venom at 2.6 Å: implication of central loop swapping based on deletion in the linker region. **Journal of Molecular Biology**, v. 289, n. 1, p. 103-112, 1999.

MIZUNO, H.; FUJIMOTO, Z.; KOIZUMI, M.; KANO, H.; ATODA, H.; MORITA, T. Structure of coagulation factors IX/X-binding protein, a heterodimer of C-type lectin domains. **Nature Structural Biology**, v. 4, n. 6, p. 438-441, 1997.

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

MONTEIRO, R. Q.; FOGUEL, D.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Subunit dissociation, unfolding, and inactivation of bothrojaracin, a C-type lectin-like protein from snake venom. **Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 509-515, 2003.

MONTEIRO, R. Q.; YAMANOUYE, N.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; BON, C.; ZINGALI, R. B. Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principles in individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 153-163, 1998.

MORAIS, J. F.; DE FREITAS, M. C.; YAMAGUCHI, I. K.; DOS SANTOS, M. C.; DA SILVA, W. D. Snake antivenoms from hyperimmunized horses: comparison of the antivenom activity and biological properties of their whole IgG and F(ab')₂ fragments. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 725-734, 1994.

MORAIS, V. e MASSALDI, H. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 876-882, 2005.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; CARDOSO, D. F.; TANIZAKI, M. M.; MOTA, I. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. **Toxicon**, v. 29, n. 12, p. 1471-1480, 1991.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; LÍNICA, A.; DELLA-CASA, M. S.; KAMIGUTI, A. S.; HO, P. L.; CRAMPTON, J. M.; THEAKSTON, R. D. Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 369, n. 2, p. 295-301, 1999.

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

MUNIZ, E. G.; MARIA, W. S.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; BUHRNHEIM, P.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Neutralizing potency of horse antithrotophic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 38, n. 12, p. 1859-1863, 2000.

NIEWIAROWSKI, S.; MCLANE, M. A.; KLOCZEWIAK, M.; STEWART, G. J. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. **Seminars in Hematology**, v. 31, n. 4, p. 289-300, 1994.

NIKAI, T.; KATO, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H. Amino acid sequence and biological properties of the lectin from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu). **Toxicon**, v. 38, n. 5, p. 707-711, 2000.

NISHIMURA, H.; TAKAHASHI, K.; SAKURAI, K.; FUJINUMA, K.; IMAMURA, Y.; OOBA, M.; INADA, Y. Modification of batroxobin with activated polyethylene glycol: reduction of binding ability towards anti-batroxobin antibody and retention of defibrinogenation activity in circulation of preimmunized dogs. **Life Sciences**, v. 33, n. 15, p. 1467-1473, 1983.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 91-101, 2004.

OGILVIE, M. L.; BYL, J. W.; GARTNER, T. K. Platelet-aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 62, n. 2, p. 704-707, 1989.

OKUDA, D.; HORII, K.; MIZUNO, H.; MORITA, T. Characterization and preliminary crystallographic studies of EMS16, an antagonist of collagen receptor (GPIa/IIa) from the venom of *Echis multisquamatus*. **Journal of Biochemistry**, v. 134, n. 1, p. 19-23, 2003.

OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; GUIMARÃES, P. R.; ABREU, P.A.; DUTRA, D. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; RODRIGUES, C. R.; HO, P. L.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 659-671, 2008.

OTERO, R.; GUTIÉRREZ, J. M.; NÚÑEZ, V.; ROBLES, A.; ESTRADA, R.; SEGURA, E.; TORO, M. F.; GARCÍA, M. E.; DÍAZ, A.; RAMÍREZ, E. C.; GÓMEZ, G.; CASTAÑEDA, J.; MORENO, M. E. A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. The Regional Group on Antivenom Therapy Research (REGATHER). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 6, p. 696-700, 1996.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, E.; NISHIDA, S.; TITANI, K. C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, n. 1, p. 306-310, 1994.

PANUNTO, P. C.; DA SILVA, M. A.; LINARDIA, A.; BUZIN, M. P.; MELO, S. E. S. F. C.; MELLO, S. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 21-31, 2006.

PEREIRA-BITTENCOURT, M.; CARVALHO, D. D.; GAGLIARDI, A. R.; COLLINS, D. C. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. **Anticancer Research**, v. 19, n. 5, p. 4023-4025, 1999.

PETRETSKI, J. H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C. P.; ALVES, E. W.; KIPNIS, T. L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 11, p. 1293-1300, 2000.

PICOLO, G.; CHACUR, M.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F.; CURY, Y. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1221-1228, 2002.

QINGHUA, L.; XIAOWEI, Z.; WEI, Y.; CHENJI, L.; YIJUN, H.; PENGXIN, Q.; XINGWEN, S.; SONGNIAN, H.; GUANGMEI, Y. A catalog for transcripts in the venom gland of the *Agkistrodon acutus*: identification of the toxins potentially involved in coagulopathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 2, p. 522-531, 2006.

RAFAEL, A.; TANJONI, I.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; FURTADO, M. F. An alternative method to access in vitro the hemorrhagic activity of snake venoms. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p. 479-487, 2008.

RAMOS, O. H. P. **Produção de uma pró-metaloproteinase recombinante em bactéria, ativação in vitro e modelagem molecular**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2001.

ROCHA, O. A.; BICALHO, A. F.; SILVEIRA, J. N.; LOPES, E. S.; HENEINE, I. F. A nontoxic derivative of *Bothrops jararaca* venom suitable to generate antibodies against the native venom. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 99, n. 4, p. 143-145, 1992.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, n. 6, p. 471-479, 2001.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A.; UZCATEGUI, W.; AZUAJE, R.; GIRON, M. E.; AGUILAR, I. ELISA assays for the detection of *Bothrops lanceolatus* venom in envenomed patient plasmas. **Roumanian archives of microbiology and immunology**, v. 57, n. 3-4, p. 271-278, 1998.

RUCAVADO, A. e LOMONTE, B. Neutralization of myonecrosis, hemorrhage, and edema induced by *Bothrops asper* snake venom by homologous and heterologous pre-existing antibodies in mice. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 567-577, 1996.

RUCAVADO, A.; MORENO, E.; GUTIÉRREZ, J. M. Effect of adjuvants on the antibody response of mice to *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 10, p. 1337-1340, 1996.

RUSSELL, F. E. **Snake venom poisoning**. Philadelphia: Lippincott, 1980.

SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, L. L.; GIGLIO, J. R.; RECHIA, C. G.; FULY, A. L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; FRANCO, J. J.; STABELI, R. G.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. BjuSSuSP-I: A new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**. [Artigo ainda não publicado] 2007.

SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ESCALANTE, T.; ARCE, V.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. The venom of *Bothrops asper* from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. **Toxicon**, v. 39, n. 2-3, p. 401-405, 2001.

SELISTRE, H. S. e GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1135-1144, 1987.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O. A.; DE SOUZA, G. E.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 28, n. 3, p. 261-273, 1990.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; DE SOUZA, E. L.; BELTRAMINI, L. M.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. **Protein Expression and Purification**, v. 19, n. 1, p. 41-47, 2000.

SEN, U.; VASUDEVAN, S.; SUBBARAO, G.; MC CLINTOCK, R. A.; CELIKEL, R.; RUGGERI, Z. M.; VARUGHESE, K. I. Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. **Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 342-352, 2001.

SERRANO, S. M.; SHANNON, J. D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C.; FOX, J. W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501-510, 2005.

SHIN, Y.; OKUYAMA, I.; HASEGAWA, J.; MORITA, T. Molecular cloning of glycoprotein Ib-binding protein, flavocetin-A, which inhibits platelet aggregation. **Thrombosis Research**, v. 99, n. 3, p. 239-247, 2000.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000a.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 201-209, 2000b.

SOARES, A. M.; SESTITO, W. P.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; CUNHA, O. A.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 2, p. 258-270, 2004.

SOUZA, J. R.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 787-792, 2001.

SOUZA, C. T.; MOURA, M. B.; MAGALHAES, A.; HENEINE, L. G.; OLORTEGUI, C. C.; DINIZ, C. R.; SANCHEZ, E. F. Inhibition of mutalysin II, a metalloproteinase from bushmaster snake venom by human alpha2-macroglobulin and rabbit immunoglobulin. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v. 130, n. 2, p. 155-168, 2001.

STÁBELI, R. G.; MAGALHÃES, L. M.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; OLIVEIRA, E. B. Antibodies to a fragment of the *Bothrops moojeni* l-amino acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent protein. **Toxicon**, v. 46, n. 3, p. 308-317, 2005.

STOCKER, W.; NG, M.; AULD, D. S. Fluorescent oligopeptide substrates for kinetic characterization of the specificity of *Astacus* protease. **Biochemistry**, v. 29, n. 45, p. 10418-10425, 1990.

TAMAROZZI, M. B.; SOARES, S. G.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; BARBOSA, J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 9, p. 1450-1457, 2006.

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

TANJONI, I.; BUTERA, D.; SPENCER, P. J.; TAKEHARA, H. A.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 809-816, 2003b.

THEAKSTON, R. D.; REID, H. A.; IDDON, D.; LARRICK, J. W. Protective effect of snake venom antibodies in sera of previous snake bite victims. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 77, n. 3, p. 311-314, 1983.

THOMAS, L.; CHAUSSON, N.; UZAN, J.; KAIDOMAR, S.; VIGNES, R.; PLUMELLE, Y.; BUCHER, B.; SMADJA, D. Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-Lance" *Bothrops lanceolatus* in Martinique despite antivenom treatment: a report of three recent cases. **Toxicon**, v. 48, n. 1, p. 23-28, 2006.

TSURUTA, L. R.; HAYASHI, M. A.; KONNO, K.; TAMBOURGI, D. V.; ASSAKURA, M. T.; CAMARGO, A. C.; SANT'ANNA, O. A. A natural carrier effect and the generation of specific antibodies to biologically active peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 353, n. 2, p. 174-180, 2006.

TU, A. T. **Hemorrhagic proteases from snake venoms. Hemostasis and animal venoms.** New York: Pirkle and Markland ed., 1988.

VIJAYAN, M. e NAGASUMA, C. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 6, p. 707-714, 1999.

WALKER, J. R.; NAGAR, B.; YOUNG, N. M.; HIRAMA, T.; RINI, J. M. X-ray crystal structure of a galactose-specific C-type lectin possessing a novel decameric quaternary structure. **Biochemistry**, v. 43, n. 13, p. 3783-3792, 2004.

WEI, Q.; LU, Q. M.; JIN, Y.; LI, R.; WEI, J. F.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Purification and cloning of a novel C-type lectin-like protein with platelet aggregation activity from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1331-1338, 2002.

WEIS, W. I.; KAHN, R.; FOURME, R.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**, v. 254, n. 5038, p. 1608-1615, 1991.

WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; SOARES, M. R.; BLOCH, C. Jr.; ZINGALI, R. B. Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 12, p. 1703-1708, 2005.

XU, G.; TENG, M.; NIU, L.; LIU, P.; DONG, Y.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q. Purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of two novel C-type lectin-like proteins: Aall-A and Aall-B from *Deinagkistrodon acutus* venom. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 60, n. 11, p. 2035-2037, 2004.

XU, Q.; WU, X. F.; XIA, Q. C.; WANG, K. Y. Cloning of a galactose-binding lectin from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*. **The Biochemical Journal**. v. 341, n. 3, p. 733-737, 1999.

ZENG, R.; XU, Q.; SHAO, X. X.; WANG, K. Y.; XIA, Q. C. Characterization and analysis of a novel glycoprotein from snake venom using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and Edman degradation. **European Journal of Biochemistry**, v. 266, n. 2, p. 352-358, 1999.

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

ZHA, X. D.; LIU, J.; XU, K. S. cDNA cloning, sequence analysis, and recombinant expression of akitonin beta, a C-type lectin-like protein from *Agkistrodon acutus*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 3, p. 372-377, 2004.

ZHONG, S. R.; JIN, Y.; WU, J. B.; CHEN, R. Q.; JIA, Y. H.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; ZHANG, Y. Characterization and molecular cloning of dabocetin, a potent antiplatelet C-type lectin-like protein from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 104-112, 2006.

ZYCHAR, B. C.; CASTRO, N. C. Jr.; MARCELINO, J. R.; GONÇALVES, L. R. Phenol used as a preservative in *Bothrops* antivenom induces impairment in leukocyte-endothelial interactions. **Toxicon**, v. 51, n. 7, p. 1151-1157, 2008.

ANEXO

Snake venom C-type lectins and C-type lectins-like proteins: Conserved structural scaffold, multiple activities

Russolina B Zingali¹, Carlos Correa-Netto^{1,2}, **Viviane Guimarães-Gomes¹**

1-Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Estrutural, CCS, UFRJ
Rio de Janeiro, Brazil

2- Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ Brasil.

Summary

Introduction

Structural features and mechanism of action

True lectins (CTL)

CTL-Like

CLT-like binding to factor IX and/or factor X

Thrombin and prothrombin binding proteins

vWF binding proteins

Platelet binding proteins

Molecular cloning and *in vitro* expression

Information derived from proteomic and transcriptomic analysis of venom.

Future direction

Abstract:

Snake venoms are rich in a large variety of proteins and peptides that can interfere in diverse biological processes. This review focuses on snake-venom proteins that belong to the C-type lectin family. These proteins include (1) true lectins that interact with carbohydrates through a Carbohydrate Recognition Domain (CRD); (2) C-type lectin-like proteins that bind to factors IX- and X- from blood coagulation through the Gla domain of factor X/Xa and/or IX/IXa; (3) prothrombin- and thrombin-binding proteins, represented by bothrojaracin and salmorin, either bind to prothrombin, impairing thrombin formation, or to thrombin, inhibiting its biological activities, such as clotting of fibrinogen, platelet activation, and so forth; and (4) C-type lectins –like molecules that interact with von Willebrand Factor leading to its binding to GPIb platelet receptor resulting in agglutination and (5) proteins that interact with platelet receptors inducing or inhibiting platelet aggregation or agglutination. The general structural characteristics of these proteins and current knowledge regarding their mechanisms of action are discussed. The detailed analysis of these molecules in terms of structure–function relationship will, in all probably, help with the development of new medical and pharmacological applications.

1. Introduction

Snake venom lectins (SVL) are a family of proteins produced exclusively in the gland of venomous snakes. This family present two distinct classes of lectins with conserved structural, but diverse biological function. C-type lectin (CTL) and C-type lectin-like (CTL-like) proteins. CTL is the group of lectins that bind saccharides in a Ca^{2+} - dependent fashion. They also contain a conserved region consisting of 115-130 amino acid residues that is called carbohydrate recognition domain (CRD). Animal C-type lectins have recently been classified in seventeen groups [for rev.

see 1] SVL belongs to the group VII which consist of a simply CRD and only binds to sugar. One example of this class of protein is the pancreatic lectin [2]. On the other hand, CTL-like proteins do not bind to sugar due to a disruption of CDR domain, nevertheless they have acquired the capability of binding different molecules leading to diverse biological activities [3, 4].

Since their initial description in 1980 [5], CTL and CTL-like proteins have been isolated from the venom of many snake genera, including: *Agkistrodon* [6, 7], *Bitis* [8], *Bothrops* [5, 9-13], *Bungarus* [14] *Crotalus* [6], *Dendroaspis* [15], *Lachesis* [15-18] and *Trimeresurus* [19, 20] (Table 1).

While CTL are homodimeric proteins, C-type lectin-like proteins are usually heterodimeric, but some exist as oligomers of the heterodimer. The subunits have homologous sequences and are generally linked by a disulphide bond as well as by loop swapping between the α and β subunits. The crystal structure of some CTL and CTL-like have been described [21-25]. Table 1 list CTL and CTL-like molecules purified from Viperidae and Elapidae snake venoms.

Genus	Species	Molecule	Function	Type	Sequence	References
Agkistrodon	<i>A. bilineatus</i>	Bilinelixin	- Induce platelet agglutination	CTL-Like	No	[32]
	<i>A. contortrix</i>	AcL	- Hemagglutination	CTL	No	[6, 26]
	<i>A. piscivorus</i>	ApL	- Hemagglutination - Induce platelet aggregation	CTL	Yes	[6, 7, 26]
	<i>B. alternatus</i>	Bothroalteinin	- Inhibit thrombin	CTL-Like	No	[54, 55]
	<i>B. asper</i>	Aspercetin,	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	No	[181]
	<i>B. atrox</i>	BaL/Thrombolectin	- Hemagglutination - Induce platelet aggregation	CTL	Yes	[5, 26]
	<i>B. cotiara</i>	Bothrojaracin-like	- Inhibit thrombin	CTL-Like	No	[55]
	<i>B. godmani</i>	BgL	- Hemagglutination - Induction of edema	CTL	No	[9]
	<i>B. insularis</i>	BiL	- Hemagglutination - Renal effects	CTL	Yes ²	[12, 40]
	Bothrops	<i>B. jararaca</i>	Bothrojaracin-like	- Inhibit thrombin	CTL-Like	Yes ²
<i>B. jararacussu</i>		Botrocetin	- Hemagglutination - Inhibit thrombin - Inhibit prothrombin - Inhibit V factor	CTL	Yes	[10, 41]
<i>B. jararacussu</i>		Bjcul	- Hemagglutination - Hypotension - Inhibition of tumors - Induction of edema	CTL-Like	Yes ³	[10, 21, 56]
<i>B. jararacussu</i>		Bjcul	- Hemagglutination - Hypotension - Inhibition of tumors - Induction of edema	CTL	Yes	[35-39]

		Bothrojaracin-like	- Inhibit thrombin	CTL-Like	No	[55]	
	<i>B. moojeni</i>	Bothrojaracin-like	- Inhibit trombin	CTL-Like	No	[55]	
	<i>B. neuwiedi</i>	Bothrojaracin-like	- Inhibit trombin	CTL-Like	No	[55]	
	<i>B. pirajai</i>	BpL	- Hemagglutination - Renal effects	CTL	No	[13]	
Calloselasma	<i>C. rhodostoma</i> ⁴	Rhodocytin (aggreitin)	- Inhibit platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[130, 137, 138, 145, 182]	
Crotalus	<i>C. atrox</i>	CaL	- Hemagglutination	CTL	Yes ³	[6, 57, 58]	
	<i>C. durissus</i>	Convulxin	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[60-66]	
	<i>C. ruber</i>	CrL	- Hemagglutination	CTL	Yes	[59]	
		AaIL	- Hemagglutination	CTL	Yes ³	[174]	
Deinagkistrodon		ACFI	- Binding IX and X factors	CTL-Like	Yes	[146]	
		Agglucetin	- Induce platelet aggregation - Pro-angiogenic effect	CTL-Like	Yes	[28-30, 178]	
		Agkaggregin	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[180]	
	<i>D. acutus</i> ⁵	Agkicetin-C	- Inhibit platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[172, 173, 144]	
		Agkisacutacetin	- Inhibit platelet aggregation - Binding IX and X factors	CTL-Like	Yes	[84, 94, 101, 102, 103, 104, 105-108]	
		Agkistin	- Inhibit platelet aggregation - Anti-angiogenic effect	CTL-Like	No	[27, 179]	
		Akitonin β	- Inhibit platelet aggregation	CTL-Like	Yes	[31]	

Gloydius	<i>G. halys</i> ⁶	Salmorin	- Inhibit thrombin - Inhibit prothrombin	CTL-Like	Yes	[113]
		Halyxin/AHP IX-bp	- Binding IX and X factors	CTL-Like	Yes ³	[98, 100]
Lachesis	<i>L. muta</i>	Bothrojaracin-like	- Inhibit thrombin	CTL-Like	No	[55]
		LmL	- Hemagglutination - Induce platelet aggregation - Hypotension	CTL	Yes	[15-17, 26, 67, 89, 168]
		IX/Xbp	- Binding IX and X factors	CTL-Like	Yes ³	[25, 68, 82-85, 90, 128]
Protothothrops	<i>P. flavoviridis</i>	Flavocetin	- Inhibit platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[23, 71, 72]
		Mucetin	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	No	[81, 134]
		Mucrocetin	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[176]
		TMVA	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	Yes	[142]
		Alboaggregin	- Induce platelet agglutination	CTL-Like	Yes	[74-80]
Trimeresurus	<i>T. albolabris</i>	Alboluxin	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	No	[177]

	<i>T. okinavensis</i>	ToL/HhL	<ul style="list-style-type: none"> - Hemagglutination - The modulation of Ca²⁺ release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum 	CTL	Yes	[20, 70]
	<i>T. purpureomaculatus</i>	Purpureotin	<ul style="list-style-type: none"> - Induce platelet aggregation 	CTL-Like	Yes	[175]
	<i>T. stejnegeri</i>	Stejnulin	<ul style="list-style-type: none"> - Induce platelet aggregation 	CTL-Like	Yes	[127]
		TsL	<ul style="list-style-type: none"> - Hemagglutination 	CTL	Yes	[68, 69]
		TSV-GPIIb-BP	<ul style="list-style-type: none"> - Induce platelet aggregation 	CTL-Like	Yes	[73]
		TSV-FIX-BP	<ul style="list-style-type: none"> - Binding IX factor 	CTL-Like	Yes	[128]

	<i>Bitis arietans</i>	BaL/PaL	- Hemagglutination - The modulation of Ca ²⁺ release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum	CTL	Yes	[8, 33, 141]
Bitis		Bitiscetin	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[22, 34]
	<i>B. caudalis</i>	BcL	ND	CTL	Yes	[159]
	<i>B. gabonica</i>	BgL	ND	CTL	Yes	[159]
	<i>B. nasicornis</i>	BnL	ND	CTL	Yes	[159]
Daboia	<i>D. russelii</i>	Dabocetin	- Inhibit platelet agglutination	CTL-Like	Yes	[86]
	<i>E. carinatus</i>	Echicetin	- Inhibit platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[133, 135, 136]
Echis		ECLV IX/X bp	- Binding IX and X factors	CTL-Like	Yes ²	[98, 109]
	<i>E. multiscquamatus</i>	EMS16	- Inhibit platelet aggregation	CTL-Like	Yes ³	[129, 143]
	<i>E. ocellatus</i>	EoL	ND	CTL	Yes	[141]
	<i>E. pyramidum</i>	EpL	ND	CTL	Yes	[141]
	<i>B. fasciatus</i>	BfL	ND	CTL	Yes	[14]
	<i>B. multicinctus</i>	BmL	ND	CTL	Yes	[14, 87]
Bungarus ¹	<i>D. jamesonii</i>	DjL	ND	CTL	No	[15]
Ophiophagus ¹	<i>O. hannah</i>	Ophioluxin	- Induce platelet aggregation	CTL-Like	No	[126]

Table 1. Viperidae C-Type Lectins and C-Type Lectin-like proteins identified and characterized from various snake venoms

(¹) Genus from Elapidae family.

(²) These lectins have quaternary structure identified by 3D Model or (³) X-Ray Crystalization.

(⁴) Also named as *Agkistrodon rhodostoma*.

(⁵) Also named as *Agkistrodon acutus*.

(⁶) Also named as *Agkistrodon halys*

ND – Note Determined.

2. Structural features and mechanism of action

2.1 True lectins (C-Type Lectin - CTL):

Several CTL have been purified and characterized, nevertheless a few of them were partially or totally sequenced, including those from *Crotalus atrox*, *Lachesis muta stenophrys*, *Agkistrodon p. piscivorus*, *Trimeresurus okinavensis* and *Bothrops jararacussu* venoms [7, 20, 37, 57, 88, 89]. The crystal structure of only one lectin, *Crotalus atrox* lectin, was determined [58] and some genes have been cloned and sequenced [12, 14, 31, 38, 68], with approximately ten complete sequences described in literature. In general, these purified proteins cause agglutination of red cells (erythrocytes), nonetheless other biological activities have been described, all of them related to the ability of binding sugar. The lack of structural information and a more systematic strategy to compare various subclasses of this venom family makes it difficult to more accurately look at their biological activities.

The C-type lectins (CTLs) or snake venom true lectins make up a large protein family. They are characterized by specifically binding D-galactose, lactose and some may also recognize D-mannose sugars [14]. They present a highly conserved primary structure, including the carbohydrate recognition domain (CRD). Recently Abreu and coworkers [88] compared various CTLs by three-dimensional modeling. The overall sequence analysis of eleven CTLs (CaL, ApL, BaL, BjcuL, BjL, BpL, BiL, LmsL, TsL, BfL-1, and BfL-2) revealed a significant degree of homology among them (53–97%). As expected, the CRD involved in binding the carbohydrate and calcium is conserved in most of the studied CTLs [88]. These lectins are dimers or oligomers containing one CRD per subunit arranged by monomers with ~130 amino acid residues [2, 88]. Mainly, each monomer possesses the canonical fold and is comprised of six to eight β -sheets flanked by two α -helices, two short 3_{10} -helices, and a considerable amount of coil structure. Secondary structure of each subunit is stabilized mainly by three intrachain disulfide bonds (C3-C14, C31-C131, and C106-C123) and C86 is the residue involved in the formation of disulfide-linked homodimers. These molecules showed a specific loop that is important in supporting the CRD and facilitates the formation of their dimeric form [58, 90, 91]. In addition, they present a characteristic 10-residues N-terminal extension that is involved in subunit interaction, making important contacts between monomers [57, 58].

Crystallographic studies have revealed the presence of an additional calcium ion-binding sites, besides the one involved in carbohydrate binding and the stabilization of these proteins. The bound calcium ion interacts directly with galactose or mannose moieties, a hallmark of the C-type lectin-carbohydrate interaction. Their monosaccharide binding specificities depend on the CRDs spatial arrangement [92, 93]. The calcium ion itself is coordinated by eight ligands (protein residues Q96, D98, E104, N119, and D120) [58] with the distorted pentagonal bipyramidal geometry. Some of these residues (Q96, D98, N119, and E104) also make direct hydrogen bonds to the galactose 3- and 4-OH groups [58]. The surface directly involved in carbohydrate-binding (CRD) is negatively charged in all studied CTLs from snake venom and present a concave shape that fits galactose and calcium ion within [88]. These features probably allow the interaction of SVLs with the specific saccharide hydroxyl groups and calcium ion, and consequently modulate the biological function of these lectins as hemagglutinating molecules [88].

Figure 1

The dimeric structure of CTLs, with two carbohydrate recognition sites [14], causes erythrocyte agglutination, although other biological effects have also been reported. Almost all described biological activities seem to be due to the binding of sugar residues on cell surface glycolyx. Nevertheless, the precise mechanism of action and the dependence of sugar or specific binding to cellular receptors remain unclear. Furthermore, lectins were tested for diverse biological activities, as described below, but the lack of comprehensive and comparative approach made the complete understanding of biological activities described difficult. Some of these activities are: 1) platelet aggregation and agglutination for *A. p. leukostoma* (western cottonmouth moccasin) lectin (ApL), *L. muta* (bushmaster) lectin (LmL) and *B. atrox* (fer-de-lance) lectin (BaL/thrombolectin) [26]; 2) calcium release from skeletal muscle from *B. arietans* (puff adder) lectin (BaL/PaL) and *T. okinavensis* (himehabu) lectin (ToL/HhL) [33, 70]; 3) inhibition of various tumoral cell lines growth by *B. jararacussu* lectin, BjcuL [35]; 4) nephrotoxicity by *B. insularis* (jararaca ilhoa) lectin (BiL) and *B. pirajai* (Bahia jararacussu) lectin (BpL) [13, 40]; 5) induction of edema by *B. godmani* (Godmann's pit viper) lectin and BjcuL [13, 39].

In case of a systemic action, *in vivo* experiments with *L. muta* lectin (1.5 mg/kg rats) produce a sharp and prolonged hypotension [17]. The same effects occur with

i.v. injection of *B. jararacussu* lectin, BjcuL (0.2 mg/kg rats) [39], but in subtle form and a rapid return to the resting level is observed.

2.2 C-Type Lectin-Like (CTL-like)

This group of proteins lack carbohydrate binding capacity and is, at present, only found in snake venoms. C-type-lectin-like proteins shares common structural features but present a variety of biological activities. Most of the described activities are directed toward blood coagulation factors or platelet receptors. The evolution analysis of cDNA sequence of these proteins show that they diverged into three different groups: true lectins, A or alpha and B or beta chains of C-type lectin like proteins [91]. A and B chains diverged from a common C-type lectin ancestral. The processes that bring isozymes or isoproteins into being seems to be based in gene duplication followed by accelerate base substitution [for rev. 91]. These molecules can be classified based on their target proteins as described below. Interestingly, Li and coworkers [94] described for the first time a C-type lectin like protein – Agkisacutacetin, which possesses two activities: binding to GPIb on platelet surface and also to Factors IX and X. This unusual finding warrant further investigation.

2.2.1. CTL-like binding to factor IX and/or factor X

Proteins that bind blood factors X, and/or IX, witch are activated or not, have been characterized in various snake venoms. Atoda and Morita reported the first purification of this kind of molecule in 1989 [95]. Based on their ligand recognition specificity, these proteins can be classified into three types: [A] coagulation factor IX/X-binding proteins, such as those purified from *T. flavoviridis* [82, 95], *B. jararaca* [96], *Echis carinatus leucogaster* [98], and *A. halys brevicaudus* [98] snake venoms; [B] coagulation factor IX-binding proteins, purified from *T. flavoviridis* [99], *T. stejnegeri* [68], and *A. halys pallas* [100] venoms; and [C] coagulation factor X-binding proteins, purified from *Deinagkistrodon acutus* venom [101, 102, 103, 104] former *Agkistrodon acutus* snake, although the proteins purified by different research groups present some physicochemical differences as far as they were analized they have very similar sequences. More recently, Li and coworkers [94] characterized agkisacutacin isolated from this same venom.

These proteins generally have a molecular mass around 30 kDa and are $\alpha\beta$ -heterodimers linked by a single disulfide bridge. Nevertheless halyxin, from *A.h. brevicaudus*, contains three chains, two of them are translated from the same mRNA [98]. Habu IX/X-binding protein [90] and habu IX-binding protein [25, 85] isolated from *T. flavoviridis* have the same β subunit but different α subunits, which differ at only 19 (15%) of the total 129 amino acids. The crystal structures of these proteins show that each subunit of these molecules comprises a globular unit with an extended loop that contributes to a tight interaction with the other subunit, a characteristic shared by all C-type lectin-like proteins [88]. Their structures differ significantly from a true lectin such as the mannose binding protein, where this loop is folded inward and participates in Ca^{++} binding and carbohydrate recognition. The presence of this extended loop leads to the disruption of the Carbohydrate Recognition Domain (CRD) [90]. A concave surface is formed and is the putative binding site for the coagulation factors' Gla-domain.

The role of Ca^{2+} in habu factor IX/X and IX-binding protein and in anticoagulant factors I and II from *D. acutus* have been studied extensively [84, 105-108]. Spectrophotometric studies have shown that Ca^{2+} is essential for protein stabilization, probably for folding and also for biological activities [107, 108] since the binding of Factor X with anticoagulant factor I is lost when Ca^{2+} is replaced by another ion (terbium) [106]. Alternatively, Atoda and co-workers [109] proposed that Ca^{2+} is not essential for the final fold, since similar proteins or subunits that do not contain the binding site for Ca^{2+} can assume the same fold as the ones that do bind Ca^{2+} .

These proteins prolong the prothrombin time [95], and retard factor Xa-induced clotting. By different techniques it was demonstrated that they could bind with a stoichiometric relation of 1:1 to factor X/Xa and/or IX/IXa; or both factors [95, 96]. Interestingly, these proteins do not bind to Gla-domainless factors IX and X, and do not bind other Gla-containing proteins such as prothrombin, factor VII, protein C or protein S [95-97, 102]. Their interaction occurs only in the presence of Ca^{2+} [99, 101, 110].

Crystallographic studies have shown that the anticoagulant activity is based on the fact that the Gla-domain site, essential for membrane binding, is buried when the complex is formed with the habu factor IX-binding protein [24, 111]. These complexes impair the interaction of the Gla domain with the membrane, which is essential for the amplification of the coagulation process.

Whether or not these IX/X binding proteins have antithrombotic effect has yet to be ascertained. They are being used as tools to understand the role of Gla domain in the formation of the blood-coagulation complex [24, 111]. Gla-domains may thus serve as new targets for the development of anticoagulant and antithrombotic drugs.

2.2.2. Thrombin and prothrombin binding proteins

Besides the molecules that bind Gla domains of factors IX and X, venoms present another class of C-type lectin-like protein that binds to thrombin and prothrombin. Bothrojaracin was described in 1993 as the first specific inhibitor for thrombin isolated from snake venom [42]. Since then its structure and mechanism of action have been studied and characterized. Its homologs, bothroalternin and bothroinsularin were also purified from others Brazilian snake venoms, [54, 112]. Another protein, salmorin, was isolated from *Agkistrodon halys brevicaudus* [113].

Bothrojaracin and salmorin are 30-kDa proteins formed by two distinct but homologous chains linked together by disulfide bridges. They are very acidic proteins [42, 113]. Sequencing of the N-terminal and cDNA sequence has shown that bothrojaracin is another member of the C-type lectin-like family [42, 44]. Bothrojaracin is similar to a large number of molecules isolated from snake venoms: botrocetin (similarity to the A chains 80 % and B chains 60 %); factors IX/X-binding protein (57 and 54 %); GP Ib-binding protein (65 and 62%); and salmorin (56 and 52 %), among many others [56, 96, 113, 114].

Bothrojaracin possesses only 11 of the 13 amino-acid residues important for the Carbohydrate Recognition Domain (CRD), and thus is not able to bind to carbohydrates [44]. Experimentally bothrojaracin activity is not calcium-dependent although a calcium-binding site (Ser41, Gln43, Glu47, and Glu128) is present in β -chain and an incomplete calcium binding site in α -chain, where Glu128 is replaced by Lys128 [109, 112]. The structural role for Ca^{2+} is not clear.

The extensive homology with other C-type lectin-like proteins allowed us to deduce the arrangement of disulfide bonds of bothrojaracin [52] and to model its three-dimensional structure [112]. A comparison with bothroinsularin which is 100 fold less active than bothrojaracin points to the concave region between chains as the binding site for thrombin.

Bothrojaracin interacts with thrombin and prothrombin, forming a stable 1:1 complex [42, 43, 48, 50]. The calculated K_d for bothrojaracin was 0.6 nM and 100 nM for thrombin and prothrombin, respectively [43]. Bothrojaracin binds to thrombin exosite I displacing ligands such as fibrin, hirudin, thrombomodulin and factor V and does not block the catalytic site [42, 43, 45].

Bothrojaracin competes with Hirudin fragment 54-65 for binding to prothrombin, demonstrating that in fact both molecules bind to the so-called pro-exosite I of prothrombin [50, 115]. The activity of the tenase complex was blocked in the presence of either bothrojaracin or a hirudin peptide. This inhibition was much more evident in the presence of factor V together with activated platelets, suggestive of a possible involvement of pro-exosite I in the interaction between prothrombin and factor V [48, 51]. Nevertheless, the structurally similar salmorin inhibits prothrombin activation by factor Xa independently from the presence of factor V.

Bothrojaracin exerts its anticoagulant effect by two distinct mechanisms: 1) it binds to activated thrombin through exosite 1, blocking fibrinogen clotting, platelet activation, factor V activation and other effects, and 2) it interacts with prothrombin, decreasing its proteolytic activation—especially that which is dependent on factor V interaction [48, 50, 51]. These characteristics make bothrojaracin a promising tool for the investigation of antithrombotic activities *in vivo*. In fact unpublished data in our laboratory show that bothrojaracin is a potent antithrombotic agent with a long term *in vivo* activity and may be of use for the development of new drugs, designed to use zymogens as new targets.

2.2.3. von Willebrand Factor binding proteins

The first report for molecules from snake venom that interact with vWF is from Read and coworkers (1978) [116] who screened snake venoms for the induction of vWF-mediated platelet agglutination. Venoms from five species (*Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, *B. medusa*, *B. neuwiedii*, and *Bitis arietans*) out of 73 venoms showed this activity. Botrocetin and bitiscetin were purified and showed to bind to VWF and modulate its activity to elicit platelet activation via glycoprotein Ib (GPIb) [117, 118]. Actually botrocetin was the first C-type lectin like molecule identified and its characterization was only possible after its complete sequencing by Usami and coworkers in 1993 [56].

As common for C-type lectins, both botrocetin and bitiscetin are composed of two heterologous chains linked together by disulfide bond. Interestingly, although these molecules have the same function they share low similarity (47% for α chain and 44% for β chain). Furthermore, bitiscetin is positively charged while botrocetin is negatively charged, they probably bind to different sites on von Willebrand factor. The crystal structures of these two molecules were determined [21, 22] and it was shown that the overall structure is very similar to various C-type lectin like molecules such as FIX/X bp (see above) [90]. Both subunits have a globular domain formed by two α helices and five to eight β strands, and an extended loop domain that interact with the globular domain of the other subunit (domain swap) giving a concave zone. A common feature between these molecules, which is different from other C-type lectin molecules, is the presence at the central concave region of acidic amino acid residues from both subunits forming a negatively charged region [22]. Bitiscetin did not show binding to metal cations [22], while botrocetin was shown to present one divalent binding site in the β chain similar to that seen in both coagulation factor IX/X-bp and coagulation factor IX-bp [21].

The agglutinating activity of botrocetin and bitiscetin is dependent on the presence of von Willebrand factor. In fact both molecules, botrocetin and bitiscetin were shown to bind specifically to von Willebrand Factor [118, 119] which in turn binds to the platelet receptor GPIb triggering the agglutination process. Several lines of evidence show that the A1 domain of vWF is the binding site for botrocetin and bitiscetin [22, 120] although it has also been demonstrated that bitiscetin can interact with the A3 domain since it does not bind to vWF lacking A3 domain and also competes with collagen, which preferentially binds to A3 domain. It was previously hypothesized that botrocetin or bitiscetin would induce a conformational change at the A1 domain that would expose the von Willebrand factor binding site to GPIb [121]. However the crystal structures of botrocetin and bitiscetin complexed with the VWF A1 domain indicate that these modulators directly bind to the A1 domain of VWF in close proximity to the GPIb binding site, and surprisingly no significant conformational change on the GPIb-binding site of the A1 domain was observed [122]. Possibly, bitiscetin and botrocetin could provide a positively charged patch that would interact to the anionic region at GPIb providing a supplemental platform fitting for GPIb. This hypothesis needs yet to be confirmed, although it has been

demonstrated that botrocetin/von Willebrand complex does not bind the GPIb that lacks sulfated Tyr residues, responsible for the anionic region [123].

2.2.4. Platelet binding proteins

Many C-type lectins can bind to platelet receptors leading to an activation or inhibition of platelet aggregation and/or agglutination (see Table 1). Among the receptors that were already described as target for C-type lectins we can cite GPIb, GP VI and GPIa/IIa (integrin $\alpha 2\beta 1$).

The echicetin [124], agkistin [27] and flavocetin-A [125] are examples of CTL-like proteins that strongly inhibit platelet aggregation by specific binding to platelet GPIb. However, alboaggregin B [74], TSV-GPIb-BP [73] and agglucetin [28] are snake CTL-like proteins that induce platelet agglutination via GPIb without activating platelets. Some CTL-like proteins present dual specificity for both platelet GPIb and GPVI receptors such as convulxin, alboaggregin A and alboluxin. On the other hand, other CTL proteins, ophioluxin and stejnulxin, bind only to GPVI despite their high homology to convulxin, [126,127]. Another platelet target for CTL-like proteins that was described is $\alpha 2\beta 1$ integrin receptor. EMS16 [129], rhodocetin, rhodocytin (aggrexin or rhodocytin) [130], and bilinexin [32] were shown to interact with this receptor. However, in the meantime, it was demonstrated that rhodocytin induces platelet activation through the CLEC-2 receptor but not via $\alpha 2\beta 1$ integrin, GPIb, or GPVI [131, 132].

C-type lectins in snake venoms with platelet binding activity mostly have a heterodimeric structure with two subunits α and β that are often oligomerized to form larger molecules. The alboaggregin, echicetin, convulxin and flavocetin are high-molecular mass platelet binding proteins and the 3D structure was determined by X-ray crystallography to identify the molecular recognition sites within its heterodimeric structure [23]. These studies have further demonstrated that flavocetin-A and convulxin, with molecular weight around 149 kDa, are a disulfide-linked cyclic tetramer ($\alpha_4\beta_4$). The overall structure of these molecules showed that the α - and β -subunits are dimerized in a manner similar to 3D domain swapping as already described in IX/X-bp and IX-bp [25, 90], and an interchain disulfide bridge connects

the two subunits. The tetramerization is mediated by another interchain disulfide bridge between cysteine residues at the C-terminus of the α -subunit and at the N-terminus of the β -subunit of the neighboring $\alpha\beta$ -heterodimer. The $\alpha\beta$ -heterodimers are arranged in a manner of “head to- tail” interaction between cysteine residues located at either end of the long axis of the almost linearly elongated dimer unit [23]. The structure of echicetin, a dimeric CTL-like protein with platelet-inhibiting capability, has also been solved. The overall 3-D structure showed to be very similar to other CTL-like proteins. [133].

Simple heterodimeric members of this family have been shown to inhibit platelet functions by binding to GPIb but others activate platelets via the same receptor. Another series of snake C-type lectins activate platelets by binding to GPVI while yet another series uses the integrin $\alpha_2\beta_1$ to affect platelet function [134]. A classic example of a GPIb –binding C-type lectin is echicetin, which was early shown to block von Willebrand factor and thrombin platelet activation [4, 61, 135, 136]. Flavocetin-A is another member of this protein family that antagonizes platelet activity through GPIb-binding [23, 72, 125], as well as other platelet aggregation agonist, such as alboaggregin-B.[74, 76]. On the other hand aggretin/rhodocytin that interact via CLEC-2 [3, 137, 138] and convulxin that binds to GPVI receptor are agonists of these platelet receptors. It is interesting to notice that although these proteins share high sequence and structural similarities it has been shown that the binding sites on these molecules are slightly different leading to diverse responses [134, 140]. Also cross blocking experiments using radiolabeled anti GPIb α monoclonal antibodies showed that protein binding sites do not perfectly match [139]. In addition, other mechanisms of platelet agglutination also have been demonstrated as for echicetin, that also interacts with IgMk leading to platelet agglutination in plasma [4, 91, 134].

3. Molecular cloning and *in vitro* expression

The first cDNA sequence obtained of a true lectin was a CTL from *Trimeresurus stejnegeri* venom [68]. Thereafter, the cloning of cDNA sequences from *Echis ocellatus*, *E. pyramidum leakeyi*, *E. carinatus sochureki* and *B. arietans* was realized [141] also showing sequences similar to CTL proteins.

The molecular biology techniques were useful to identify many sequences, of CTL-like proteins. The complete amino acid sequences of stejnulxin subunits [127] and blood coagulation factor IX-binding protein (TSV-FIX-BP) [73], both from *Trimeresurus stejnegeri* venom revealed its A and B chain residues composition. Alpha and beta subunits from dabocetin, a *Daboia russellii siamensis* protein [86] and Alboaggregin B from *Trimeresurus albolabris* venom [80], the mature amino acid sequences of the alpha and beta subunits of TMVA, from *Trimeresurus mucrosquamatus* [142] and EMS16, found in the venom of *Echis multisquamatus* [143] also were deduced from cloned cDNAs. The analyses of cDNA from *Agkistrodon halys brevicaudus* gland, showed clones encoding the two separate polypeptide chains from salmorin [113] and also three existing chains of halyxin [98]. The complete amino acid sequence of Agkicetin-C, from *Agkistrodon acutus* (or *Deinagkistrodon acutus*) snake, also was resolved [144] as well as clones encoding for the alpha and beta chains of aggrexin from *Agkistrodon rhodostoma* (or *Calloselasma rhodostoma*) [145].

In case of flavocetin-A (from *Trimeresurus flavoviridis* snake) a toxin of 149 kDa, and consists of two subunits, alpha and beta (with 17 and 14 kDa, respectively) the primary structure deduced by cDNA sequencing revealed some features of quaternary structure. The amino acid sequences of the alpha and beta [72] showed the additional disulfide bridges formed with Cys 135 of alpha subunit and Cys 3 of the beta subunit probably causing polymerization of this heterodimer. Another example is the two chains of convulxin [62]. Assuming that the localization of intra and interchain disulphide bridges of each chain is similar to other lectins, the existence of an additional interchain bridge explains its tridimeric structure (alpha₂beta)₃, later confirmed by the crystallography studies.

Some of the cloned molecules were expressed in different heterologous system. The CTL from *Bothrops jararacussu* snake gland was expressed by *E. coli* cells as inclusion bodies [38], using the active dimer for structural and biological assays (circular dichroism/ spectrometry and hemagglutinate techniques). Moreover, the expression of recombinant CTL-like was also realized. The expression of functional bothrojaracin (from *Bothrops jararaca* snake) was achieved in COS cells upon transfection with two vectors containing the complete cDNAs. Recombinant bothrojaracin, which was secreted into the medium, was able to bind and inhibit thrombin [44]. The toxin akitonin beta from *Agkistrodon acutus* [31] was expressed in

E. coli cells as inclusion bodies and achieved a high level of expression (superior to 150 mg/L) using TOPO system and exhibited its inhibitory activities on ADP-induced rat platelet aggregation *in vitro*. Using different vectors, the anticoagulant CTL-like protein ACFI from *Agkistrodon acutus* venom was expressed in *Pichia pastoris* host (yields of 1-4 mg/L). The two subunits cDNAs of this heterodimer protein, were transformed and expressed separately or together. However, the experimental results indicate that heterodimerization of two subunits is required for its function [146].

Up to the present, most of CTL and CTL-like proteins have been identified in Viperidae venom. Only a few lectins were identified in Elapidae snake venoms. The screen the cDNA libraries obtained from the venom glands of *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus* revealed the first lectins from Elapidae snake venom glands: named BFL-1, BFL-2 and BML [14]. Cloning and expression in *E. coli* cells as inclusion bodies of two CTL (BML-1 and BML-2) from the venom gland of *Bungarus multicinctus* also was achieved [87] as well as the confirmation of their hemagglutinating activity.

4. Proteomic and Transcriptomic analyses

There has been significant effort directed toward the generation of information through proteomics (venomics) from snake venom and transcriptomic from glands. Currently, around eleven snakes have had their venom gland transcriptomes analyzed: *Bothrops jararaca* [41], *Bothrops jararacussu* [147], *Bothrops insularis* [148], *Lachesis muta* [67], *Bitis gabonica* [149], *Philodryas olfersii* [150], *Oxyuranus scutellatus* [151], *Agkistrodon acutus* [152], *Echis ocellatus* [153], *Deinagkistrodon acutus* [154], *Sistrurus catenatus edwardsii* [155]. The analysis of the ESTs produced showed the presence of up to 15 protein families [156]. Furthermore, recent studies describe detailed proteomic information of snake venom [157-167]. These analyses show that C-type lectin and C-type lectin like proteins are ubiquitously present in snake venoms and relatively abundantly expressed. There are significant differences among the species [168] in terms of the relative occurrence of these proteins and percentage of total proteome [159]. However, some venoms from elapid snakes such as *Oxyuranus scutellatus* and *Naja kaouthia* did not show the presence of C-type lectins [151, 160]. Interestingly the proteomic characterization of two related Central

American snakes showed that *Atropoides nummifer* contains true lectins, while *Atropoides picadoi* showed C-type lectin-like [157].

The analysis of gene expression in the venom glands of *B. insularis* snake using ESTs identified gene clusters for two CTL: one related to *B. arietans* lectin (PAL) and another to *T. stegnejeri* lectin (TSL) [148]. After that, subsequent experiments of cloning, sequencing and purification was realized using this cDNA library, encoding a protein with high identity to true lectin named of BiL [12].

The transcripts expressed in the venom gland of *Bothrops jararacussu* were obtained by sequencing of randomly selected cDNA clones and were identified using existing databases [149]. A full-length cDNA encoding a galactose binding CTL and 25 transcripts encoding CTL-like proteins have been found. In the case of *B. jararaca*, the analyses of expressed sequenced tags (ESTs) of a venom gland cDNA library were subjected to bioinformatics analysis, and showed 8.3% of the transcripts were CTL and CTL-like [41]. In the cases of *Agkistrodon acutus* [152] and *Bitis arietans* [169], clusters related to CTL and CTL-like molecules accounted for 5.22% and 13.2% of the total transcripts, respectively.

5. Future direction

The combination of classical protein chemistry and new high throughput techniques will allow us to describe new molecules of this protein family and eventually new binding targets and biological activities.

Carbohydrates have an immense potential for encoding biological information. In this context, numerous data demonstrate that malignant transformation is associated with various and complex alterations in the glycosylation process. General use of lectins include, for example, diagnosis/prognosis (probes in anatomy, histochemistry and cytochemistry; serodiagnosis and radio imaging) and cancer therapy (targeted therapy, direct antitumor therapy, development of antiadhesins, mitogenic lectin therapy and use as immunotoxins) [170]. Besides the targeting specific cells, the lectin-sugar interaction can also be used to direct and deliver drugs to their site of action. The concept of bioadhesion via lectins may be applied for the gastrointestinal tract and others biological barriers like the nasal mucosa, the lung, the buccal cavity, the eye and the blood–brain barrier [171]. It is possible, thus, to envisage the

usefulness of venom CTL for medical application, nevertheless this field remain to be explored.

Many CTL-like venom proteins described inhibit binding of physiological ligands, for example, vWF and collagen, which have multiple binding partners. As a result, they acquire the ability to interact with multiple receptors or plasma proteins concurrently and, thus, increase the chance of interfering with the normal hemostatic function. Overall, SVL family modulates protein functions by exerting either inhibitory or activating effects using their highly homologous primary structure. This could be important for the understanding of hemostatic activation during thrombosis and for the development of novel drugs.

References

- 1- Zelensky, A.N., and Gready, J.E. 2005, *FEBS J.*, 272, 6179.
- 2- Drickamer, K. 1999, *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 585.
- 3- Morita, T. 2005, *Toxicon*, 45, 1099.
- 4- Lu, Q., Navdaev, A., Clemetson, J.M., Clemetson, K.J. 2005, *Toxicon*, 45, 1089.
- 5- Gartner, T.K., Stocker, K., Williams, D.C. 1980, *FEBS Lett.*, 117, 13.
- 6- Gartner, T.K., and Ogilvie, M.L. 1984, *Biochem. J.*, 224, 301.
- 7- Komori, Y., Nikai, T., Tohkai, T., Sugihara, H. 1999, *Toxicon*, 37, 1053.
- 8- Nikai, T., Suzuki, J., Komori, Y., Ohkura, M., Ohizumi, Y., Sugihara, H. 1995, *Biol. Pharm. Bull.*, 18, 1620.
- 9- Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Ramirez, G. 1990, *Toxicon*, 28, 75.
- 10- Ozeki, Y., Matsui, T., Hamako, J., Suzuki, M., Fujimura, Y., Yoshida, E., Nishida, S., Titani K. 1994, *Arch. Biochem. Biophys.*, 308, 306.
- 11- Carvalho, D.D., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J.C. 1998., *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 44, 933.
- 12- Guimarães-Gomes, V., Oliveira-Carvalho, A.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Dutra, D.L.S., Pujol-Luz, M., Castro, H.C., Ho, P.L., Zingali, R.B. 2004, *Arch. Biochem. Biophys.*, 432, 1.
- 13- Havt, A., Toyama, M.H., Nascimento, N.R.F., Toyama, D.O., Nobre, A.C.L., Martins, A.M.C., Barbosa, P.S.F., Novello, J.C., Boschero, A.C., Carneiro, E.M., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S.A. 2005, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 37, 130.
- 14- Zha, H.G., Lee, W.H., Zhang, Y. 2001, *Toxicon*, 39, 1887.
- 15- Ogilvie, M.L., Dockter, M.E., Gartner, T.K. 1986, *J. Biochem.*, 100, 1425.
- 16- Gómez-Leiva, M.A., and Aragón-Ortiz, F. 1986, *Rev. Biol. Trop.*, 34, 49.
- 17- Aragón-Ortiz, F., Brenes-Brenes, J.R., Gubensek, F. 1989, *Rev. Biol. Trop.*, 37, 79.
- 18- Aragón-Ortiz, F., Brenes-Brenes, J.R., Gubensek, F. 1990, *Toxicon*, 28, 143.
- 19- Liang, X.-L., and Wang, K.-Y.I. 1993, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 25, 515.
- 20- Nikai, T., Kato, S., Komori, Y., Sugihara, H. 2000, *Toxicon*, 38, 707.
- 21- Sen, U., Vasudevan, S., Subbarao, G., McClintock, R.A., Celikel, R., Ruggeri, Z.M. et al. 2001, *Biochemistry*, 40, 345.
- 22- Hirotsu, S., Mizuno, H., Fukuda, K., Qi, M.C., Matsui, T., Hamako, J. Morita, T., Titani, K. 2001, *Biochemistry*, 40, 13592.
- 23- Fukuda, K., Mizuno, H., Atoda, H., Morita, T. 2000, *Biochemistry*, 39, 1915.
- 24- Mizuno, H., Fujimoto, Z., Atoda, H., Morita, T. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 7230.

- 25- Mizuno, H., Fujimoto, Z., Koizumi, M., Kano, H., Atoda, H., Morita, T. 1999, *J. Mol. Biol.*, 289, 103.
- 26- Ogilvie, M.L., Byl, J.W., Gartner, T.K. 1989, *Thromb. Haemost.*, 62, 704.
- 27- Yeh, C.H., Chang, M.C., Peng, H.C., Huang, T.F. 2001, *Br. J. Pharmacol.*, 132, 843.
- 28- Wang, W.J., and Huang, T.F. 2001, *Thromb. Haemost.*, 86, 1077.
- 29- Wang, W.J., Ling, Q.D., Liao, M.Y., Huang, T.F. 2003, *Thromb. Haemost.*, 90, 465.
- 30- Andrews, R.K., Gardiner, E.E., Shen, Y., Berndt, M.C. 2003, *Curr. Med. Chem. Cardiovas. Hematol. Agents.*, 1, 143.
- 31- Zha, X.D., Liu, J., Xu, K.S. 2004, *Acta Pharmacol. Sin.*, 25, 372.
- 32- Du, X.Y., Navdaev, A., Clemetson, J.M., Magnenat, E., Wells, T.N., Clemetson, K.J. 2001, *Thromb. Haemost.*, 86, 1277.
- 33- Ohkura, M., Miyashita, Y., Nikai, T., Suzuki, J., Komori, Y., Sugihara, H., Ohizumi, Y. 1996, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 1043.
- 34- Matsui, T., Hamako, J., Matsushita, T., Nakayama, T., Fujimura, Y., Titani, K. 2002, *Biochemistry*, 41, 7939.
- 35- Pereira-Bittencourt, M., Carvalho, D.D., Gagliardi, A.R., Collins, D.C. 1999, *Anticancer Res.*, 19, 4023.
- 36- Carvalho, D.D., Schmitmeier, S., Novello, J.C., Markland, F.S. 2001, *Toxicon*, 39, 1471.
- 37- Carvalho, D.D., Marangoni, S., Novello, J.C. 2002, *J. Protein Chem.*, 21, 43.
- 38- Kassab, B.H., Carvalho, D.D., Oliveira, M.A., Baptista, G.R., Pereira, G.A.G., Novello, J.C. 2004, *Protein Exp. Purif.* 35, 344.
- 39- Panunto, P.C., da Silva, M.A., Linardia, A., Buzin, M.P., Melo, S.E.S.F.C., Mello, S.M., Prado-Franceschi, J., Hyslop, S. 2006, *Toxicon*, 47, 21.
- 40- Braga, M.D., Martins, A.M., Amora, D.N, de Menezes D.B., Toyama, M.H., Toyama, D.O., Marangoni, S., Barbosa, P.S., de Sousa Alves, R., Fonteles, M.C., Monteiro, H.S. 2006, *Toxicon*, 47, 859.
- 41- Cidade, D.A., Simão, T.A., Dávila, A.M., Wagner, G., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ho, P.L., Bom, C., Zingali, R.B., Albano, R.M. 2006, *Toxicon*, 48, 437.
- 42- Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M.C., Bon, C. 1993, *Biochemistry*, 32, 10794.
- 43- Arocas, V., Zingali, R.B., Guillin, M.C., Bon, C., Jandrot-Perus, M. 1996, *Biochemistry*, 35, 9083.
- 44- Arocas, V., Castro, H.C., Zingali, R.B., Guillin, M.C., Jandrot-Perrus, M., Bon, C., Wisner, A. 1997, *Eur. J. Biochem.*, 248, 550.
- 45- Arocas, V., Lemaire, C., Bouton, M.C., Beazeaud, A., Bon, C., Guillin, M.C., Jandrot-Perrus, M. 1998, *Thromb. Haemost.*, 79, 1157.
- 46- Monteiro, R.Q., Dutra, D.L.S., Machado, O.L.T., Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Bon, C., Zingali, R.B. 1998, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*, 120, 791.
- 47- Monteiro, R.Q., Rapôso, J.G., Wisner, A., Guimarães, J.A, Bon, C., Zingali, R.B. 1999, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 262, 819.
- 48- Monteiro, R.Q., and Zingali, R.B. 2000, *Arch. Biochem. Biophys.*, 382, 123.
- 49- Monteiro, R.Q., Bock, P.E., Bianconi, M.L., Zingali, R.B. 2001, *Protein Sci.*, 10, 1897.
- 50- Zingali, R.B., Bianconi, M.L., Monteiro, R.Q. 2001, *Haemostasis*, 31, 273.
- 51- Monteiro, R.Q., and Zingali, R.B. 2002, *Thromb. Haemost.*, 87, 288.
- 52- Monteiro, R.Q., Foguel, D., Castro, H.C., Zingali, R.B. 2003, *Biochemistry*, 42, 509.
- 53- Zingali, R.B., Ferreira, M.S., Assafim, M., Frattani, F.S., Monteiro, R.Q. 2005, *Pathophysiol. Haemost. Thromb.*, 34, 160.
- 54- Castro, H.C., Dutra, D.L., Oliveira-Carvalho, A.L., Zingali, R.B. 1998, *Toxicon*, 36, 1903.
- 55- Castro, H.C.; Fernandes, M., Zingali, R.B. 1999, *Toxicon*, 37, 1403.
- 56- Usami, Y., Fujimura, Y., Suzuki, M., Ozeki, Y., Nishio, K., Fukui, H., Titani, K. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 928.
- 57- Hirabayashi, J., Kusunoki, T., Kasai, K. 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 2320.
- 58- Walker, J.R., Nagar, B., Young, N.M., Hiram, T., Rini, J.M. 2004, *Biochemistry*, 43, 3783.
- 59- Hamako, J., Suzuki, Y., Hayashi, N., Kimura, M., Ozeki, Y., Hashimoto, K., Matsui, T. 2007, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 146, 299.

- 60- Faili, A., Randon, J., Francischetti, I.M., Vargaftig, B.B., Hatmi, M. 1994, *Biochem. J.* 298, 87.
- 61- Polgár, J., Clemetson, J.M., Kehrel, B.E., Wiedemann, M., Magnenat, E.M., Wells, T.N., Clemetson K.J. 1997, *J. Biol. Chem.*, 272, 13576.
- 62- Leduc, M., and Bon, C. 1998, *Biochem. J.*, 333, 389.
- 63- Niedergang, F., Alcover, A., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Francischetti, I.M., Bon, C., Leduc, M. 2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273, 246.
- 64- Murakami, M.T., Zela, S.P., Gava, L.M., Michelin-Duarte, S., Cintra, A.C., Arni, R.K. 2003, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 478.
- 65- Kanaji, S., Kanaji, T., Furihata, K., Kato, K., Ware, J.L., Kunicki, T.J. 2003, *J. Biol. Chem.*, 278, 39452.
- 66- Batuwangala, T., Leduc, M., Gibbins, J.M., Bon, C., Jones, E.Y. 2004, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60, 46.
- 67- Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ching, A.T., Carvalho, E., Faria, F., Nishiyama, M.Y.Jr, Ho, P.L., Diniz, M.R. 2006, *Genetics*, 173, 877.
- 68- Xu, Q., Wu, X.F., Xia, Q.C., Wang, K.Y. 1999, *Biochem. J.*, 341, 733.
- 69- Zeng, R., Xu, Q., Shao, X.X., Wang, K.Y., Xia, Q.C. 2001, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15, 2213.
- 70- Hirata, Y., Ito, M., Nikai, T., Kato, S., Komori, Y., Sugiura, H., Ohizumi, Y. 1999, *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 1207.
- 71- Fukuda, K., Mizuno, H., Atoda, H., Morita, T. 1999, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 55, 1911.
- 72- Shin, Y., Okuyama, I., Hasegawa, J., Morita, T. 2000, *Thromb. Res.*, 99, 239.
- 73- Lee, W.H., and Zhang, Y. 2003, *Toxicon*, 41, 885.
- 74- Peng, M., Lu, W., Kirby, E.P. 1991, *Biochemistry*, 30, 11529.
- 75- Peng, M., Lu, W., Kirby, E.P. 1992, *Thromb. Haemost.*, 67, 702.
- 76- Yoshida, E., Fujimura, Y., Miura, S., Sugimoto, M., Fukui, H., Narita, N., Usami, Y., Suzuki, M., Titani, K. 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 1386.
- 77- Usami, Y., Suzuki, M., Yoshida, E., Sakurai, Y., Hirano, K., Kawasaki, T., Fujimura, Y., Titani, K. 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 219, 727.
- 78- Kowalska, M.A., Tan, L., Holt, J.C., Peng, M., Karczewski, J., Calvete, J.J., Niewiarowski, S. 1998, *Thromb. Haemost.*, 79, 609.
- 79- Dörmann, D., Clemetson, J.M., Navdaev, A., Kehrel, B.E., Clemetson, K.J. 2001, *Blood.*, 97, 929.
- 80- Arpijuntarangkoon, J., Rojnuckarin, P., Muanpasitporn, C., Kaeothip, S., Sangvanich, P., Intragumtornchai, T. 2007, *Platelets*, 18, 266.
- 81- Lu, Q., Navdaev, A., Clemetson, J.M., Clemetson, K.J. 2004, *Thromb. Haemost.*, 91, 1168.
- 82- Atoda, H., Hyuga, M., Morita, T. 1991, *Eur. J. Biol. Chem.*, 266, 14903.
- 83- Atoda, H., and Morita, T. 1993, *J. Biochem.*, 113, 159.
- 84- Suzuki, N., Fujimoto, Z., Morita, T., Fukamizu, A., Mizuno, H. 2005, *J. Mol. Biol.*, 353, 80.
- 85- Suzuki, N., Shikamoto, Y., Fujimoto, Z., Morita, T., Mizuno, H. 2005, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 61, 147.
- 86- Zhong, S.R., Jin, Y., Wu, J.B., Chen, R.Q., Jia, Y.H., Wang, W.Y., Xiong, Y.L., Zhang, Y. 2006, *Toxicon*, 47, 104.
- 87- Lin, L.P., Lin, Q., Wang, Y.Q. 2007, *Toxicon*, 50, 411.
- 88- Abreu, P.A., Albuquerque, M.G., Rodrigues, C.R., Castro, H.C. 2006, *Toxicon*, 48, 690.
- 89- Aragón-Ortiz, F., Mentele, R., Auerswald, E.A. 1996, *Toxicon*, 34, 763.
- 90- Mizuno, H., Fujimoto, Z., Koizumi, M., Kano, H., Atoda, H., Morita, T. 1997, *Nat. Struct. Biol.*, 4, 438.
- 91- Ogawa, T., Chijiwa, T., Oda-Ueda, N., Ohno, M. 2005, *Toxicon*, 45, 1.
- 92- Weis, W.I., and Drickamer, K. 1996, *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 441.
- 93- Rini, J.M. 1995, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24, 551.
- 94- Li, W.F., Chen, L., Li, X.M., Liu, J. 2005, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332, 904.
- 95- Atoda, H., and Morita, T. 1989, *J. Biochem.* 106, 808.

- 96- Sekiya, F., Atoda, H., Morita, T. 1993, *Biochemistry*, 32, 6892.
- 97- Chen, Y.L.; and Tsai, I.H. 1996, *Biochemistry*, 35, 5264.
- 98- Koo, B.H., Sohn, Y.D., Hwang, K.C., Jang, Y., Kim, D.S., Chung, K.H. 2002, *Toxicon*, 40, 947.
- 99- Atoda, H., Ishikawa, M., Yoshihara, E., Sekiya, F., Morita, T. 1995, *J. Biochem.*, 118, 965.
- 100- Zang, J., Teng, M., Niu, L. 2003, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 59, 730.
- 101- Cox, A.C. 1993, *Toxicon*, 31, 1445.
- 102- Atoda, H., Ishikawa, M., Mizuno, H., Morita, T. 1998, *Biochemistry*, 47, 17361.
- 103- Xu, X., Liu, Q., Xie, Y., Wu, S.D. 2000, *Toxicon*, 38, 1517.
- 104- Tani, A., Ogawa, T., Nose, T., Nikandrov, N.N., Deshimaru, M., Chijiwa, T., Chang, C.C., Fukumaki, Y., Ohno, M. 2002, *Toxicon*, 40, 803.
- 105- Sekiya, F., Yamashita, T., Morita, T. 1995, *Biochemistry*, 34, 10043.
- 106- Xu, X., Liu, Q., Xie, Y. 2002, *Biochemistry*, 41, 3546.
- 107- Xu, X., Liu, Q., Liu, Y., Xie, Y. 2002, *J. Protein. Chem.*, 21, 123.
- 108- Xu, X., Liu, Q., Yu, H., Xie, Y. 2002, *Protein Sci.*, 11, 944.
- 109- Atoda, H., Kaneko, H., Mizuno, H., Morita, T. 2002, *FEBS Lett.*, 531, 229.
- 110- Atoda, H., Yoshida, N., Ishikawa, M., Morita, T. 1994, *Eur. J. Biochem.*, 224, 703.
- 111- Shikamoto, Y., Morita, T., Fujimoto, Z., Mizuno, H. 2003, *J. Biol. Chem.*, 278, 24090.
- 112- Oliveira-Carvalho, A.L., Guimarães, P.R., Abreu, P.A., Dutra, D.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Rodrigues, C.R., Ho, P.L., Castro, H.C., Zingali, R.B. 2008, *Toxicon*, 51, 659.
- 113- Koh, Y., Chung, K., Kim, D. 2000, *Thromb. Res.*, 99, 389.
- 114- Kawasaki, T., Fujimura, Y., Usami, Y., Suzuki, M., Miura, S., Sakurai, Y., Makita, K., Taniuchi, Y., Hirano, K., Titani, K. 1996, *J. Biol. Chem.*, 271, 10635.
- 115- Anderson, P.J., Nasset, A., Dharmawardana, K.R., Bock, P.E. 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 16435.
- 116- Read, M.S., Shermer, R.W., Brinkhous, K.M. 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75, 4514.
- 117- Brinkhous, K.M., Read, M.S., Fricke, W.A., Wagner, R.H. 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 1463.
- 118- Hamako, J., Matsui, T., Suzuki, M., Ito, M., Makita, K., Fujimura, Y., Ozeki, Y., Titani, K. 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226, 273.
- 119- Andrews, R.K., Booth, W.J., Gorman, J.J., Castaldi, P.A., Berndt, M.C. 1989, *Biochemistry*, 28, 8317.
- 120- Matsushita, T., Meyer, D., Sadler, J.E. 2000, *J. Biol. Chem.*, 275, 11044.
- 121- Fukuda, K., Doggett, T.A., Bankston, L.A., Cruz, M.A., Diacovo, T.G., Liddington, R.C. 2002, *Structure*, 10, 943.
- 122- Maita, N., Nishio, K., Nishimoto, E., Matsui, T., Shikamoto, Y., Morita, T., Sadler, J.E., Mizuno, H. 2003, *J. Biol. Chem.*, 278, 37777.
- 123- Dong, J., Ye, P., Schade, A.J., Gao, S., Romo, G.M., Turner, N.T., McIntire, L.V., López, J.A. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 16690.
- 124- Peng, M., Holt, J.C., Niewiarowski, S. 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205, 68.
- 125- Taniuchi, Y., Kawasaki, T., Fujimura, Y., Suzuki, M., Titani, K., Sakai, Y., *et al.* 1995, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1244, 331.
- 126- Du, X.Y., Clemetson, J.M., Navdaev, A., Magnenat, E.M., Wells, T.N., Clemetson, K.J. 2002, *J. Biol. Chem.*, 277, 35124.
- 127- Lee, W.H., Du, X.Y., Lu, Q.M., Clemetson, K.J., Zhang, Y. 2003, *Thromb. Haemost.*, 90, 662.
- 128- Lee, W.H., Zhuang, Q.Y., Zhang, Y. 2003, *Toxicon*, 41, 765.
- 129- Marcinkiewicz, C., Lobb, R.R., Marcinkiewicz, M.M., Daniel, J.L., Smith, J.B., Dangelmaier, C., *et al.* 2000, *Biochemistry*, 39, 9859.
- 130- Wang, R., Kini, R.M., Chung, M.C. 1999, *Biochemistry*, 38, 7584.

- 131- Bergmeier, W., Bouvard, D., Eble, J.A., Mokhtari-Nejad, R., Schulte, V., Zirngibl, H., Brakebusch, C., Fässler, R., Nieswandt, B. 2001, *J. Biol. Chem.*, 276, 25121.
- 132- Suzuki-Inoue, K., Fuller, G.L., Garcia, A., Eble, J.A., Pohlmann, S., Inoue, O., *et al.* 2006, *Blood*, 107, 542.
- 133- Jasti, J., Paramasivam, M., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2004. *J Mol Biol.* 335:167.
- 134- Lu, Q., Clemetson, J.M., Clemetson, K.J. 2005, *J. Thromb. Haemost.* 3, 2065.
- 135- Peng, M., Emig, F.A., Mao, A., Lu, W., Kirby, E.P., Niewiarowski, S., Kowalska, M.A. 1995, *Thromb. Haemost.*, 74, 954.
- 136- Peng, M., Lu, W., Beviglia, L., Niewiarowski, S., Kirby, E.P. 1993, *Blood*, 81, 2321.
- 137- Huang, T.F., Liu, C.Z., Yang, S.H. 1995, *Biochem J.*, 309, 1021.
- 138- Shin, Y., and Morita, T. 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 741.
- 139- Andrews RK, Kroll MH, Ward CM, Rose JW, Scarborough RM, Smith AI, López JA, Berndt MC. 1996 *Biochemistry*, 35, 12629.
- 140- Francischetti, I.M., Saliou, B., Leduc, M., Carlini, C.R., Hatmi, M., Randon, J., Faili, A., Bon, C. 1997, *Toxicon*, 35, 1217.
- 141- Harrison, R.A., Oliver, J., Hasson, S.S., Bharati, K., Theakston, R.D. 2003, *Gene*, 315, 95.
- 142- Wei, Q., Lu, Q.M., Jin, Y., Li, R., Wei, J.F., Wang, W.Y., Xiong, Y.L. 2002, *Toxicon*, 40, 1331.
- 143- Okuda, D., Horii, K., Mizuno, H., Morita, T. 2003, *J. Biochem.* 134, 19.
- 144- Chen, Y.L., Tsai, K.W., Chang, T., Hong, T.M., Tsai, I.H. 2000, *Thromb. Haemost.*, 83, 119.
- 145- Chung, C.H., Au, L.C., Huang, T.F. 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 263, 723.
- 146- Hu, S., Li, W., Chen, L., Liu, J. 2005, *Toxicon*, 46, 716.
- 147- Kashima, S., Roberto, P. G., Soares, A. M., Astolfi-Filho, S. *et al.* 2004, *Biochimie*, 86, 211.
- 148- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L. 2002, *Gene*, 299, 279.
- 149- Francischetti, I.M., My-Pham, V., Harrison, J., Garfield, M.K., Ribeiro, J.M. 2004, *Gene*, 337, 55.
- 150- Ching, A.T., Rocha, M.M., Paes Leme, A.F., Pimenta, D.C. de Fátima, D., Furtado, M., Serrano, S.M., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L. 2006, *FEBS Lett.*, 580, 4417.
- 151- Pierre, L.S., Woods, R., Earl, S., Masci, P.P., Lavin, M.F. 2005, *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 2679.
- 152- Qinghua, L., Xiaowei, Z., Wei, Y., Chenji, L. *et al.* 2006, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341, 522.
- 153- Wagstaff, S.C., and Harrison, R.A. 2006, *Gene*, 377, 21.
- 154- Zhang, B., Liu, Q., Yin, W., Zhang, X. *et al.* 2006, *BMC Genomics*, 7, 152.
- 155- Pahari, S., Mackessy, S.P., Kini, R.M. 2007, *BMC Mol. Biol.*, 8, 115.
- 156- Fox, J.W., Serrano, S.M. 2008, *Proteomics*, 8, 909.
- 157- Angulo, Y., Escolano, J., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Sanz, L., Calvete, J.J. 2007, *J. Proteome Res.*, 7, 708.
- 158- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Sanz, L. 2006, *J Proteome Res.*, 6, 326.
- 159- Calvete, J.J., Escolano, J., Sanz, L. 2007, *J. Proteome Res.*, 6, 2732.
- 160- Kulkeaw, K., Chaicumpa, W., Sakolvaree, Y., Tongtawe, P., Tapchaisri, P. 2007, *Toxicon*, 49, 1026.
- 161- Sanz, L., Gibbs, H.L., Mackessy, S.P., Calvete, J.J. 2006, *J. Proteome Res.*, 5, 2098.
- 162- Fox, J.W., Ma, L., Nelson, K., Sherman, N.E., Serrano, S.M. 2006, *Toxicon*, 47, 700.
- 163- Bazaa, A., Marrakchi N, El Ayeb M, Sanz L, Calvete JJ., *Proteomics.* 5(16):4223-35.
- 164- Serrano, S.M., Shannon, J.D., Wang, D., Camargo, A.C., Fox, J.W. 2005, *Proteomics*, 5, 501.
- 165- Li, S., Wang, J., Zhang, X., Ren, Y., Wang, N., Zhao, K., Chen, X., Zhao, C., Li, X., Shao, J., Yin, J., West, M.B., Xu, N., Liu, S. 2004, *Biochem. J.*, 384, 119.
- 166- Juarez, P., Sanz, L., Calvete, J.J. 2004, *Proteomics*, 4, 327.
- 167- Nawarak, J., Sinchaikul, S., Wu, C.Y., Liau, M.Y., Phutrakul, S., Chen, S.T. 2003, *Electrophoresis*, 24, 2838.

- 168- De-Simone SG, Netto CC, Silva FP Jr. 2006 *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*;838(2):135-8.
- 169- Juárez, P., Wagstaff, S.C., Oliver, J., Sanz, L., Harrison, R.A., Calvete, J.J. 2006, *J. Mol. Evol.* 63, 142.
- 170- Mody, R., Shantaram, J., Chaney, W. 1995, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 33, 1.
- 171- Biesa, C., Lehra, C-M., Woodleyb, J.F. 2004, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 56, 425.
- 172- Xu, G., Ulrichs, H., Vauterin, S., De Meyer, S.F., Deckmyn, H., Teng, M., Niu, L. 2005, *Toxicon.* 45, 561.
- 173- Xu, G., Huang, Q., Teng, M., Liu, P., Dong, Y., Niu, L. 2005, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 75.
- 174- Xu, G., Teng, M., Niu, L., Liu, P., Dong, Y., Liu, Q., Huang, Q., Hao, Q. 2004, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2035.
- 175- Li, X., Zheng, L., Kong, C., Kolatkar, P.R., Chung, M.C. 2004, *Arch. Biochem. Biophys.* 424, 53.
- 176- Huang, K.F., Ko, T.P., Hung, C.C., Chu, J., Wang, A.H., Chiou, S.H. 2004, *Biochem. J.* 378, 399.
- 177- Du, X.-Y., Magnenat, E., Wells, T.N., Clemetson, K.J. 2002, *Thromb. Haemost.* 87, 692.
- 178- Wang, W.J. 2008, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 753.
- 179- Yeh, C.H., Wang, W.C., Hsieh, T.T., Huang, T.F. 2000, *J. Biol. Chem.* 275, 18615.
- 180- Liu, S., Zhu, Z., Sun, J., Zhu, Z., Huang, Q., Teng, M., Niu, L. 2002, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58, 675.
- 181- Rucavado, A., Soto, M., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D., Fox, J.W., Escalante, T., Gutiérrez, J.M. 2001, *Thromb. Haemost.* 85, 710.
- 182- Paaventhana, P., Kong, C., Joseph, J.S., Chung, M.C., Kolatkar, P.R. 2005, *Protein Sci.* 14, 169.

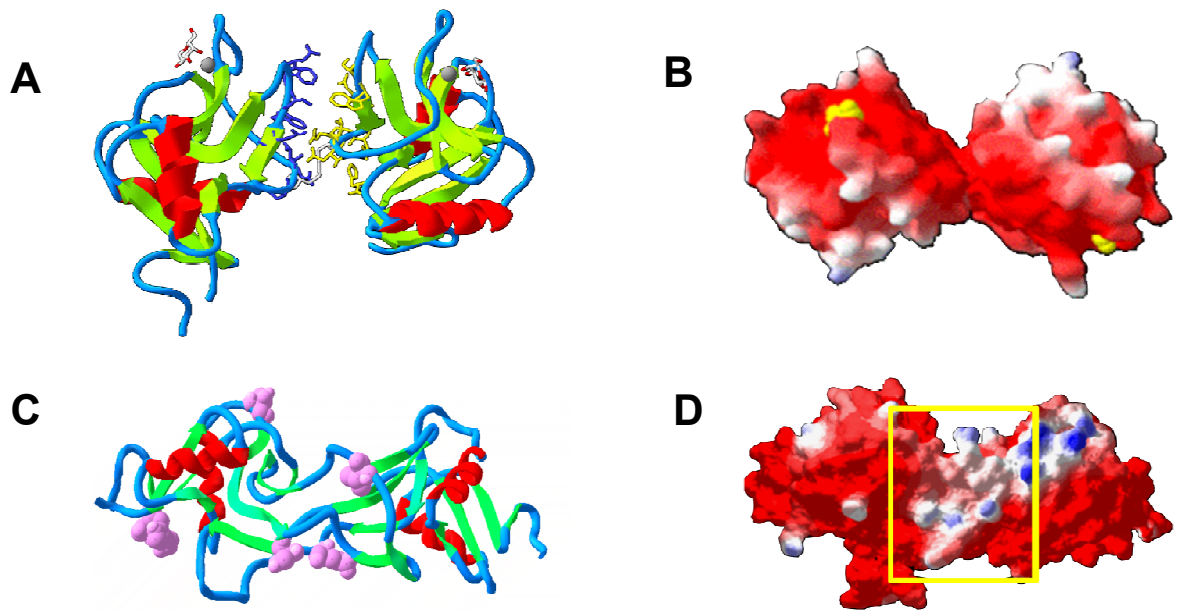


Figure 1. Models of representative of each CTL or CTL-Like protein subclass.

A, Ribbon representation of the CTL BjcUL homodimer complexed with calcium and galactose. The interchain disulfide bridge is indicated in white, calcium in gray, and residues at the interface environment represented in blue and yellow. The atoms and bonds of galactose are color coded according to atom type (red for oxygen and white for Carbon); **C**, Ribbon representation of the CTL-Like, Bothrojaracin (Bjc), in that is composed of a globular body and an extended loop, respectively, forming an intertwined dimer. Solid spheres in pink represent the four regions containing the non-conserved positions as compared to bothroinsularin. **B**, **D**: Electrostatic potential maps of BjcUL (B) and Bin (D) homology models (Figure gently provide by H.C.Castro).

Curriculum Vitae

Nome: Viviane Guimarães Gomes

Nascimento: 17/08/1979

Naturalidade: Rio de Janeiro

Formação Acadêmica

- Graduação em Enfermagem e Obstetrícia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1998 a 2002.
- Mestrado em Bioquímica no Instituto de Bioquímica Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002 a 2004.
- Doutorado em Bioquímica no Instituto de Bioquímica Médica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004 a 2008.

Orientação de Estudante

- Eduardo da Silva Pereira. Iniciação científica, 2005.

Comunicação em Congresso

- 07 comunicações em congressos nacionais.
- 02 comunicações em congressos internacionais.

Publicações

- **Guimarães-Gomes, V.**, Aguiar, R.M., Hingel, M.A., Santos, R.B. (2003). Infecção hospitalar: conhecimento dos acadêmicos de enfermagem. *Enfermagem Brasil*, v. 02: 141-149 (artigo completo).
- **Guimarães-Gomes, V.**, Oliveira-Carvalho, A.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Dutra, D.L.S., Castro, H.C., Ho, P.L., Zingali, R.B. (2003). Cloning and purification of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 09, n. 02 (artigo resumido).
- **Guimarães-Gomes, V.**, Oliveira-Carvalho, A.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Dutra, D.L.S., Pujol-Luz, M., Castro, H.C., Ho, P.L., Zingali, R.B. (2004) Cloning, characterization and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, v. 432: 01-11 (artigo completo).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)