

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

RAIANA APOLINÁRIO DE PAULA

**ESTUDO DA DINÂMICA MOLECULAR DAS LECTINAS DE
VENENO DE *Bothrops jararaca* (BJL), *Bothrops
jararacussu* (BJcuL) E *Bothrops leucurus* (BIL)**

Recife
2017

RAIANA APOLINÁRIO DE PAULA

**ESTUDO DA DINÂMICA MOLECULAR DAS LECTINAS DE VENENO
DE *Bothrops jararaca* (BJL), *Bothrops jararacussu* (BJcuL) E
Bothrops leucurus (BIL)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em de Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração BIOQUÍMICA E FISILOGIA, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Russolina
Benedeta Zingali
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza
dos Santos Correia

Recife
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Paula, Raiana Apolinário de

Estudo da dinâmica molecular das lectinas de veneno de *Bothrops jararaca* (BJL), *Bothrops jararacussu* (BJcuL) e *Bothrops leucurus* (BIL)/ Raiana Apolinário de Paula- 2017.

139 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Russolina Benedeta Zingali

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2017.

Inclui referências

1. Lectinas 2. Cobras venenosas- veneno 3. Sangue-coagulação I. Zingali, Russolina Benedeta (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-

RAIANA APOLINÁRIO DE PAULA

**ESTUDO DA DINÂMICA MOLECULAR DAS LECTINAS DE VENENO
DE *Bothrops jararaca* (BJL), *Bothrops jararacussu* (BJcuL) E
Bothrops leucurus (BIL)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em de Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração BIOQUÍMICA E FISILOGIA, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 17 / 02 / 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico este trabalho à minha mãe
Aparecida, pelo seu amor incondicional,
esforço, dedicação e compreensão, em
todos os momentos desta e de outras
caminhadas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, renovado a cada provação que se apresenta, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Às minhas orientadoras e amigas Professoras Russolina Benedeta Zingali e Maria Tereza dos Santos Correia, pela paciência, sensibilidade, apoio ao longo desta jornada e principalmente por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de mulheres as quais sempre farão parte da minha vida.

À Professora Maria Luiza Vilela Oliva, por me receber muito bem e proporcionar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório com acesso total e junto aos seus alunos. Serei eternamente grata pelo apoio, incentivo e sugestões para realização desta pesquisa. Sem o seu precioso apoio este trabalho não seria possível de ser conduzido.

Aos Professores Vera Lúcia de Menezes Lima, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, membros da Banca Examinadora, por terem atendido ao convite para desempenhar este papel, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar este trabalho.

À minha querida mainha Aparecida, por ser tão dedicada e amiga, a pessoa que mais me apóia creditando na minha capacidade, o meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho e a quem credito a totalidade do meu sucesso. Minha Linda te amo!!

Ao meu pai Paulo Ferreira, por seu amor, confiança, estímulo, fé constantes e por entender minhas prioridades e sempre acreditar sempre no meu potencial. Papito te amo!!

À minha querida avó Edite, por todo o seu amor, paciência, dedicação e apoio sempre demonstrado. Meu eterno amor e agradecimento.

Ao meu querido avô Rodrigo, por me fazer acreditar que nada é impossível, pessoa que sigo como exemplo, dedicado, amigo, batalhador, uma pessoa que mostrou que muitas vezes um gesto marca mais que muitas palavras, coração bondoso que

dedicou toda sua vida à família. Meu eterno amor e agradecimento.

À minha querida tia e Madrinha Cristina dos Santos, por seu exemplo de determinação, coragem, competência, pelo seu amor, alegria, e atenção sem reservas...

Ao meu querido tio e Padrinho Pedro dos Santos, pela amizade, amor, companherismo, inúmeros momentos de descontração e força nessa minha caminhada.

Ao meu querido tio Marcelo, pelo amor, carinho, companherismo e todas as contribuições para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectualmente.

À minha querida amiga e Doutora Mychely Melo, que mesmo sendo famosa nacionalmente nunca esqueceu seus amigos e continuou com sua simplicidade nos dando a honra de sua presença. Brincadeiras a parte, quero te agradecer Xely pelos momentos incríveis que passamos juntas durante esses 10 anos de parceria na UFPE, apoio incondicional, companheirismo, paciência, momentos de felicidade e também de tristezas. Sua tranquilidade me inspirou muitas vezes e me ajudou a superar fases difíceis. Nosso laço de amizade sem dúvida alguma é um dos melhores momentos desta jornada!!!

Ao meu amigo Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, pelos valiosos momentos de aprendizagem e debates; por seu apoio, colaboração e importantes sugestões ao longo deste trabalho que o tornou mais completo. Você sempre foi uma inspiração para mim desde que cheguei em 2007 no laboratório de Glicoproteínas.

À minha “amiguínea” e futura Mestra Rafaela Mota, por seu carinho, inigualável convivência, vários momentos de discussões que proporcionaram crescimento profissional. Passamos por muitos momentos difíceis, foram inúmeros trabalhos; mas também tivemos muitos momentos de descontração, várias conversas, passeios e compras! Tudo foi necessário para nosso crescimento. Acredite valeu muito apena!!!

À minha amiga Mariana Cristina, pelo apoio e cumplicidade; por me receber e me fazer conhecer muito bem a cidade de São Paulo, por sempre ouvir os meus apereios tantas vezes quantas foram necessárias para me acalmar e diminuir a natural ansiedade de quem tem de dar conta de uma grande responsabilidade em um tempo limitado. Seus conselhos e sugestões foram fundamentais para a realização do meu

trabalho. Serei eternamente grata.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica que conquistei para a vida toda... Ana Paula, Carol, Cibele, Clóvis, Elba, Evelyne, Fernanda Andrade, Fernanda Pacífico, Isabel, Larissa, Mariana, Marina, Marisol, Milena, Mychely, Paula Fernanda, Priscilla Sales, Renata Maria, Robson, Thiago Cahú e Túlio. Coloquei em ordem alfabética para não dizerem que amo mais um do que o outro! Tenho que agradecer a vocês por fazerem parte do meu cotidiano durante estes últimos 10 anos, por me ajudarem nas dúvidas que vez por muitas vezes me surgiam, por me apoiar nos momentos difíceis e, até mesmo, por estarem presentes nos momentos mais descontraídos, além de me ajudarem a concretizar meu aprendizado em bioquímica. Com vocês aprendi a trabalhar coletivamente e a tomar gosto pela pesquisa. A todos vocês os meus mais sinceros agradecimentos.

Estendo meus agradecimentos aos meus amigos Augusto, Ana Carvalho, Carlos, Denize, Dione, Flávia, Marjolly, Rafael, Ricardo, Roseane, Vanessa e Viviane do Laboratório UEMP –UFRJ por me receberem de maneira tão acolhedora e principalmente pelos valiosos ensinamentos que aprendi.

Aos meus queridos amigos André Lira, Camila, Joana, Luciana, Luiza, Ricardo, Rodrigo, Sarah e Tati, que tive o privilégio de trabalhar no Laboratório de Bioquímica da UNIFESP, sou eternamente grata por tudo que pude aprender com vocês, e obrigada por toda paciência que tiveram com os meus erros. Não tenho palavras para expressar como sou grata por toda a experiência que adquiri com cada um de vocês. Não esqueço como vocês amenizaram meus momentos difíceis e dos nossos divertimentos que fazia nossos dias ficarem mais leves. E não podia deixar de ressaltar nossos melhores momentos ... aqueles de muita “gordice” que acontecia a qualquer hora do dia desde o almoço até o lanchinho da tarde. Lembrem-se à distância e o tempo nunca irão nos separar, vocês fazem parte do meu coração.

Preciso também agradecer a Annielle, minha querida *roommate*. Obrigada por agüentar minha catarolice matinal, minhas reclamações (a respeito do frio) e a bagunça que ficava cozinha quando eu entrava lá. Você me deu força em tudo que precisei.

Aos meus queridos amigos Miron, João e Helena, pelo carinho imenso que vocês têm por mim, por estarem sempre dispostos a me ouvir, sempre me apoiando, pela disposição constante em ajudar, gentileza e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco – FACEPE, pelo apoio científico e financeiro.

Muitas foram as pessoas que me auxiliaram ao longo desses anos todos. Não importa o que fizeram, elas estiveram presentes e disso eu jamais esquecerei. A todas elas, os meus mais sinceros agradecimentos, meu carinho e também meu pedido de desculpas pelas falhas que tenha cometido durante esse tempo.

Muito obrigada. Grande beijo!!!

“Aonde fica a saída?”, Perguntou Alice ao gato que
ria.
“Depende”, respondeu o gato.
“De quê?”, replicou Alice;
“Depende de para onde você quer ir...”

Lewis Carroll, 1865.

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se encontram em vários organismos e se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados. As lectinas do tipo C de animal são uma grande família de lectinas dependentes de Ca^{2+} . Os venenos de serpentes contêm lectinas do tipo C com propriedades de se ligarem à galactose. Elas são capazes de inibir ou ativar receptores específicos de membrana de plaquetas e fatores de coagulação do sangue. Podendo promover uma grande quantidade de efeitos biológicos. O presente estudo foi realizado com o objetivo de purificar lectinas de venenos de serpentes de *B. jararaca* (BJL), de *B. jararacussu* (BJcuL) e de *B. leucurus* (BIL) com novo protocolo por cromatografia de afinidade em gel de guar e avaliadas a sua ação na coagulação sanguínea, agregação plaquetária e formação de coágulo de fibrina. Estas lectinas exibem homogeneidade na sua purificação apresentando um padrão com um único pico na cromatografia de fase reversa usando uma coluna C-18. A pureza e o peso molecular de 32 kDa das lectinas foram confirmados por espectrometria de massa em MALDI / TOF. Também foi realizado o sequenciamento de aminoácidos dessas proteínas para comprovar a natureza lectínica dessas proteínas. Eles têm homologia de 98% com outras lectinas tipo- C de serpentes, provando que essas lectinas pertencem à família das verdadeiras lectinas do tipo C, ligadoras de galactose e dependentes de cálcio. Estas lectinas mostraram atividade proteolítica ao substrato sintético do fibrinogênio e alteraram o tempo de coagulação no aPTT em menos de 8 segundos, exibindo pró-coagulante ou anticoagulante característico, dependendo da concentração utilizada. Não apresentou atividade de agregação plasmática rica em plaquetas, plaquetas lavadas e não inibiu a agregação plaquetária induzida por colágeno, ácido araquidônico, adrenalina e trombina. Entretanto, essas lectinas estenderam o tempo para mais que 300 segundos para a formação de coágulos de fibrina devido a atividade anticoagulante que foi confirmada para incubar as lectinas com fibrinogênio e ao avaliar o perfil eletroforético desta interação observou-se que as lectinas foram capazes de hidrolisar a cadeia alfa do fibrinogênio. Essas lectinas podem representar uma ferramenta interessante na busca pelo mecanismo de ação das lectinas de veneno de serpente na coagulação sanguínea e elas também possuem atividade fibrinolítica.

Palavras-chave: Lectinas tipo-C. Coagulação sanguínea. Coágulo de fibrina.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins that found in a wide range of organisms and bind reversibly to carbohydrates and glycoconjugates. Animal C-type lectins are a large family of Ca^{2+} dependent lectins. Snake venoms contain C-type lectins with galactose-binding properties. They are able to inhibit or activate specific platelet membrane receptors and blood coagulation factors and can promote a large of biological effects. The present study was performed to purify lectins from snake venoms of *B. jararaca* (BJL), *B. jararacussu* (BJcuL) and *B. leucurus* (BIL) with new protocol by affinity chromatography in guar gel and evaluated for their assessment action on blood coagulation, platelet aggregation and formation of fibrin clot. These lectins exhibit homogeneity in your purification featuring a pattern with a single spike in reverse phase chromatography using a C-18 column. The purity and molecular weight of the lectins were confirmed by mass spectrometry in MALDI/TOF. Was also accomplished the sequencing of aminoacids of these proteins to prove lectin nature of these proteins. They have homology of 98% with other C-Type lectins of snakes, proving that these lectins belong to the family of the true C-type lectins galactose binding and calcium-dependent. These lectins showed proteolytic activity to the synthetic substrate of Fibrinogen and altered the clotting time in the aPTT less than 8 seconds, test only, displaying characteristic pro coagulant or anticoagulant depending on the concentration used. Showed no activity for aggregation plasma rich in platelets, washed platelet and not inhibited platelet aggregation induced by collagen, arachidonic acid, Adrenaline and Thrombin. However, these lectins have extended the time more than 300 seconds for fibrin clot formation due an anticoagulant activity that was confirmed to incubate the lectins with fibrinogen and when evaluating the electrophoretic profile of this interaction has been observed that the lectins were able to hydrolyze fibrinogen alpha chain. These lectins may represent an interesting tool in the search for the mechanism of action these lectins on blood coagulation in order to say that they also have fibrinolytic activity.

Keywords: C-type Lectins. Blood coagulation. Fibrin clot.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Extração da peçonha de <i>Bothrops leucurus</i>	23
FIGURA 2. <i>Bothrops jararaca</i>	24
FIGURA 3. <i>Bothrops jararacussu</i>	25
FIGURA 4. <i>Bothrops leucurus</i>	26
FIGURA 5. Um modelo atualizado da resposta hemostática à lesão vascular...	27
FIGURA 6. Modelo da cascata de coagulação proposto da década de 1960.....	29
FIGURA 7. Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação..	30
FIGURA 8. TAFI: ponto de conexão entre o sistema de coagulação e da fibrinólise, intermediado pelo complexo trombina/trombomodulina.....	35
FIGURA 9. Rede de hemaglutinação mediada por lectinas.....	38
FIGURA 10. Estrutura de lectinas tipo – C.....	45
FIGURA 11. Estrutura do complexo de ligação entre o trímero MBP-A e o Man6GlcNAc2Asn.....	46
FIGURA 12. Alinhamento múltiplo de SVgalL.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição das lectinas na natureza.....	39
TABELA 2. Classificação das lectinas quanto aos aspectos estruturais.....	41
TABELA 3- Inibição da atividade hemaglutinante das lectinas Tipo-C por carboidratos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina-difosfato
ApL	Lectina de <i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>
ASGPR	Receptor para assialoglicoproteínas (inglês “asialoglycoprotein receptor”)
ATP	Adenosina trifosfato
BaL	Lectina de <i>Bitis arietans</i>
BiL	Lectina de <i>Bothrops insularis</i>
BJcuL	Lectina de <i>Bothrops jararacussu</i>
BJcuL	Lectina tipo C de <i>Bothrops jararacussu</i>
BJL	Lectina de <i>Bothrops Jararaca</i>
BIL	Lectina de <i>Bothrops leucurus</i>
BmLec	Lectina de <i>Bothrops moojeni</i>
BpaLL	Lectina de <i>Bothrops pauloensis</i>
BpirL	Lectina de <i>Bothrops pirajai</i>
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
CRD	Domínio de reconhecimento a carboidratos (do inglês “carbohydrate recognition domain”)
CTLD	(do inglês “C-type lectin-like domain”)
CrL	Lectina de <i>Crotalus ruber</i>
CTLs	Lectinas tipo C (do inglês “C-type lectins”)
FGN	Fibrinogênio
FIX	Fator IX
FT	Fator tecidual
FV	Fator V
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado

FVIII	Fator VIII
FVIII	Fator VIII
FVIIIa	Fator VIII ativado
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
GPIb	Glicoproteína Ib
LmL	Lectina de <i>Lachesis muta stenophry</i>
MBPs	Proteínas de ligação de manose (do inglês “manose bind proteins”)
PAIs	Inibidores dos ativadores do plasminogênio (do inglês “plasminogen activator inhibitors”)
PDF	Produtos de degradação de fibrina
PF3	Fator plaquetário 3
PK	Pré-caliceína
PLG	Plasminogênio
Pn	Plasmina
RNA	Ácido ribonucleico
RSL	Lectina de cascavel
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de acrilamida usando Dodecil sulfato de sódio (do inglês “PolyAcrylamide Gel Electrophoresis - Sodium Dodecyl Sulfate”)
SVgallS	Lectinas de serpentes ligadoras de galactose (do inglês “Snake venom galactoside-binding lectins “)
TAFI	Inibidor da fibrinólise ativado por trombina (do inglês “thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor”)
TM	Trombomodulina
ToL	Lectina de <i>Trimeresurus okinavensis</i>
TP	Tempo de protrombina

TPA Ativador do plasminogênio do tecidual (do inglês “tecidual plasminogen activator”)

TsL Lectina de *Trimeresurus stejnegeri*.

TTPa Tempo de tromboplastina parcial ativado

TxA₂ Tromboxano A₂

UPA Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (do inglês “urokinase plasminogen activator”)

vWF Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	22
2.1 SERPENTES	22
2.2 HEMOSTASIA.....	26
2.2.1 Iniciação.....	30
2.2.2 Extensão.....	32
2.2.3 Estabilização.....	33
2.2.4 Sistema Fibrinolítico.....	34
2.3 LECTINAS.....	37
2.4 LECTINA DE ANIMAL.....	42
2.5 LECTINA DE TIPO – C	43
2.6 LECTINA TIPO – C DE SERPENTES.....	47
3 OBJETIVOS.....	56
3.1 OBJETIVO GERAL.....	56
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	56
4 RESULTADOS.....	57
4.1 ARTIGO 1 – A NEW C-TYPE LECTIN PURIFICATION APPROACH FOR <i>Bothrops jararacussu</i> VENOM: CHARACTERIZATION AND STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES.....	57
4.2 ARTIGO 2 – HEMOSTATICALLY ACTIVE C-TYPE GALACTOSE-BINDING LECTIN FROM <i>Bothrops leucurus</i> SNAKE VENON.....	80
4.3 ARTIGO 3 – A NEW METHOD TO PURIFY <i>Bothrops jararaca</i> VENOM LECTIN AND ITS EFFECT ON HEMOSTATIC PARAMETERS.....	105
5 CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS.....	130

1 INTRODUÇÃO

A fauna de répteis do Brasil é representada por 760 espécies sendo que 386 dessas espécies são serpentes e apenas 75 espécies são consideradas peçonhentas de importância médica. No Brasil, essas serpentes estão reunidas no grupo Caenophidia, sendo este, dividido em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Colubridae e Dipsadidae. A família Viperidae é dividida em duas subfamílias (Viperinae e Crotalinae) sendo os gêneros *Bothrops* (jararacas), *Bothrocophias*, *Lachesis* (surucucus) e *Crotalus* (cascavéis), pertencentes à subfamília Crotalinae. Esses quatro gêneros da Família Viperidae e dois gêneros da Família Elapidae (*Micrurus* [corais] e *Leptomicrurus*) representam as serpentes peçonhentas de interesse médico. A grande maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no país é devida às espécies do gênero *Bothrops*, que reúne o maior número de espécies e subespécies (COSTA; BÉRNILS, 2014).

A peçonha botrópica apresenta mais de 90% de seu peso seco constituído por um conjunto complexo de enzimas e diversos outros componentes protéicos que demonstram importante papel na alteração de processos fisiológicos. Dentre suas várias ações, a atividade proteolítica é inerente a todas as espécies do gênero. Estas enzimas não são responsáveis pela ação letal, mas sim por séria hemorragia e necrose local e/ou sistêmica principalmente por interferir em diversos pontos do mecanismo hemostático (BOLDRINI-FRANÇA et al, 2010; CUNHA; MARTINS, 2012).

Já é conhecido que a ação hemorrágica é um dos fenômenos mais característicos induzidos pela peçonha botrópica. Esta hemorragia pode ocorrer no local da picada assim como em outros tecidos e órgãos. O mecanismo de ação destas toxinas parece estar baseado na abertura das junções intercelulares entre as células endoteliais, ocasionando o extravasamento (fenômeno hemorrágico). Muitas dessas toxinas são proteases, que degradam colágeno tipo IV, principal constituinte da lâmina basal que recobre as células endoteliais (GUTTIERREZ, 1989). Já a ação coagulante pode ser decorrente de ações simultâneas como a conversão de fator X em fator X ativado; conversão de protrombina em trombina, na ausência de fator V (ativação direta); conversão de protrombina em trombina, na presença de fator V (ativação indireta) e finalmente da conversão de fibrinogênio em fibrina (atividade trombina-símile) (AMARAL et al, 1987).

Bothrops Jararaca (Jararaca) é uma serpente que é encontrada principalmente no sudeste e sul do Brasil. A lectina de *Bothrops Jararaca* (BJL) foi isolada do veneno dessa serpente usando uma combinação de cromatografias de afinidade e gel filtração e apresentou ligação aos carboidratos: galactose e metil α -D –galactopiranosídeo. Possui em sua estrutura o domínio de ligação a carboidratos (CRD-like) (OZEKI et al, 1994).

Bothrops jararacussu (Jararacuçu) é uma serpente encontrada em alguns estados das regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil. Uma lectina tipo C de *Bothrops jararacussu* (BJcuL) foi isolada usando uma combinação de cromatografias de afinidade e gel filtração e apresentou grande afinidade por galactose. (CORRÊA – NETTO et al, 2010)

Bothrops leucurus (Jararaca-de-rabo-branco) é uma importante serpente venenosa que habita o Nordeste do Brasil. Uma lectina foi isolada do veneno usando uma combinação de cromatografias de afinidade e gel filtração. A lectina de *Bothrops leucurus* (BIL) aglutina eritrócito de coelho, inibiu a aglutinação de eritrócitos por galactose, rafinose, lactose, soro bovino fetal, caseína e apresenta atividade antibacteriana e atividade citotóxica (NUNES et al. 2011).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica capazes de interagir especificamente com carboidratos e podem ser encontrados em animais, plantas, insetos e microorganismos (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011). As lectinas de animais são agrupadas em quatro famílias (Tipo C, I, S, P) conforme afinidade ao carboidrato ligante. As lectinas tipo C do veneno de serpentes são cálcio dependente e são exclusivamente homodímeros. Têm como carboidratos ligantes a manose, galactose, fucose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina. Possuem funções diversas como, por exemplo, participação na interação célula-célula, na imunidade inata e adquirida, montagem de rede da matriz extracelular (YAMAZAKI, 2007).

As diferenças estruturais entre as lectinas são devido à variação quanto ao número de subunidades por molécula e pela natureza dos polipeptídeos. Pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e também as interações hidrofóbicas podem estar presentes nas subunidades de associação (KENNEDY et al, 1995); as interações entre as subunidades parecem desempenhar um papel dominante para as diversas funções e estabilidade dessas proteínas (MITRA et al, 2002).

O estudo das várias biomoléculas presentes na peçonha das serpentes,

especialmente as lectinas, é de grande importância científica para a elucidação de diversos mecanismos fisiofarmacológicos, destacando-se a “cascata da coagulação”, a fibrinólise, o sistema complemento, o processo inflamatório, a atividade hemorrágica e miotóxica dessas proteínas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SERPENTES

As serpentes ou ofídios são animais vertebrados e carnívoros que pertencem ao grupo dos répteis. E da mesma maneira que os outros répteis, elas não conseguem controlar a temperatura de seu corpo, por isso são chamadas de animais ectotérmicos (INSTITUTO BUTANTAN, 2017).

Já foram descritas aproximadamente 3.576 espécies de serpentes no mundo, segundo a lista da Reptile Database, correspondendo a cerca de 35 % do total de espécies de répteis descritas (UETZ, 2015). A diversidade de répteis se destaca no Brasil ocupando o quarto lugar mundial, perdendo apenas para a Austrália, México e Índia (MARTINS; MOLINA, 2012). O Brasil é composto por 773 espécies de répteis e mais 48 subespécies, que totaliza 819 táxons, dos quais, destacam-se as 392 espécies de serpentes dentre estas apenas 75 espécies são consideradas peçonhentas, isto é, aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las (SBH, 2015). Estas serpentes peçonhentas estão reunidas no grupo Caenophidia dividido em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Colubridae e Dipsadidae. Uma das famílias de maior relevância no cenário nacional é a Viperidae, pois representa o grupo mais evoluído em relação à inoculação de peçonha, além de ocasionarem elevados índices de acidentes e mortes em seres humanos. A família Viperidae é dividida em duas subfamílias (Viperinae e Crotalinae) sendo os gêneros *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus*, pertencentes à subfamília Crotalinae (CIT, 2014).

A produção de substâncias tóxicas dos animais se dá por meio da bioacumulação de toxinas nos tecido através da alimentação ou pela produção própria por meio das glândulas produtoras de toxinas. Quando essa mistura é usada com a presença de aparato inoculador passa a ser chamada de peçonha e na sua ausência é chamada de veneno (OLIVEIRA; PIRES JR., 2011).

As peçonhas das serpentes apresentam uma mistura complexa de toxinas que causam modificações fisiológicas nas presas e foram desenvolvidas evolutivamente como estratégia de imobilizar e capturar seu alimento, ajudando na pré-digestão do seu alimento. As serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são os que apresentam o mais alto grau de especialização no aparelho venenífero, portanto apresentam um

complexo sistema de produção e estocagem de peçonha (Figura 1) (PINHO et al, 2008). Elas representam o gênero de serpentes mais estudadas no país por serem responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos e apresentarem grande diversidade na composição da peçonha. (SINITOX, 2013)

FIGURA 1 - Extração da peçonha de *Bothrops leucurus*.



Fonte: Arquivo pessoal de Breno Almeida, 2015.

As serpentes do gênero *Bothrops* causam a maior porcentagem dos acidentes ofídicos representando cerca de 90% devido à sua vasta distribuição geográfica e comportamento agressivo quando se sente ameaçada. (SGRINOLLI et al, 2011) Geralmente, a peçonha das serpentes possuem moléculas que compreendem cerca de 90% a 95% do seu peso seco, incluindo muitas proteínas tóxicas e não tóxicas. Os principais componentes químicos presentes na peçonha do gênero *Bothrops* são as metaloproteinases, serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas, miotoxinas e neurotoxinas (CUNHA; MARTINS, 2012).

As metaloproteinases compõem 50% da peçonha e são responsáveis por desencadear hemorragia (OLIVEIRA, 2009). As serinoproteases são enzimas proteolíticas, que constituem aproximadamente 20% do total de proteínas e atuam principalmente na digestão, hemostasia e ativação do sistema complemento (BARROS, 2010). As fosfolipases fazem parte de uma família de enzimas que causam neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, ativação ou inibição da agregação plaquetária, edema, convulsão, hipotensão, hemorragia interna (MASUDA et al, 2005). As desintegrinas possuem atividade antiplaquetária e antitrombótica. As miotoxinas causam a perda da permeabilidade seletiva para íons como o cálcio,

mediadores importantes no processo de necrose muscular (LEITE, 2004).

Bothrops jararaca é uma serpente terrestre de tamanho médio. Possui em média 120 centímetros de comprimento, podendo chegar até 160 centímetros, sendo relativamente delgada. O padrão de coloração desta espécie é extremamente variável. A coloração dorsal de fundo pode ser bronze, pardo, cinza, amarelo, oliva ou próximo ao marrom (Figura 2); é usualmente escura sobre a cabeça e as porções anteriores e posteriores do corpo. No Brasil, ela é encontrada no sudeste da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e estende-se a oeste para o extremo leste de Mato Grosso. A peçonha da jararaca pode provocar lesões no local da picada, tais como hemorragia e necrose (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

FIGURA 2 - *Bothrops jararaca*.

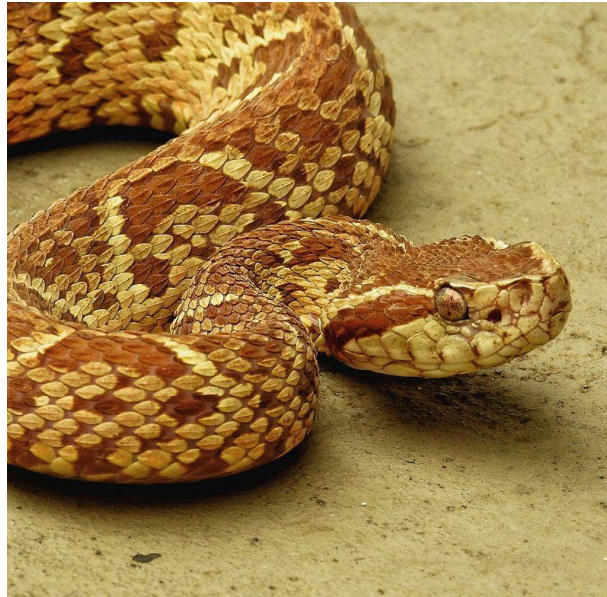


Fonte: Página do Instituto butantan¹.

Bothrops jararacussu é uma serpente de até 2 metros de comprimento e coloração dorsal variável entre cinza, rosa, amarelo, marrom ou preto, com manchas triangulares marrom-escuras (Figura 3). Sendo encontrada na Bahia e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul. A peçonha de *B jararacussu* apresenta uma alta atividade fosfolipásica e principalmente miotóxica, que são capazes de induzir mionecrose, hemorragia, edema, hipotensão e inibição da agregação plaquetária (TAKEDA, 2004).

¹Disponível em :

http://www.butantan.gov.br/educacao/cursos/biologiaanimal/reconhecimento_animaispeconhento/Paginas/default.as

FIGURA 3 - *Bothrops jararacussu*.

Fonte: Página do Wikipédia².

Bothrops leucurus (Jararaca-de-rabo-branco) é uma espécie de porte avantajado, podendo medir até 170 centímetros de comprimento e possui desenhos em forma de trapézio, tons marrons e ligeiramente amarelados, ventre esbranquiçado em forma de xadrez (Figura 4). Sendo comumente encontrada na faixa atlântica (Zona da Mata) do Nordeste, desde a Paraíba até o norte do Espírito Santo (GREGO et al, 2006). A peçonha da jararaca de rabo branco é capaz induzir atividade coagulante, edematogênica, hemorrágica e necrótica (CALMEY et al, 2002).

Foram registrados, pelo Ministério da Saúde (SINAN, 2016), 416.109 casos de acidentes ofídicos no Brasil entre os anos de 2000 e 2015. Dos acidentes ocorridos no país neste período, 1720 levaram as vítimas a óbito e destes, 564 foram registrados no Nordeste. A região Nordeste apresentou o maior número de vítimas fatais no ano de 2015, sendo 8 mortes em Pernambuco, considerado o terceiro estado do Nordeste com mais casos de acidentes ofídicos e óbitos registrados, ficando atrás apenas da Bahia e do Maranhão.

²Disponível em : <https://pt.wikipedia.org/wiki/Jararacu%C3%A7u>

FIGURA 4 - *Bothrops leucurus*.

Fonte: Arquivo pessoal de Breno Almeida, 2015.

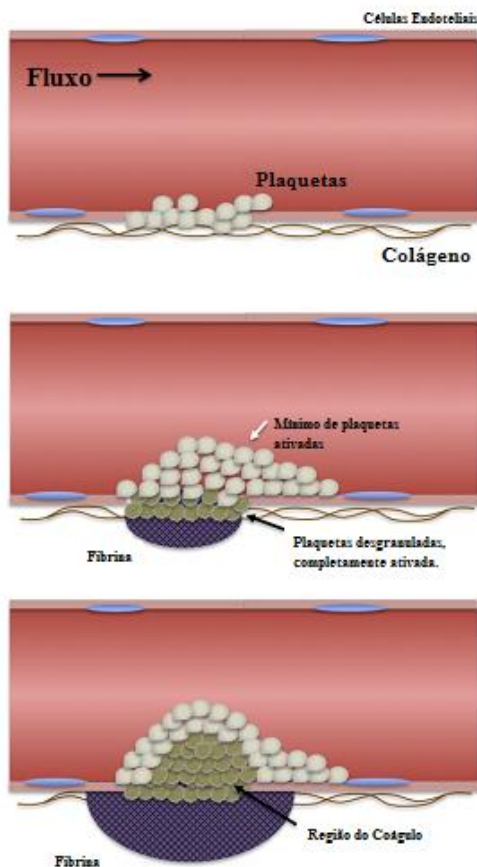
Foi demonstrado que peçonha de ofídios contém toxinas complexas que foram desenvolvidas e aprimoradas ao longo do tempo por esses animais e apresentam diversas ações nos sistemas biológicos. Nos acidentes por envenenamentos ofídicos é relatado principalmente os efeitos relacionados aos distúrbios na coagulação sanguínea. Com isso, essas biomoléculas dispõem de grande potencial para produção de novas drogas terapêuticas. Podendo ser usadas no tratamento para amenizar dores, tratamento de doenças como esclerose múltipla, doenças cardiovasculares, dentre outras doenças do sistema hemostático. Reforçando assim, a necessidade do conhecimento do potencial biotecnológico dos animais peçonhentos do Brasil (OLIVEIRA; PIRES JR., 2011).

2.2 HEMOSTASIA

O termo hemostasia pode ser definido como uma sequência complexa de fenômenos biológicos que ocorre em imediata resposta à lesão de um vaso sanguíneo com objetivo de deter a hemorragia. O mecanismo hemostático é formado por três

processos: Iniciação, extensão e estabilização (Figura 5). A finalidade desses processos é de manter a fluidez necessária do sangue, sem haver extravasamento pelos vasos ou obstrução do fluxo pela presença de trombos. As partículas envolvidas nesse processo incluem moléculas de adesão e seus ligantes, os receptores de superfície de plaquetas que iniciam as vias de sinalização intracelulares e a cascata de coagulação, a geração de trombina e fibrina (TOMAIUOLO et al, 2017).

FIGURA 5- Um modelo atualizado da resposta hemostática à lesão vascular. Este modelo atualizado leva em consideração o gradiente de ativação plaquetária vindo do local da lesão. GPIb, glicoproteína Ib; Tromboxano A₂ - TxA₂ e fator de von Willebrand – vWF.



1. Iniciação

Adesão inicial das plaquetas a região da lesão, mediada por interações GPIb-vWf e reforçada pela adesão ao colágeno.

2. Extensão

Ativação plaquetária por colágeno e trombina ocorrem na base do vaso. Recrutamento adicional de plaquetas na parte superior do coágulo necessita de ADP e/ou TxA₂.

3. Estabilização

Para a formação do coágulo é necessária a ativação plaquetária mediada por trombina. A formação de fibrina está localizada na base do coágulo e expande para o espaço extravascular.

Fonte: Adaptado de TOMAIUOLO et al, 2017

O sistema de coagulação por muito tempo foi considerado constituído apenas por fatores de coagulação e plaquetas. Atualmente, considera-se um sistema multifacetado, extremamente balanceado, no qual participam componentes celulares e moleculares. O modelo da cascata da coagulação foi um grande avanço para compreender a formação do coágulo *in vitro* e para monitoramento laboratorial, entretanto, tem falhado como um modelo do processo hemostático *in vivo* (COLMAN, 2001).

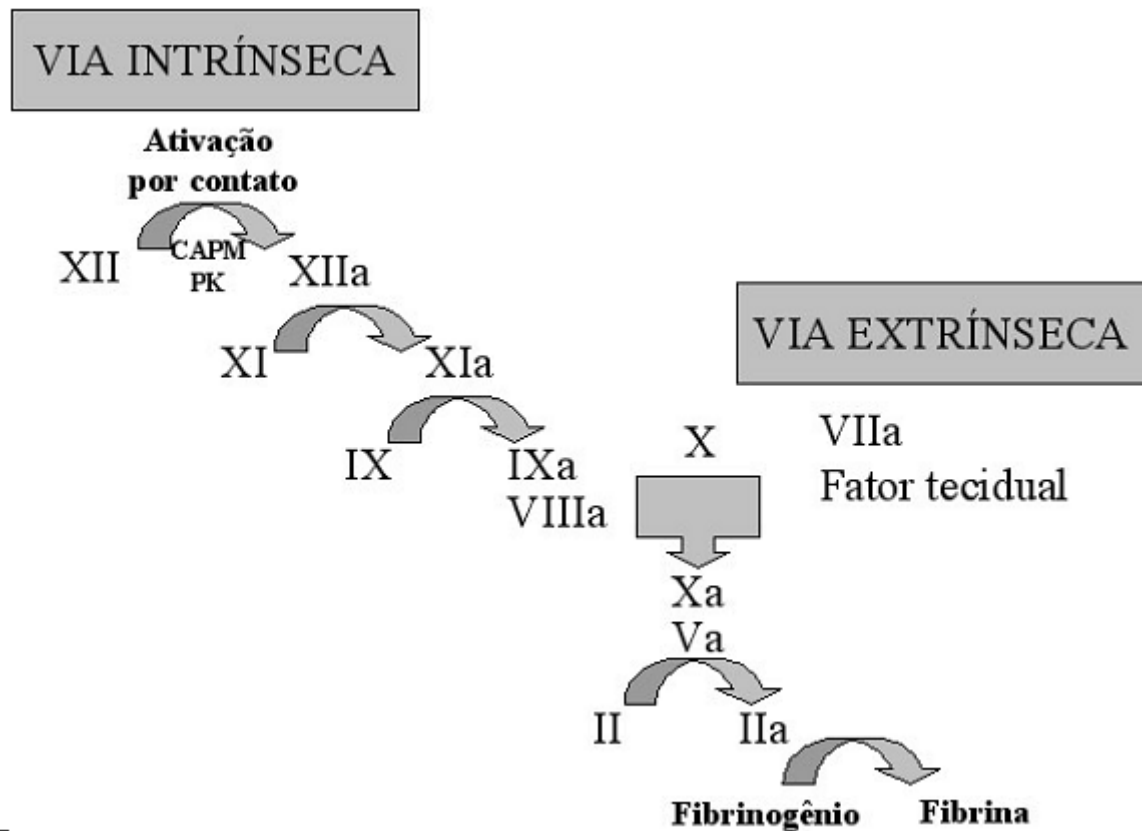
A clássica cascata da coagulação, proposta em 1964, por Macfarlane, Davie e Ratnoff foi proposta para explicar a fisiologia da coagulação do sangue, segundo o qual a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, resultando na formação de trombina que, então, quebra a molécula de fibrinogênio em monômeros de fibrina.

Esta proposta de cascata divide a coagulação em uma via extrínseca que envolve elementos do sangue e uma via intrínseca que é iniciada por componentes presentes no espaço intravascular. Essas vias convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X (FX). Na via extrínseca, o fator VII plasmático é ativado na presença de seu cofator, o fator tecidual (FT), formando o complexo fator VII ativado/FT (FVIIa/FT), responsável pela ativação do fator X. Na via intrínseca, a ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal processo é denominado "ativação por contato" e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (PK), uma serinoprotease e o cininogênio (CAPM) de alto peso molecular. O fator XII ativado ativa o fator XI que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IX ativado, na presença de fator VIII ativado por traços de trombina, e em presença e íons cálcio, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e, subsequentemente, formação de fibrina (Figura 6) (FERREIRA et al, 2010).

Este modelo se mostra inadequado no que diz respeito à importância relativa das duas vias de ativação da coagulação. Pode citar como exemplo a gravidade das manifestações hemorrágicas, decorrentes das deficiências dos fatores intrínsecos VIII e IX, na doença hemofílica A e B, respectivamente. No passado foi proposto que a via intrínseca teria maior relevância na fisiologia da coagulação. Entretanto, essa idéia não está correta, pois é de conhecimento que a deficiência do fator XI, fator XII, pré-caliceína e cininogênio são associados a um distúrbio hemorrágico leve. Portanto, os fatores intrínsecos não têm importância primária na geração do fator IXa durante o

processo hemostático normal. Por outro lado, a deficiência de fator VII, que é crucial para a ativação extrínseca da coagulação do sangue, está associada a um quadro hemorrágico similar à Hemofilia. Associando esses dados, solidifica a idéia que a ativação do fator IX não depende apenas da via intrínseca. Indicando que a coagulação do sangue é iniciada principalmente pela via do fator tecidual ou extrínseca. Adicionalmente, experimentos conduzidos nas últimas três décadas demonstraram que a via intrínseca e extrínseca não exibem funcionamento independente (FRANCO, 2001).

FIGURA 6 – Modelo da cascata de coagulação proposto da década de 1960.

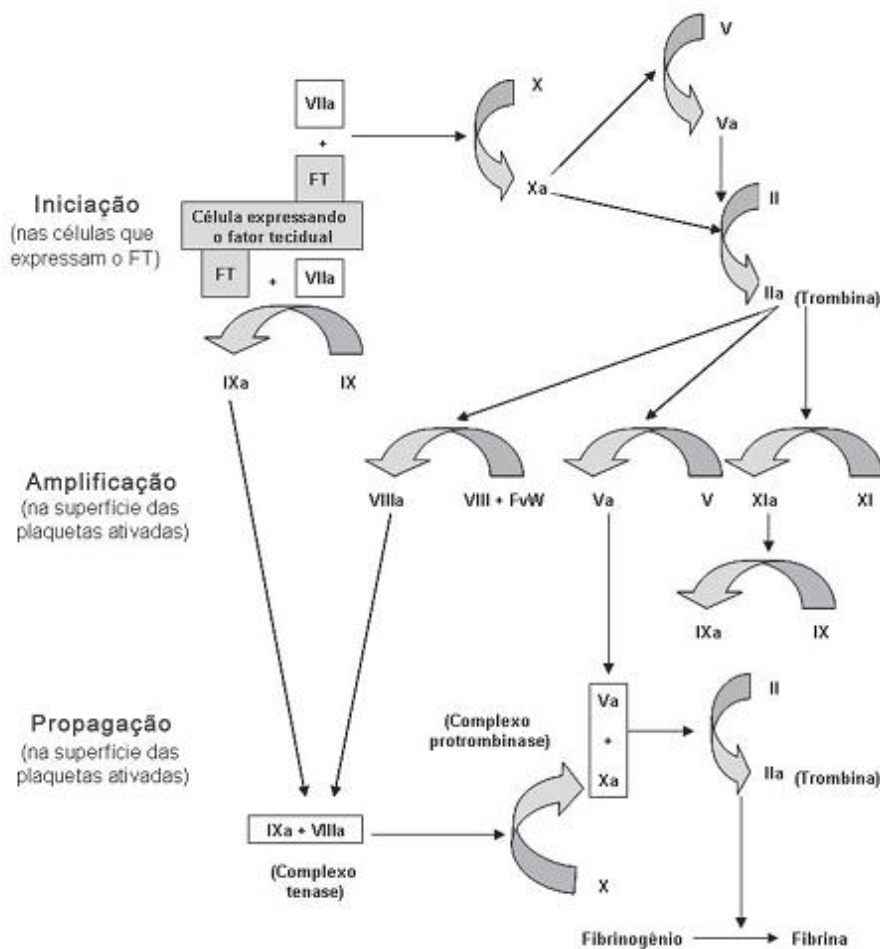


Fonte: FRANCO, 2001.

Diante dos questionamentos citados anteriormente, foi proposto uma nova forma de esclarecer o mecanismo da hemostasia. Esse modelo é baseado na interação dos fatores da coagulação com superfícies celulares específicas, explicando assim, o mecanismo fisiopatológico de certos distúrbios da coagulação. Esse processo é iniciado pela exposição de FT na corrente sanguínea, que é expresso não só nas células endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor

do leito vascular, como células do músculo liso e fibroblastos. Muitas evidências sugerem que o FT está também presente no sangue em micropartículas celulares provenientes de membranas fragmentadas de vários tipos de células, estas micropartículas podem desempenhar importante papel nos processos trombóticos, pois estudos revelam que o complexo FVIIa / FT ativa não somente o fator X, mas também o fator IX. Nesse novo modelo, o processo de hemostasia é descrito com três fases sobrepostas: iniciação, amplificação e propagação (Figura 7) (RIDDEL et al, 2007).

FIGURA 7- Representação do modelo da coagulação baseado em superfícies celulares compreendendo as fases de iniciação, amplificação e propagação. Fator tecidual (FT), ativado (a).



Fonte: FERREIRA et al., 2010

2.2.1 Iniciação

O processo inicial da coagulação desencadeado pela lesão vascular. Imediatamente, mecanismos locais produzem vasoconstrição, alteração da

permeabilidade vascular com produção de edema, ocorrendo também uma vasodilatação nos vasos afluentes da região em que ocorreu a lesão, o FT tem sua superfície exposta aos componentes do sangue sendo rapidamente ligado ao FVII, desencadeando a ativação de outros fatores e ao mesmo tempo iniciando a adesão plaquetária (VINE, 2009).

O FT, uma vez ligado ao FVII presente no sangue, rapidamente o ativa em FVIIa formando o complexo FVIIa/FT, responsável pela ativação de pequenas quantidades de FIX e FX. O FXa associado com o seu cofator, FVa, forma um complexo protrombinase na superfície da célula que expressa o FT. O FV pode ser ativado tanto pelo FXa como por proteases não coagulantes, resultando em FVa. Esse complexo transforma pequenas quantidades de protrombina (Fator II) em trombina, que são insuficientes para completar o processo de formação do coágulo de fibrina, mas são de fundamental importância para a fase de amplificação da coagulação (HOFFMAN, 2003; PÉREZ-GÓMEZ et al, 2007).

O processo segue para a fase de amplificação somente quando há dano vascular, permitindo que plaquetas e FVIII (ligado ao fator de von Willebrand) entrem em contato com o tecido extravascular onde se aderem às células que expressam FT (RIDDEL et al, 2007). Ainda durante essa fase, as plaquetas circulantes são recrutadas para o local da lesão através de interações adesivas entre fator de vonWillebrand (vWf) ligado às fibras de colágeno da parede do endotélio e o receptor das plaquetas que é formado pela glicoproteína (GPIb-IX – V). O vWf é normalmente encontrado circulando no plasma em uma forma inativa, é sintetizado pelas células endoteliais como parte da matriz extracelular, sendo armazenado e também secretada pelos corpos de Weibel-Palade (RUGGERI, 2007).

A interação entre o complexo de vWf – GPIb é considerado relativamente fraco, sendo necessário interações adesivas adicionais mediadas por moléculas de adesão da família das integrinas. Elas estão localizadas na superfície das plaquetas, sendo importantes para fixação das plaquetas de maneira firme no local da lesão. Nessa classe de proteínas estão incluídas a integrina $\alpha_2\beta_1$, que é responsável pela ligação ao colágeno e a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ que liga o vWf e outros ligantes. Para as integrinas atuarem na sua função de ligante, as plaquetas precisam de uma mudança conformacional de repouso para o estado ativo para haver uma ativação plaquetária (SAVAGE, SALDIVAR; RUGGERI, 1996).

O adenosina-difosfato (ADP) é responsável pela ativação das plaquetas e pela modificação da sua forma, que passa de discóide para esférica com aparecimento de pseudópodes. Ativação plaquetária ocorre durante a fase de iniciação e é provavelmente mediada através de várias vias, incluindo a ativação do receptor de colágeno GPVI, ativação de plaquetas por ATP e receptores de ADP através da liberação destas moléculas por células danificadas e sinalização posterior ao complexo GPIb-IX-V (RAND et al, 1997). Além disso, a perda de sangue no local da lesão se encontra também o fator tecidual que é expresso por células tanto na parede do vaso como no tecido extravascular iniciando a geração de trombina, que é um potente ativador de plaquetas. Neste estágio, as plaquetas exteriorizam uma lipoproteína denominada fator plaquetário 3 (PF3), que desempenha papel de superfície fosfolipídica (superfície ativadora) que participa de inúmeras reações da cascata de coagulação (RUGGERI; MENDOLICCHIO, 2007).

2.2.2 Extensão

Após a adesão inicial de plaquetas e sua ativação, plaquetas adicionais são recrutadas da circulação para formar um agregado através de coesão plaquetária durante a fase de extensão. Esta coesão é mediada principalmente pela ligação de fibrinogênio do plasma a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cada molécula de fibrinogênio apresenta dois sítios de ligação a $\alpha_{IIb}\beta_3$ e, portanto, pode mediar interações entre plaquetas por ligação a receptores em duas plaquetas adjacentes. Recrutamento de plaquetas e $\alpha_{IIb}\beta_3$ – mediada coesão requerem ativação plaquetária pela liberação do ADP por grânulos densos de plaquetas e tromboxano A_2 (Tx A_2) gerado pelas plaquetas já aderidas no local da lesão. Nesta ocasião, pequenas quantidades de trombina são produzidas pelas células que expressam o FT, podendo interagir com as plaquetas e o complexo FVIII/FvW (TOMAIUOLO et al, 2017).

Dessa forma, inicia-se o processo expansão culminando na formação de fibrina estável, que consolida o tampão plaquetário inicial. Esta pequena quantidade de trombina gerada pelas células que expressam o FT possui várias funções importantes, sendo a principal delas é a ativação máxima de plaquetas, que expõem receptores e sítios de ligação para os fatores da coagulação ativados. Como resultado dessa ativação, as plaquetas alteram a permeabilidade de suas membranas, permitindo a entrada de íons cálcio e saída de substâncias quimiotáticas que atraem os fatores da

coagulação para sua superfície, além de liberarem FV parcialmente ativados (PÉREZ-GÓMEZ et al, 2007). Além disso, pequenas quantidades de trombina ativam o FXI a FXIa na superfície da plaqueta durante essa fase. A ativação do FXI pela trombina na superfície das plaquetas explica porque o FXII não é necessário para a hemostasia normal. Sendo assim, as plaquetas ativadas têm agora fatores ativados FVa, FVIIIa e FIXa em sua superfície. Simultaneamente, por mecanismos quimiotáticos, os fatores mencionados são atraídos à superfície das plaquetas onde se inicia rapidamente a fase de propagação (MONROE; HOFFMAN, 2009).

2.2.3 Estabilização

Uma vez formado o recente tampão hemostático, este deve ser condensado para ficar firmemente ancorado no local da lesão para assim resistir à força do fluxo sanguíneo evitando uma nova hemorragia. A fase de extensão tem como característica principal o recrutamento de um grande número de plaquetas para a região da lesão e pela produção dos complexos fator IXa/fator VIIIa e fator Xa/fator Va, chamados respectivamente de complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas (VINE, 2009). Primeiramente, o FIXa ativado durante a fase de iniciação pode agora se ligar ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Uma quantidade adicional de FIXa pode também ser produzida pelo FXIa ligado às plaquetas. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada, maior quantidade de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa. Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina (HOFFMAN, 2003).

Além de ativar as plaquetas, a trombina converte fibrinogênio em fibrina, formando uma rede de fibras de fibrina que ajuda a estabilizar o tampão plaquetária. Esta estabilização também é reforçada pela consolidação da massa plaquetária através de retração das plaquetas mediada por actina e miosina. Ativação plaquetária é reforçada pelo feedback positivo dos agonistas solúveis (trombina, ADP, TxA₂), bem como pelas vias de sinalização são iniciados uma vez que as plaquetas ficam próximas umas das outras, que os seus receptores se associam ao ligante. Novamente, a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ tem um papel importante neste estágio, agora atuando

como uma molécula de sinalização que regula o processo de retração das plaquetas (LAW et al, 1997).

2.2.4 Sistema Fibrinolítico

O sistema fibrinolítico é composto por diversas proteínas, que regulam a geração de plasmina, que é uma enzima ativa, produzida a partir de uma proenzima inativa chamada de plasminogênio e como função degradar a fibrina e ativar metaloproteinases de matriz extracelular. Portanto, a fibrinólise pode ser definida como a degradação da fibrina, mediada pela plasmina. Em condições fisiológicas a coagulação e fibrinólise encontram-se em equilíbrio dinâmico de tal forma que, ocorrem simultaneamente, enquanto a primeira interrompe a perda sanguínea, a última remove a fibrina formada em excesso e o sangue volta a fluir normalmente no interior do vaso restaurado (COLLEN, 1999).

As enzimas do sistema fibrinolítico são todas do tipo serinoproteases, ao passo que os inibidores da fibrinólise são membros da superfamília de proteínas designadas serpinas. São conhecidos dois ativadores fisiológicos do plasminogênio: o ativador do plasminogênio do tecidual - TPA do inglês “tecidual plasminogen activator” e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase - UPA, do inglês “urokinase plasminogen activator” (FRANCO, 2001).

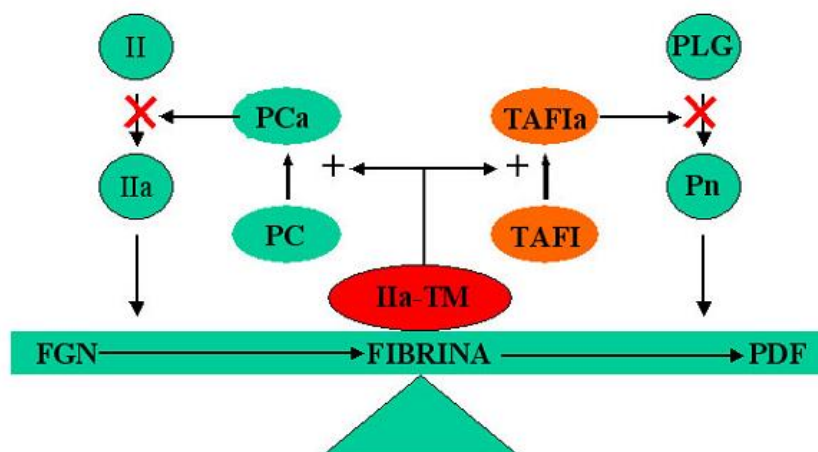
Estes dois ativadores têm alta especificidade de ligação com seu substrato plasminogênio e promovem hidrólise de uma única ponte peptídica, que resulta na formação de uma serinoprotease ativa, a plasmina. Embora a plasmina degrade não somente a fibrina, como também, o fibrinogênio, fator V e fator VIII. Em condições normais, a fibrinólise ocorre como processo que é altamente específico para a fibrina, portanto de ativação local e restrita, e não sistêmica, cumprindo, assim, sua função de remover o excesso de fibrina do intravascular de modo equilibrado (COLLEN, 1999).

Esta especificidade dependente de fibrina é resultado de interações moleculares específicas entre os ativadores do plasminogênio, o plasminogênio, a fibrina, e os inibidores da fibrinólise. Em contraste a esses mecanismos fisiológicos, ativação mais extensa do sistema fibrinolítico ocorre quando há infusão de agentes trombolíticos do tipo estreptoquinase e uroquinase, que não são específicos para a presença de fibrina. A inibição do sistema fibrinolítico ocorre em nível dos ativadores

do plasminogênio mediante ação de inibidores específicos chamados de PAIs do inglês “plasminogen activator inhibitors”, cujo principal representante é o PAI-1 e os que atuam diretamente sobre a plasmina, sendo esta função inibitória exercida pela α_2 -antiplasmina. O inibidor de plasmina, α_2 -antiplasmina, está presente no plasma e combina-se com o excesso de plasmina liberada, impedindo o aparecimento de fibrinólise generalizada. Esta proteína está presente na circulação em concentração plasmática 10 vezes maior do que a plasmina (FRANCO, 2001).

Foi identificado também, mais um componente do sistema fibrinolítico e designado de TAFI do inglês “thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor”, trata-se de um inibidor da fibrinólise que é ativado pela trombina, também denominado de carboxipeptidase B plasmática, procarboxipeptidase U ou procarboxipeptidase R. O TAFI é um zimogênio plasmático que ocupa importante papel na hemostasia, funcionando como um potente inibidor da fibrinólise. O TAFI é ativado pela trombina, tripsina e plasmina, em sua forma ativada, é capaz de inibir a fibrinólise por remover resíduos de lisina da molécula de fibrina durante o processo de lise do coágulo, suprimindo as propriedades de cofator da fibrina parcialmente degradada na ativação do plasminogênio. Curiosamente, a principal via de ativação do TAFI é dependente da ligação do fator IIa (trombina) à trombomodulina, um complexo que tem também a função de ativar o sistema da proteína C. Dessa forma, a molécula do TAFI representa um ponto de conexão entre os sistemas de coagulação e fibrinolítico (Figura 8) (BAJZAR, 2000).

FIGURA 8 - TAFI: ponto de conexão entre o sistema de coagulação e da fibrinólise, intermediado pelo complexo trombina/trombomodulina. PLG: plasminogênio, Pn: plasmina, TM: trombomodulina, FGN: fibrinogênio, PDF: produtos de degradação de fibrina.



Essa mudança no modo de enxergar os mecanismos da hemostasia através do modelo baseado em superfícies celulares é muito importante, pois é capaz de explicar alguns aspectos clínicos do mecanismo hemostático que o modelo clássico da cascata não permite. Este novo modelo propiciou um melhor entendimento do processo da coagulação in vivo, e apresenta maior consistência com as observações clínicas de vários distúrbios da coagulação. Contudo, vale ressaltar que no que se refere ao sistema de coagulação, a utilização dos termos: via “intrínseca” e “extrínseca” pode ser ainda útil na interpretação de dois exames laboratoriais, utilizados na rotina da avaliação da hemostasia (LEWIS, BAIN; BATES, 2006).

Tradicionalmente, os métodos de triagem para avaliação da coagulação sanguínea compreendem o tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), que analisa a via intrínseca, e o tempo de protrombina (TP), que avalia a via extrínseca da coagulação. A mudança no processo de entendimento das fases da coagulação para o modelo baseado em superfícies celulares vem mostrar que as via extrínseca e intrínseca são independentes. A via extrínseca opera na superfície das células que expressam FT para iniciar e amplificar o processo de coagulação. Os componentes da via intrínseca operam na superfície das plaquetas ativadas para produzirem grande quantidade de trombina que resultará na formação e estabilização do coágulo de fibrina (MONROE; HOFFMAN, 2009).

Desta forma, o TP avalia os níveis pró-coagulantes envolvidos na fase de iniciação da coagulação, enquanto o TTPa avalia os níveis pró-coagulantes envolvidos na produção de grande quantidade de trombina na superfície das plaquetas ativadas, gerada durante a fase de estabilização. Frisando que o modelo da cascata da coagulação e os testes de coagulação da clínica comum não refletem a complexidade da hemostasia in vivo (FERREIRA et al, 2010).

Faz-se relevante citar que diversos componentes das peçonhas ofídicas são capazes de afetar o sistema hemostático. As toxinas envolvidas nesse processo podem ter ação coagulante, por apresentarem atividade trombina-like, ou por ativarem os fatores II (protrombina) ou X da cascata de coagulação. Outras podem também ter ação anticoagulante, pela ativação da proteína C, que inibe alguns fatores de coagulação, ou pela inibição direta de trombina ou de alguns fatores da cascata de coagulação, como os fatores IX e X. Além disso, as toxinas podem apresentar atividade fibrinogenolítica, que dissolve a rede de fibrina ou impede sua formação pelo consumo do fibrinogênio ocasionando a incoagulabilidade sanguínea frequente nos

acidentes ofídicos. Existem também toxinas com ação no endotélio vascular, gerando quadro hemorrágico frequente nesses acidentes e com ação direta sobre as plaquetas, interferindo na sua agregação (SARTIM, 2014).

2.3 LECTINAS

A ocorrência na natureza de proteínas capazes de aglutinar eritrócitos é conhecida desde meados do fim do século XIX. Tais proteínas foram então denominadas hemaglutininas, ou fitohemaglutininas, devido ao fato de serem originalmente encontradas em extratos vegetais. O primeiro registro científico é creditado a Peter Hermann Stillmark, em 1888, quando constatou que a toxina presente nas sementes de *Ricinus communis* era uma proteína e a denominou de ricina. Por um breve tempo sua toxicidade foi atribuída diretamente à sua capacidade hemaglutinante. Posteriormente Hellin, também trabalhando no mesmo grupo de pesquisa de Stillmark, fez descobertas similares com sementes de *Abrus precatorius*. A partir desta época, várias dessas proteínas foram isoladas e caracterizadas com relação à sua estrutura molecular, especificidade por carboidratos e propriedades bioquímicas (SHARON; LIS, 2004).

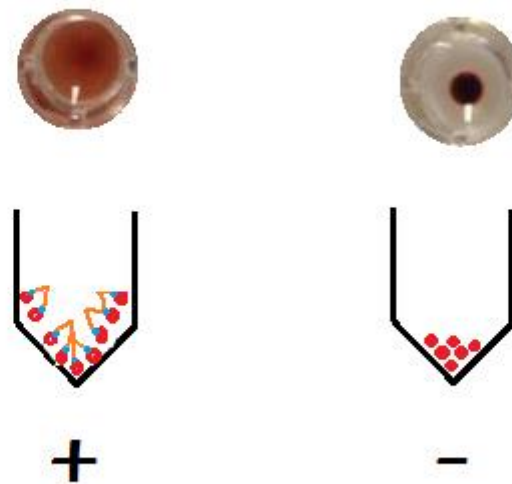
Landsteiner; Raubitschek, em 1908, discutiram pela primeira vez a especificidade das lectinas e observaram que vários extratos de sementes de leguminosas apresentavam diferentes propriedades de hemaglutinação quando analisados com eritrócitos de diferentes espécies de animais, provavelmente porque as lectinas de diferentes espécies vegetais, freqüentemente diferem na sua estrutura molecular e na sua especificidade.

A palavra lectina é derivada do latim “Legere”, que significa selecionar ou escolher, e foi generalizado para abranger todas as aglutininas de origem não imune específica para carboidratos independente da especificidade para tipo sanguíneo ou fonte de ligação (KOMATH et al, 2006). Este termo tem como definição uma classe de proteínas que se ligam a carboidratos com considerável especificidade. Outras propriedades características das lectinas são de aglutinar células, precipitar polissacarídeos ou glicoproteínas. Isto ocorre devido a essas proteínas serem polivalentes, cada molécula de lectina que apresente no mínimo dois sítios de ligação a carboidratos permite uma interação entre células, por ligação com açúcares das superfícies celulares, ou entre macromoléculas que contém carboidratos (SHARON;

LIS, 2004).

As lectinas podem interagir com os açúcares da superfície das células podendo originar uma ligação cruzada levando a precipitação (de polissacarídeos, glicoproteínas, peptidoglicanos, ácido teicóico, glicofosfolipídios, etc.), fenômeno este denominado aglutinação celular (CORREIA; COELHO, 1995; MO et al, 2000; ZENTENO et al, 2000). A capacidade de aglutinar células (Figura 9) distingue lectinas de outras macromoléculas ligantes de açúcares como as glicosidases e glicotransferases (GOLDSTEIN et al, 1980).

Figura 9 – Rede de hemaglutinação mediada por lectinas.



Fonte: Raiana Apolinário, 2017.

A especificidade das lectinas é determinada pela conformação exata dos sítios de ligação e da natureza dos resíduos de aminoácidos para os quais o carboidrato é ligado. Dessa forma, pequenas alterações na estrutura dos sítios de ligação, como por exemplo, a substituição de apenas um ou dois resíduos de aminoácidos, podem resultar em alterações significativas na especificidade da lectina sem, no entanto, afetar sua estrutura tridimensional da proteína (SHARON; LIS, 2004).

Lectinas foram inicialmente encontradas e descritas em plantas, mas nos anos seguintes várias lectinas foram isoladas de microrganismos e também de animais. Interessante é que lectinas de planta e animal não apresentam nenhuma homologia estrutural principal, no entanto, elas demonstram semelhança na ligação específica a

carboidratos (Tabela 1). Isto sugere que genes das lectinas de animais e vegetais co-evoluíram, destacando assim a importância das interações lectina – carboidratos em sistemas vivos (WANG; NG, 2003).

Tabela 1- Distribuição das lectinas na natureza.

Fonte de Lectina				Especificidade ao açúcar
Microrganismos e vírus	Invertebrados	Vertebrados	Plantas	
<i>Escherichia coli</i>			Fava	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Fígado de rato	Lentilha	Manose
			Ervilha	
			Feijão-de-porco	
		Poraquê	Mamona	
Amoeba	Besouro	Placenta humana	<i>Erythrina</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mosca	Fígado de rato	<i>cristagali</i>	
Mixomicetos	Ouriço	Veneno de serpentes	<i>Griffonia</i>	Galactose
		Fígado de frango	<i>simplicifolia</i>	
			Amendoin	
			<i>Griffonia simplicifolia</i>	
			<i>Ulex europaeus</i>	N-acetilglicosamina
			Trigo	
Caramujo		<i>Dolichos biflorus</i>		
Barata		Feijão-de-lima		N-acetilgalactosamina
		Soja		
			<i>Lotus</i>	
<i>Vibrio cholerae</i>	Soro de enguia		<i>tetragonolobus</i>	L-fucose
	Fígado de rato		<i>Ulex europeus</i>	
	Caranguejo			
Vírus Influenza	ferradura	Sapo	Sabugueiro	Ácido N-acetilneuraminico
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Lagosta		Trigo	
	Lesma			

Fonte: Adaptado de SHARON; LIS, 2004.

Inúmeras lectinas, assim, tornaram-se disponíveis ao longo do tempo e o interesse nelas foi estimulado pela demonstração que são ferramentas de valor inestimável para

a detecção, isolamento e caracterização de glicoconjugados, principalmente de glicoproteínas, para histoquímica das células e tecidos e para o exame das mudanças que ocorrem nas superfícies das células, durante processos fisiológicos e patológicos e de diferenciação de células de câncer. A caracterização físico-química de lectinas é importante na elucidação de seu comportamento em diferentes sistemas biológicos (SOUZA et al, 2001).

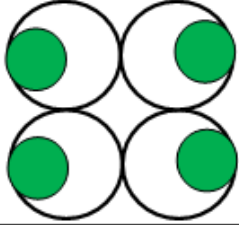
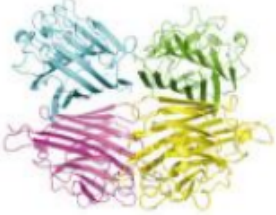
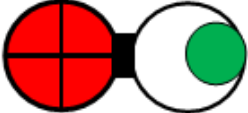
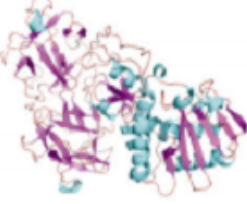
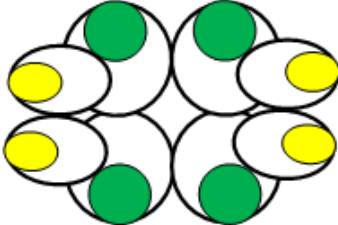
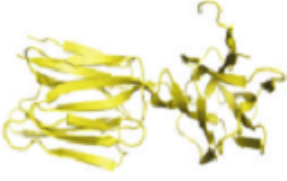
Durante os últimos anos, diversas pesquisas foram realizadas com diferentes lectinas para caracterizar sua estrutura primária e tridimensional. Observou-se que as lectinas de diversas origens não possuíam semelhança em sua sequência primária, mas compartilhavam equivalências em suas estruturas terciárias. (GHAZARIAN et al, 2011; MODY et al, 1995).

As lectinas podem ser subdivididas em quatro tipos principais, de acordo com aspectos estruturais e a habilidade de reconhecer e ligar carboidratos (Tabela 2): **merolectinas** - lectinas com apenas um domínio de ligação a carboidratos, que são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células; **hololectinas** - lectinas que possuem no mínimo dois ou mais domínios homólogos de ligação a carboidratos; **quimerolectinas** - proteínas com um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado que possui uma atividade biológica distinta e independente; e **superlectinas** - incluem as lectinas que possuem dois domínios de ligação a carboidratos estrutural e funcionalmente distintos (VAN DAMME, 1998).

As estruturas das lectinas foram descritas como protômeros, sendo que um protômero é definido como uma subunidade madura ou a soma de subunidades maduras derivadas de produtos primários de tradução do RNA mensageiro que codifica as lectinas. Dependendo do número de protômeros, uma lectina é chamada de monômero, dímero, trímero, tetrâmero e assim sucessivamente (PEUMANS et al, 2001).

Geralmente as lectinas são degradadas durante o processamento do alimento, devido à perda da sua estrutura quaternária e terciária, resultando na produção de dímeros ou monômeros, que podem possuir sítio de ligação para carboidratos, mas são incapazes de aglutinar membranas celulares (LORIS et al, 1998).

Tabela 2. Classificação das lectinas quanto aos aspectos estruturais.

Representação Esquemática	Exemplo
Merolectina Proteína monomérica com um único sítio ativo. 	 Lectina de <i>Hevea brasiliensis</i> ANDERSEN <i>et al.</i>, 1993
Hololectina Proteína tetramérica com quatro sítios ativos homólogos. 	 Lectina de <i>Arachis Hypogaea</i> RAVISHANKAR <i>et al.</i>, 2001
Quimerolectina Proteína com um sítio de ligação a carboidrato e um outro domínio que possui uma função não lectínica. 	 Lectina de <i>Ricinus communis</i> RUTEMBER <i>et al.</i>, 1991
Superlectina Proteína com dois domínios diferentes com afinidade por carboidratos distintos. 	 Lectina de <i>Musa acuminata</i> MEAGHER <i>et al.</i>, 2005

Fonte: Adaptado de MORENO, 2008.

2.4 LECTINA DE ANIMAL

Inicialmente uma das primeiras lectinas de origem animal a ser comprovada especificidade a um açúcar (L-fucose) foi da enguia (WATKINS et al, 1952). O isolamento em 1974 da lectina de mamífero, com o receptor específico para galactose foi a asialoglicoproteína hepática, resultado da investigação por Gilbert Ashwell e Anatol G. Morell dos mecanismos que controlam o tempo de vida de glicoproteínas na circulação sanguínea.

Desde o início da década de 1980, ampliou-se o número de lectinas purificadas de animais, em grande parte graças ao advento de técnicas de clonagem e recombinação. Além disso, muitas estruturas moleculares de complexos lectina-carboidrato foram resolvidas. Com base na análise das sequências de aminoácidos das lectinas animais conhecidas, Kurt Drickamer propôs em 1988 que a atividade de ligação a carboidratos da maioria das lectinas foi gerada por limitados resíduos de aminoácidos denominados como o domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) do inglês “carbohydrate recognition domain”. Estudos realizados sobre o CRD revelam que esse domínio é tipicamente responsável por reconhecer os resíduos de carboidratos nos terminais das glicoproteínas e glicolípidos de membrana celular (LOMONTE et al, 1990).

Nas lectinas de animais, foram identificadas várias sequências de aminoácidos altamente conservados para CRD, permitindo assim que os pesquisadores pudessem categorizar a maioria destas lectinas em famílias e superfamílias relacionadas estruturalmente. Lectinas tipo C (CTLs) do inglês “C-type lectins” são as mais abundantes de todas as lectinas de animais e a superfamília CTL é agrupada em três famílias: selectinas, colectinas e lectinas endocíticas (SHARON; LIS, 2004).

A maioria das CTLs é grande, assimétrica e tem um ou mais CRDs e ainda existem nesse grupo as proteínas dependentes Ca^{+2} que apresentam um número variável de domínios polipeptídios estruturalmente e funcionalmente diferente. Em contraste, a superfamília CTL das lectinas tipo S (galectinas) são geralmente pequenas, não-glicosiladas, solúveis e existem como proteínas não dependentes de Ca^{+2} , encontradas no meio intracelular e extracelular. Até o momento já foram identificadas dez galectinas que se ligam a N-acetylactosamina ($\text{Gal-}\beta\text{-1-nGlcNAc-R}$) por reconhecimento ao resíduo $\beta\text{-gal}$ (GORELIK et al, 2001).

Nas CTLs, a família da colectina inclui as lectinas de colágeno, como por

exemplo, as proteínas de ligação de manose (MBPs) do inglês “manose bind proteins”; os surfactantes pulmonares SP-A e SP-D e congulinina. Ainda nas CTLs, a família selectina inclui o E -, L - e P-selectinas. Estas selectinas têm um único domínio do tipo crescimento epidérmico (EGF), um CRD extracelular, uma cauda citoplasmática, um domínio transmembrana. Selectinas ligam especificamente oligossacarídeos como Sialyl Lewis^A (sLe^a) e Sialyl Lewis^X (sLe^x) ou seus equivalentes sulfatados (RUSEVA et al, 2009).

Outra família de lectina de interesse especial é o siglecs. Os siglecs são lectinas de ligadoras de ácido siálico tipo Ig e pertencem à Superfamília Ig. Elas carregam padrões de expressão única em diferentes células, indicando que elas estão envolvidas em processos celulares altamente especializados e específicos (YAMANAKA et al, 2009).

2.5 LECTINA TIPO-C

Lectina tipo-C é a maior e a mais diversa das famílias de lectinas encontradas em animais. Essas proteínas apresentam uma forma estrutural única e tem um domínio de ligação a carboidratos (CDR) que na maioria dos casos está relacionada com ligação aos íons de Ca⁺⁺, tornando atividade de ligação a açúcar dependente de Ca⁺⁺ (WEIS et al, 1998).

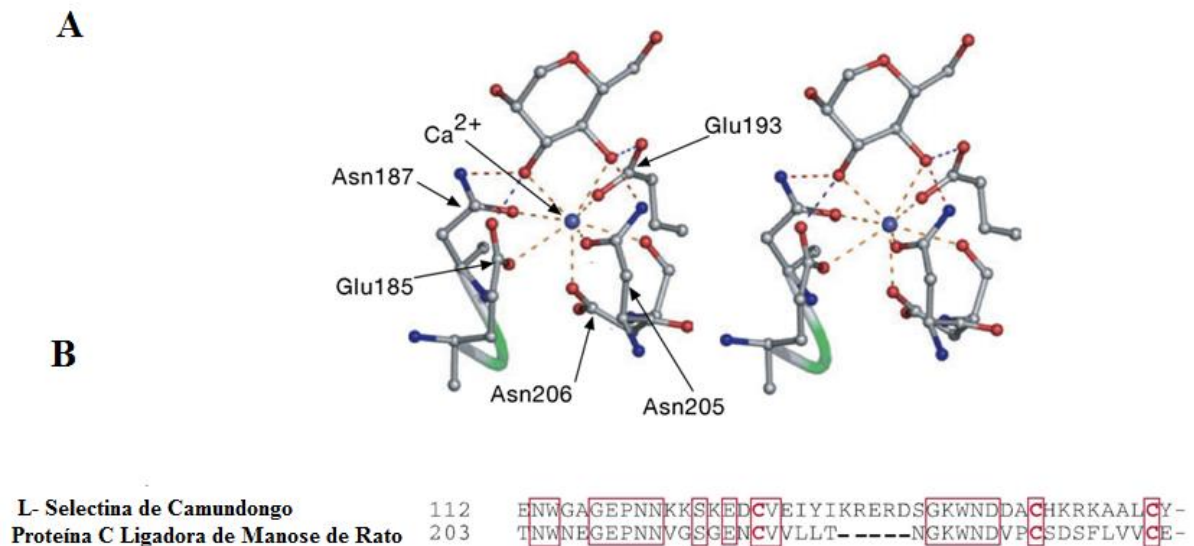
Muitos receptores contendo CRDs do tipo C são encontrados no sistema imunológico, com funções, incluindo a adesão celular, reconhecimento a patógeno com base também no reconhecimento dos glicanos endógenos dos mamíferos ou através da ligação com os glicanos de microrganismos. Maneiras de como algumas lectinas tipo-C agem no sistema imunológico têm sido estabelecidas. Por exemplo, a importância das selectinas em interações entre leucócitos e endotélio é totalmente comprovada em fenótipos de camundongos nocauteados e os sintomas de uma doença congênita humana de glicosilação que impede a síntese de ligantes fucosilados reconhecidos pelas selectinas (ZARBOCK et al, 2011; LU; WILD, 2012). Essas lectinas compartilham homologia estrutural primária e secundária em seus (CRDs). Lectinas tipo-C têm um enovelamento formado por uma sequência de proteínas altamente variável e que também está presente em muitas proteínas que não ligam carboidratos (CTLD). Lectinas tipo-C e proteínas com CTLDs são encontradas em todos os organismos. Algumas destas proteínas são secretadas e

outras são proteínas transmembrana. Elas muitas vezes são oligomerizadas em homodímeros, homotrímeros ou ordenadas em oligômeros superiores, o que aumenta a sua avidéz por múltiplos ligantes. Embora elas compartilhem a homologia estrutural, as lectinas tipo-C geralmente diferem significativamente no reconhecimento aos diversos tipos de carboidratos (MCMAHON et al, 2005).

O enovelamento das lectinas tipo-C foi encontrado em mais de 1000 proteínas, e a está relacionado com o sítio de ligação ao ligante o que não está necessariamente restrita a afinidade a carboidratos. A ligação a açúcares pelas lectinas tipo-C é sempre dependente de Ca^{++} por causa de resíduos específicos de aminoácidos que coordenam o Ca^{++} e conectam os grupos hidroxila aos açúcares (WEIS; TAYLOR; DRICKAMER, 1998).

O enovelamento das lectina tipo-C é único. Elas são formadas por um domínio compacto de 110 a 130 resíduos de aminoácidos com um loop duplo, duas β -folha pregueadas antiparalelas, composto por resíduos carboxi e amino- terminal ligado por duas α -hélices e três antiparalela β -folha. A CRD apresenta duas pontes de dissulfeto altamente conservadas e até quatro sítios para a ligação de Ca^{++} , com ocupação deles dependendo de cada lectina. Resíduos de aminoácidos com cadeias laterais de carbonila são freqüentemente coordenados para Ca^{++} no CRD, e estes resíduos são vinculados diretamente a açúcares quando Ca^{++} está ligado ao sítio. Alterações em aminoácidos dentro da CRD podem alterar a especificidade para os açúcares (Figura 10A). Uma seqüência de resíduos de aminoácidos conservados como "EPN" e "WND" são responsáveis pelas ligações aos carboidratos dentro do CRD das lectinas tipo-C (Figura 10B). No entanto, devido ao sítio de ligação ser relativamente raso e com pouco contato para açúcares é difícil prever o carboidrato que é específico para uma lectina tipo-C. Não obstante, determinantes de sequência no CRD fornecem pistas para a especificidade dos "monossacarídeos" das lectinas tipo-C (CUMMINGS; RICHARD; MCEVER, 2009).

FIGURA 10- Estrutura de lectinas tipo-C.



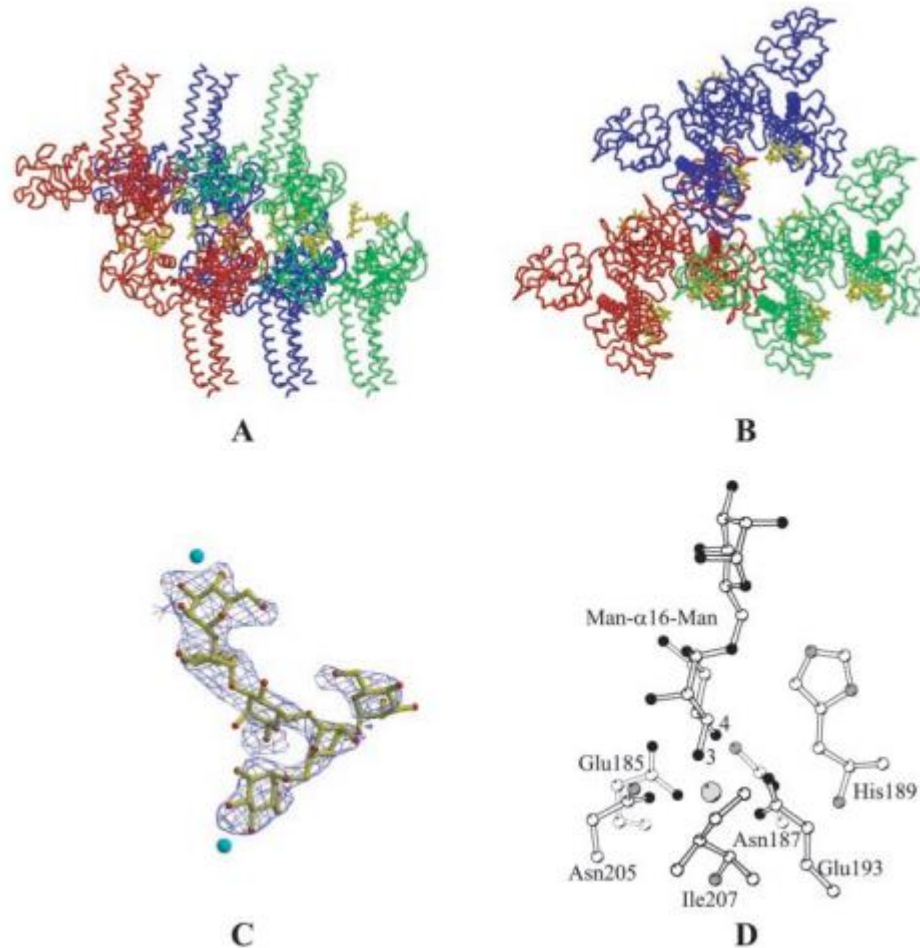
Fonte: Adaptado de SARTIM; SAMPAIO, 2015.

(A) Reprodução do complexo entre MBP-A de rato e o resíduo terminal de manose presente no N-glycan $\text{Man}_6\text{-GlcNAc}_2\text{-Asn}$. Ligações covalentes em laranja. As pontes de hidrogênio que atuam como aceitor dos grupos hidroxila do açúcar está em vermelho e aqueles onde elas atuam como doador estão em azul. A interação ocorre pela formação de um complexo ternário entre o terminal de manose do glicano, dois sítios de ligação aos íons Ca^{++} e a proteína. Esse complexo é estabilizado por uma rede ligações covalentes e pontes de hidrogênio envolvendo as hidroxilas 3 - e 4 - do átomo de manose, duas ligações covalentes com os íons Ca^{++} e quatro pontes de hidrogênio com a cadeias laterais de carbonila que formam o sítio de ligação Ca^{++} . (B) Comparação da sequência primária entre diferentes lectinas tipo – C. Os resíduos estão enumerados a partir do N- terminal. Resíduos de cisteína estão em vermelho e os resíduos homólogos estão destacados nas caixas.

Em várias lectinas tipo-C, tais como P-selectina e o ASGPR, a ligação com Ca^{2+} induz mudanças estruturais no CRD que estabilizam a região de duplo loop. A perda de Ca^{2+} pode levar a desestabilização destes loops e perda do ligante, mesmo quando Ca^{2+} não está diretamente envolvido no complexo do ligante, como visto no receptor de manose de macrófagos. Esta desestabilização também é importante nas alterações induzidas pela mudança do pH que levam à perda de afinidade de ligação ao ligante, devido à perda de Ca^{2+} induzida pela alteração do pH. Lectinas tipo-C existem tanto como oligômeros ou como monômeros. Muitas lectinas tipo-C ocorrem como trímeros, incluindo a Proteína A ligadora de manose de rato (MBP-A). OCRDs estão no topo do trímero e realçam as interações multivalentes com ligantes de

carboidratos. (Figura 11) (KOLATKAR et al, 2002).

Figura 11 - Estrutura do complexo de ligação entre o trímero MBP-A e o Man6GlcNAc2Asn.



Fonte: KOLATKAR et al, 2002.

A) Arranjo da cristalografia, mostrando as três unidades de cadeias assimétrica com trímeros adjacentes lateralmente enovelados em estruturas de β -folha e ligado ao açúcar. O carboidrato é mostrado em amarelo, e cada unidade assimétrica é mostrada em uma cor diferente. B) Vista superior da estrutura dos trímeros. C) Mapa de densidade de elétrons. D) Terminal de manose ligado a MBP-A.

Existem pelo menos 17 subfamílias de lectinas tipo-C com CTLDs, que são diferenciadas pela estrutura de seus domínios. Estudos realizados em com proteínas codificadas do genoma humano identificou mais de 100 diferentes proteínas apresentando CTLD. As maiorias destes grupos têm um único CTLD, entretanto o receptor de manose nos macrófagos (grupo VI) tem oito destes domínios. As outras

subfamílias VII (REG), IX (tetranectina), XI (atractina), XIII (DGCR2; Gene chamado de Região Crítica DiGeorge), XV (BIMLEC) e XVII (CBCP) são conhecidos por não ter afinidade a glicano. Analisando por uma perspectiva funcional, os grupos que apresentam mais informações são: colectinas, receptores endocíticos, lectinas mielóides e selectinas. Proteínas com CTLD são encontradas também em todos os metazoários e muitos não metazoários. Este último grupo inclui toxinas bacterianas como por exemplo, toxina pertussis; proteínas de aderência da membrana externa como por exemplo, invasina da *Yersinia pseudotuberculosis* e proteínas virais (por exemplo, proteína de envelope em vírus de Epstein-Barr). Curiosamente, as proteínas virais apresentam mais semelhança com as proteínas CTLD de mamíferos do que as proteínas bacterianas. Lectinas tipo-C dependentes de cálcio também foram identificadas em peçonha de serpentes e são classificadas em dois grupos distintos: as verdadeiras lectinas tipo-C que se ligam a açúcares e as parecidas com as lectinas tipo-C chamadas de “C-type lectin like” ou snaclecs do inglês “snake venom C-type lectins” (GUPTA, 2012).

2.6 LECTINA TIPO-C DE SERPENTES

Lectinas de peçonha de serpente compreende a uma classe de toxinas capazes de reconhecer e interagir com resíduos de carboidratos. Lectins-like são proteínas heterodiméricas com domínio tipo CRD relativo, mas não são capazes de interagir especificamente com açúcares. Por outro lado, as lectinas tipo C interagem com glicanos, são proteínas homodiméricas, compostas por dois monômeros idênticos ligados por pontes dissulfeto com massa molecular de aproximadamente 15 kDa, apresentando um CRD funcional que se liga a carboidratos e é capaz de induzir a hemaglutinação por reconhecimento de glicoconjugados da superfície dos eritrócitos (ABREU et al, 2006). A maioria das lectinas de serpentes que ligam a glicanos são membros das proteínas tipo- C ligadoras de galactose, devido à sua capacidade de ligar ao cálcio elas interagem com resíduos terminais da galactose. A primeira lectina ligadora de galactose purificada foi a trombolectina, isolada de peçonha de *Bothrops atrox*, quase 80 anos mais tarde em relação às primeiras lectinas tipo- C de animais caracterizadas. Desde então, vários trabalhos de purificação e caracterização estrutural e funcional dessas proteínas de peçonha de serpentes foram descritos nas

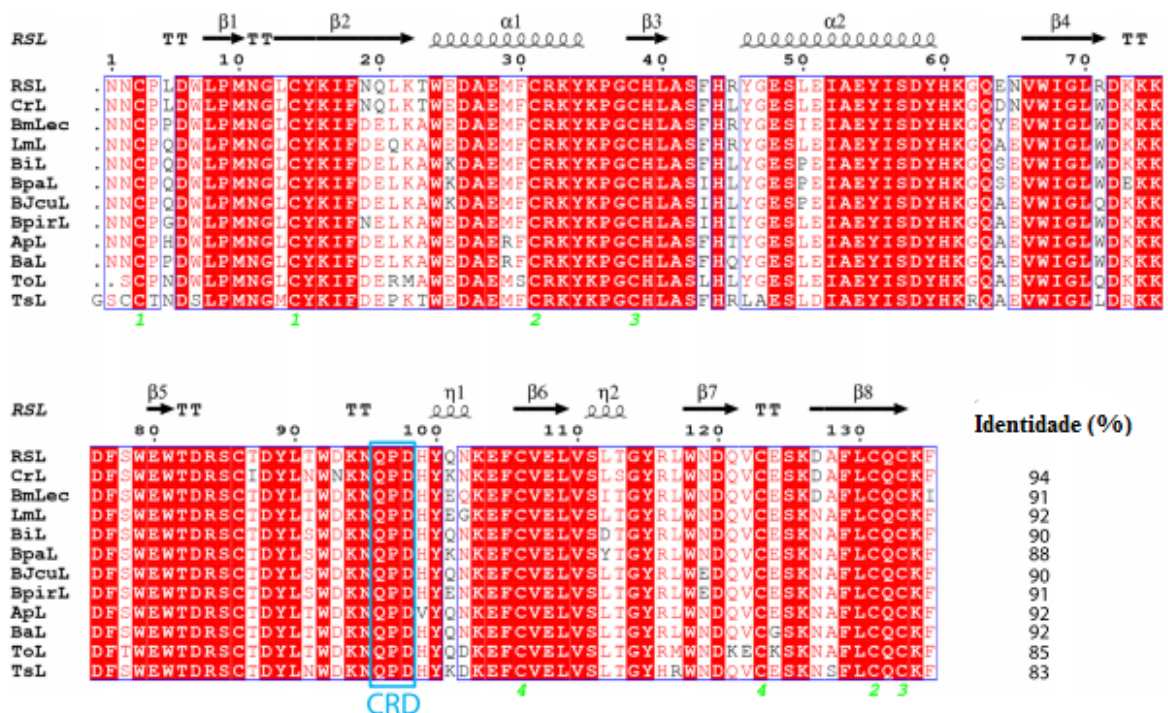
famílias Viperidae e Elapidae, incluindo os gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Bitis*, *Agkistrodon*, *Lachesis*, *Dendroaspis* e *Trimeresurus* (GARTNER; STOCKER; WILLIAMS, 1980; CASTANHEIRA et al, 2013). A lectina isolada de *Lachesis muta stenophrys* (LmL) primeira foi classificada como lectin-like por autores. No entanto, levando em conta seus aspectos moleculares e funcionais uma definição mais adequada foi providenciada ao classificá-la como uma lectina verdadeira (CASTANHEIRA et al, 2013).

Importantes avanços na análise molecular e determinação das estruturas de SVgalLs do inglês “galactoside-binding C- type lectin” foram realizados durante os últimos anos. Embora os detalhes das informações estruturais dessas lectinas variem desde uma simples análise de massa molecular por eletroforese SDS-PAGE até uma determinação completa de estrutura quaternária, em relação aos aspectos moleculares gerais, indicam que essas proteínas apresentam uma alta similaridade. Atualmente, a lectina de cascavel (RSL), do veneno de *Crotalus atrox*, é a única SVgalL cuja estrutura foi determinada completamente por cristalografia de raio X e é muito utilizada na análise de comparação estrutural com outras lectinas desta mesma classe (ABREU et al, 2006; WALKER et al, 2004).

Todas as SVgalLs são proteínas homodiméricas compostas por pontes dissulfeto, apresentando monômeros com massa molecular variando de 14 a 16,2 kDa. As estruturas primárias de doze SVgalLs foram determinadas e apresentaram de 134 à 136 resíduos de aminoácidos como descrito para as seguintes lectinas: RSL — lectina da cascavel *Crotalus atrox*, ApL — lectina de *Agkistrodon piscivorus piscivorus*, BaL — lectina de *Bitis arietans*, CrL — lectina de *Crotalus ruber*, BiL — lectina de *Bothrops insularis*, BmLec — lectina de *Bothrops moojeni*, BpalL — lectina de *Bothrops pauloensis*, BJcuL — lectina de *Bothrops jararacussu*, BpirL — lectina de *Bothrops pirajai*, LmL — lectina de *Lachesis muta stenophrys*, ToL — lectina de *Trimeresurus okinavensis* e TsL — lectina de *Trimeresurus stejnegeri*. A análise das seqüências de aminoácidos entre as SVgalLs citadas anteriormente foram feitas mostrando um grau de identidade de 82 a 97%, entre elas, indicando uma alta similaridade de estrutura primária entre essas lectinas. Um estudo do alinhamento múltiplo foi realizado comparando as estruturas primárias e secundárias de RSL com as lectinas mencionadas. As identidades das seqüências variam de 83 a 94% quando comparado a RSL, evidenciando assim, importantes características estruturais

conservadas como, por exemplo, pode-se citar o posicionamento dos resíduos de cisteína. Nessas SVgalLs, verificou-se que de oito a nove dos resíduos de cisteína são altamente conservados, indicando a presença de quatro pontes dissulfeto intramoleculares do tipo Cys-Cys (Cys³ – Cys¹⁴, Cys³¹ – Cys¹³¹, Cys³⁸ – Cys¹³³ e Cys¹⁰⁶ – Cys¹²³), determinado assim a estrutura RSL (Figura 12). Além disso, o resíduo Cys⁸⁶ está diretamente envolvido na ponte dissulfeto intercadeia, que responsável pela composição do padrão estrutural dimérico da RSL, sendo observado o mesmo posicionamento dos resíduos para as outras SVgalLs (SARTIM; SAMPAIO, 2015).

FIGURA 12 - Alinhamento múltiplo de SVgalL.



Fonte: SARTIM & SAMPAIO, 2015.

O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando-se como base a estrutura RSL. Resíduos totalmente conservados são destacados em fundo vermelho. Resíduos de cisteína envolvidos na ponte dissulfeto intercadeias são indicados por números verdes. O Domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) é indicado pela caixa azul.

Estudos relatam a análise do conteúdo das estruturas secundárias de algumas SVgalLs por dicroísmo circular. A lectina de *Bothrops leucurus* (BiL) e LmL

apresentam principalmente as estruturas β - folha (68 e 78% respectivamente) com apenas 1% de estruturas α - hélice, sendo assim elas foram classificadas como uma proteína de classe β , enquanto BJcuL possui 18,8% de estruturas α -hélice e 32,2% de β - folha e é classificada como uma proteína de classe $\alpha \beta$. Walker et al em 2004 determinou que a estrutura RSL é composta de oito β -folhas e dois α -hélices (Figura 8). E ao comparar esse resíduos de aminoácidos da RSL, envolvidos na estrutura secundária, com outras SVgalLs foi demonstrado que essas proteínas são compostas por resíduos altamente conservados. A conformação da estrutura secundária é comprovada por interações intermoleculares envolvendo os segmentos de aminoácido monomérico. Os resíduos H⁹⁹ e F¹⁰⁵ em conjunto com D⁷² da RSL e conservados nas outras lectinas, parecem estar envolvidos na estabilização do loop entre a estrutura β -folha 4 e β 7, o domínio CRD e β 7 (Figura 12). Da mesma maneira que a estrutura dimérica é mantida também pelas interações da cisteína intermonoméricas, interações eletrostáticas entre os monômeros das proteínas, através das pontes de hidrogênio (ABREU et al, 2006; SARTIM; SAMPAIO, 2015).

Em geral, o motivo pelo qual o domínio CRD das lectinas tipo- C são ligadoras de galactose é devido à presença de três resíduos de aminoácidos, glutamina, prolina e ácido aspártico (Gln-Pro-Asp), que são considerados determinantes para suas especificidades, onde essa interação ao carboidrato é mediada por íons de cálcio. Podendo ser comprovado por comparação das estruturas primárias das SVgalLs, que se apresentam totalmente conservada em todas elas, indicando uma atividade em comum de reconhecimento aos carboidratos (SARTIM; & SAMPAIO, 2015).

Os aspectos que envolvem a especificidade de ligação a galactose pelas lectinas estão relacionados com interações das pontes de hidrogênio com os grupos hidroxila da galactose, sendo diferente para as proteínas que ligam manose em que CRD é composto de pelos seguintes aminoácidos EPN ácido glutâmico, prolina e asparagina (Glu-Pro-Asn), enquanto a interação com manose envolve a ligação do íon de cálcio simultaneamente com resíduos E e N da ponte de hidrogênio. Fica esclarecido que o CRD é responsável pela interação a galactose e essa atividade é mediada por íons de cálcio, sendo também importante tanto na estabilização da conformação estrutural como na interação com carboidrato (WALKER et al, 2004).

As SVgalLs também são capazes de formar oligômeros de ordem superior. Estudos de cristalografia de raio-x da estrutura da RSL revela que ela é uma proteína decamérica, composta por cinco dímeros interligados pontes dissulfeto totalizando

dez monômeros, sendo estes, organizados na forma de dois pseudo-pentâmeros simétricos. Da mesma maneira que ocorre com a RSL, a avaliação da estrutura quaternária da BJcuL, usando diferentes métodos computacionais e biofísicos, revelou que esta lectina, em solução, é uma proteína globular com massa molecular de 147,5 kDa com indicações que BJcuL também forma uma estrutura de decamérica oligomerizada (SILVA JR. et al, 2008).

O complexo decamérico da RSL é composto por cinco dímeros, sendo esses monômeros ligados por pontes dissulfeto e organizados como dois pentâmeros, onde sua estrutura oligomérica é mantida principalmente por quatro pontes de sal e interações apolares (WALKER et al, 2004). O fato da estrutura decamérica da RSL apresentar dez sítios de ligação a carboidratos localizados na borda de dois pentâmeros sugere que a lectina apresenta uma capacidade de atividade polivalente de interação ao ligante, como mostrado através de sua capacidade de induzir aglutinação dos eritrócitos devido à ligação com a superfície celular oposta. A capacidade de mediar interações multivalentes com diferentes glicoconjugados biológicos foram descritas em várias SVgallLs, tais como galatrox, de peçonha da serpente *Bothrops atrox*, que induz uma atividade pro-inflamatória através da sua interação com galactose de glicoconjugados na superfície de neutrófilos e macrófagos e proteínas da matriz extracelular (SARTIM et al, 2014).

Devido aos diferentes efeitos das lectinas nas funções biológicas, tornou importante dentro da “lectinômica” a compreensão do padrão molecular de reconhecimentos aos carboidratos (GABIUS et al, 2002). Até agora, com a exceção da lectina ligadora de manose isolada da peçonha de *Oxyuranus scutellatus*, a maioria das lectinas de peçonha de serpentes que se ligam a glicanos apresentam a capacidade de interagir especificamente com açúcares através de resíduo terminal de galactose (ABREU et al, 2006). Curiosamente, esta similaridade de padrões de reconhecimento a galactose é refletida em vários aspectos entre as SVgallLs, tais como o processo de purificação que, para a maioria das lectinas de serpentes, é realizado por cromatografia líquida, utilizando resinas de afinidade com uma matriz composta de componentes baseados em lactose ou galactose (GARTNER; STOCKER; WILLIAMS, 1980; CASTANHEIRA et al, 2013).

Os principais estudos relatados para avaliar ligação específica a carboidratos pelas SVgallLs consistem na avaliação da capacidade de açúcares inibirem a atividade de aglutinação dos eritrócitos. Os resultados obtidos para essas SVgallLs mostram

que os glicanos com resíduo terminal galactose apresentou uma atividade inibitória mais eficiente. Embora o padrão de reconhecimento a galactose entre essas lectinas seja semelhante, possivelmente ela está associada com os aspectos estruturais relacionados ao domínio CRD, as variações nos resíduos galactose tais como substituição da ligação do dissacarídeo ou introdução de substituto como por exemplo o grupos metil ou amina no resíduo terminal da galactose intensifica ou diminui a especificidade de reconhecimento de lectina (Tabela 3) (YOUNG et al, 2011).

Tabela 3- Inibição da atividade hemaglutinante das lectinas Tipo-C por carboidratos.

SVgalL	Espécie de serpente	Terminal do carboidrato galactosídeo (ordem de inibição)
Apl	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	D-galactose>Lactose>N-acetil-D-galactosamina
Trombolectina	<i>Bothrops atrox</i>	Tiodigalactosídeo>Lactose>Metil β-D-galactopiranosídeo>Metil α-D-galactopiranosídeo>D-galactose
BiL	<i>Bothrops insularis</i>	Tiodigalactosídeo>Lactose>D-galactose>N-acetil-D-galactosamina
BjL	<i>Bothrops jararaca</i>	Tiodigalactosídeo>Lactose=N-acetil-lactosamina>Metil β-D-galactopiranosídeo=D-galactose>Metil α-D-galactopiranosídeo>N-acetil-D-galactosamina
CML	<i>Agkistrodon piscivorus leukostoma</i>	Tiodigalactosídeo>Lactose>Metil β-D-galactopiranosídeo>D-galactose>Metil α-D-galactopiranosídeo
BJcuL	<i>Bothrops jararacussu</i>	Lactose>D-galactose>D-galactosamina
RSL	<i>Crotalus atrox</i>	Tiodigalactosídeo>Lactose>Metil β-D-galactopiranosídeo=D-galactose>Metil α-D-galactopiranosídeo
BleucL	<i>Bothrops leucurus</i>	D-galactose>Lactose>N-acetil-D-galactosamina>Asialofetuin

BpaL	<i>Bothrops pauloensis</i>	Lactose>D-galactose>N-acetil-D-galactosamina
BpL	<i>Bothrops pirajai</i>	Lactose>D-galactose
CuHL	<i>Agkistrodon contortrix</i> <i>contortrix</i>	Tiodigalactosideo>Metil β -D-galactopiranosideo>Lactose>Metil α -D-galactopiranosideo>D-galactose
CrL	<i>Crotalus ruber</i>	Tiodigalactosideo>N-acetil-D-galactosamina=Lactulose>Lactose=Metil β -D-galactopiranosideo>D-galactose
LmL	<i>Lachesis muta</i> <i>stenophrys</i>	Tiodigalactosideo>Lactose>Metil β -D-galactopiranosideo>D-galactose>Metil α -D-galactopiranosideo>Galactosamina
ToL	<i>Trimeresurus</i> <i>okinavensis</i>	Tiodigalactosideo=Lactose
JML	<i>Dendroaspis jamesonii</i>	Tiodigalactosideo=Lactose>Metil α -D-galactopiranosideo>Metil β -D-galactopiranosideo=D-galactose>Galactosamina

Fonte: SARTIM; SAMPAIO, 2015.

Ultimamente, os avanços nos métodos de reconhecimento da especificidade das proteínas a carboidratos incluem novas técnicas, abrindo assim as portas para a melhoria da especificidade dessas proteínas usando uma variedade dos glicanos que imitam fontes biológicas de glicoconjugados. Essa investigação é feita pela técnica de microarray de glicanos através da glicômica funcional, núcleo de interação proteína e glicano. Essa técnica é composta por um sistema de fase sólida de triagem para avaliar o reconhecimento de proteínas como por exemplos as lectinas em uma variedade de estruturas de glicanos imobilizados. Estas técnicas apresentam resultados magníficos e têm sido altamente construtivas para esclarecer o padrão de reconhecimento de carboidratos pelas SVgalLs e têm facilitado a elucidação dos mecanismos de atuação dessas lectinas nos eventos biológicos (HEIMBURG-MOLINARO et al, 2011).

Os glicanos são encontrados em sistemas vivos como oligossacarídeos livres ou como glicoconjugados presentes na superfície da célula e estão envolvidos em uma gama de funções biológicas, incluindo a sinalização, reconhecimento e adesão de moléculas (GEMEINER et al, 2009). O reconhecimento específico a carboidratos por lectinas representa um evento chave em uma variedade de fenômenos biológicos

envolvendo interações do tipo célula - célula, como observado na migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interações do tipo hospedeiro - patógeno e indução mitogênica (VARKI, 2009).

Pesquisas apontam envolvimento das SVgalLs no sistema de hemostático, evidenciando que essas lectinas agem exclusivamente nas funções plaquetárias, como mostrado pelos agonistas da agregação plaquetária nas seguintes lectinas: BmLec, RSL, AplLec, ToL e LmL. O mecanismo proposto para ativação plaquetária foi baseado no relatório de Ogilvie et al., em 1989, que evidenciou o reconhecimento dos carboidratos na superfície das plaquetas por LmL e a indução a agregação plaquetária mediada pela sinalização da glicoproteína IIb/IIIa. Portanto, considerando a característica das SVgalLs de se ligarem especificamente aos glicanos, estes resultados indicam que a presença de resíduos galactose nos glicoconjugados de superfície plaquetária, é responsável pelo reconhecimento por lectinas iniciando a estimulação de plaquetas e possivelmente induzindo distúrbios de coagulação do sangue associados às picadas de serpentes. Por outro lado, várias outras lectinas não foram capazes de induzir ou inibir a agregação plaquetária, CuHL, galatrox, BJL, BJcuL, trombolectina e CrL. Esta diversidade funcional envolvendo a função plaquetária pode está associada com diferenças de especificidade de reconhecimento aos carboidratos entre as SVgalLs (OGILVIE; BYL; GARTNER, 1989).

A ampla ocorrência das SVgalLs e, sua variedade de especificidade por carboidratos, despertou o interesse para investigações das diversas funções destas proteínas que resultou nas seguintes aplicações biotecnológicas: a indução da aglutinação para a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* pela BpalL; inibição do o crescimento da bactéria Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus* pelas BpalL e BIL. Entretanto, BmLec, induziu atividade bactericida contra a bactérias Gram-negativas *Xanthomonas axonopodis pv. Passiflorae*. As lectinas BJcuL e BIL induziu morte celular por apoptose contra a linhagens celulares MKN45, AGS, HT29 e K562. BgL apresentou resposta inflamatória ao ser capaz de induzir edema de fase aguda na pata de camundongos. BiL, BpirL e BmLec foram capazes de induzir alterações nos parâmetros funcionais renais como pressão de perfusão, resistência vascular renal, fluxo urinário, taxa de filtração glomerular e transporte tubular de íons (SARTIM; SAMPAIO, 2015).

Durante os últimos 36 anos, os cientistas mostraram que as peçonhas de serpentes representam uma importante fonte de lectinas que estão envolvidas em

diversas características do sistema biológico das serpentes. A especificidade para certos tipos de carboidratos conferem a estas moléculas a capacidade de reconhecer uma grande variedade de glicoconjugados e atuar como uma ferramenta importante em pesquisa básica, diagnóstico clínico e terapia farmacológica. No entanto, dado o avanço das novas técnicas aplicadas para relacionar com a grande quantidade de informações sobre as diversas funções das lectinas que reconhece carboidratos, ainda se faz necessário a investigação de novas aplicações biológicas para essas proteínas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Purificar as três lectinas de peçonha de serpentes: BJL, BJcul, BIL com novo protocolo de obtenção utilizando o gel de guar, caracterizando suas estruturas moleculares e avaliando suas atividades biológicas.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Obter as três lectinas de veneno das serpentes: *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops leucurus* utilizando gel de guar;
- b) Sequenciar o N-terminal das lectinas por degradação de Edman automatizado;
- c) Determinar a massa molecular e avaliar a homologia entre as lectinas após digestão proteolítica seguida por espectrometria de massas;
- d) Avaliação do efeito das lectinas purificadas e caracterizadas em modelo experimental “in vitro” de coagulação, agregação plaquetária e atividade trombina-like.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 – A NEW C-TYPE LECTIN PURIFICATION APPROACH FOR *Bothrops jararacussu* VENOM: CHARACTERIZATION AND STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITIES.

A new C-type lectin purification approach for *Bothrops jararacussu* venom: characterization and study of biological activities.

Raiana Apolinário de Paula¹, Tatiana Fontes Ottaiano³, Maria Luiza Vilela Oliva³, Maria T. S. Correia¹, Russolina B. Zingali².

¹ Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, PE, Brazil. ² Laboratório de Hemostase e Venenos (LabHemoVen), Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil ³ Laboratório de Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author.

E-mail address: lzingali@bioqmed.ufrj.br (R.B. Zingali)

Abstract

Snake venoms contain saccharide-binding lectins. In this work, we examined the biological activities of a lectin (BjcuL) purified from *Bothrops jararacussu* snake venom with one step by chromatography on Guar gun. The protein, a homodimer with subunits of 14.5 kDa and it was sequenced 120 amino acids residues confirming your identity. BjcuL agglutinated rabbit formaldehyde-fixed erythrocytes at 500 ng/ml and had no direct hemolytic activity. Showed proteolytic activity for Tos-Gly-Pro-Arg-AMC substrate. The lectin (up to 12 μ M) did not aggregate human platelet-rich plasma (PRP) or washed platelets (WP), nor did it alter the aggregation induced by ADP, ADR, AA, Collagen in PRP or by thrombin in WP. BJcuL in lower concentration shortened the activated partial thromboplastin time (APTT), however prolonged the time in a concentration up to 8 μ M and do not affects the prothrombin time (PT).

Keywords: Lectin; Platelet aggregation; Venom.

1 Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins that recognize non-immunologic source carbohydrate structures selectively and reversibly. The main features of this class of proteins is interact with carbohydrates and therefore may combine with glycoconjugates from cell or tissue surface and have been isolated from animals, plants, insects and microorganisms [1]. The animals lectins are grouped in four families (type C, I, S, P) according to the saccharide-binding affinity [2]. C-type lectin is the largest and most diverse family of lectins found in animals. These proteins have a structural form unique and have a carbohydrate recognition domain (CRD) which in most cases is related to connection to the Ca^{++} , making sugar-binding activity dependent on Ca^{++} [3].

Snake venoms are a rich source of C-type galactoside-binding lectins (SVgalLs). Usually, they are, homodimeric proteins, composed of two identical monomers linked by disulfide bridges with molecular mass of approximately 15 kDa, showing a CRD functional that binds to carbohydrates and is able to induce the hemagglutination by recognition of glycoconjugates of the erythrocyte surface [4]. Research indicates involvement of SVgalLs in the hemostatic system, highlighting that these lectins act on platelet function and coagulation factors. This action can be related to the fact that venom is known for presenting hemorrhagic action [5].

Bothrops jararacussu is a snake found in some states of the Northeast, Midwest, Southeast and South of Brazil and its venom have a high phospholipase activity and mainly myotoxic, that are capable of inducing myonecrosis, hemorrhage, edema, hypotension and inhibition of platelet aggregation [6]. Among SVgalLs, the lectin BJcuL was isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom and characterized as regarding its structural and biological functions. In fact, the ability to recognize and bind to specific galactose- containing glycoconjugates allows BJcuL to promote a wide variety of biological activities such as human and pig erythrocyte agglutination, induction of pro-inflammatory response and microbial biofilm disruption. In addition, BJcuL was shown to be toxic to tumoral cell lines, indicating a novel potential approach on the development of antitumoral therapeutics [7].

The present study we report a new purification approach of snake venom galactoside-binding C-type lectins from *Bothrops jararacussu* (BJcuL) by providing insights on the

structural and biological activities associated with its anticoagulant properties in vitro hemostatic parameters of human blood coagulation.

2 Experimental

2.1 Materials

Guar gun from Sigma (Saint Louis, USA). Column C18 from Shimadzu. Other analytical grade inorganic and organic chemicals from commercial sources in Brazil.

2.2 Isolation of BJcuL

Bothrops jararacussu crude venom was donated by the Institute Vital Brazil (Rio de Janeiro, Brasil). Lyophilized crude venom of *B. jararacussu* (30 mg) was dissolved in 30 mL of CTBS buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM CaCl₂, pH 7.5) in 4 °C. The pooled venom was applied to a column (10 x 1.0 cm) of guar gel previously equilibrated with CTBS at a flow rate of 10 mL/h at 4 °C. BIL was eluted from the column with 200 mM galactose in CTBS.

2.3 Reversed-phase HPLC

BJcuL was subjected to reverse-phase column C18 on HPLC system (Shimadzu) for purity analysis. The column was equilibrated with solvent A [0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in H₂O] and eluted using solvent B (90% acetonitrile in 0.1% TFA) in a linear gradient, where B = 5% when t = 0 min, B = 5% at t = 5 min, B = 100% at t = 60 min, B = 0% when t = 65 min. The elution profile was monitored at 215 and 280 nm.

2.4 Hemagglutination activity (HA)

Glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes were obtained as described by Bing, Weyand, and Stavinsky [8]. The lectin (50µL) was serially two-fold diluted in microtiter V-plates containing 0.15 M NaCl before addition of 50 µL 2.5% (v/v) suspension of treated rabbit erythrocytes. The results were read after about 45 min when the control, containing only erythrocytes fully precipitated, appeared as a dot at the bottom of the well. HA (inverse of the titer) was defined as the highest sample dilution showing full hemagglutination [9].

2.5 Carbohydrate content

The total neutral sugar concentration of BJcuL (0,5mg/ml) was measured in a microplate by the phenol-sulfuric acid method according to Masuko et al. [10] using d(+)-mannose as a standard. To summarize, 150 μ l of concentrated sulfuric acid was rapidly added to 50 μ l of mannose (0–10 μ g) in a well of a 96-well microplate followed by the addition of 30 μ l of 5% phenol in water. The mixture was heated for 5 min at 90°C in a static water bath (floating). After cooling to room temperature for 5 min in another water bath, the microplate was wiped dry, and the absorbance at 490 nm was measured by a microplate reader (Spectra Count™).

2.6 SDS-PAGE

Electrophoresis under denaturing, non-reducing and reducing (dithiothreitol, 200 mg/ml) conditions was performed according to the procedure of Laemmli [11] using 5% (w/v) stacking and 15% (w/v) separating gels. The gels were stained for 30 min with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in 10% (v/v) acetic acid.

2.7 Mass spectrometry

The molecular weight and purity of BJcuL performed on a MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry), Bruker Daltonics Microflex LT (Billerica, USA). Sample 2 μ L was applied on a metal plate and, after five minutes, 2 μ L of matrix (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) have been applied. The sample matrix crystals were formed on the plate, which is inserted into the spectrometer. On equipment, the crystals were irradiated by pulse laser of the nitrogen at 337 nm. The analysis was performed on positive linear mode with external calibration and the spectrum of mass was given by the relationship between the relative intensity of each ion and their mass-to-charge ratio (m/z).

2.8 Primary sequence determination Edman

Edman degradation [12] was performed with an automatic gas-phase sequencer (492cLC; Applied Biosystems) using conditions recommended by the manufacturer. Samples (2.0 mg/mL) for sequencing were reduced in 200 μ L of 0.25 M Tris–HCl buffer, pH 8.5 containing 6 M guanidine–HCl, 1 mM EDTA and 5 mg of DTT, and alkylated with iodoacetamide [13]. Then, the protein was separated by reversed phase chromatography HPLC. The similarity of sequences was searched using the BLAST protein sequence database [14] and the sequences were aligned with the MULTALIN

program [15]. Theoretical pI was calculated by ExPASy ProtParam tool through the primary sequence of the protein.

2.9 Determination of amino acid sequence

Dried lectin was dissolved in solutions of pH 7.4 and separately digested with trypsin/Lys-C (enzyme:protein ratio, 1:100) enzyme under the following conditions: 50 mM NH_4HCO_3 or 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 . The samples were reduced with 5 mM dithiothreitol for 30 min at 60 °C and alkylated with 14 mM iodoacetamide for 30 min in the dark at room temperature. Incubation with the enzyme was conducted for 15 min at 37 °C. The mass spectrometric experiment of lectin peptidic fractions was performed on a Synapt G2 mass spectrometer coupled to a nanoAcquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). The peptide mixture was loaded online for 5 min at a flow rate of 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ of phase A (0.1% formic acid) using a Symmetry C18 trapping column (5 μm particles, 180 $\mu\text{m} \times 20$ mm length; Waters, Milford, MA, USA). The mixture of trapped peptides was subsequently separated by elution with a gradient of 7–35% of phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) through a BEH 130 C18 column (1.7 μm particles, 75 $\times$ 150 mm; Waters, Milford, MA, USA) in 93 min, at 275 nL/min. Data were acquired in the data-independent mode in the m/z range of 50–1600 in resolution mode. Collision energies were alternated between 4 eV and a ramp of 17–60 eV for precursor ion and fragment ions, respectively, using scan times of 1.25 s. The ESI source was operated in positive mode with a capillary voltage of 3.0 kV, block temperature of 70 °C, and cone voltage of 50 V. For lock mass correction, [Glu1]-Fibrinopeptide B solution (500 fmol/mL in 50% acetonitrile, 0.1 formic acid; Waters, Milford, MA, USA) was infused through the reference sprayer at 500 nL/min and sampled every 60 s. The MS/MS spectra were exported as a *.pkl file through ProteinLynx Global Server v3.0.1 and imported in PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, Canada) for de novo analysis and multi-round database search [16].

2.10 Protease activity thrombin-like

A possible serinoprotease activity of lectin was performed using synthetic substrates chromogenic N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) and fluorogenic Tos-gly-Pro-Arg-AMC specific to activities such as trypsin and thrombin, respectively. The assay was similar to a previously reported method [17] and performed at 37° C in

Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM containing 0.02% CaCl₂, v/v. The BJcuL 10 μ M was incubated with the 60 minute by BApNA in 96 wells plate. The color release by enzyme action was monitored every 5 min, in 405 nm, using the spectrophotometer Packard, SpectraCount. For activity thrombin-like, lectin 12 μ M was incubated for 60 minutes at 37° C with the substrate fluorogenic Tos-gly-Pro-Arg-AMC (37 mM) in 96 wells plate. The release of the fluorophore was monitored every 5 minutes, λ EX 380nm and λ EM 440 nm, using the spectrofluorimeter Packard, SpectraCount and fluorescence intensities were calibrated with 7-amino-4-methylcoumarin. The enzyme activity was analyzed with the Tris-HCl 0,005 M containing 0, 15 M NaCl, 0.1% PEG 8000, pH 8.0.

2.11 Determination of enzyme kinetics

For determination of behavior Michaelis-Menten was calculate Km and Vmax of lectin, the same methodology described above, using 30 μ l of BJcuL (2.0 mg/ml) and different concentrations of the substrate Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (2.0, 6.0, 12.0, 18.0, 24.0, 30.0, 37.0, 45.0, 52.0 and 60.0 μ M) in a final volume of 260 μ l. The test was performer in triplicate. The graph and the values of Km and Vmax were obtained from the use of the program GraphPadPrism 5.0.

2.12 Platelet aggregation

Venous blood from healthy volunteers was collected into plastic tubes containing 3.8% trisodium citrate. Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at $141 \times g$ for 12 min at room temperature. Washed platelets (WPs) were obtained by centrifugation of PRP added to 2% EDTA (EDTA/PRP 1:20) at $880 \times g$ for 15 min, followed by two washes with 0.9 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 2.1 mM MgCl₂, 22 mM C₆H₅Na₃O₇, 140 mM NaCl, 0.055 mM glucose and 0.053 mM BSA, pH 6.5. The pellet was suspended in 2 ml of Tyrode's buffer (10 mM Hepes, 134 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM NaHCO₃, 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂ and 0.055 mM glucose, pH 7.4). The platelets were counted with a KX-21 N counter and adjusted to a final concentration of 3×10^8 /ml. The aggregation was measured by the Born and Cross turbidimetric method [18] and monitored at 37°C for 6 min using a Chrono-log aggregometer with 500 μ l of the platelet suspension and ADP (10 μ M), arachidonic acid (500 μ g/ml), collagen (4 μ g/ml), epinephrine (60 μ M), fib- rinogen (500 μ g/ml) or thrombin (1.0 U) as an agonist with continuous stirring. Different concentrations of BJcuL were used for activation and for inhibition testing BJcuL have been added to the

plasma 5 minutes before the addition of agonists. Controls were made at the beginning and end of each experiment

2.13 Activated partial thromboplastin time (aPTT)

The aPTT was determined using a semi-automated BFT II coagulometer (Dade Behring) according to the method of Silva et al. [19]. The total plasma was obtained by the centrifugation of several human blood samples at $1726 \times g$ for 15 min (25°C). The aPTT control assay contained 50 μL of saline, 50 μL of plasma and 50 μL of aPTT reagent (Dade actin-activated cephaloplastin). After incubation for 120 s, 50 μL of 0.025 M calcium chloride were added to the control assay. BJcuL (6, 8, 10 and 12 μM) was incubated for 120 s with 50 μL of plasma and 50 μL of the aPTT reagent, followed by the addition of 50 μL of 0.025 M calcium chloride.

2.14 Prothrombin time (PT)

The control for the PT assay was made with 50 μL of saline and 50 μL of plasma. After incubation for 60 s at 37°C , 100 μL of reagent Thromborel S were added to the control assays. Different concentrations of BIL (50 μL of 6, 8, 10 and 12 μM) were incubated for 60 s at 37°C with 50 μL of plasma, followed by the subsequent addition of 100 μL of the PT and the time was measure using a semi-automated BFT II coagulometer (Dade Behring). Each assay was made in triplicate and results were expressed as average of 3 independent protocols. All experiments were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de São Paulo, number CEP 1793/11, according to Brazilian federal law.

2.15 Clot formation time on fibrinogen

For obtaining the standard clotting time (positive control), 75 μL of fibrinogen (1 mg/mL) from human plasma (F4883-Sigma-Aldrich) were added to a cuvette containing 70 μL of 0.15 M NaCl and 5 μL of human thrombin 0.1 U/ μL (T6884-Sigma-Aldrich). The clotting time was determined in Dade Berhring -BFT coagulometer. To test a possible action thrombin-like of lectin, 75 μL of Fibrinogen (1 mg/mL), diluted in TRIS-HCl 50 mM at pH 7.7, were added in the cuvettes containing 10, 25, 50 and 75 μL of BJcuL (2, 6, 8 and 10 μM , respectively) and adjusted with NaCl 0,15 M at final volume 150 μL . Immediately after the addition of the fibrinogen, clotting was accompanied in coagulometer. To test a possible direct effect of BJcuL on thrombin, a second test was performed. For this, 2, 6, 8 and 10 μM of BJcuL were incubated at 37°C for 5 minutes with 5 μL of human thrombin 0.1 U/ μL and the final volume completed with NaCl to

0,15 M to 150 μ L, after incubation, 75 μ L of Fibrinogen (1 mg/ml) were added to the solution and the cuvettes containing the mixture was submitted to coagulometer to determine the clotting time. Other test was performed with modification to see effects of BJcuL directly on fibrinogen. Sample of BJcuL (2, 6, 8 and 10 μ M) were incubated at 37° C for 10 minutes with 75 μ L of Fibrinogen (1 mg/ml) and completed with NaCl 0, 15 M to final volume 150 μ L, after incubation time, were added 5 μ L of human thrombin 0.1 U/ μ L in cuvettes containing the mixture and the clotting time was determined. All tests were made in triplicate.

2.16 Degradation of the fibrin clot

To evaluate the ability of BJcuL to degrade the clot, were used 5 μ L of human thrombin 0.1 U/ μ L (T6884-Sigma-Aldrich) and 75 μ L of fibrinogen (1 mg/mL) to form fibrin clotting. After the formation of clotting, were added BJcuL at concentrations 6, 8 and 10 μ M in 0,15 M NaCl to final volume 150 μ L. After were adding the lectin, clotting dissociation was evaluated with eye detection and the time was marker in seconds.

2.17 Fibrinogenolytic activity

The Fibrinogenolytic activity was assayed on SDS- PAGE gel (5% stacking/14% resolving gel) as described [11]. Small vials containing about 50 μ g of fibrinogen in 50mM Tris-HCl pH 7.7 buffer were incubated with 10 μ g BJcuL at 37 °C in different times (5 ', 20 ', 30 ' and 60 minutes). After incubation and digestion, an aliquot was separated for analysis in mass spectrometer (MALDI/TOF). The digestion was stopped by adding 8 μ L sample buffer containing 0.1% /1% β -Mercaptoethanol and heated at 90° C for 3 minutes. As controls, were incubated separately 10 μ g of BJcuL and 50 μ g of fibrinogen , at 37 °C for 60 minutes, being these samples were submitted to the same procedures above. The proteolytic activity was monitored on the coomassie blue-stained gel after electrophoresis by observing the cleavage patterns of fibrinogen chains.

2.18 Statistical analysis

Differences between means values were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multi-comparison test in the coagulation assays. A p value < 0.05 was considered significant.

3 Results and discussion

3.1 Purification

The purification of *B. jararacussu* venom lectin involved only one chromatographic step in affinity chromatography with Guarana column (Figure 1A) in CTBS. The elution was performed in galactose 0,3 M in CTBS, resulting in adsorbed (G1) fraction agglutinated erythrocytes from rabbits and humans of all blood types with a minimum concentration of 1 µg. The homogeneity of BJcuL was confirmed by the elution of one peak from a C18 column (Figure 1B) with 60.0% acetonitrile. This material was used as the starting material for sequencing. The purity of BJcuL was confirmed by SDS-PAGE (Figure 1C). BJcuL showed strong lectin activity specific hemagglutinating activity of 2.959 U/mg. The yields of the chromatographic fractions with hemagglutinating activities and protein concentrations are presented in Table 1. The new method to purify BJcuL was efficient because they were simple, fast and cheaper than usual commercial affinity matrices for chromatography.

3.2 Structural characterization

BJcuL appeared as a single band by SDS-PAGE with an apparent molecular mass of approximately 30.0 kDa under non-reducing and 15.0 kDa under reducing conditions (Figure 1C), suggesting that the native protein is composed of disulfide-bonded subunits. The molecular mass of BJcuL was determined to be $32,497 \pm 2.926$ Da by mass spectrometry (Figure 2). From the sequencing of BJcuL obtain two sequences with 139 amino acid residues. The N-terminal sequence presented ten sequenced amino acid residues. The second sequence presented 45 peptides and reveals almost all amino acid residues from *B. jararacussu* lectin; they are between the positions 1 to 137, showed 16 unique peptides and prove that the lectin purified in this study is really a true C-type lectin. The amino acid residues from BJcuL are similar to other lectins from snake venom, according to the Blast protein database [20]. A comparison of the sequences showed sequence conservation for of *B. jararacussu* lectin (BJcuL- 100%), *B. jararaca* lectin (BJL-94%), *B. pauloensis* lectin (BpLec- 96%), *Lachesis stenophrys* lectin (LmsL-36%), *Trimeresurus stejnegeri* lectin (TsL- 32%) and *B. insularis* lectin (BiL-97%) suggesting that this lectin belongs to family of galactose-binding C-type lectin (Figure 4). The carbohydrate content of BJcuL accounts for 5.3% by the phenol-sulfuric acid method.

3.3 Biological characterization of homeostasis of blood coagulation in vitro

The protease activity of BJcuL on BApNA substrate wasn't detect, however for fluorogenic (N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride/Sigma-Aldrich) substrate, these lectin showed dose and time dependent thrombin-like activity (Figure 5). The specific activity of BJcuL was 1.75 U/mg and by presenting a certain activity on this substrate, we conducted a study of enzyme kinetics of this lectin. This protein whose behavior Michaelis-Menten (Figure 6) with V_{max} measured in 0,12 μ M/sec and the value of K_m , Kat and $Kcat/K_m$ are on table 2, BJcuL showed specificity to Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC.

The influence of BJcuL on blood coagulation was determined by activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), platelet aggregation and fibrinolytic activity. The positive control used in the assays was plasma of healthy volunteer donors with normal values for clotting times.

BJcuL not induce aggregation in plasma rich in platelets (PRP) (Figure 7A). Also this lectin even with different concentration, no inhibitory effect was observed in platelet aggregation induced by agonist as: adenosine diphosphate (ADP) (Figure 7A), arachidonic acid (AA) (Figure 7B), collagen (Figure 7C) and epinephrine (ADR) (Figure 7D). No interference of BJcuL in platelet aggregation was observed in PRP with different agonists, suggesting that lectin may be interacting with the coagulation factors present in the PRP and thus do not interfere in platelets and not inhibit platelet aggregation induced by agonists. Therefore another test was performed using washed platelets to prove that the lectins not activate these platelets and not inhibit the action of aggregation agonists without external interference. As a result, it was proven that the BJcuL does not interact in platelets (Figure 8A), neither inhibited thrombin, that was used as activator of aggregation (Figure 8B), suggesting that lectin do not interfere in these processes.

The determination of aPTT is particularly useful in monitoring the effect of heparin and determining deficiencies of factors VIII, IX, XI and XII. TP reflects the activity of factor II (prothrombin), V, VII and X, whose deficiency is accompanied by a prolongation of time required for clot formation [21]. BJcuL in concentrations 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 6.0, 8.0, 10 and 12 μ M cause significantly shortened time to aPTT (to less than 8 s) this is due to systemic activation of coagulation and subsequent systemic deposition of fibrin, leading to the consumption of clotting factors and platelets (Figure 9A). However

PT, assayed at concentrations 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 6.0, 8.0, 10 and 12 μ M not affected the coagulation time (Figure 9B), suggests the BJcuL there are no interference in extrinsic pathway. The lectins from snake venom have a special feature of being able to bind to carbohydrates and calcium-dependent, because of this characteristic, BJcuL was tested in the aPTT in presence of galactose and calcium (Figure 9C). BJcuL in presence of sugar do not change your feature of being a procoagulant molecule, these results suggest that CDR from BJcuL not interacts with the carbohydrate portion of serine proteases of the coagulation cascade from intrinsic pathway. However the presence of calcium prolonged clotting time. Suggest that the presence of calcium can change the structure of the lectin causing it to act as an anticoagulant molecule. Thus BJcuL showed an anticoagulant activity in calcium presence, since in determining the R, the ratio between sample coagulation time and control coagulation time [22] was higher than 1.0.

The specific activity of BJcuL on the synthetic substrate of fibrinogen was observed in this study. Due to this fact, was rated the action of BJcuL formation of clotting with pure human fibrinogen and was also analyzed a possible fibrinogenolysis activity from this lectin. Clot formation occurred in the presence of thrombin and fibrinogen and this was considered as positive control. The assays was performed with BJcuL at 2, 6, 8 and 10 μ M incubated with thrombin for 5 minutes and evaluated the profile of clot formation (Figure 10A). Also, the BJcuL at the same concentrations was incubated with fibrinogen for 10 minutes and was observed time of formation clotting (Figure 10B). BJcuL when incubated with thrombin do not affect the clotting time, however when it was incubated at concentrations 8 and 10 μ M with fibrinogen caused prolongation of time formation clotting. This demonstrates that the lectin can interact with fibrinogen in a dependent dose.

For evaluation capacity of BJcuL to degrade the fibrin clot, the protein was added at concentrations of 2, 6, 8 and 10 μ M to recent formed clots and, after 5 minutes. In all, lectin concentrations with a soft, the coagulation clotting was dissolved with a soft agitation, presenting fibrinogenolysis activity.

Fibrinogen is a soluble glycoprotein and major plasma protein coagulation. It is a heterodimeric molecule, with 340 kDa and containing three different polypeptide chains (α , β , and γ) which are linked by disulphide bridges. Thrombin cleaves α and β , chains to release fibrinopeptides A and B, respectively, from the amino terminal. After

fibrinopeptide release, the resulting fibrin monomers undergo polymerization to form an insoluble fibrin clotting [23]. Lectins are a protein that presents as one of its features the ability to bind to glycoproteins or glycoconjugates. In this study the BJcuL showed the ability to interact with fibrinogen modify the homeostatic parameters of blood coagulation. To prove this activity, BJcuL was incubated with fibrinogen, electrophoretic profile and mass spectrometry (MALDI/TOF) was evaluated to observe the presence of hydrolysis of the fibrinogen chains. Unfortunately the analysis by mass spectrometry did not provide sufficient signal intensity to be detected the fibrinopeptide by the instrument. The BJcuL, when incubated in different times (10 up to 120 minutes) with fibrinogen, no present fibrinogenolysis activity on the β and γ chains, however this lectin showed fibrinogenolysis activity on the α chain in within the first 10 minutes (Figure 11). Until now, snake venom lectin do not presented fibrinogenolysis activity to the alpha chain of thrombin. This activity may be related to the CDR of lectin that binds to the fibrinogen or the presence of a catalytic site on the lectin structure.

4 Conclusions

In this work demonstrated a new method of purification of BJcuL more efficient and cheap. It was determined the purity and amino acid sequencing showed the high homology with other proteins C-type lectins, proving it is real C-type lectin. Also, was investigated the ability of this protein in degrading the fibrinogen and was observed that the BJcuL made the cleavage into chains α , they are strongly procoagulant and depending on the concentration they exhibits anticoagulant activity and this activities is no dependent sugar domain region. Indicating this lectin can act on different components of blood coagulation system.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are grateful for research grants and fellowship to MLVO. Also, the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) are acknowledged for financial support.

Purification step BJcuL	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	HA ^a	THA ^b	SHA ^c	Yield (%)
Crude venom	30.0	1.0	30.0	0	0	0	100
G1- BJcuL (Guar Gun elution)	15.0	0.692	10.38	2048	30.720	2.959	34.6

a Hemagglutinating activity was performed with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde-treated erythrocytes.

b Total hemagglutinating activity = HA × volume (ml).

c Specific hemagglutinating activity = HA/protein (mg/ml).

Table 1. Purification of *Bothrops jararacussu* lectin.

Enzyme		BJcuL	
Substrate	K _m μM	K _{cat} Sec ⁻¹	K _{cat} /K _m M ⁻¹ . Sec ⁻¹
Tos-Gly-Pro-Arg-AMC	54.62	0,0122	2.2 × 10 ²

Table 2. Kinetic parameters of hydrolysis by *Bothrops jararacussu* lectin 10 μM.

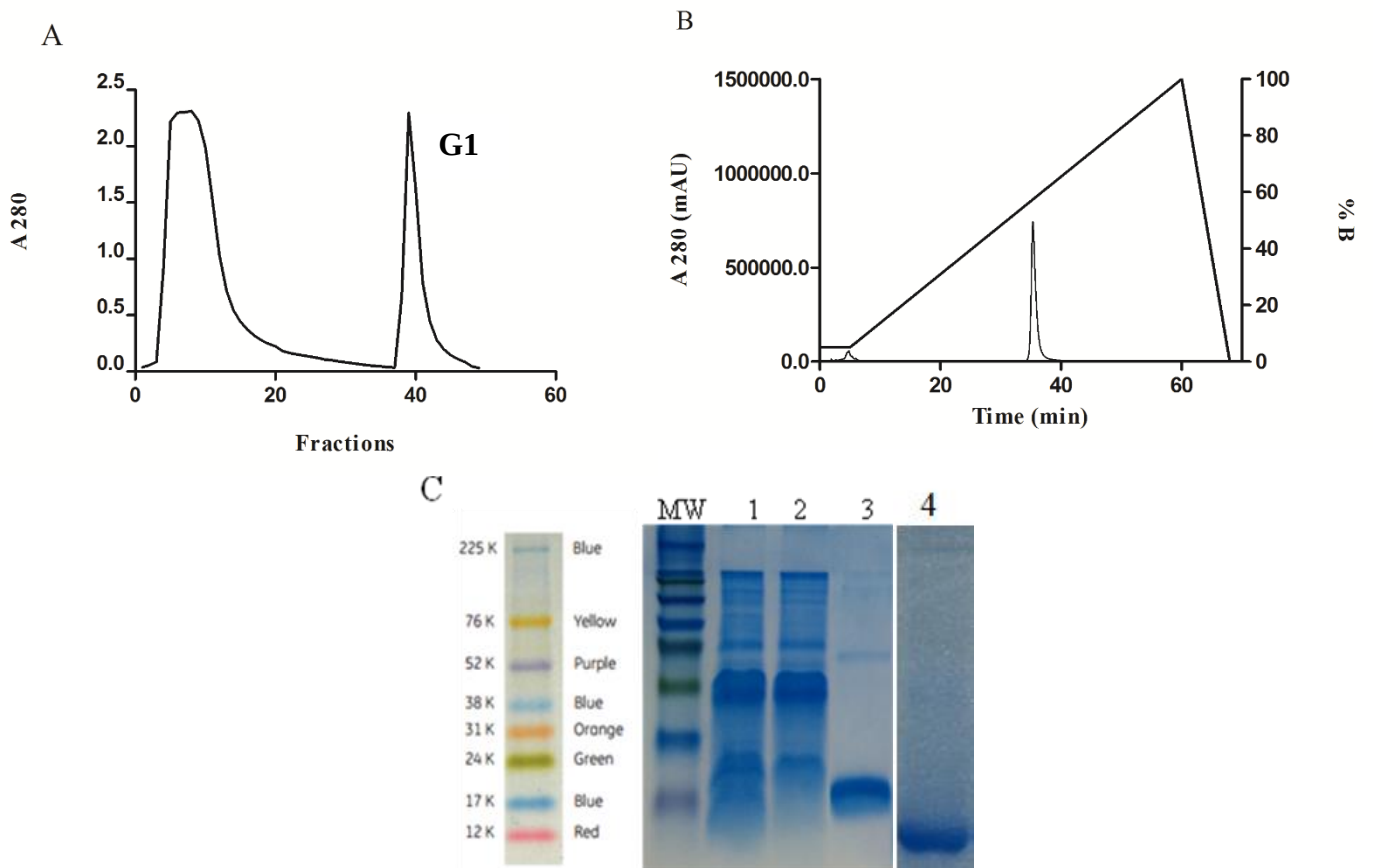


Figure 1. Purification of *B. jararacussu* lectin by chromatography via (A) Guar gum column (10 ml) equilibrated with CTBS, pH 7,5. Adsorbed proteins (G1) were eluted with 0,3 M galactose and fractions are monitored in a absorbance at 280 nm. BJcuL homogeneity was analyzed by HPLC using a Bondapak C18 reversed-phase column (B). The elution profile was monitored at 280 nm. (C) SDS-PAGE of BJcuL using a 15% polyacrylamide gel. Lane 0 represents the molecular weight markers Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - Full Range (KDa) Colors: Blue (225), Red (150), Green (102), Yellow (76), Purple (52), Blue (38), Orange (31), Green (24), Blue (17), Red (12). Lane 1 represents the crude venom (20 µg). Lane 2 represents the non-adsorbed fraction of venom (20 µg). Lanes 3 and 4 represent BJcuL (20 µg) heated at 100°C for 5 min.

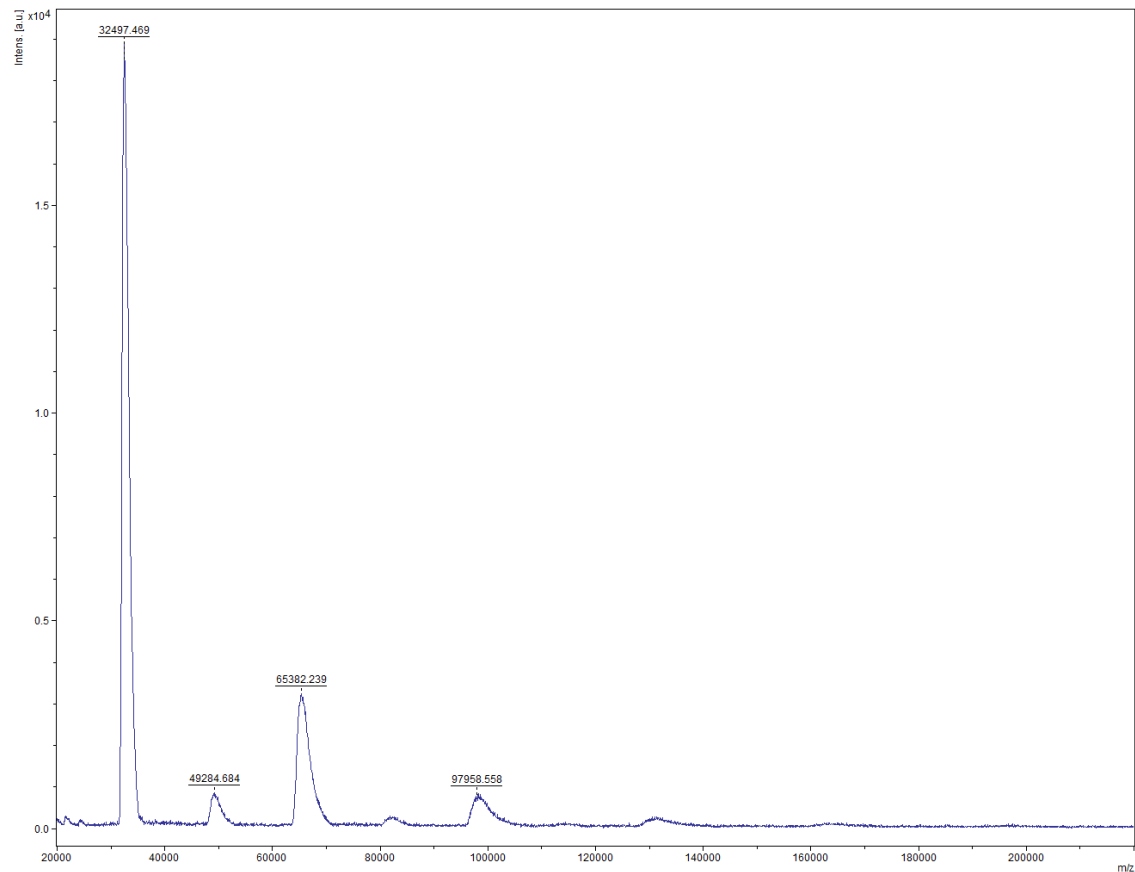


Figure 2. MALDI-TOF mass spectrometry of BJcuL. First peak, with mass of 32497 Da represents pure lectins. The second third and fourth peaks, show the molecule in the form of Dimer and trimer and tetramer respectively.

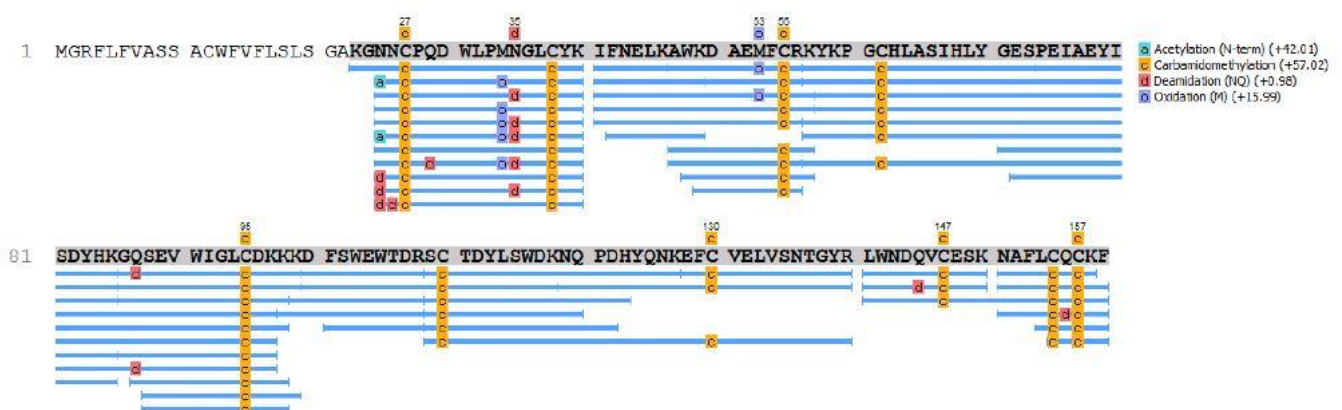


Figure 3: comparison analysis of amino acids of lectina BJcuL on the software Peaks 2.0. The sequence checked has homology with sequences deposited in database.

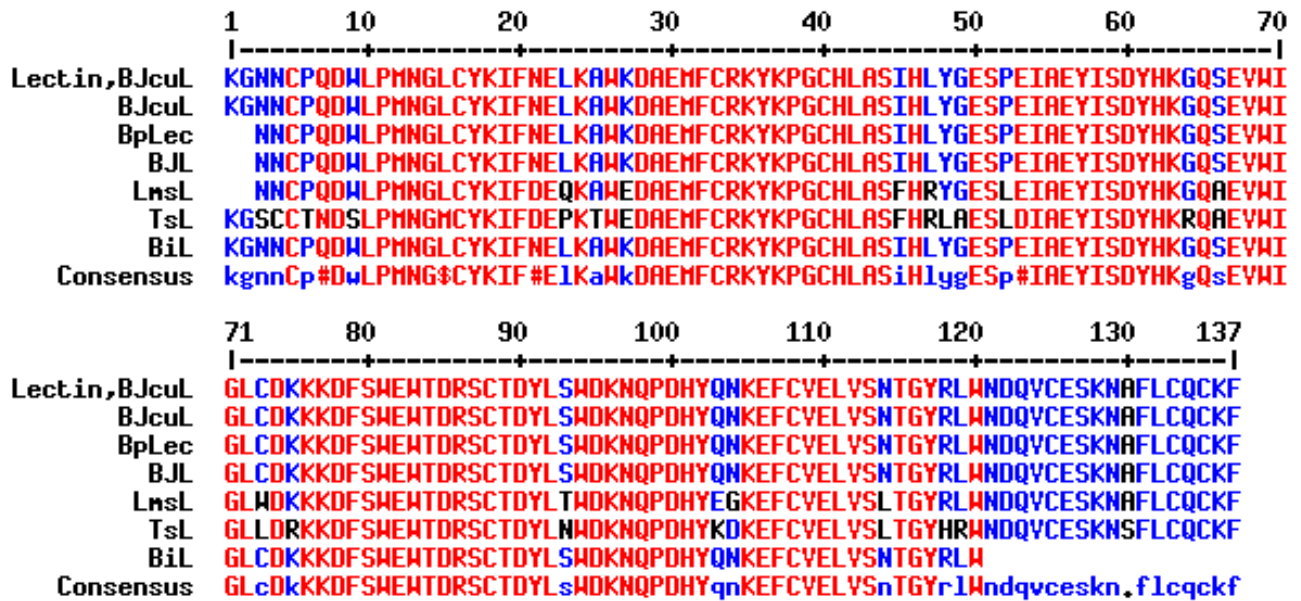


Figure 4. Multiple sequence alignment of BJcuL. Similarities between the amino acid sequences of *B. jararacussu* lectin (BJcuL- P83519.2), *B. jararaca* lectin (BJL-Q9PRY7.2), *B. pauloensis* lectin (BpLec P86970.2), *Lachesis stenophrys* lectin (LmsL-Q9PSM4.1), *Trimeresurus stejnegeri* lectin (TsL- Q9YGP1) and *B. insularis* lectin (BiL-Q6QX33.1). The dashes indicate the gaps that were introduced for optimal alignment and maximum similarity for the MULTALIN program. Residues identical to BJcuL are displayed in red, low consensus are in blue.

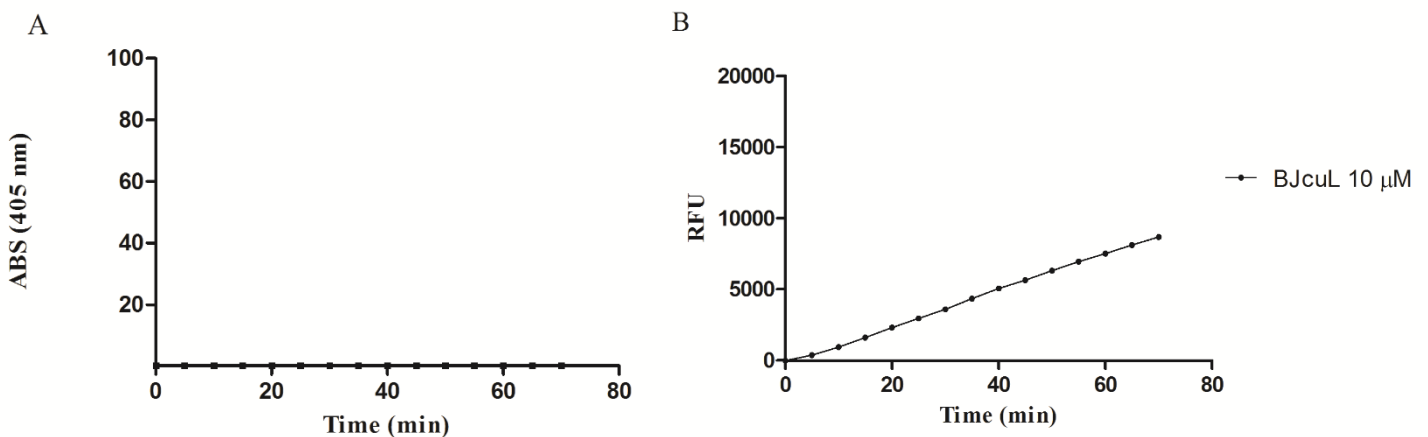


Figure 5. Specific activity of BJcuL 10 μ M on substrate. A: BApNA B: Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC.

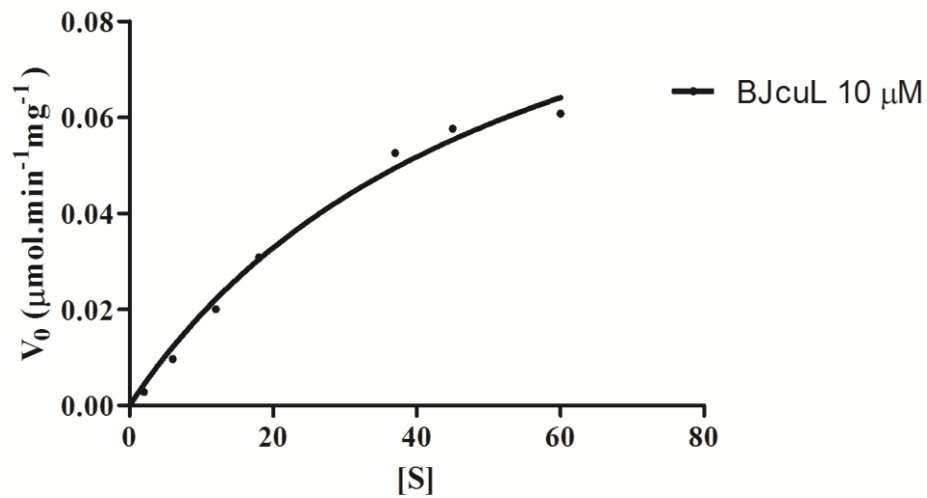


Figure 6. Enzyme Kinetics of BJcuL. The lectin was tested on different substrate concentrations Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (2, 6, 12, 18, 24, 30, 37, 45 and 52 μM).

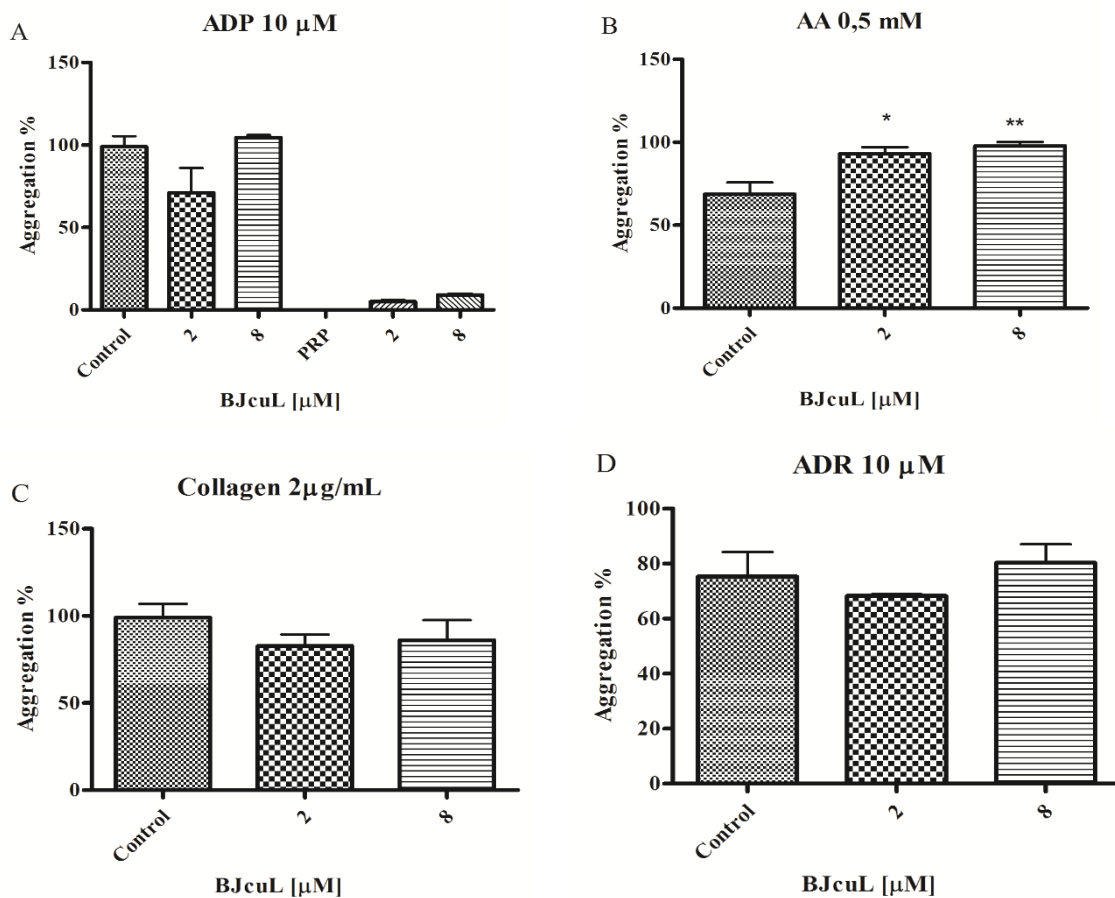


Figure 7. The influence of BJcuL on platelet aggregation. Different concentrations of BJcuL were incubated with $2-3 \times 10^8/\text{ml}$ of platelets for 5 min at 37°C followed by the addition of the following platelet aggregation agonists: ADP (A), arachidonic acid (B), collagen (C), epinephrine (D) p-Value <0.05 (*) and p-value <0.001 (**). The data represent means $\pm$ SDs, $n = 3$

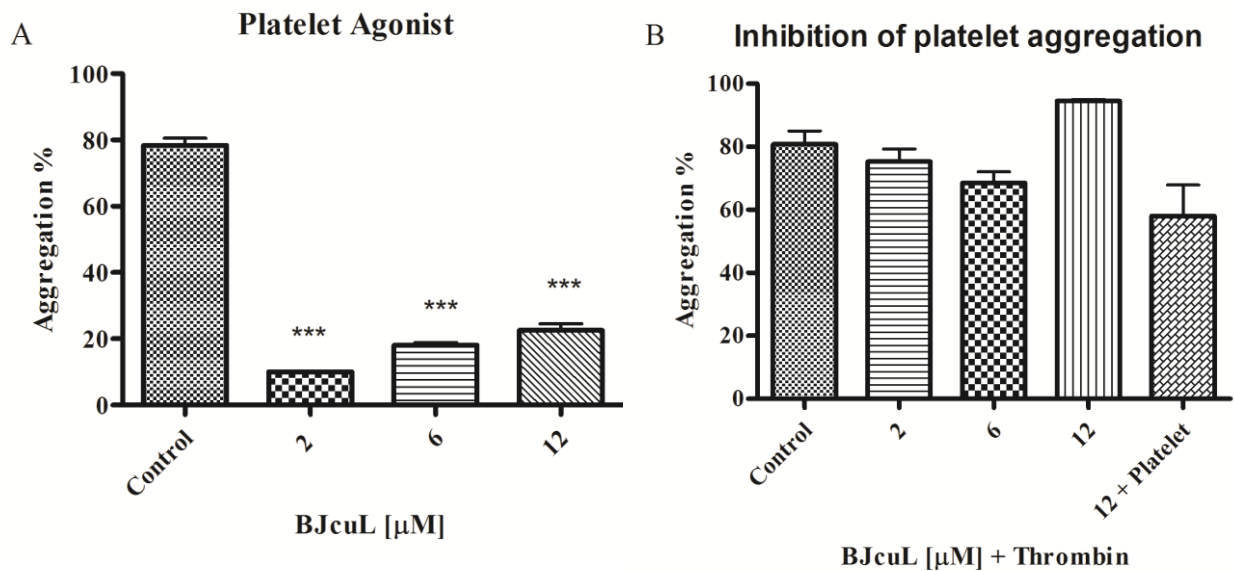


Figure 8. The influence of BJcuL on washed platelet aggregation. Different Assay was performed with $2-3 \times 10^8$ /ml of platelets incubated for 5 min at 37°C, followed by the addition: BJcuL as platelet aggregation agonists (A), BJcuL incubated with thrombin for 5 min (B) p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and p>0,001 (***). The data represent means $\pm$ SDs, n = 3

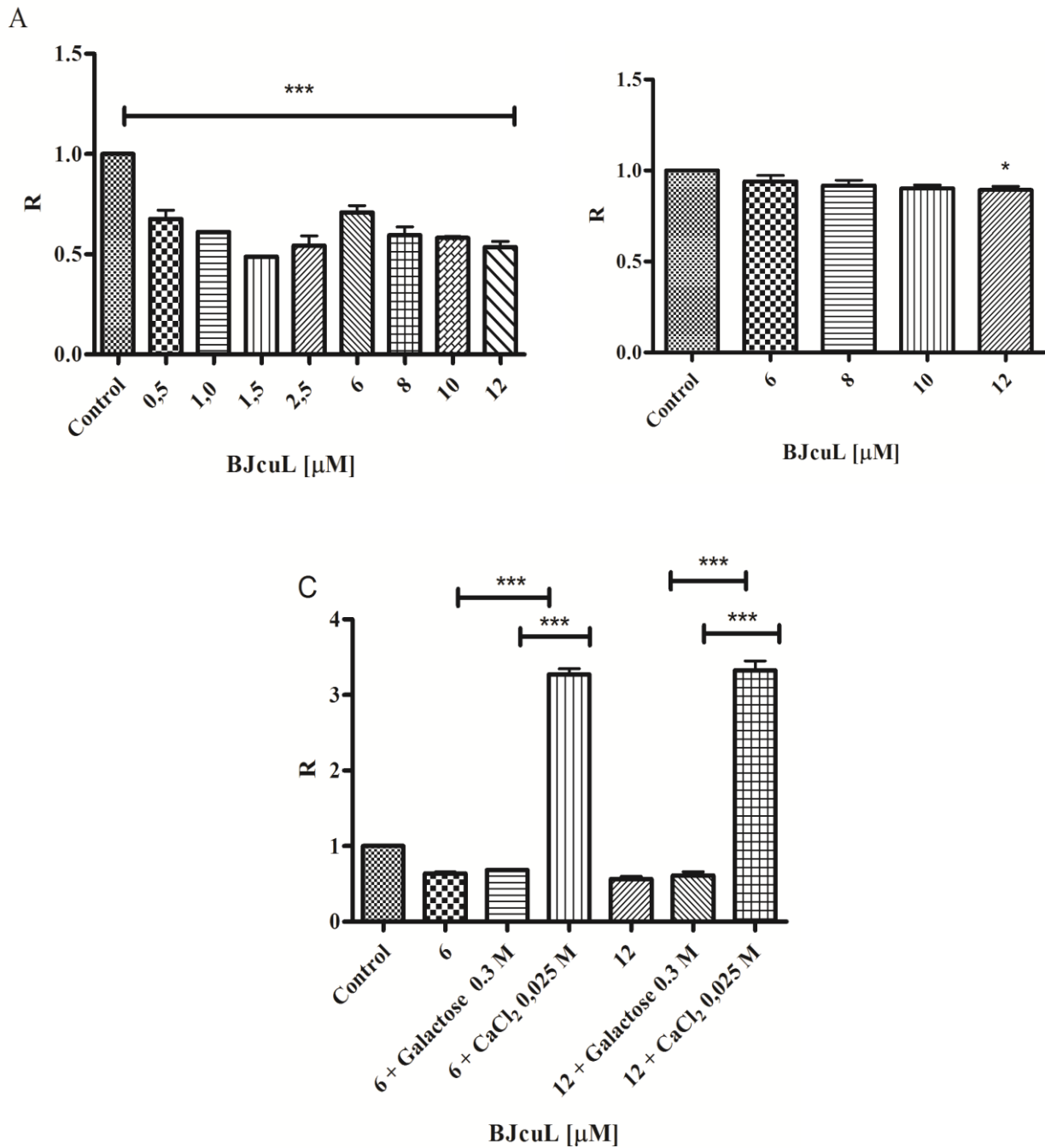


Figure 9. The influence of BJcuL on blood coagulation. The results were determined by activated partial thromboplastin time (aPTT, A), prothrombin time (PT, B) and activated partial thromboplastin time in presence the galactose and calcium (aPTT, C). R is the ratio of blood coagulation time in the presence of lectin to a normal (control) sample. p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and p>0.001 (***). The data represent means $\pm$ SDs, n = 3.

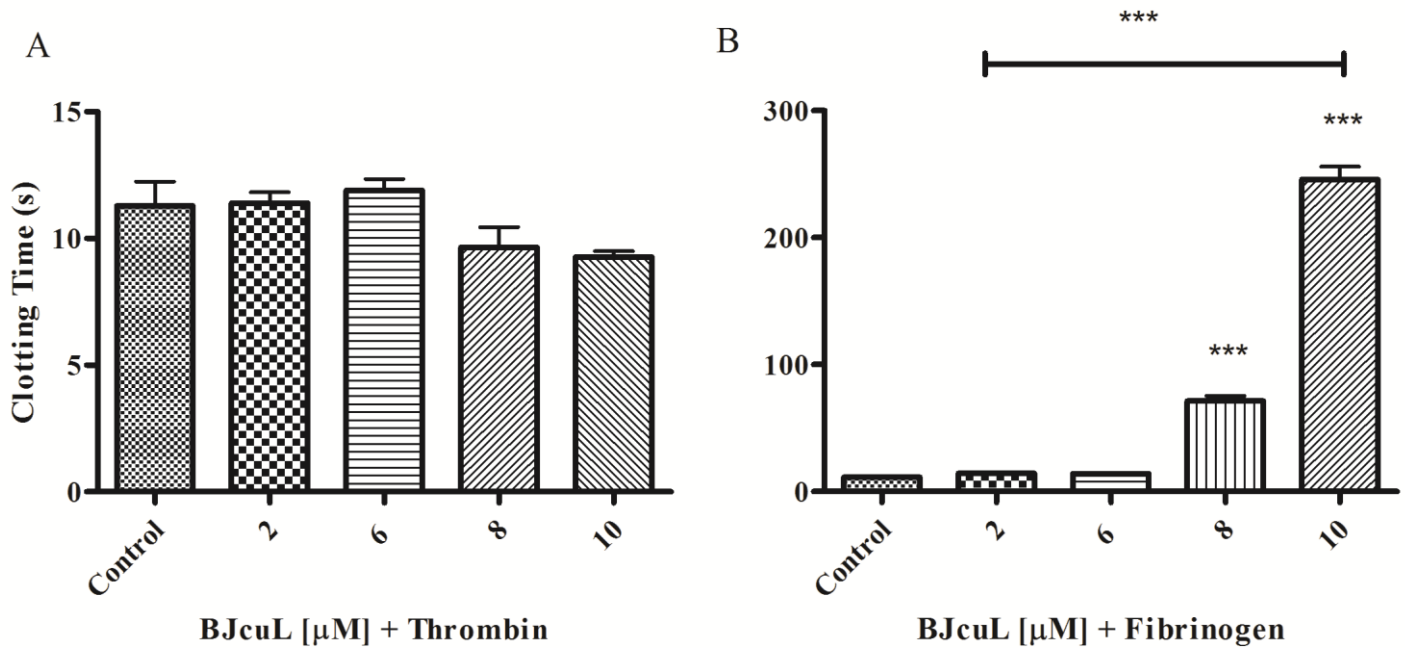


Figure 10. Influence of BJcuL in formation time of fibrin clot. (A) Lectin incubate with thrombin for 5 min (B) Lectin incubate with fibrinogen for 10 min. After incubation period they used to formation clot. p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and $p>0.001$ (***). The data represent means $\pm$ SDs, $n = 3$.



Figure 11. Fibrinogenolysis Activity of BJcuL on SDS-PAGE. Lane (1) Molecular weight; Lane (2) Fibrinogen - positive control; Lane (3) Fibrinogen + BJcuL 10 min; Lane (4) Fibrinogen + BJcuL 20 min; Lane (5) Fibrinogen + BJcuL 40 min; Lane (6) Fibrinogen + BJcuL 60 min; Lane (7) Fibrinogen + BJcuL 80min; Lane (8) Fibrinogen + BJcuL 100 min; Lane (9) Fibrinogen + BJcuL 120 min; Lane (10) BJcuL.

References

- [1] Sharon N, Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14 (11) 53R–62R.
- [2] Yamazaki, Y.; Morita, T. 2007. Snake Venom Components Affecting Blood Coagulation and the Vascular System: Structural Similarities and Marked Diversity. *Current Pharmaceutical Design* 13 2872-2886.
- [3] Weis WI, Taylor ME, Drickamer K: The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 1998, 163:19-34.
- [4] Abreu, P. A.; Albuquerque, M. G.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. *Toxicon*. v. 48, n. 6, p. 690–701, 2006.
- [5] Sartim, M. A.; Sampaio, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. V.21, n. 35, 2015.
- [6] Takeda, AAS et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A(2) complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors at 1.9-and 1.45-Å resolution. *Biochimica Et Biophysica Acta-proteins and Proteomics*. Amsterdam: Elsevier B.V., v. 1699, n. 1-2, p. 281-284, 2004.
- [7] Sartim, Marco A., et al. "Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom." *Toxicon* 126 (2017): 59-69.
- [8] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavinsky, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124 (1967) 1166–1170.
- [9] M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55 (1995) 261–273.
- [10] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* 2005;339:69–72.
- [11] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [12] P. Edman, *Acta Chemica Scandinavica* 4 (1950) 277–282
- [13] P.T. Matsudaira, In *a Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, San Diego, CA, 1989:20–22.

- [14] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 3389–3402.
- [15] F. Corpet, *Nucleic Acids Research* 16 (1988) 10881–10890.
- [16] J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, et al., PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) (M111.010587–M111.010587).
- [17] Szewczuk Z, Gibbs BF, Yue SY, Purisima EO, Konishi Y. Conformationally restricted thrombin inhibitors resistant to proteolytic digestion. *Biochemistry* 31:9132–9140, 1992
- [18] Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963;168:178–95.
- [19] Silva MCC, Santana LA, Silva-Lucca RA, Lima ALR, Ferreira JG, Paiva PMG, et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: an affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochem* 2011;46:74–80.
- [20] Borrebaeck CA, Lönnerdal B, Etzler ME. Metal ion content of *Dolichos biflorus* lectin and effect of divalent cations on lectin activity. *Biochemistry* 1981;20(14):4119e22.
- [21] P.H. Silva, Y. Hashimoto, *Coagulação-Visão Laboratorial da Hemostasia Primária e Secundária*, 1st ed., Revinter, Rio de Janeiro, 2006
- [22] P. Möhnle, N.M. Schwann, W.K. Vaughn, M.C. Snabes, W. Lau, J. Levin, N.A. Nussmeier, *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 19 (2005) 19–25.
- [23] Medved, L. E Weisel, J. W. on behalf of fibrinogen and factor XIII subcommittee of the scientific standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, p. 355-359. 2009.

4.2 ARTIGO 2 – HEMOSTATICALLY ACTIVE C-TYPE GALACTOSE-BINDING LECTIN FROM *Bothrops leucurus* SNAKE VENOM.

Hemostatically active C-type galactose-binding lectin from *Bothrops leucurus* snake venom.

Raiana Apolinário de Paula¹, Tatiana Fontes Ottaiano³, Míriam Camargo Guarniei Ogata³, Maria Luiza Vilela Oliva³, Maria T. S. Correia¹, Russolina B. Zingali².

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-420, Recife, PE, Brazil. ² Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil ³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author.

E-mail address: lzingali@bioqmed.ufrj.br (R.B. Zingali)

Abstract

BIL, was purified from *Bothrops leucurus* venom by affinity chromatography with guar gum. The molecular homogeneity and purity of BIL were assessed by reversed-phase HPLC on C-18 column. BIL appeared as a single band of approximately 30.0 kDa on SDS-PAGE under non-reducing and 15.0 KDa under reducing conditions, and its molecular weight was determined to be 32,384 Da by MALDI/TOF-MS. BIL is a glycoprotein with a carbohydrate content of 5.7% determined by the phenol–sulfuric acid method. The N-terminal structure of BIL shows similarity with other lectins from the genus *Bothrops*. BIL increases coagulation time, but this effect is not related to carbohydrate domain region. BIL does not inhibits ADP- and epinephrine-induced platelet aggregation. BIL have a fibrinolytic activity in a dose-dependent manner and is able to digest the fibrinogen alpha chain.

Keywords: *Bothrops leucurus*, Snake venom lectin, Coagulation time, Platelet aggregation.

1 Introduction

There are five major families of venomous snakes. Venoms from the Hydrophilidae family are mainly myotoxic, while toxins from Colubridae remain not well characterized. Proteins with hemorrhagic effect are frequently present in venoms from the families of Viperidae and Crotalidae. Venoms from the Elapidae family exert primarily neurotoxic effect. However, recent studies have shown that Elapidae venoms also disrupt hemostasis using proteins, such as the C-type lectins from *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus* [1]. By affecting blood cells, plasma proteins, and vessel wall components, the venoms from the Viperidae, Crotalidae, and the Elapidae families have a diverse toxic effect. Snake toxins can inhibit as well as activate a broad range of coagulation factors, including fibrinogen, prothrombin, factor V, factor IX, factor X, and thrombin. They are typically metalloproteinases, C-type lectins or serine proteases. Snake toxins also modulate platelet activity. While most of them act on platelets directly, some snake toxins require plasma proteins such as IgMk [2] or vWf [3] as cofactors. These toxins are mainly C-type lectins, disintegrins, and disintegrin-like proteins. In addition to platelets, erythrocytes are also sensitive to snake toxins [4].

Hemostasis involves vasoconstriction which results in reduced blood flow, activated platelets and blood coagulation factors, and fibrinolysis. At the site of the vascular injury, platelets adhere to the exposed sub-endothelial macromolecules, especially collagen. Attached platelets become activated and aggregate. Simultaneously, blood coagulation factors are activated, leading to fibrin clot formation. For many years activation of blood coagulation factors was represented by a cascade model, but clinical and experimental observations have demonstrated that this model does not completely explain the events of hemostasis *in vivo*. It was therefore replaced by a cell-based model by Hoffman and Monroe [5] that considers haemostasis as occurring in three steps: initiation, amplification, and propagation. This process requires the participation of two types of cells, tissue factor (TF) bearing cells and platelets. Blood coagulation is initiated when coagulation factor VII (FVII) from plasma comes into contact with TF on cells outside the vasculature, as a result of blood vessel injury, and undergoes activation to FVIIa that subsequently activates small amounts of other factors. The complex then activates prothrombin to thrombin on the surface of platelets, permitting additional platelet adhesion and aggregation at the site of the vessel injury. Thrombin cleaves fibrinogen and so enables its polymerization and stabilizes the fibrin clot by

cross-linking fibrin molecules. Once the fibrin-platelet clot is formed over the vessel injury area, the clotting process is attenuated to avoid thrombotic occlusion in surrounding normal areas of the vasculature. Finally, following healing of the wound, fibrinolysis removes the clot from the blood system. The main fibrin-degrading enzyme in the blood is plasmin, which is formed from plasminogen by specific proteolysis by endogenous serine proteinases, tissue-plasminogen activator (t-PA) and urokinase (u-PA). Snake venoms contain both enzymes and non-enzymatic proteins that decrease the coagulability of blood, induce bleeding and secondary effects, for example hypovolaemic shock and organ damage, or induce thrombosis [6].

Lectins are glycoproteins and/or oligomeric proteins found in a diverse assortment of organisms and mediate carbohydrate-recognition events [7]. Because of their ability to recognize complex carbohydrates on cell surfaces with high specificity, lectins are important actors in the social life of cells in various tissues and body fluids. Moreover, lectins with specificity for particular types of glycan structures may present interesting biotechnological and biomedical applications [8]. According to their structural similarities, animal lectins are categorized into several families. Various proteins that display carbohydrate-binding activity in a Ca^{2+} -dependent manner are classified into the C-type lectin family [9]. Snake venom lectins (SVLs) belong to group VII of the C-type animal lectins. This type of lectin has been found in the venom of several snakes (from Elapidae, Viperidae and Crotalidae families). Their binding specificity is most often attributed to galactose but also to mannose [10]. SVLs generally account for 1% of the dry weight of venom and are composed of two identical disulfide-linked 14–16 kDa subunits, each one containing a CRD [11] and have a number of other biological activities *in vitro*, including agglutination of erythrocytes, mitogenic activity on lymphocytes, inhibition of cancer cell proliferation and cytotoxicity to some tumors and endothelial cell lines [12], their real pathogenic effect *in vivo* is unknown.

The venom of *Bothrops leucurus* causes considerable damage because they induce clotting activity, edema, hemorrhage and necrosis [13]. A lectin was isolated from this venom using a combination of affinity and gel filtration chromatography. The lectin of *Bothrops leucurus* (BIL) agglutinates rabbit erythrocyte, inhibited agglutination of erythrocytes by galactose, raffinose, lactose, fetal bovine serum, casein and features antibacterial activity and cytotoxic activity [14].

Due to severe toxicological effects caused on hemostasis by snake venom and considering the number of accidents related with these animals was increased. Study the specific proteins from snake venom, such as lectins, becomes very important tool, cause they could be a potential application in treatment and diagnosing thromboembolic disorders, mainly because the fact that *Bothrops leucurus* is endemic specie in the Northeast of Brazil and it is responsible for major attacks in this region. In this article, we report the purification, primary structure and its effect on blood clotting parameters and platelet aggregation the lectin from *B. leucurus*, which may be important for antithrombotic and anticoagulant drug development.

2 Experimental

2.1 Materials

Guar gun from Sigma (Saint Louis, USA). Column C18 from Shimadzu. Other analytical grade inorganic and organic chemicals from commercial sources in Brazil.

2.2 Isolation of BIL

Bothrops leucurus crude venom was donated by Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da Universidade Federal de Pernambuco (Licence SISBIO Nº 2611.29885/2009-PE), Recife, Pernambuco. Lyophilized crude venom of *B. leucurus* (30 mg) was dissolved in 30 mL of CTBS buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM CaCl₂, pH 7.5) in 4 °C. The pooled venom was applied to a column (10 x 1.0 cm) of guar gel previously equilibrated with CTBS at a flow rate of 10 mL/h at 4 °C. BIL was eluted from the column with 200 mM galactose in CTBS.

2.3 Reversed-phase HPLC

BIL was subjected to reverse-phase column C18 on HPLC system (Shimadzu) for purity analysis. The column was equilibrated with solvent A [0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in H₂O] and eluted using solvent B (90% acetonitrile in 0.1% TFA) in a linear gradient, where B = 5% when t = 0 min, B = 5% at t = 5 min, B = 100% at t = 60 min, B = 0% when t = 69 min. The elution profile was monitored at 215 and 280 nm.

2.4 Hemagglutination activity (HA)

Glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes were obtained as described by Bing, Weyand, and Stavinsky [15]. The lectin (50µL) was serially two-fold diluted in microtiter V-plates containing 0.15 M NaCl before addition of 50 µL 2.5% (v/v) suspension of

treated rabbit erythrocytes. The results were read after about 45 min when the control, containing only erythrocytes fully precipitated, appeared as a dot at the bottom of the well. HA (inverse of the titer) was defined as the highest sample dilution showing full hemagglutination [16].

2.5 Carbohydrate content

The total neutral sugar concentration of BIL (0,5mg/ml) was measured in a microplate by the phenol-sulfuric acid method according to Masuko et al. [17] using d(+)-mannose as a standard. To summarize, 150 μ l of concentrated sulfuric acid was rapidly added to 50 μ l of mannose (0–10 μ g) in a well of a 96-well microplate followed by the addition of 30 μ l of 5% phenol in water. The mixture was heated for 5 min at 90°C in a static water bath (floating). After cooling to room temperature for 5 min in another water bath, the microplate was wiped dry, and the absorbance at 490 nm was measured by a microplate reader (Spectra Count™).

2.6 SDS-PAGE

Electrophoresis was performed under denaturing, non-reducing and reducing (dithiothreitol, 200 mg/ml) conditions was performed according to the procedure of Laemmli [18] using 5% (w/v) stacking and 15% (w/v) separating gels. The gels were stained for 30 min with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in 10% (v/v) acetic acid.

2.7 Mass spectrometry

The molecular weight and purity of BIL performed on a MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry), Bruker Daltonics Microflex LT (Billerica, USA). Sample 2 μ L was applied on a metal plate and, after five minutes, 2 μ L of matrix (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) have been applied. The sample matrix crystals were formed on the plate, which is inserted into the spectrometer. On equipment, the crystals were irradiated by pulse laser of the nitrogen at 337 nm. The analysis was performed on positive linear mode with external calibration and the spectrum of mass was given by the relationship between the relative intensity of each ion and their mass-to-charge ratio (m/z).

2.8 Primary sequence determination Edman

Edman degradation [19] was performed with an automatic gas-phase sequencer (492cLC; Applied Biosystems) using conditions recommended by the manufacturer. Samples (2.0 mg/mL) for sequencing were reduced in 200 μ L of 0.25 M Tris–HCl buffer, pH 8.5 containing 6 M guanidine–HCl, 1 mM EDTA and 5 mg of DTT, and alkylated with iodoacetamide [20]. Then, the protein was separated by reversed phase chromatography HPLC. The similarity of sequences was searched using the BLAST protein sequence database [21] and the sequences were aligned with the MULTALIN program [22]. Theoretical pI was calculated by ExPASy ProtParam tool through the primary sequence of the protein.

2.9 Determination of amino acid sequence

Dried lectin was dissolved in solutions of pH 7.4 and separately digested with trypsin/Lys-C (enzyme:protein ratio, 1:100) enzyme under the following conditions: 50 mM NH_4HCO_3 or 100 mM Tris–HCl, 10 mM CaCl_2 . The samples were reduced with 5 mM dithiothreitol for 30 min at 60 °C and alkylated with 14 mM iodoacetamide for 30 min in the dark at room temperature. Incubation with the enzyme was conducted for 15 min at 37 °C. The mass spectrometric experiment of lectin peptidic fractions was performed on a Synapt G2 mass spectrometer coupled to a nanoAcquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). The peptide mixture was loaded online for 5 min at a flow rate of 8 μ L/min of phase A (0.1% formic acid) using a Symmetry C18 trapping column (5 μ m particles, 180 μ m $\times$ 20 mm length; Waters, Milford, MA, USA). The mixture of trapped peptides was subsequently separated by elution with a gradient of 7–35% of phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) through a BEH 130 C18 column (1.7 μ m particles, 75 $\times$ 150 mm; Waters, Milford, MA, USA) in 93 min, at 275 nL/min. Data were acquired in the data-independent mode in the m/z range of 50–1600 in resolution mode. Collision energies were alternated between 4 eV and a ramp of 17–60 eV for precursor ion and fragment ions, respectively, using scan times of 1.25 s. The ESI source was operated in positive mode with a capillary voltage of 3.0 kV, block temperature of 70 °C, and cone voltage of 50 V. For lock mass correction, [Glu1]-Fibrinopeptide B solution (500 fmol/mL in 50% acetonitrile, 0.1 formic acid; Waters, Milford, MA, USA) was infused through the reference sprayer at 500 nL/min and sampled every 60 s. The MS/MS spectra were exported as a *.pkl file through ProteinLynx Global Server v3.0.1 and imported in PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics

Solution Inc., Waterloo, Canada) for de novo analysis and multi-round database search [23].

2.10 Protease activity thrombin-like

A possible serinoprotease activity of lectin was performed using synthetic substrates chromogenic N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) and fluorogenic Tos-gly-Pro-Arg-AMC specific to activities such as trypsin and thrombin, respectively. The assay was similar to a previously reported method [24] and performed at 37° C in Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM containing 0.02% CaCl₂, v/v. The BIL 10 µM was incubated with the 60 minute by BAPNA in 96 wells plate. The color release by enzyme action was monitored every 5 min, in 405 nm, using the spectrophotometer Packard, SpectraCount. For activity thrombin-like, BIL 10 µM was incubated for 60 minutes at 37° C with the substrate fluorogenic Tos-gly-Pro-Arg-AMC (37 mM) in 96 wells plate. The release of the fluorophore was monitored every 5 minutes, λEX 380nm and λEM 440 nm, using the spectrofluorimeter Packard, SpectraCount and fluorescence intensities were calibrated with 7-amino-4-methylcoumarin. The enzyme activity was analyzed with the Tris-HCl 0,005 M, containing 0, 15 M NaCl and 0.1% PEG 8000 pH 8.0.

2.11 Determination of enzyme kinetics

For determination of behavior Michaelis-Menten was calculate K_m and V_{max} of lectin, the same methodology described above, using 30 µl of BIL (2.0 mg/ml) and different concentrations of the substrate Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (2.0, 6.0, 12.0, 18.0, 24.0, 30.0, 37.0, 45.0, 52.0 and 60.0 µM) in a final volume of 260 µl. The test was performed in triplicate. The graph and the values of K_m and V_{max} were obtained from the use of the program GraphPadPrism 5.0.

2.12 Platelet aggregation

Venous blood from healthy volunteers was collected into plastic tubes containing 3.8% trisodium citrate. Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 141 × g for 12 min at room temperature. Washed platelets (WPs) were obtained by centrifugation of PRP added to 2% EDTA (EDTA/PRP 1:20) at 880 × g for 15 min, followed by two washes with 0.9 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 2.1 mM MgCl₂, 22 mM C₆H₅Na₃O₇, 140 mM NaCl, 0.055 mM glucose and 0.053 mM BSA, pH 6.5. The pellet was suspended in 2 ml of Tyrode's buffer (10 mM Hepes, 134 mM NaCl,

1 mM CaCl_2 , 12 mM NaHCO_3 , 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 and 0.055 mM glucose, pH 7.4). The platelets were counted with a KX-21 N counter and adjusted to a final concentration of $3 \times 10^8/\text{ml}$. The aggregation was measured by the Born and Cross turbidimetric method [25] and monitored at 37°C for 6 min using a Chrono-log aggregometer with 500 μl of the platelet suspension and ADP (10 μM), arachidonic acid (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), collagen (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), epinephrine (60 μM), fibrinogen (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or thrombin (1.0 U) as an agonist with continuous stirring. Different concentrations of BIL were used for activation and for inhibition testing BIL have been added to the plasma 5 minutes before the addition of agonists. Controls were made at the beginning and end of each experiment

2.13 Activated partial thromboplastin time (aPTT)

The aPTT was determined using a semi-automated BFT II coagulometer (Dade Behring) according to the method of Silva et al. [26]. The total plasma was obtained by the centrifugation of several human blood samples at $1726 \times g$ for 15 min (25°C). The aPTT control assay contained 50 μl of saline, 50 μl of plasma and 50 μl of aPTT reagent (Dade actin-activated cephaloplastin). After incubation for 120 s, 50 μl of 0.025 M calcium chloride were added to the control assay. BIL (6, 8, 10 and 12 μM) was incubated for 120 s with 50 μl of plasma and 50 μl of the aPTT reagent, followed by the addition of 50 μl of 0.025 M calcium chloride.

2.14 Prothrombin time (PT)

The control for the PT assay was made with 50 μl of saline and 50 μl of plasma. After incubation for 60 s at 37°C , 100 μl of reagent Thromborel S were added to the control assays. Different concentrations of BIL (50 μl of 6, 8, 10 and 12 μM) were incubated for 60 s at 37°C with 50 μl of plasma, followed by the subsequent addition of 100 μl of the PT and the time was measured using a semi-automated BFT II coagulometer (Dade Behring). Each assay was made in triplicate and results were expressed as average of 3 independent protocols. All experiments were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de São Paulo, number CEP 1793/11, according to Brazilian federal law.

2.15 Clot formation time on fibrinogen

For obtaining the standard clotting time (positive control), 75 μL of fibrinogen (1 mg/mL) from human plasma (F4883-Sigma-Aldrich) were added to a cuvette containing 70 μL of 0.15 M NaCl and 5 μL of human thrombin 0.1 U/ μL (T6884-Sigma-Aldrich). The

clotting time was determined in Dade Berhring -BFT coagulometer. To test a possible action thrombin-like of lectin, 75 μ L of fibrinogen (1 mg/mL), diluted in TRIS-HCl 50 mM at pH 7.7, were added in the cuvettes containing 10, 25, 50 and 75 μ L of BIL (2, 6, 8 and 10 μ M, respectively) and adjusted with NaCl 0,15 M at final volume 150 μ L. Immediately after the addition of the fibrinogen, clotting was accompanied in coagulometer. To test a possible direct effect of BIL on thrombin, a second test was performed. For this, 2, 6, 8 and 10 μ M of BIL were incubated at 37° C for 5 minutes with 5 μ L of human thrombin 0.1 U/ μ L and the final volume completed with NaCl to 0,15 M to 150 μ L, after incubation, 75 μ L of Fibrinogen (1 mg/ml) were added to the solution and the cuvettes containing the mixture was submitted to coagulometer to determine the clotting time. Other test was performed with modification to see effects of BIL directly on fibrinogen. Sample of BIL (2, 6, 8 and 10 μ M) were incubated at 37° C for 10 minutes with 75 μ L of fibrinogen (1 mg/ml) and completed with NaCl 0, 15 M to final volume 150 μ L, after incubation time, were added 5 μ L of human thrombin 0.1 U/ μ L in cuvettes containing the mixture and the clotting time was determined. All tests were made in triplicate.

2.16 Degradation of the fibrin clot

To evaluate the ability of BIL to degrade the clot, were used 5 μ L of human thrombin 0.1 U/ μ L (T6884-Sigma-Aldrich) and 75 μ L of fibrinogen (1 mg/mL) to form fibrin clotting. After the formation of clotting, were added BIL at concentrations 6, 8 and 10 μ M in 0,15 M NaCl to final volume 150 μ L. After were adding the lectin, clotting dissociation was evaluated with eye detection and the time was marker in seconds.

2.17 Fibrinogenolytic activity

The fibrinogenolytic activity was assayed on SDS- PAGE gel (5% stacking/14% resolving gel) as described [18]. Small vials containing about 50 μ g of fibrinogen in 50mM Tris-HCl pH 7.7 buffer were incubated with 10 μ g BIL at 37 °C in different times (5 ', 20 ', 30 ' and 60 minutes). After the incubation time, the digestion was stopped by adding 8 μ L sample buffer containing 0.1% /1% β -Mercaptoethanol and heated at 90° C for 3 minutes. As controls, were incubated separately 10 μ g of BIL and 50 μ g of fibrinogen, at 37 °C for 60 minutes, being these samples were submitted to the same procedures above. The proteolytic activity was monitored on the coomassie blue-stained gel after electrophoresis by observing the cleavage patterns of fibrinogen chains.

2.18 Statistical analysis

Differences between means values were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multi-comparison test in the coagulation assays. A p value < 0.05 was considered significant.

3 Results and discussion

3.1 Purification

The purification of *B. leucurus* venom lectin involved only one chromatographic step in affinity chromatography with Guar column (Figure 1A) in CTBS. The elution was performed in galactose 0,3 M in CTBS, resulting in adsorbed (G1) fraction agglutinated erythrocytes from rabbits and humans of all blood types with a minimum concentration of 1 µg. The homogeneity of BIL was confirmed by the elution of one peak from a C18 column (Figure 1B) with 60.0% acetonitrile. This material was used as the starting material for sequencing. The purity of BIL was confirmed by SDS-PAGE (Figure 1C). BIL showed strong lectin activity specific hemagglutinating activity of 10.240 U/mg. The yields of the chromatographic fractions with hemagglutinating activities and protein concentrations are presented in Table 1.

3.2 Structural characterization

BIL appeared as a single band by SDS-PAGE with an apparent molecular mass of approximately 30.0 kDa under non-reducing and 15.0 KDa under reducing conditions (Figure 1C), suggesting that the native protein is composed of disulfide-bonded subunits. The molecular mass of BIL was determined to be $32,384 \pm 2.926$ Da by mass spectrometry (Figure 2). From the sequencing of BIL was obtain only the N-terminal, the complete sequence of amino acid residues was not possible to identify. The N-terminal sequence presented ten sequenced amino acid residues conserved. The amino acid residues from BIL are similar to other lectins from snake venom, according to the Blast protein database [20]. A comparison of the sequences showed sequence conservation for of *B. jararacussu* lectin (BJcuL- 100%), *B. jararaca* lectin (BJL-94%), *B. pauloensis* lectin (BpLec- 96%), *Lachesis stenophrys* lectin (LmsL-36%), *Trimeresurus stejnegeri* lectin (TsL- 32%) and *B. insularis* lectin (BiL-97%) suggesting that this lectin belongs to family of galactose-binding C-type lectin (Figure 3). The carbohydrate content of BIL accounts for 5.7% by the phenol-sulfuric acid method.

3.3 Biological characterization of homeostasis of blood coagulation in vitro

The protease activity of BIL on BApNA substrate wasn't detect, however for fluorogenic (N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride/Sigma-Aldrich) substrate, these lectin showed dose and time dependent thrombin-like activity (Figure 4). The specific activity of BIL was 4.47 U/mg and by presenting a certain activity on this substrate, we conducted a study of enzyme kinetics of this lectin. This protein whose behavior Michaelis-Menten (Figure 5) with $V_{\text{máx}}$ measured in 0,0441 $\mu\text{M}/\text{sec}$ and the value of K_m , K_{at} and K_{cat}/K_m are on table 2, BIL showed specificity to Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC.

The influence of BIL on blood coagulation was determined by activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), platelet aggregation and fibrinolytic activity. The positive control used in the assays was plasma of healthy volunteer donors with normal values for clotting times.

BIL not induce aggregation in plasma rich in platelets (PRP) (Figure 6A). Also this lectin even with different concentration, no inhibitory effect was observed in platelet aggregation induced by agonist as: adenosine diphosphate (ADP) (Figure 6A), arachidonic acid (AA) (Figure 6B), collagen (Figure 6C) and epinephrine (ADR) (Figure 6D). No interference of BIL in platelet aggregation was observed in PRP with different agonists, suggesting that lectin may be interacting with the coagulation factors present in the PRP and thus do not interfere in platelets and not inhibit platelet aggregation induced by agonists. Therefore another test was performed using washed platelets to prove that the lectins not activate these platelets and not inhibit the action of aggregation agonists without external interference. As a result, it was proven that the BIL does not interact in platelets (Figure 7A), neither inhibited thrombin, that was used as activator of aggregation (Figure 7B), suggesting that lectin do not interfere in these processes.

The determination of aPTT is particularly useful in monitoring the effect of heparin and determining deficiencies of factors VIII, IX, XI and XII. TP reflects the activity of factor II (prothrombin), V, VII and X, whose deficiency is accompanied by a prolongation of time required for clot formation [21]. BIL in concentrations 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 6.0, 8.0 and 10 μM cause significantly shortened time to aPTT (to less than 8 s) this is due to systemic activation of coagulation and subsequent systemic deposition of fibrin, leading to the consumption of clotting factors and platelets. However in concentration

12 μM , the time was prolonged due to the fact that BIL in lower concentration stimulate rapid coagulation with a consequent consumption of clotting factors, the fibrinolytic system is triggered with the same speed causing widespread hemorrhaging (Figure 8A). However PT, assayed at concentrations 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 6.0, 8.0, 10 and 12 μM not affected the coagulation time (Figure 8B), suggests the BIL there are no interference in extrinsic pathway. The lectins from snake venom have a special feature of being able to bind to carbohydrates and calcium-dependent, because of this characteristic, BIL was tested in the aPTT in presence of galactose and calcium (Figure 8C). BIL in presence of sugar do not change your feature of being a procoagulant molecule, these results suggest that CDR from BIL not interacts with the carbohydrate portion of serine proteases of the coagulation cascade from intrinsic pathway. However the presence of calcium prolonged clotting time. Suggest that the presence of calcium can change the structure of the lectin causing it to act as an anticoagulant molecule. Thus BIL showed an anticoagulant activity in calcium presence, since in determining the R, the ratio between sample coagulation time and control coagulation time [22] was higher than 1.0.

The specific activity of BIL on the synthetic substrate of fibrinogen was observed in this study. Due to this fact, was rated the action of BIL formation of clotting with pure human fibrinogen and was also analyzed a possible fibrinogenolysis activity from this lectin. Clot formation occurred in the presence of thrombin and fibrinogen and this was considered as positive control. The assays was performed with BIL at 2, 6, 8 and 10 μM incubated with thrombin for 5 minutes and evaluated the profile of clot formation (Figure 9A). Also, the BIL at the same concentrations was incubated with fibrinogen for 10 minutes and was observed time of formation clotting (Figure 9B). BIL when incubated with thrombin do not affect the clotting time, however when it was incubated at concentrations 8 and 10 μM with fibrinogen caused prolongation of time formation clotting. This demonstrates that the lectin can interact with fibrinogen in a dependent dose.

For evaluation capacity of BIL to degrade the fibrin clot, the protein was added at concentrations of 2, 6, 8 and 10 μM to recent formed clots and, after 5 minutes. In all, lectin concentrations with a soft, the coagulation clotting was dissolved with a soft agitation, presenting fibrinogenolysis activity.

Fibrinogen is a soluble glycoprotein and major plasma protein coagulation. It is a heterodimeric molecule, with 340 kDa and containing three different polypeptide chains (α , β , and γ) which are linked by disulphide bridges. Thrombin cleaves α and β chains to release fibrinopeptides A and B, respectively, from the amino terminal. After fibrinopeptide release, the resulting fibrin monomers undergo polymerization to form an insoluble fibrin clotting [23]. Lectins are a protein that presents as one of its features the ability to bind to glycoproteins or glycoconjugates. In this study the BIL showed the ability to interact with fibrinogen modify the homeostatic parameters of blood coagulation. To prove this activity, BIL was incubated with fibrinogen, electrophoretic profile and mass spectrometry (MALDI/TOF) was evaluated to observe the presence of hydrolysis of the fibrinogen chains. Unfortunately the analysis by mass spectrometry did not provide sufficient signal intensity to be detected the fibrinopeptide by the instrument. The BIL, when incubated in different times (10 up to 120 minutes) with fibrinogen, no present fibrinogenolysis activity on the β and γ chains, however this lectin showed fibrinogenolysis activity on the α chain in within the first 10 minutes (Figure 10). Until now, snake venom lectin do not presented fibrinogenolysis activity to the alpha chain of thrombin. This activity may be related to the CDR of lectin that binds to the fibrinogen or the presence of a catalytic site on the lectin structure.

4 Conclusions

In this work demonstrated a new method of purification of BIL was efficient. It was determined the purity and N- terminal sequencing showed the high homology with other proteins C-type lectins, proving it is real C-type lectin. Also, was investigated the ability of this protein in degrading the fibrinogen and was observed that the BIL made the cleavage into chains α , depending on the concentration they are procoagulant or anticoagulant activity and this activities is no dependent sugar domain region. Indicating this lectin can act on different components of blood coagulation system.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior (CAPES). We are grateful for research grants and fellowship to MLVO. Also, the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) are acknowledged for financial support.

Purification step BIL	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	HA ^a	THA ^b	SHA ^c	Yield (%)
Crude venom	30.0	1.0	30.0	0	0	0	100
G1- BIL (Guar Gun elution)	15.0	0.4	6.0	4096	61.440	10.240	20

a Hemagglutinating activity was performed with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde-treated erythrocytes.

b Total hemagglutinating activity = HA × volume (ml).

c Specific hemagglutinating activity = HA/protein (mg/ml).

Table 1. Purification of *Bothrops leucurus* lectin.

Enzyme	BIL		
Substrate	K _m μM	K _{cat} Sec ⁻¹	K _{cat} /K _m M ⁻¹ . Sec ⁻¹
Tos-Gly-Pro-Arg-AMC	31.52	0,004	1.3 × 10 ²

Table 2. Kinetic parameters of hydrolysis by *Bothrops leucurus* lectin 10 μM.

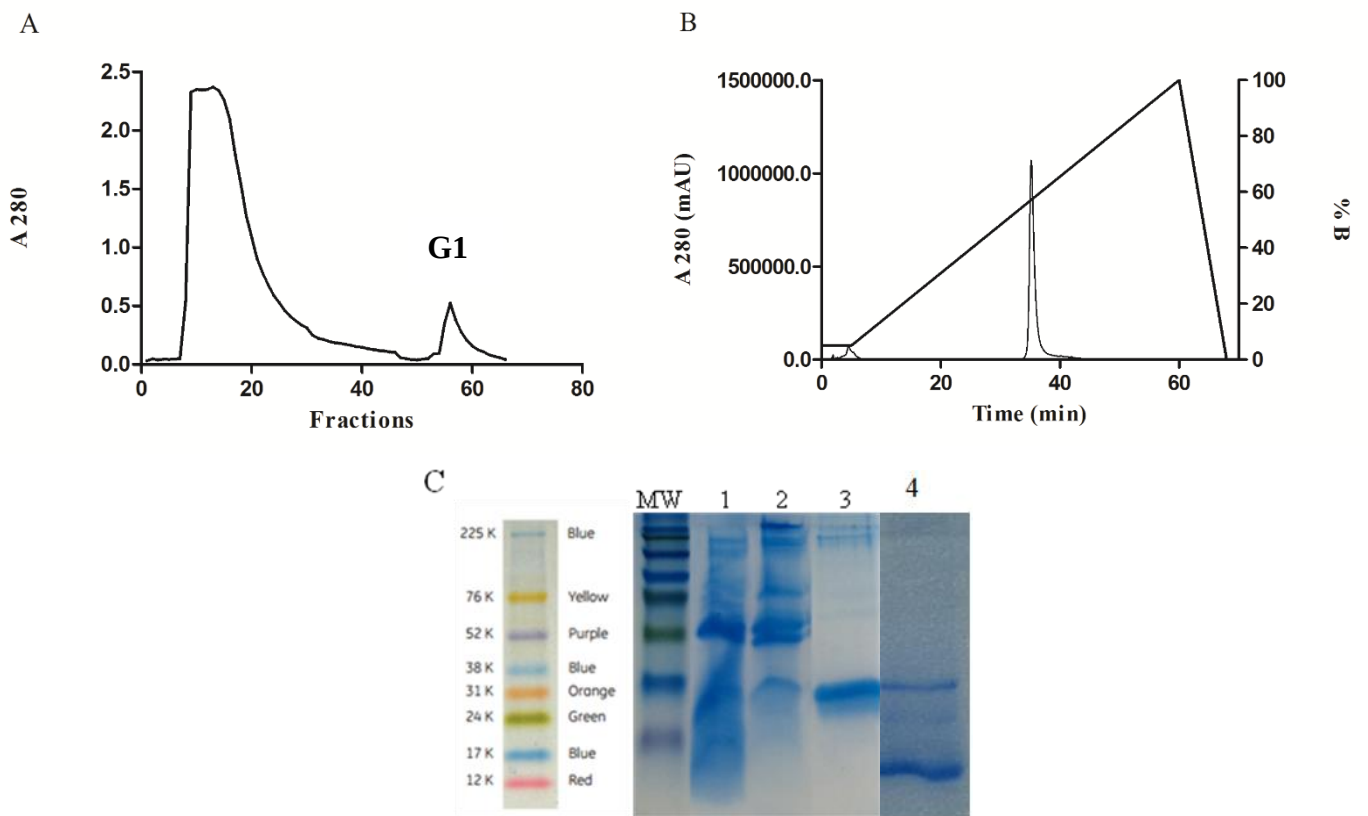


Figure 1. Purification of *B. leucurus* lectin by chromatography via (A) Guar gum column (10 ml) equilibrated with CTBS, pH 7.5. Adsorbed proteins (G1) were eluted with 0.3 M galactose and fractions are monitored in absorbance at 280 nm. BIL homogeneity was analyzed by HPLC using a Bondapak C18 reversed-phase column (B). The elution profile was monitored at 280 nm. (C) SDS-PAGE of BIL using a 15% polyacrylamide gel. Lane 0 represents the molecular weight markers Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - Full Range (KDa) Colors: Blue (225), Red (150), Green (102), Yellow (76), Purple (52), Blue (38), Orange (31), Green (24), Blue (17), Red (12). Lane 1 represents the crude venom (20 µg). Lane 2 represents the non-adsorbed fraction of venom (20 µg). Lanes 3 and 4 represent BIL (20 µg) heated at 100°C for 5 min in the absence and presence of DTT, respectively.

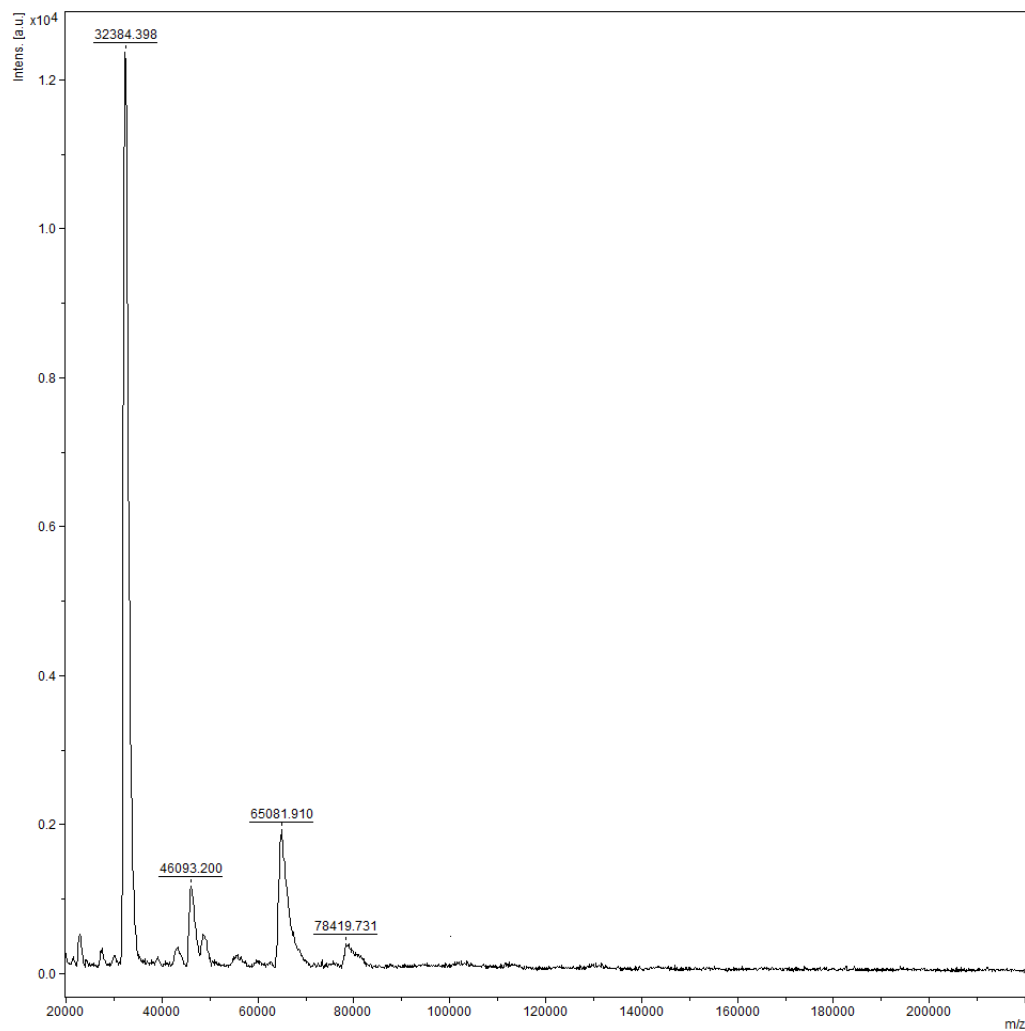


Figure 2. MALDI-TOF mass spectrometry of BIL. First peak, with mass of 32384 Da represents pure lectins. The second third and fourth peaks, show the molecule in the form of Dimer and trimer and tetramer respectively.

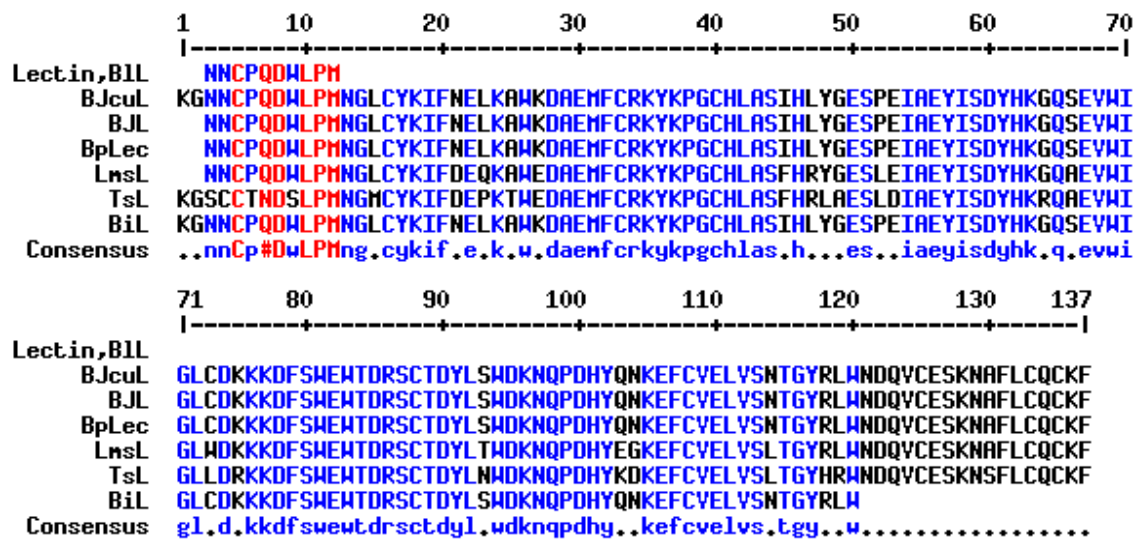


Figure 3. Multiple sequence alignment of BIL. Similarities between the amino acid sequences of *B. jararacussu* lectin (BJcuL- P83519.2), *B. jararaca* lectin (BJL-Q9PRY7.2), *B. pauloensis* lectin (BpLec P86970.2), *Lachesis stenophrys* lectin (LmsL-Q9PSM4.1), *Trimeresurus stejnegeri* lectin (TsL- Q9YGP1) and *B. insularis* lectin (BiL-Q6QX33.1). The dashes indicate the gaps that were introduced for optimal alignment and maximum similarity for the MULTALIN program. Residues identical to BIL are displayed in red, low consensus are in blue.

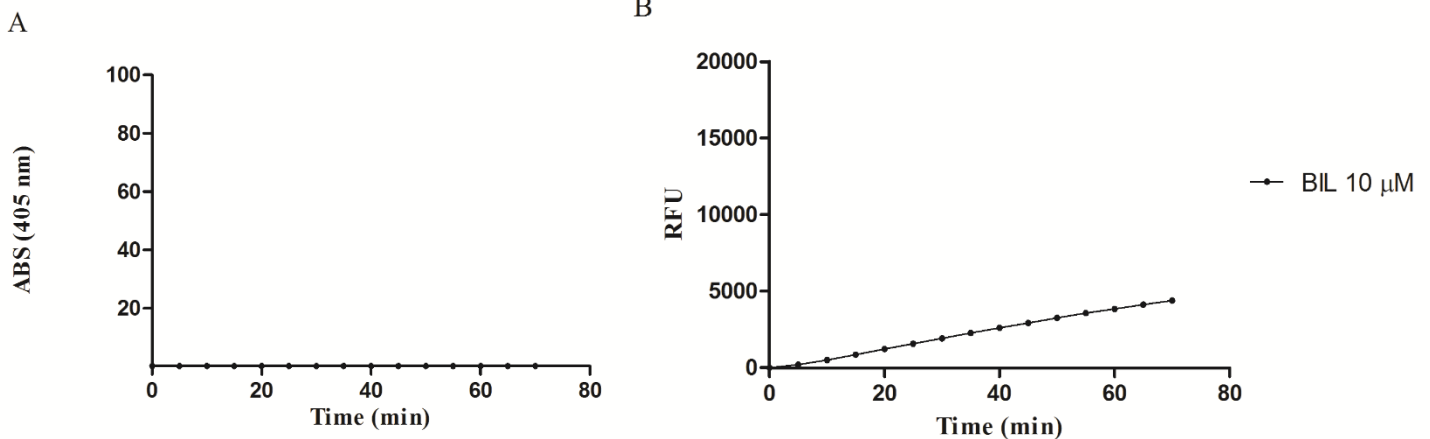


Figure 4. Specific activity of BIL 10 μ M on substrate. A: BApNA B: Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC.

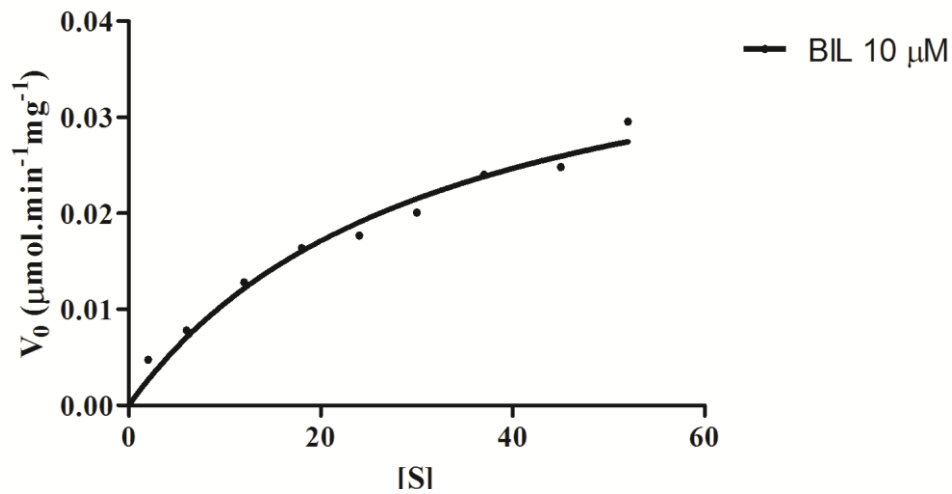


Figure 5. Enzyme Kinetics of BIL. The lectin was tested on different substrate concentrations Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (2, 6, 12, 18, 24, 30, 37, 45 and 52 μM).

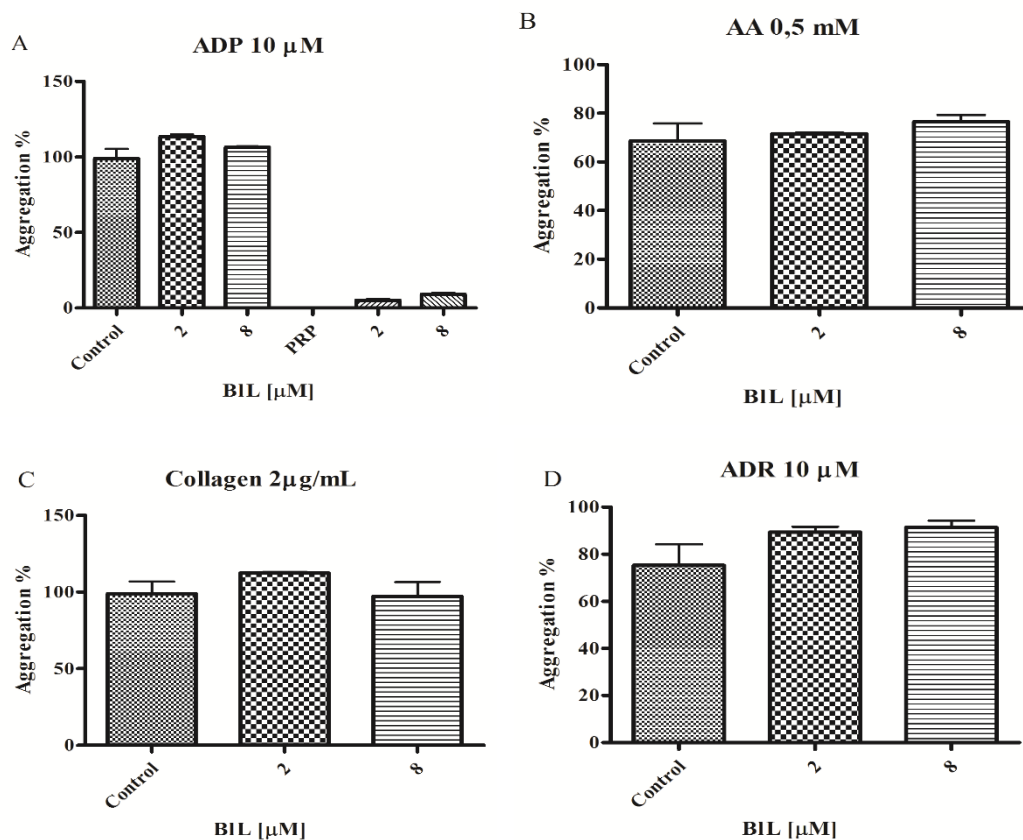


Figure 6. The influence of BIL on platelet aggregation. Different concentrations of BIL were incubated with $2-3 \times 10^8/\text{ml}$ of platelets for 5 min at 37°C followed by the addition of the following platelet aggregation agonists: ADP (A), arachidonic acid (B), collagen (C), epinephrine (D) p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and $p>0,001$ (***). The data represent means $\pm$ SDs, $n = 3$

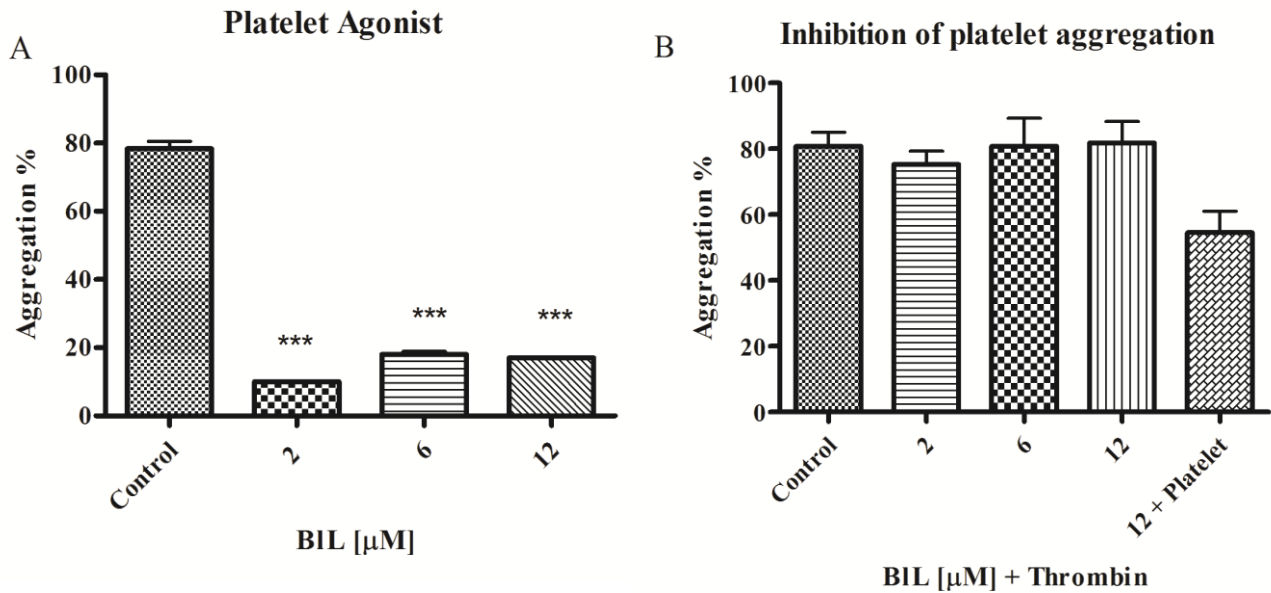


Figure 7. The influence of BIL on washed platelet aggregation. Different Assay was performed with $2-3 \times 10^8$ /ml of platelets incubate for 5 min at 37°C , followed by the addition: BIL as platelet aggregation agonists (A), BIL incubate with thrombin for 5 min (B) p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and $p>0.001$ (***). The data represent means $\pm$ SDs, $n = 3$

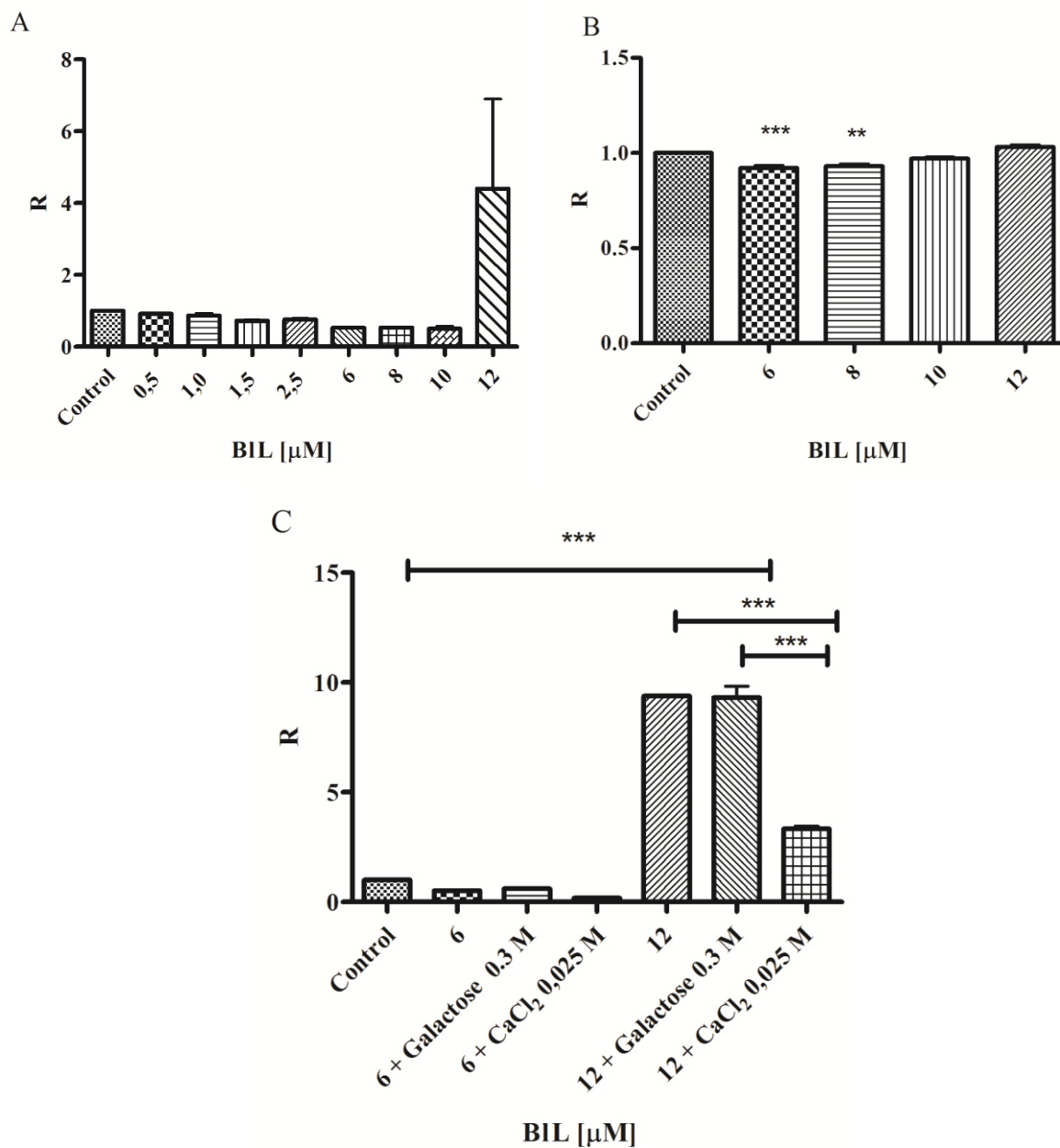
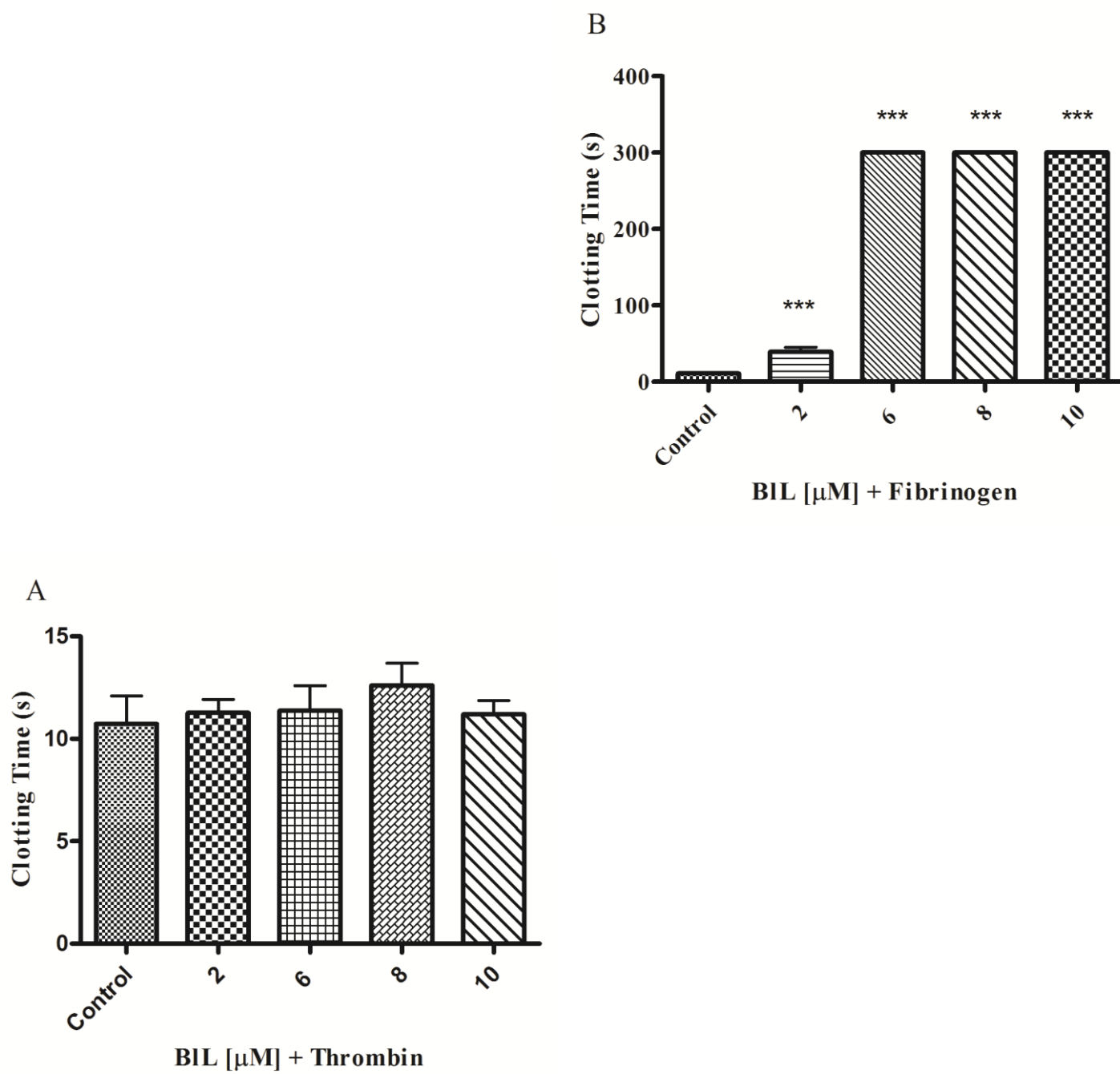
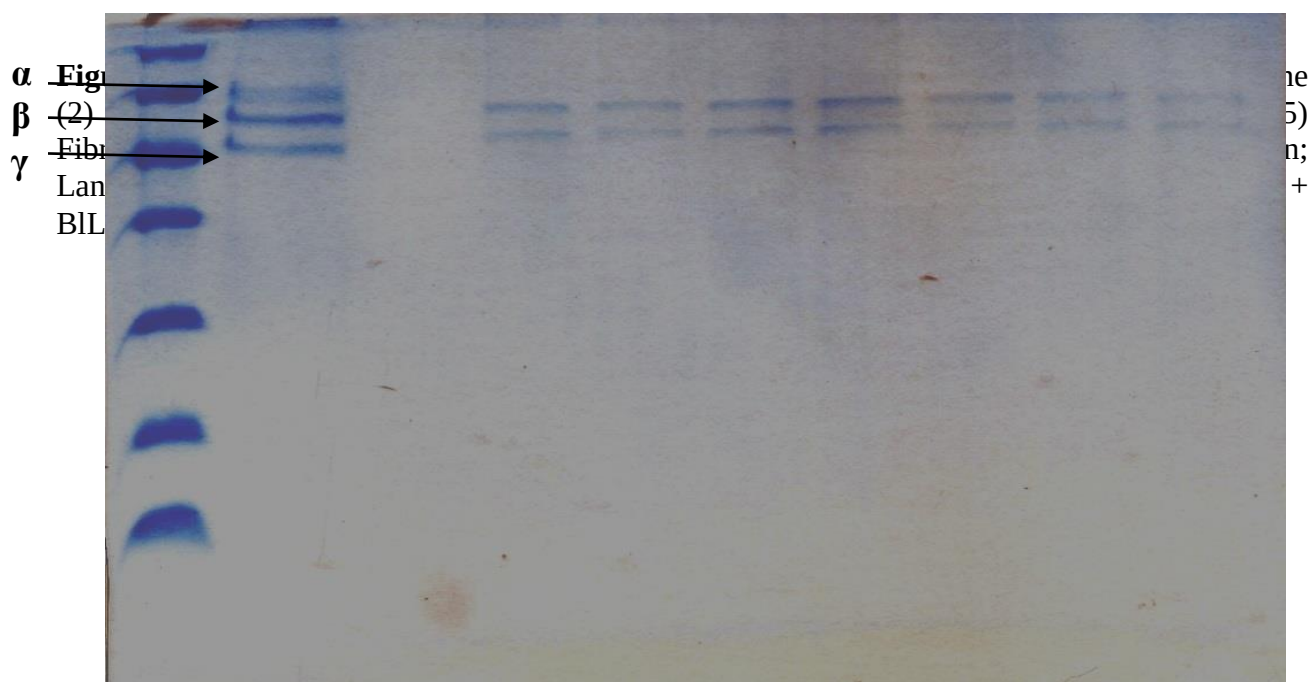


Figure8. The influence of BIL on blood coagulation. The results were determined by activated partial thromboplastin time (aPTT, A), prothrombin time (PT, B) and activated partial thromboplastin time in presence the galactose and calcium (aPTT, C). R is the ratio of blood coagulation time in the presence of lectin to a normal (control) sample. p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and p>0.001 (***). The data represent means $\pm$ SDs, n = 3.





References

- [1] H.G. Zha, W.H. Lee, Y. Zhang, Cloning of cDNAs encoding C-type lectins from Elapidae snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*, *Toxicon* 39 (2002) 1887–1892.
- [2] A. Navdaev, K.J. Clemetson, Glycoprotein Ib cross-linking/ligation on echicetin-coated surfaces or echicetin-IgMkappa in stirred suspension activates platelets by cytoskeleton modulated calcium release, *J. Biol. Chem.* 277 (2001) 45928–45934.
- [3] K.M. Brinkhous, M.S. Read, W.A. Frick, R.H. Wagner, Botrocetin (venom coagglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1983) 1463–1466.
- [4] J. Hamako, T. Matsui, M. Suzuki, M. Ito, K. Makita, Y. Fujimura, et al., Purification and characterization of bitiscetin, a novel von Willebrand factor modulator protein from *Bitis arietans* snake venom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226 (1996) 273–279.
- [5] White, J., 2005. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon* 45, 951–967. W
- [6] Hoffman and Monroe, 2001

- [7] Lis, H., Sharon, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem Rev.* 98, 637–674
- [8] Wu, A.M., Khoo, K.H., Yu, S.Y., Yang, Z., Kannagi, R., Watkins, W.M., 2007. Glycomic mapping of pseudomucinous human ovarian cyst glyco- proteins: identification of Lewis and sialyl Lewis glycotopes. *Proteo- mics* 7, 3699–3717.
- [9] Drickamer, K., 1993. Evolution of Ca(2p)-dependent animal lectins. *Prog. Nucleic Acid Res.* 45, 207–232.
- [10] Sharon, E., Sharon, N., Ben-Tal, N., 2003. Evolutionary analysis reveals collective properties and specificity in the C-type lectin and lectin- like domain superfamily. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 52, 44–55.
- [11] Ozeki, Y., Matsui, T., Hamako, J., Suzuki, M., Fujimura, Y., Yoshida, E., Nishida, S., Titani, K., 1994. C-type galactoside-binding lectin from Bothrops jararaca venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 306–310
- [12] Kassab, B.H., Carvalho, D.D., Oliveira, M.A., Baptista, G.R., Pereira, G.A.G., Novello, J.C., 2004. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the Bothrops jararacussu snake venom. *Protein Exp. Purif.* 35, 344–352.
- [13] Calmey, K .U.; Velarde, D. T.; Sanchez, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**. v.40, p.501-509, 2002.
- [14] Nunes, E. S.; Aranda-Souza, M. A.; Vaz, A. F.; Santana, G. M.; Gomes, F. S.; Coelho, L. C.; Paiva, P. M.; Da Silva, R. M.; Silva-Lucca, R. A.; Oliva, M. L.; Guarnieri, M. C.; Correia, M. T. Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*. v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.
- [15] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavinsky, *Proceedings of the Society for Exper- imental Biology and Medicine* 124 (1967) 1166–1170.
- [16] M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55 (1995) 261–273.
- [17] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* 2005;339:69–72.
- [18] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [19] P. Edman, *Acta Chemica Scandinavica* 4 (1950) 277–282

- [20] P.T. Matsudaira, In a Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA, 1989:20–22.
- [21] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 3389–3402.
- [22] F. Corpet, *Nucleic Acids Research* 16 (1988) 10881–10890.
- [23] J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, et al., PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) (M111.010587–M111.010587).
- [24] Szewczuk Z, Gibbs BF, Yue SY, Purisima EO, Konishi Y. Conformationally restricted thrombin inhibitors resistant to proteolytic digestion. *Biochemistry* 31:9132–9140, 1992
- [25] Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963;168:178–95.
- [26] Silva MCC, Santana LA, Silva-Lucca RA, Lima ALR, Ferreira JG, Paiva PMG, et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: an affinity matrix to purify a soybean (Glycine max) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochem* 2011;46:74–80.
- [27] Borrebaeck CA, Lönnerdal B, Etzler ME. Metal ion content of *Dolichos biflorus* lectin and effect of divalent cations on lectin activity. *Biochemistry* 1981;20(14):4119–22.

4.3 ARTIGO 3 – A NEW METHOD TO PURIFY *Bothrops jararaca* VENOM LECTIN AND ITS EFFECT ON HEMOSTATIC PARAMETERS

A new method to purify *Bothrops jararaca* venom lectin and its effect on hemostatic parameters.

Raiana Apolinário de Paula¹, Tatiana Fontes Ottaiano³, Maria Luiza Vilela Oliva³, Maria T. S. Correia¹, Russolina B. Zingali².

¹ Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50.670-420, Recife, PE, Brazil. ² Laboratório de Hemostase e Venenos (LabHemoVen), Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil ³ Laboratório de Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil

Corresponding author.

E-mail address: lzingali@bioqmed.ufrj.br (R.B. Zingali)

Abstract

Lectins are carbohydrate recognition proteins. BIL, an antibacterial Lectin, was isolated from venom of *Bothrops jararaca*. In this study was evaluated the interaction of the lectin with various components of the blood coagulation. BIL presented proteinase activity for synthetic substrate of fibrinogen and significantly prolonged and shorten the time required for blood coagulation, activated partial thromboplastin (aPTT) depending on your concentration, but do not change prothrombin times (PT). Even in the presence of the specific carbohydrate, the lectin did not change your activity. BIL acted as a procoagulant protein on in vitro blood coagulation parameters and at least being able to digest the fibrinogen alpha chain.

Keywords: C-type Lectin; Blood coagulation; Fibrinogen.

1 Introduction

Lectins are defined as ubiquitous proteins of non-immune origin that mediate carbohydrate-recognition events [1]. Because of their ability to recognize complex carbohydrates on cell surfaces with high specificity, may present interesting biotechnological and biomedical applications [2].

According to their structural similarities, animal lectins are categorized into several families. Various proteins that display carbohydrate-binding activity in a Ca^{2+} -dependent manner are classified into the C-type lectin family [3]. They contain C-type carbohydrate-recognition domains (CRDs) which are composed of 110–130 amino acid residues. In vertebrate C-type lectins, the C-type CRDs mostly occur as carbohydrate-binding modules linked to other domains with distinct functions [4].

Snakes belonging to the genus *Bothrops* are the main agent of ophidian accidents, due to its 90% contribution to 20,000 snake bites that occurs every year in Brazil [5]. In this context, the most important species is *Bothrops jararaca*, which occurs from Bahia to Rio Grande do Sul States. The victims of botropic envenomation typically have systemic manifestations, such as bleeding and blood incoagulability, besides local reactions, like edema, ecchymosis, blisters and necrosis [6].

Snake venom lectins (SVLs) belong to group VII of the C-type animal lectins. SVLs exhibit high primary sequence identity with some invariant amino acid residues, including a conserved disulfide bond pattern. Their binding specificity is most often attributed to galactose but also to mannose SVLs induce kidney alterations, produce dose-dependent edema and increased vascular permeability and a number of other biological activities in vitro [7].

In this study, we report new methods of purification of a galactose-binding lectin from a *Bothrops jararaca* venom and investigated its properties to activate factors of blood coagulation, aggregate platelets, as well thrombin-like activity.

2 Experimental

2.1 Materials

Guar gun from Sigma (Saint Louis, USA). Column C18 from Shimadzu. Other analytical grade inorganic and organic chemicals from commercial sources in Brazil.

2.2 Isolation of BJL

Bothrops jararaca crude venom was donated by the Institute Vital Brazil (Rio de Janeiro, Brasil). Lyophilized crude venom of *B. jararaca* (30 mg) was dissolved in 30 mL of CTBS buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM CaCl₂, pH 7.5) in 4 °C. The pooled venom was applied to a column (10 x 1.0 cm) of guar gel previously equilibrated with CTBS at a flow rate of 10 mL/h at 4 °C. BJL was eluted from the column with 200 mM galactose in CTBS.

2.3 Reversed-phase HPLC

BJL was subjected to reverse-phase column C18 on HPLC system (Shimadzu) for purity analysis. The column was equilibrated with solvent A [0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) in H₂O] and eluted using solvent B (90% acetonitrile in 0.1% TFA) in a linear gradient, where B = 5% when t = 0 min, B = 5% at t = 5 min, B = 100% at t = 60 min, B = 0% when t = 65 min. The elution profile was monitored at 215 and 280 nm.

2.4 Hemagglutination activity (HA)

Glutaraldehyde-treated rabbit erythrocytes were obtained as described by Bing, Weyand, and Stavinsky [8]. The lectin (50 µL) was serially two-fold diluted in microtiter V-plates containing 0.15 M NaCl before addition of 50 µL 2.5% (v/v) suspension of treated rabbit erythrocytes. The results were read after about 45 min when the control, containing only erythrocytes fully precipitated, appeared as a dot at the bottom of the well. HA (inverse of the titer) was defined as the highest sample dilution showing full hemagglutination [9].

2.5 Carbohydrate content

The total neutral sugar concentration of BJL (0.5 mg/mL) was measured in a microplate by the phenol-sulfuric acid method according to Masuko et al. [10] using d(+)-mannose as a standard. To summarize, 150 µL of concentrated sulfuric acid was rapidly added to 50 µL of mannose (0–10 µg) in a well of a 96-well microplate followed by the addition of 30 µL of 5% phenol in water. The mixture was heated for 5 min at 90 °C in a static

water bath (floating). After cooling to room temperature for 5 min in another water bath, the microplate was wiped dry, and the absorbance at 490 nm was measured by a microplate reader (Spectra Count™).

2.6 SDS-PAGE

Electrophoresis under denaturing, non-reducing and reducing (dithiothreitol, 200 mg/ml) conditions was performed according to the procedure of Laemmli [11] using 5% (w/v) stacking and 15% (w/v) separating gels. The gels were stained for 30 min with 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 and destained in 10% (v/v) acetic acid.

2.7 Mass spectrometry

The molecular weight and purity of BJL performed on a MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry), Bruker Daltonics Microflex LT (Billerica, USA). Sample 2 μ L was applied on a metal plate and, after five minutes, 2 μ L of matrix (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) have been applied. The sample matrix crystals were formed on the plate, which is inserted into the spectrometer. On equipment, the crystals were irradiated by pulse laser of the nitrogen at 337 nm. The analysis was performed on positive linear mode with external calibration and the spectrum of mass was given by the relationship between the relative intensity of each ion and their mass-to-charge ratio (m/z).

2.8 Primary sequence determination Edman

Edman degradation [12] was performed with an automatic gas-phase sequencer (492cLC; Applied Biosystems) using conditions recommended by the manufacturer. Samples (2.0 mg/mL) for sequencing were reduced in 200 μ L of 0.25 M Tris–HCl buffer, pH 8.5 containing 6 M guanidine–HCl, 1 mM EDTA and 5 mg of DTT, and alkylated with iodoacetamide [13]. Then, the protein was separated by reversed phase chromatography HPLC. The similarity of sequences was searched using the BLAST protein sequence database [14] and the sequences were aligned with the MULTALIN program [15]. Theoretical pI was calculated by ExPASy ProtParam tool through the primary sequence of the protein.

2.9 Determination of amino acid sequence

Dried lectin was dissolved in solutions of pH 7.4 and separately digested with trypsin/Lys-C (enzyme:protein ratio, 1:100) enzyme under the following conditions: 50 mM NH_4HCO_3 or 100 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl_2 . The samples were reduced with 5 mM dithiothreitol for 30 min at 60 °C and alkylated with 14 mM iodoacetamide for 30 min in the dark at room temperature. Incubation with the enzyme was conducted for 15 min at 37 °C. The mass spectrometric experiment of lectin peptidic fractions was performed on a Synapt G2 mass spectrometer coupled to a nanoAcquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). The peptide mixture was loaded online for 5 min at a flow rate of 8 $\mu\text{L}/\text{min}$ of phase A (0.1% formic acid) using a Symmetry C18 trapping column (5 μm particles, 180 μm $\times$ 20 mm length; Waters, Milford, MA, USA). The mixture of trapped peptides was subsequently separated by elution with a gradient of 7–35% of phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) through a BEH 130 C18 column (1.7 μm particles, 75 $\times$ 150 mm; Waters, Milford, MA, USA) in 93 min, at 275 nL/min. Data were acquired in the data-independent mode in the m/z range of 50–1600 in resolution mode. Collision energies were alternated between 4 eV and a ramp of 17–60 eV for precursor ion and fragment ions, respectively, using scan times of 1.25 s. The ESI source was operated in positive mode with a capillary voltage of 3.0 kV, block temperature of 70 °C, and cone voltage of 50 V. For lock mass correction, [Glu1]-Fibrinopeptide B solution (500 fmol/mL in 50% acetonitrile, 0.1 formic acid; Waters, Milford, MA, USA) was infused through the reference sprayer at 500 nL/min and sampled every 60 s. The MS/MS spectra were exported as a *.pkl file through ProteinLynx Global Server v3.0.1 and imported in PEAKS Studio 7.5 (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, Canada) for de novo analysis and multi-round database search [16].

2.10 Protease activity thrombin-like

A possible serinoprotease activity of lectin was performed using synthetic substrates chromogenic N-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) and fluorogenic Tos-gly-Pro-Arg-AMC specific to activities such as trypsin and thrombin, respectively. The assay was similar to a previously reported method [17] and performed at 37° C in Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM containing 0.02% CaCl_2 , v/v. The BCL 10 μM was incubated with the 60 minute by BAPNA in 96 wells plate. The color release by enzyme action was monitored every 5 min, in 405 nm, using the spectrophotometer Packard,

SpectraCount. For activity thrombin-like, lectin 12 μM was incubated for 60 minutes at 37° C with the substrate fluorogenic Tos-gly-Pro-Arg-AMC (37 mM) in 96 wells plate. The release of the fluorophore was monitored every 5 minutes, λEX 380nm and λEM 440 nm, using the spectrofluorimeter Packard, SpectraCount and fluorescence intensities were calibrated with 7-amino-4-methylcoumarin. The enzyme activity was analyzed with the Tris-HCl 0,005 M containing 0, 15 M NaCl, 0.1% PEG 8000, pH 8.0.

2.11 Determination of enzyme kinetics

For determination of behavior Michaelis-Menten was calculate K_m and V_{max} of lectin, the same methodology described above, using 30 μl of BJL (2.0 mg/ml) and different concentrations of the substrate Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (2.0, 6.0, 12.0, 18.0, 24.0, 30.0, 37.0, 45.0, 52.0 and 60.0 μM) in a final volume of 260 μl . The test was performer in triplicate. The graph and the values of K_m and V_{max} were obtained from the use of the program GraphPadPrism 5.0.

2.12 Platelet aggregation

Venous blood from healthy volunteers was collected into plastic tubes containing 3.8% trisodium citrate. Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at $141 \times g$ for 12 min at room temperature. Washed platelets (WPs) were obtained by centrifugation of PRP added to 2% EDTA (EDTA/PRP 1:20) at $880 \times g$ for 15 min, followed by two washes with 0.9 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaHCO_3 , 2.5 mM KCl, 2.1 mM MgCl_2 , 22 mM $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, 140 mM NaCl, 0.055 mM glucose and 0.053 mM BSA, pH 6.5. The pellet was suspended in 2 ml of Tyrode's buffer (10 mM Hepes, 134 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 12 mM NaHCO_3 , 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 and 0.055 mM glucose, pH 7.4). The platelets were counted with a KX-21 N counter and adjusted to a final concentration of $3 \times 10^8/\text{ml}$. The aggregation was measured by the Born and Cross turbidimetric method [18] and monitored at 37°C for 6 min using a Chrono-log aggregometer with 500 μl of the platelet suspension and ADP (10 μM), arachidonic acid (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), collagen (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), epinephrine (60 μM), fib- rinogen (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or thrombin (1.0 U) as an agonist with continuous stirring. Different concentrations of BJL were used for activation and for inhibition testing BJL have been added to the plasma 5 minutes before the addition of agonists. Controls were made at the beginning and end of each experiment

2.13 Activated partial thromboplastin time (aPTT)

The aPTT was determined using a semi-automated BFT II coagulometer (Dade Behring) according to the method of Silva et al. [19]. The total plasma was obtained by the centrifugation of several human blood samples at $1726 \times g$ for 15 min (25 °C). The aPTT control assay contained 50 µl of saline, 50 µl of plasma and 50 µl of aPTT reagent (Dade actin-activated cephaloplastin). After incubation for 120 s, 50 µl of 0.025 M calcium chloride were added to the control assay. BJL (6, 8, 10 and 12 µM) was incubated for 120 s with 50 µl of plasma and 50 µl of the aPTT reagent, followed by the addition of 50 µl of 0.025 M calcium chloride.

2.14 Prothrombin time (PT)

The control for the PT assay was made with 50 µl of saline and 50 µl of plasma. After incubation for 60 s at 37° C, 100 µl of reagent Thromborel S were added to the control assays. Different concentrations of BJL (50 µl of 6, 8, 10 and 12 µM) were incubated for 60 s at 37° C with 50 µl of plasma, followed by the subsequent addition of 100 µl of the PT and the time was measure using a semi-automated BFT II coagulometer (Dade Behring). Each assay was made in triplicate and results were expressed as average of 3 independent protocols. All experiments were approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de São Paulo, number CEP 1793/11, according to Brazilian federal law.

2.15 Clot formation time on fibrinogen

For obtaining the standard clotting time (positive control), 75 µL of fibrinogen (1 mg/mL) from human plasma (F4883-Sigma-Aldrich) were added to a cuvette containing 70 µL of 0.15 M NaCl and 5 µL of human thrombin 0.1 U/µL (T6884-Sigma-Aldrich). The clotting time was determined in Dade Berhring -BFT coagulometer. To test a possible action thrombin-like of lectin, 75 µ L of Fibrinogen (1 mg/mL), diluted in TRIS-HCl 50 mM at pH 7.7, were added in the cuvettes containing 10, 25, 50 and 75 µ L of BJL (2, 6, 8 and 10 µM, respectively) and adjusted with NaCl 0,15 M at final volume 150 µL. Immediately after the addition of the fibrinogen, clotting was accompanied in coagulometer. To test a possible direct effect of BJL on thrombin, a second test was performed. For this, 2, 6, 8 and 10 µM of BJL were incubated at 37° C for 5 minutes with 5 µL of human thrombin 0.1 U/µL and the final volume completed with NaCl to 0,15 M to 150 µL, after incubation, 75 µL of Fibrinogen (1 mg/ml) were added to the solution and the cuvettes containing the mixture was submitted to coagulometer to

determine the clotting time. Other test was performed with modification to see effects of BJL directly on fibrinogen. Sample of BJL (2, 6, 8 and 10 μM) were incubated at 37° C for 10 minutes with 75 μL of Fibrinogen (1 mg/ml) and completed with NaCl 0, 15 M to final volume 150 μL , after incubation time, were added 5 μL of human thrombin 0.1 U/ μL in cuvettes containing the mixture and the clotting time was determined. All tests were made in triplicate.

2.16 Degradation of the fibrin clot

To evaluate the ability of BJL to degrade the clot, were used 5 μL of human thrombin 0.1 U/ μL (T6884-Sigma-Aldrich) and 75 μL of fibrinogen (1 mg/mL) to form fibrin clotting. After the formation of clotting, were added BJL at concentrations 6, 8 and 10 μM in 0,15 M NaCl to final volume 150 μL . After were adding the lectin, clotting dissociation was evaluated with eye detection and the time was marker in seconds.

2.17 Fibrinogenolytic activity

The Fibrinogenolytic activity was assayed on SDS- PAGE gel (5% stacking/14% resolving gel) as described [11]. Small vials containing about 50 μg of fibrinogen in 50mM Tris-HCl pH 7.7 buffer were incubated with 10 μg BJL at 37 °C in different times (5 ', 20 ', 30 ' and 60 minutes). After incubation and digestion, an aliquot was separated for analysis in mass spectrometer (MALDI/TOF). The digestion was stopped by adding 8 μL sample buffer containing 0.1% /1% β -Mercaptoethanol and heated at 90° C for 3 minutes. As controls, were incubated separately 10 μg of BJL and 50 μg of fibrinogen , at 37 °C for 60 minutes, being these samples were submitted to the same procedures above. The proteolytic activity was monitored on the coomassie blue-stained gel after electrophoresis by observing the cleavage patterns of fibrinogen chains.

2.18 Statistical analysis

Differences between means values were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multi-comparison test in the coagulation assays. A p value < 0.05 was considered significant.

3 Results and discussion

3.1 Purification

The purification of *B. jararaca* venom lectin involved only one chromatographic step in affinity chromatography with Guarana column (Figure 1A) in CTBS. The elution was performed in galactose 0,3 M in CTBS, resulting in adsorbed (G1) fraction agglutinated erythrocytes from rabbits and humans of all blood types with a minimum concentration of 1 µg. The homogeneity of BJL was confirmed by the elution of one peak from a C18 column (Figure 1B) with 60.0% acetonitrile. This material was used as the starting material for sequencing. The purity of BJL was confirmed by SDS-PAGE (Figure 1C). BJL showed strong lectin activity specific hemagglutinating activity of 6.453 U/mg. The yields of the chromatographic fractions with hemagglutinating activities and protein concentrations are presented in Table 1. The new method to purify BJL was efficient because they were simple, fast and cheaper than usual commercial affinity matrices for chromatography.

3.2 Structural characterization

BJL appeared as a single band by SDS-PAGE with an apparent molecular mass of approximately 32.0 kDa under non-reducing and 16.0 KDa under reducing conditions (Figure 1C), suggesting that the native protein is composed of disulfide-bonded subunits. The molecular mass of BJL was determined to be $32,360 \pm 2.926$ Da by mass spectrometry (Figure 2). From the sequencing of BJL obtain two sequences with 32 amino acid residues. The N-terminal sequence presented ten sequenced amino acid residues. The second sequence presented 32 peptides and reveals almost all amino acid residues are common from several *Bothrops* lectins; they are between the positions 87 to 118, showed 2 unique peptides and prove that the lectin purified in this study is really a true C-type lectin. The amino acid residues from BJL are similar to other lectins from snake venom, according to the Blast protein database [20]. A comparison of the sequences showed sequence conservation for of *B. jararacussu* lectin (BJcuL- 100%), *B. jararaca* lectin (BJL-94%), *B. pauloensis* lectin (BpLec- 96%), *Lachesis stenophrys* lectin (LmsL-36%), *Trimeresurus stejnegeri* lectin (TsL- 32%) and *B. insularis* lectin (BiL-97%) suggesting that this lectin belongs to family of galactose-binding C-type lectin (Figure 4). The carbohydrate content of BJL accounts for 4.87% by the phenol-sulfuric acid method.

3.3 Biological characterization of homeostasis of blood coagulation in vitro

The protease activity of BJL on BApNA substrate wasn't detect, however for fluorogenic (N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride/Sigma-

Aldrich) substrate, these lectin showed dose and time dependent thrombin-like activity (Figure 5). The specific activity of BJL was 0.3 U/mg and by presenting a certain activity on this substrate, we conducted a study of enzyme kinetics of this lectin. This protein whose behavior Michaelis-Menten (Figure 6) with V_{max} measured in 0,1061 μ M/sec and the value of K_m , K_{at} and K_{cat}/K_m are on table 2, BJL showed specificity to Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC.

The influence of BJL on blood coagulation was determined by activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), platelet aggregation and fibrinolytic activity. The positive control used in the assays was plasma of healthy volunteer donors with normal values for clotting times.

BJL not induce aggregation in plasma rich in platelets (PRP) (Figure 7A). Also this lectin even with different concentration, no inhibitory effect was observed in platelet aggregation induced by agonist as: adenosine diphosphate (ADP) (Figure 7A), arachidonic acid (AA) (Figure 7B), collagen (Figure 7C) and epinephrine (ADR) (Figure 7D). No interference of BJL in platelet aggregation was observed in PRP with different agonists, suggesting that lectin may be interacting with the coagulation factors present in the PRP and thus do not interfere in platelets and not inhibit platelet aggregation induced by agonists. Therefore another test was performed using washed platelets to prove that the lectins not activate these platelets and not inhibit the action of aggregation agonists without external interference. As a result, it was proven that the BJL does not interact in platelets (Figure 8A), neither inhibited thrombin, that was used as activator of aggregation (Figure 8B), suggesting that lectin do not interfere in these processes.

The determination of aPTT is particularly useful in monitoring the effect of heparin and determining deficiencies of factors VIII, IX, XI and XII. TP reflects the activity of factor II (prothrombin), V, VII and X, whose deficiency is accompanied by a prolongation of time required for clot formation [21]. BJL in concentrations 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 6.0, 8.0, 10 and 12 μ M cause significantly shortened time to aPTT (to less than 8 s) this is due to systemic activation of coagulation and subsequent systemic deposition of fibrin, leading to the consumption of clotting factors and platelets (Figure 9A). However PT, assayed at concentrations 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 6.0, 8.0, 10 and 12 μ M not affected the coagulation time (Figure 9B), suggests the BJL there are no interference in extrinsic pathway. The lectins from snake venom have a special feature of being able to bind to

carbohydrates and calcium-dependent, because of this characteristic, BJL was tested in the aPTT in presence of galactose and calcium (Figure 9C). BJL in presence of sugar do not change your feature of being a procoagulant molecule, these results suggest that CDR from BJL not interacts with the carbohydrate portion of serine proteases of the coagulation cascade from intrinsic pathway. However the presence of calcium prolonged clotting time. Suggest that the presence of calcium can change the structure of the lectin causing it to act as an anticoagulant molecule. Thus BJL showed an anticoagulant activity in calcium presence, since in determining the R, the ratio between sample coagulation time and control coagulation time [22] was higher than 1.0.

The specific activity of BJL on the synthetic substrate of fibrinogen was observed in this study. Due to this fact, was rated the action of BJL formation of clotting with pure human fibrinogen and was also analyzed a possible fibrinogenolysis activity from this lectin. Clot formation occurred in the presence of thrombin and fibrinogen and this was considered as positive control. The assays was performed with BJL at 2, 6, 8 and 10 μ M incubated with thrombin for 5 minutes and evaluated the profile of clot formation (Figure 10A). Also, the BJL at the same concentrations was incubated with fibrinogen for 10 minutes and was observed time of formation clotting (Figure 10B). BJL when incubated with thrombin affect the clotting time in all concentration mainly 10 μ M, however when it was incubated with fibrinogen caused prolongation of time formation clotting only at 10 μ M. This demonstrates these lectin can interact with fibrinogen in a dependent dose and compete with thrombin to form the clot .

For evaluation capacity of BJL to degrade the fibrin clot, the protein was added at concentrations of 2, 6, 8 and 10 μ M to recent formed clots and, after 5 minutes. In all, lectin concentrations with a soft, the coagulation clotting was dissolved with a soft agitation, presenting fibrinogenolysis activity.

Fibrinogen is a soluble glycoprotein and major plasma protein coagulation. It is a heterodimeric molecule, with 340 kDa and containing three different polypeptide chains (α , β , and γ) which are linked by disulphide bridges. Thrombin cleaves α and β , chains to release fibrinopeptides A and B, respectively, from the amino terminal . After fibrinopeptide release, the resulting fibrin monomers undergo polymerization to form an insoluble fibrin clotting [23]. Lectins are a protein that presents as one of its features the ability to bind to glycoproteins or glycoconjugates. In this study the BJL showed the

ability to interact with fibrinogen modify the homeostatic parameters of blood coagulation. To prove this activity, BJL was incubated with fibrinogen, electrophoretic profile and mass spectrometry (MALDI/TOF) was evaluated to observe the presence of hydrolysis of the fibrinogen chains. Unfortunately the analysis by mass spectrometry did not provide sufficient signal intensity to be detected the fibrinopeptide by the instrument. The BJL, when incubated in different times (10 up to 120 minutes) with fibrinogen, no present fibrinogenolysis activity on the β and γ chains, however this lectin showed fibrinogenolysis activity on the α chain in within the first 10 minutes (Figure 11). Mass spectrometry analysis of the interaction of fibrinogen with BJL in ten minutes, showed two peaks of 32.994 and 66.642 Da representing BJL and the Fibrinogen alpha chain, respectively (Figure 12). Until now, snake venom lectin do not presented fibrinogenolysis activity to the alpha chain of thrombin. This activity may be related to the CDR of lectin that binds to the fibrinogen or the presence of a catalytic site on the lectin structure.

4 Conclusions

In this work demonstrated a new method of purification of BJL more efficient and cheap. It was determined the purity and amino acid sequencing showed the high homology with other proteins C-type lectins, proving it is real C-type lectin. Also, was investigated the ability of this protein in degrading the fibrinogen and was observed that the BJL made the cleavage into chains α , depending on the concentration they are procoagulant or anticoagulant activity and this activities is no dependent sugar domain region.. Indicating this lectin can act on different components of blood coagulation system.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are grateful for research grants and fellowship to MLVO. Also, the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) are acknowledged for financial support.

Purification step BJJ	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	HA ^a	THA ^b	SHA ^c	Yield (%)
Crude venom	30.0	1.0	30.0	0	0	0	100
G1- BJJ (Guar Gun elution)	15.0	0,630	9.45	4096	61.440	6.453	31.5

a Hemagglutinating activity was performed with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde-treated erythrocytes.

b Total hemagglutinating activity = HA × volume (ml).

c Specific hemagglutinating activity = HA/protein (mg/ml).

Table 1. Purification of *Bothrops jararaca* lectin.

Enzyme		BJL	
Substrate	K _m μM	K _{cat} Sec ⁻¹	K _{cat} /K _m M ⁻¹ . Sec ⁻¹
Tos-Gly-Pro-Arg-AMC	46.68	0,0106	2.2 × 10 ²

Table 2. Kinetic parameters of hydrolysis by *Bothrops jararaca* lectin 10 μM.

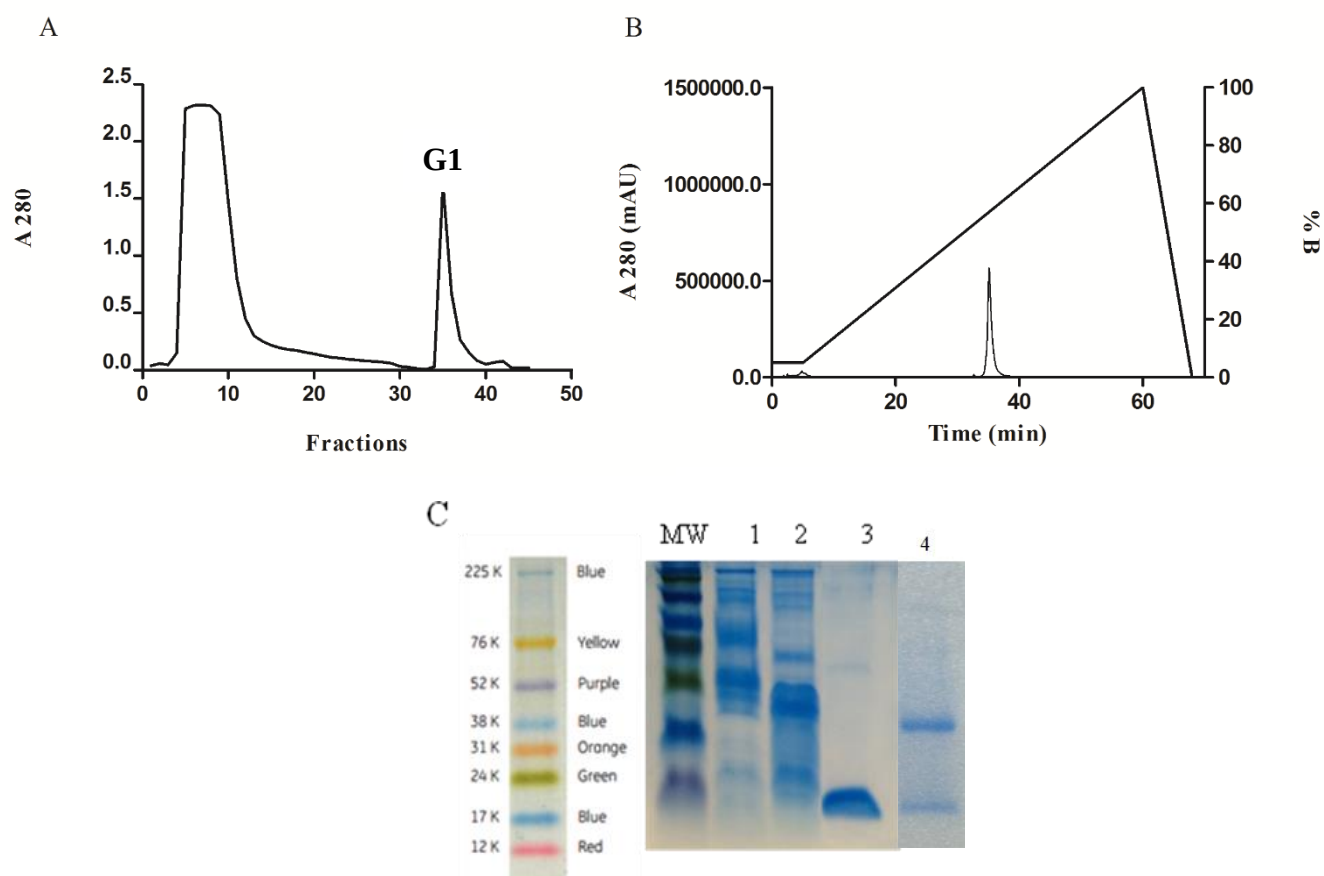
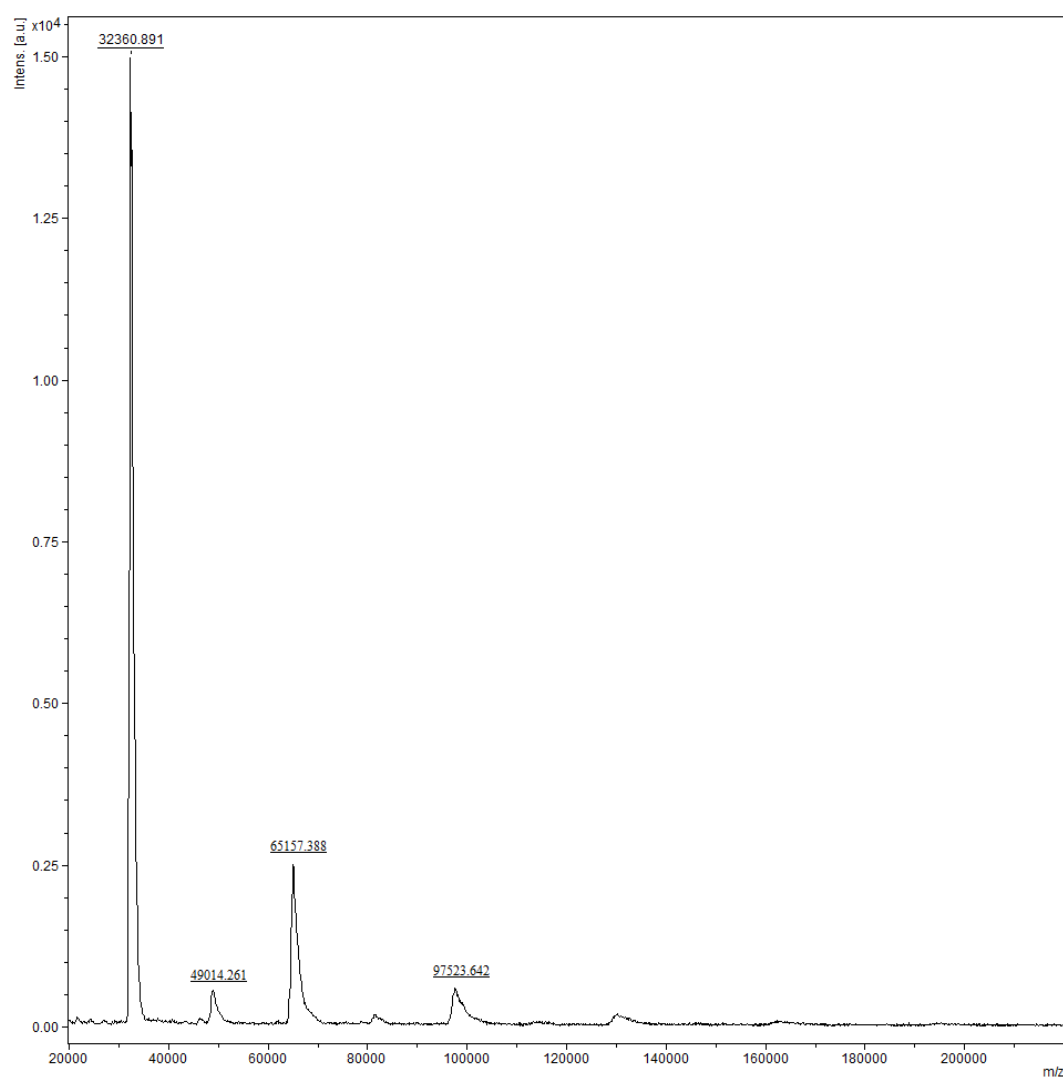


Figure 1. Purification of *B. jararaca* lectin by chromatography via (A) Guar gum column (10 ml) equilibrated with CTBS, pH 7.5. Adsorbed proteins (G1) were eluted with 0.3 M galactose and fractions are monitored in absorbance at 280 nm. B. jararaca lectin homogeneity was analyzed by HPLC using a Bondapak C18 reversed-phase column (B). The elution profile was monitored at 280 nm. (C) SDS-PAGE of B. jararaca lectin using a 15% polyacrylamide gel. Lane 0 represents the molecular weight markers Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker - Full Range (KDa) Colors: Blue (225), Red (150), Green (102), Yellow (76), Purple (52), Blue (38), Orange (31), Green (24), Blue (17), Red (12). Lane 1 represents the crude venom (20 µg). Lane 2 represents the non-adsorbed fraction of venom (20 µg). Lanes 3 and 4 represent B. jararaca lectin (20 µg) heated at 100°C for 5 min in the presence and absence of DTT, respectively.



1 MGRFLFVASS ACWFVFLSLG GAKGNCPQD WLPMNGLCYK IFNELKAWKD AEMFCRKYPK GCHLASIHLY GESPEIAEYI C Carbamidomethylation (+57.02)

81 SDYHKGQSEV WIGLCDKKKD FSWEWTDRL C TDYLSWDKNQ D PDHYQNKEFC C VELVSNTGYR C LWNDQVCESK NAFLCQCKF C D

130

Figure 3: comparison analysis of amino acids of lectina BJL on the software Peaks 2.0. The sequence checked has homology with sequences deposited in database.

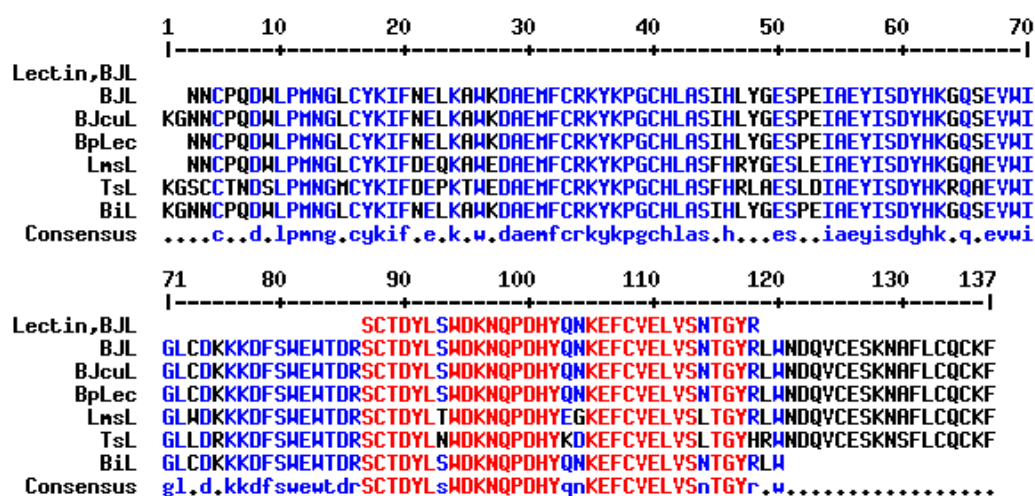


Figure 4. Multiple sequence alignment of BJL. Similarities between the amino acid sequences of *B. jararacussu* lectin (BJcuL- P83519.2), *B. jararaca* lectin (BJL-Q9PRY7.2), *B. pauloensis* lectin (BpLec P86970.2), *Lachesis stenophrys* lectin (LmsL-Q9PSM4.1), *Trimeresurus stejnegeri* lectin (TsL- Q9YGP1) and *B. insularis* lectin (BiL-Q6QX33.1). The dashes indicate the gaps that were introduced for optimal alignment and maximum similarity for the MULTALIN program. Residues identical to BJcuL are displayed in red, low consensus are in blue.

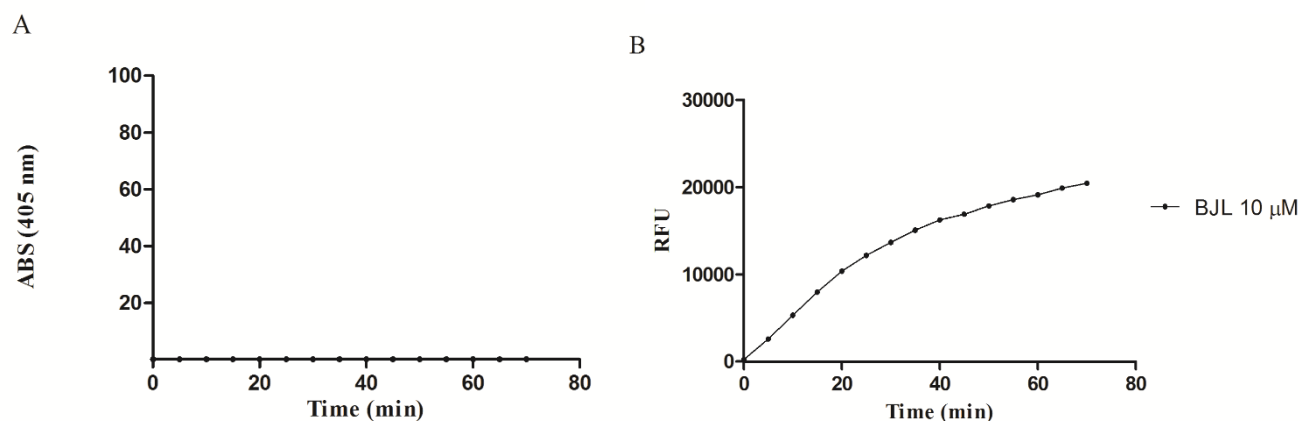


Figure 5. Specific activity of BJL 10 μM on substrate. A: BApNA B: Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC.

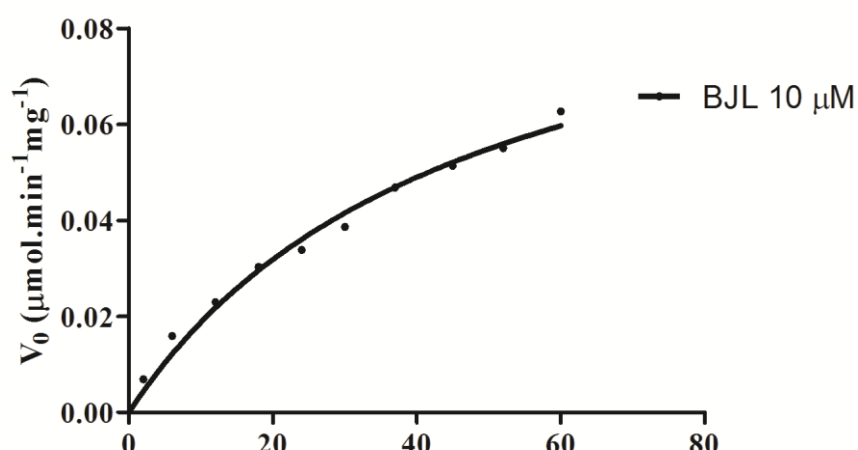


Figure 6. Enzyme Kinetics of BJL. The lectin was tested on different substrate concentrations Tos-Gly-Pro-Arg-AMC (2, 6, 12, 18, 24, 30, 37, 45 and 52 μM).

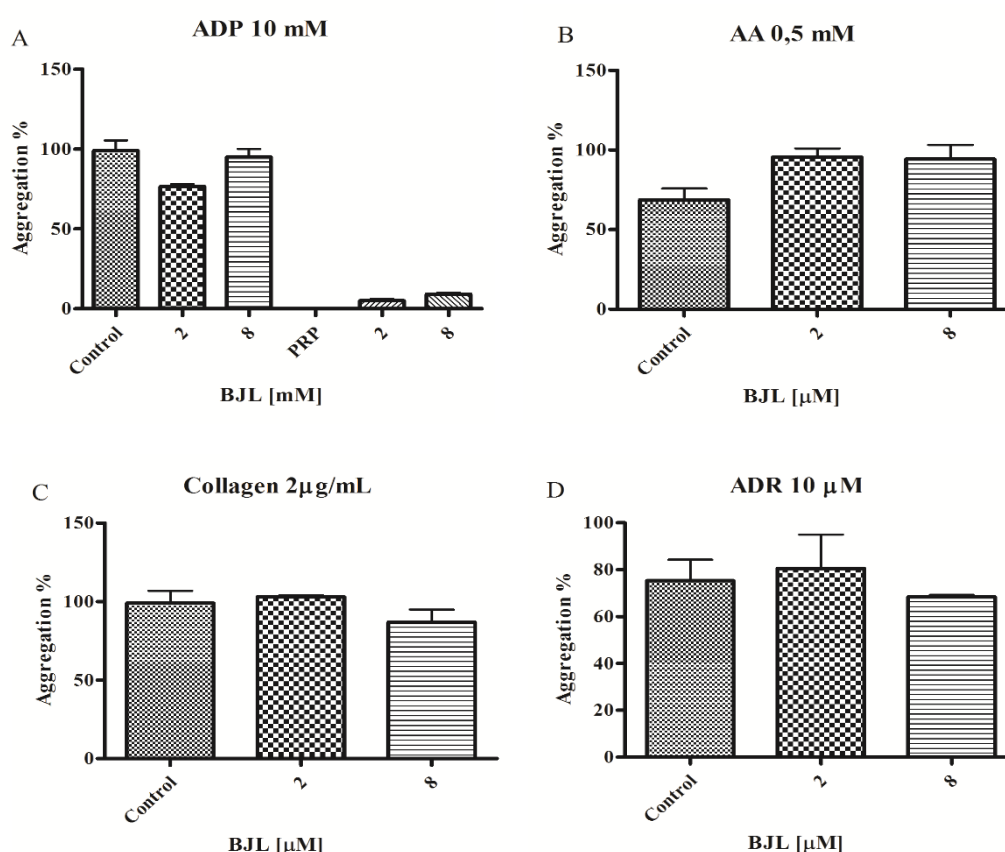


Figure 7. The influence of BJL on platelet aggregation. Different concentrations of BJL were incubated with $2-3 \times 10^8$ /ml of platelets for 5 min at 37°C followed by the addition of the following platelet aggregation agonists: ADP (A), arachidonic acid (B), collagen (C), epinephrine (D) p-Value <0.05 (*) and p-value <0.001 (**). The data represent means $\pm$ SDs, n = 3

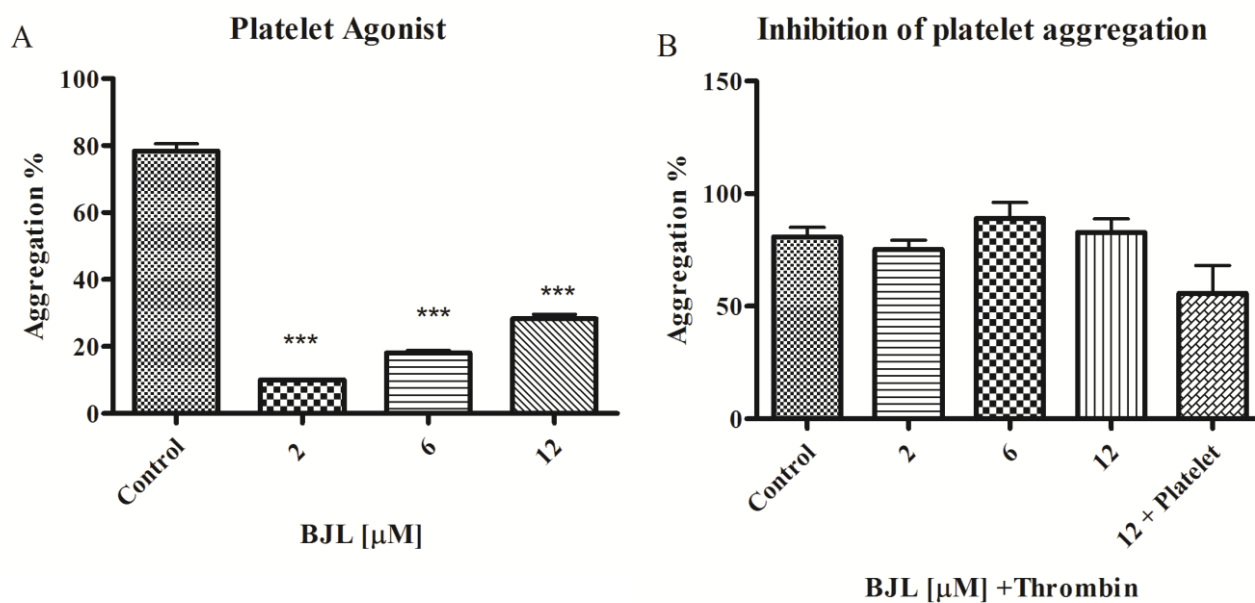


Figure 8. The influence of BJL on washed platelet aggregation. Different Assay was performed with $2-3 \times 10^8$ /ml of platelets incubated for 5 min at 37°C , followed by the addition: BJL as platelet aggregation agonists (A), BJL incubated with thrombin for 5 min (B) p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and $p>0.001$ (***). The data represent means $\pm$ SDs, $n = 3$

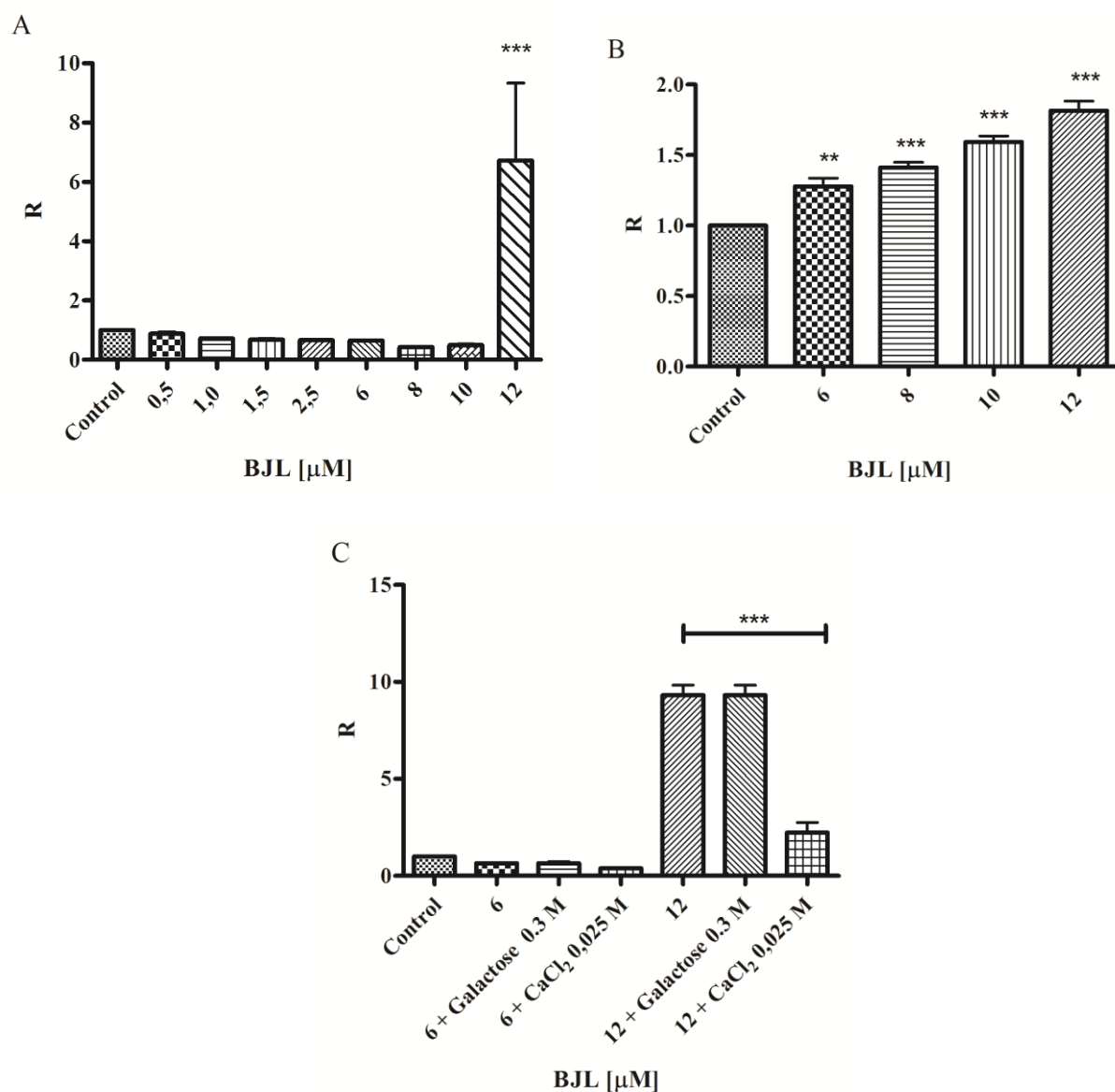


Figure 9. The influence of BJI on blood coagulation. The results were determined by activated partial thromboplastin time (aPTT, A), prothrombin time (PT, B) and activated partial thromboplastin time in presence the galactose and calcium (aPTT, C). R is the ratio of blood coagulation time in the presence of lectin to a normal (control) sample. p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and p>0,001 (***).The data represent means $\pm$ SDs, n = 3.

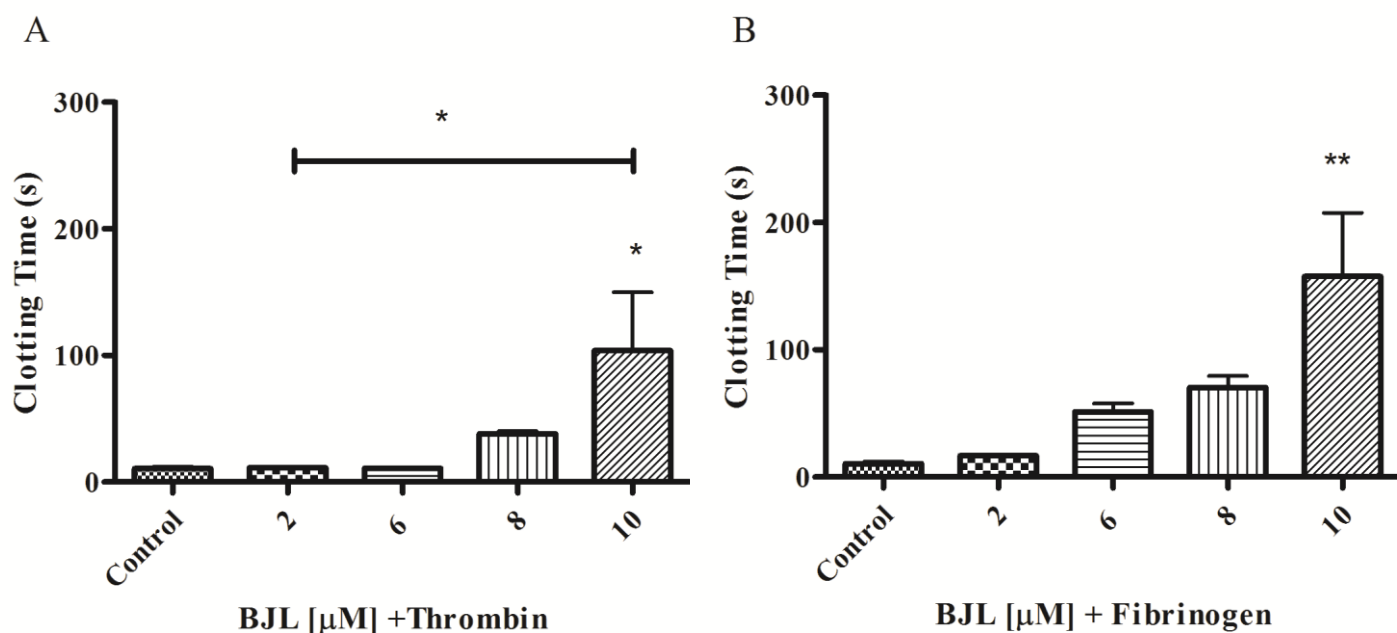


Figure 10. Influence of BJL in formation time of fibrin clot. (A) Lectin incubated with thrombin for 5 min (B) Lectin incubate with fibrinogen for 10 min. After incubation period they used to formation clot. p-Value <0.05 (*), p-value <0.001 (**) and $p > 0.001$ (***). The data represent means $\pm$ SDs, $n = 3$.

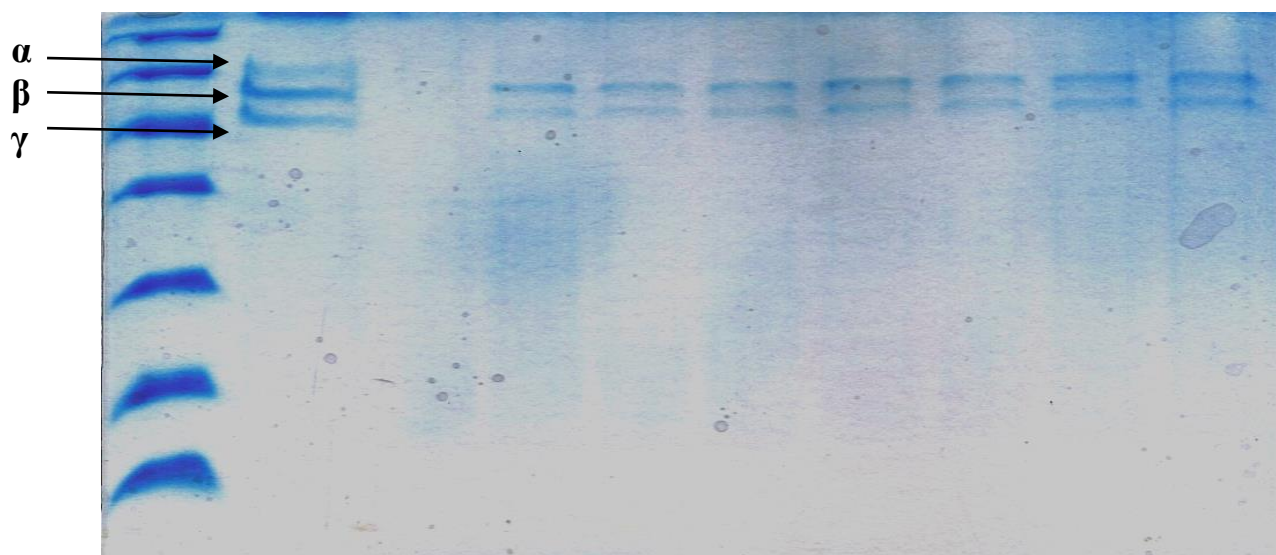


Figure 11. Fibrinogenolysis Activity of BJL on SDS-PAGE. Lane (1) Molecular weight; Lane (2) Fibrinogen - positive control; Lane (3) BJL; Lane (4) Fibrinogen + BJL 10 min; Lane (5) Fibrinogen + BJL 20 min; Lane (6) Fibrinogen + BJL 40 min; Lane (7) Fibrinogen + BJL 60 min; Lane (8) Fibrinogen + BJL 80min; Lane (9) Fibrinogen + BJL 100 min; Lane (10) Fibrinogen + BJL 120 min.

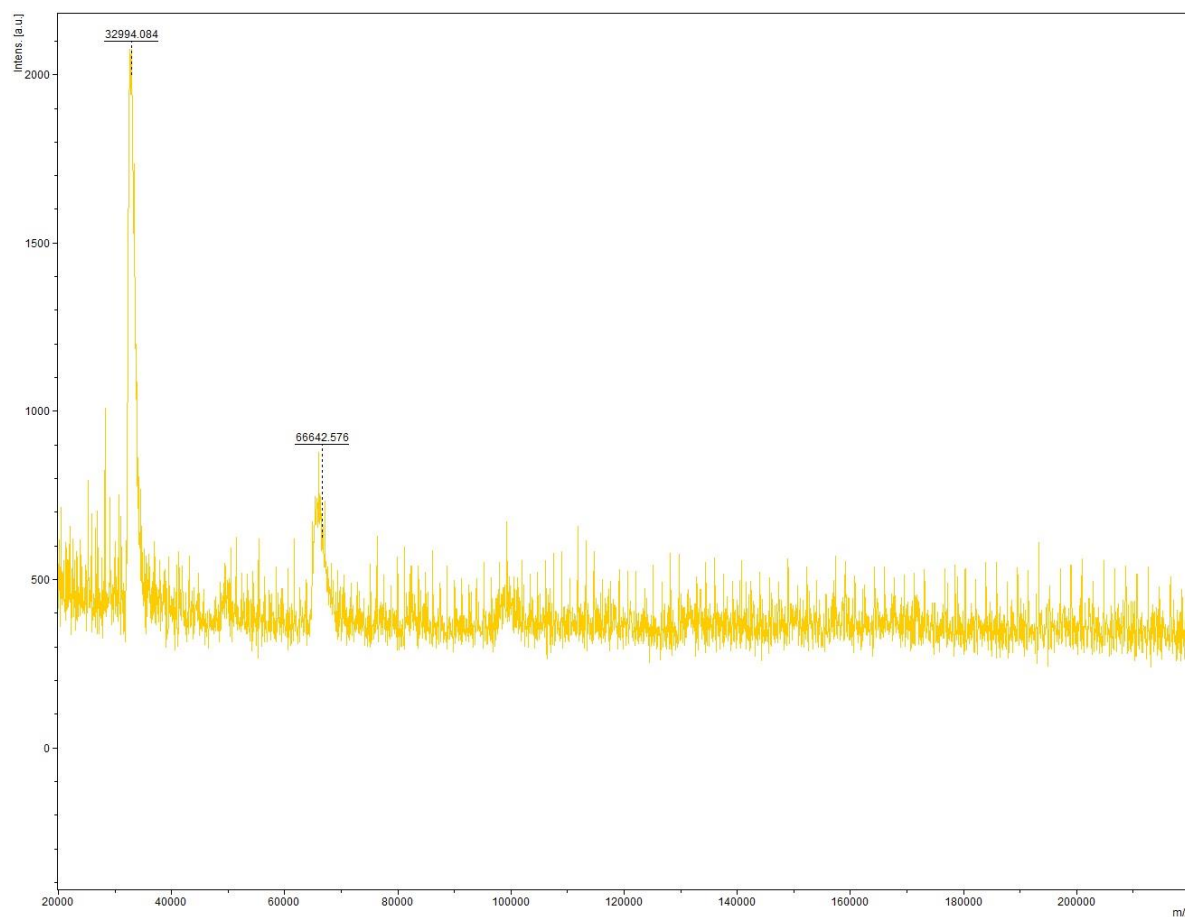


Figure 12. MALDI-TOF mass spectrometry of BJI+ Fibrinogen 10min. First peak, with mass of 32994 Da represents BJI. The second peak, represents α chain of fibrinogen.

References

- [1] Sharon N, Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14 (11) 53R–62R.
- [2] Yamazaki, Y.; Morita, T. 2007. Snake Venom Components Affecting Blood Coagulation and the Vascular System: Structural Similarities and Marked Diversity. *Current Pharmaceutical Design* 13 2872-2886.
- [3] Weis WI, Taylor ME, Drickamer K: The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 1998, 163:19-34.
- [4] Abreu, P. A.; Albuquerque, M. G.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. *Toxicon*. v. 48, n. 6, p. 690–701, 2006.
- [5] Sartim, M. A.; Sampaio, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. V.21, n. 35, 2015.
- [6] Takeda, AAS et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A(2) complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors at 1.9-and 1.45-A resolution. *Biochimica Et Biophysica Acta-proteins and Proteomics*. Amsterdam: Elsevier B.V., v. 1699, n. 1-2, p. 281-284, 2004.
- [7] Sartim, Marco A., et al. "Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from Bothrops jararacussu snake venom." *Toxicon* 126 (2017): 59-69.
- [8] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavinsky, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124 (1967) 1166–1170.
- [9] M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55 (1995) 261–273.
- [10] Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura S, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* 2005;339:69–72.
- [11] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- [12] P. Edman, *Acta Chemica Scandinavica* 4 (1950) 277–282
- [13] P.T. Matsudaira, In *a Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*, Academic Press, San Diego, CA, 1989:20–22.
- [14] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 3389–3402.

- [15] F. Corpet, *Nucleic Acids Research* 16 (1988) 10881–10890.
- [16] J. Zhang, L. Xin, B. Shan, W. Chen, M. Xie, D. Yuen, et al., PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification, *Mol. Cell. Proteomics* 11 (2012) (M111.010587–M111.010587).
- [17] Szewczuk Z, Gibbs BF, Yue SY, Purisima EO, Konishi Y. Conformationally restricted thrombin inhibitors resistant to proteolytic digestion. *Biochemistry* 31:9132–9140, 1992
- [18] Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963;168:178–95.
- [19] Silva MCC, Santana LA, Silva-Lucca RA, Lima ALR, Ferreira JG, Paiva PMG, et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: an affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochem* 2011;46:74–80.
- [20] Borrebaeck CA, Lönnnerdal B, Etzler ME. Metal ion content of *Dolichos biflorus* lectin and effect of divalent cations on lectin activity. *Biochemistry* 1981;20(14):4119e22.
- [21] P.H. Silva, Y. Hashimoto, *Coagulação-Visão Laboratorial da Hemostasia Primária e Secundária*, 1st ed., Revinter, Rio de Janeiro, 2006
- [22] P. Möhnle, N.M. Schwann, W.K. Vaughn, M.C. Snabes, W. Lau, J. Levin, N.A. Nussmeier, *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 19 (2005) 19–25.
- [23] Medved, L. E Weisel, J. W. on behalf of fibrinogen and factor XIII subcommittee of the scientific standardization committee of the international society on thrombosis and haemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, p. 355-359. 2009.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que as três lectinas purificadas da peçonha de serpente BJL, BJcuL e BIL foram purificadas de maneira eficiente, pois apresentaram um bom rendimento para obtenção dessas proteínas e foi comprovado sua pureza através da análise por espectrometria de massas e comprovando sua homologia com outras lectinas tipo-C de serpentes. Essas le

ctinas também apresentaram uma possível atividade enzimática, já que elas apresentaram certa especificidade para o substrato sintético utilizado para avaliar atividade trombina-like. Essas lectinas mostraram que afetam o tempo de coagulação sanguínea que dependendo da concentração que for utilizada apresentam características distintas como de atividade anticoagulante ou pró coagulante. Ficou esclarecido que esse comportamento ambíguo frente à coagulação sanguínea não está relacionado com ação direta nas plaquetas e nem com sítio de ligação a carboidratos presentes nessas lectinas. Essa atividade pode estar relacionada ao fato das lectinas consumirem os fatores de coagulação causando o efeito anticoagulante ou agirem diretamente sobre o fibrinogênio apresentando o efeito pró-coagulante.

REFERÊNCIAS

ABREU, P. A.; ALBUQUERQUE, M. G.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. **Toxicon**. v. 48, n. 6, p. 690–701, 2006.

AMARAL, C. F. S.; DOURADO, H. V.; KOUYOUMDJIAN, J. A.; CARDOSO, J. R.; CAMPOS, J. A.; AZEVEDO-MARQUES, M.; LOPES, P. F. **A. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos**. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde 53, 1987.

BAJZAR L. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and na antifibrinolytic pathway. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 20, p. 2511-2518, 2000

BARROS, L. C. **Atividade coagulante e da toxicidade da gioxina nativa e irradiada com Cobalto-60 isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus***. [Dissertação de Mestrado]. Doenças Tropicais. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 82 f., 2010.

BRESALIER, R. S.; YAN, P. S.; BYRD, J. C.; LOTAN, R.; RAZ, A. Expression of endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. **Cancer**. v. 80, p. 776–87, 1997.

CALMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**. v.40, p.501-509, 2002.

CAMPBELL J. A., LAMAR W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. **Comstock Publishing Associates**, Ithaca and London. 870 pp. 1500, 2004.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, P. S.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, R. S.; ET AL. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 54, p. 57–64, 2013.

CIT. **Centro de Informação Toxicológica**. 2014. Disponível em: <<http://www.cit.rs.gov.br/images/stories/2014.pdf>>. Acesso em: 10 janeiro 2017.

COLLEN, D. The plasminogen (fibrinolytic) system. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 82, p. 259-270, 1999.

COLMAN, R. W.; CLOWES, A. W.; GEORGE, J. N.; HIRSH, J.; MARDER, V. J. Overview of hemostasis. In: COLMAN, R. W.; HIRSH, J.; MARDER, V. J.; CLOWES, A. W.; GEORGE, J. N. eds. **Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice**, 4th ed, Lippincott; Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 3-16, 2001.

CORRÊA - NETTO, C.; TEIXEIRA, R. A.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; GIOVANI-DE-SIMONE, S.; SOARES, M. R.; FOGUEL, D; ZINGALI, R. B. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**. v. 55, p. 1222-35-00, 2010.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectins, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis*, Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 55, p. 261-273, 1995.

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis brasileiros: Mudanças taxonômicas. Versão 2014.2. Disponível em <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acesso em 11 set. 2016.

CUMMINGS, R. D.; MCEVER, R. P. C-type Lectins. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D. ET AL., editors. **Essentials of Glycobiology**. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**. v. 2, n. 02, p. 21-26, 2012.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**. v. 145, p. 1310-1312, 1964.

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

FERREIRA, C. N.; SOUSA, M. O.; DUSSE, L. M. S.A.; CARVALHO, M. G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 32, p. 416-421. 2010.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**. v. 34, p. 229-237. 2001.

GABIUS, H. J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H. C.; The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, n. 2–3, p. 165–177, 2002.

GARTNER, T. K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D. C. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Lett.** v. 117, n. 1, p. 13–6, 1980.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J.; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ, E.; ET AL. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances.** v. 27, n. 1, p.1–15, 2009.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica.** v. 113, p. 236–247, 2011

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin?. **Nature.** v. 285:60, 1980.

GORELIK E, GALILI U, RAZ A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev.** v. 20, p. 245–277, 2001.

GORELIK, E. Mechanisms of cytotoxic activity of lectins. **Trends Glycoscience and Glycobiology.** v. 6, p. 435–445, 1994.

GREGO, K. F.; ALVES, J. A. S.; ALBUQUERQUE, L. C. Rameh de; FERNANDES, W. Referências hematológicas para a jararaca de rabo branco (*Bothrops leucurus*) recém capturadas da natureza **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** Belo Horizonte, v. 58, n. 6, p. 1240-1243, Dec. 2006.

GUPTA, G. S. **Animal lectins: form, function and clinical applications.** Springer Science & Business Media, 2012.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. **Memórias do Instituto Butantan.** v. 51, p. 211-223, 1989.

HEIMBURG-MOLINARO, J.; SONG, X.; SMITH, D. F.; CUMMINGS, R. D. Preparation and analysis of glycan microarrays. **Current Protocols in Protein Science.** v. 12, p. 1-12, 2011.

HOFFMAN, M. A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Reviews.** v. 17, p. 1-5, 2003.

HUDGIN, R. L.; PRICER JR, W. E.; ASHWELL, G.; STOCKERT, R. J.; MORELL, A. G. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for

asialoglycoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 249, n. 17 p. 5536-5543, 1974

INSTITUTO BUTANTAN. Animais **Peçonhentos: Serpentes. Série Didática 5**. São Paulo, SP s/d. Disponível em: <http://www.toxnet.com.br/download/serpentes.pdf>. Acesso em: 08 janeiro de 2017.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**. v. 26, p. 219-30, 1995.

KOMATH S. S.; KAVITHA M.; SWAMY M.J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & Biomolecular Chemistry**. v. 4, p. 973–988, 2006.

LANDSTEINER, K.; RAUBISTSCHKE, H. (1908). In: PUSZTAI, A. **Plant Lectin**. Cambridge University Press, p. 263. 1991.

LAW, D. A.; DEGUZMAN, F. R.; HEISER, P.; MINISTRI-MADRID, K.; KILLEEN, N.; PHILLIPS DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in α IIb β 3 signalling and platelet function. **Nature**. v. 401 n. 6755, p. 808–11, 1999.

LEITE, R. S. **Efeito de uma fosfolipase A2 Lisina 49, ACL miotoxina, do veneno da serpente Agkistrodon contortrix laticinctus sobre o transporte de água em bexiga urinária isolada de sapo**. [Tese de Doutorado]. Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 97p., 2004.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9a ed. Porto Alegre: Artmed, 572p, 2006.

LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; RAMÍREZ, 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, 1990.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1383, p. 9-36. 1998.

LUHN, K.; WILD, M. K. Human deficiencies of fucosylation and sialylation affecting selectin ligands. **Seminars in Immunopathology**. v. 34, p.383-399, 2012.

MACFARLANE, R. G. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biological Amplifier. **Nature**. v. 202, p. 498 – 499, 1964.

MARTIN, S., M.; MOLINA, F. B. **Répteis: Panorama geral dos Répteis Ameaçados no Brasil**. São Paulo, 2012. 52 p.

MASUDA, S.; MURAKAMI, M.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**. p. 200-210, n. 1736, 2005.

MCMAHON, S. A.; MILLER, J. L.; LAWTON, J. A.; KERKOW, D. E.; HODES, A.; MARTI-RENOM, M. A.; DOULATOV, S.; NARAYANAN, E.; SALI, A.; MILLER, JF.; GHOSH, P. The C-type lectin fold as an evolutionary solution for massive sequence variation. **Nature Structural & Molecular Biology**. v. 12, p. 886–892, 2005.

Ministério da Saúde. Casos de acidentes por serpentes. **Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas (2000 a 2015)**. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/1-Casos-Ofidismo-2000-2015.pdf>> Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2016. Acesso em 11 janeiro. 2017.

Ministério da Saúde. Óbitos por serpentes. **Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas (2000 a 2015)**. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/20/3-Obitos-Ofidismo-2000-2015.pdf>> Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2016. Acesso em 11 janeiro. 2017.

MITRA, N.; SRINIVAS, V. R.; RAMYA, T. N. C.; AHMAD, N.; REDDY, G. B.; SUROLIA, A. Conformational stability of legume lectins reflect their different modes of quaternary association: solvent denaturation studies on concanavalin A and winged bean acidic agglutinin. **Biochemistry**. V.41, p. 9256-9263, 2002.

MO, H.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a Neu5Aca2-6Galb1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus saquamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 10623-10629, 2000.

MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J Pharmacol Toxicol Methods**. v. 33, p. 1–10, 1995.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. The coagulation cascade in cirrhosis. **Clinical Liver Disease**. v. 13, n. 1, p. 1-9, 2009.

NG, K. K.; KOLATKAR, A. R.; PARK-SNYDER, S.; FEINBERG, H.; CLARK, D. A.; DRICKAMER, K.; WEIS, W. I. Orientation of bound ligands in mannose-binding

proteins. Implications for multivalent ligand recognition. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 16088–16095, 2002.

NUNES, E. S.; ARANDA-SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SANTANA, G. M.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M.; DA SILVA, R. M.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA, M. T. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**. v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.

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.

OLIVEIRA, A. K. **Análise dos elementos estruturais de metaloproteínas das classes P-I e P-III do veneno de *Bothrops jararaca* importantes para suas interações com proteínas plasmáticas e da matriz extracelular**. [Dissertação de Mestrado]. Biotecnologia. Universidade de São Paulo. 47 f., 2009.

OLIVEIRA, N. B.; PIRES JR., O. R. Venenos e peçonhas animais: aplicações tecnológicas e Biopirataria. 6^a **Amostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC - Goiás**. 20 p., 2011.

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, p. 306–310, 1994.

PÉREZ-GÓMEZ F, BOVER R. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. **Revista Española de Cardiología**. v. 60, n. 12, p. 1217-1219, 2007.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionarily related proteins. **Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**. p. 27-54. 2001.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 47, n.1, pp.24-29, 2001.

PINHO, F. M.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snakebite-induced kidney injury in Latin America. **Seminars in Nephrology**. v. 28, p. 354-62, 2008.

POUGH, H.; HEISER, J.; JANIS, C. **A vida dos invertebrados**. 3. Ed. São Paulo: Atheneu. 2003.

RAND, J. H.; GLANVILLE, R. W.; WU, X. X.; ROSS, J. M.; ZANGARI, M.; GORDON, R. E.; SCHWARTZ, E.; POTTER, B. J. The significance of subendothelial von Willebrand factor. **Thrombosis and Haemostasis**. v. 78, n. 1, p. 445–450, 1997.

RIDDEL JR, J. P.; AOUIZERAT, B. E.; MIASKOWSKI, C.; LILLICRAP, D. P. Theories of blood coagulation. **Journal of Pediatric Oncology Nursing**. v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

RUGGERI, Z. M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. **Thrombosis Research**. v. 120, p. 5–9, 2007a.

RUGGERI, Z. M.; MENDOLICCHIO, G. L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circulation Research**. v. 100, n. 12, p. 1673–1685, 2007b.

RUSEVA, M.; KOLEV, M.; DAGNAES-HANSEN, F.; HANSEN, S. B.; TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, A.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C.; GADJEVA M. Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. **Immunology**. v. 127, p. 279–288, 2009.

SARTIM, M. A. **Isolamento, caracterização bioquímica e funtional in vitro e in vivo de uma metaloprotease isolada da peçonha de Bothrops moojeni envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação**. 54f. Tese (Doutorado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão. Preto Ribeirão Preto, 2014

SARTIM, M. A.; RIUL, T. B.; DEL CISTIA-ANDRADE, C.; STOWELL, S. R.; ARTHUR, C. M.; SORGI, C.A.; ET AL. Galatrox is a C-type lectin in Bothrops atrox snake venom that selectively binds LacNAc-terminated glycans and can induce acute inflammation. **Glycobiology**. v. 24, n. 11, p. 1010–21, 2014.

SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. V.21, n. 35, 2015.

SBH. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. 2015. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Aces s o em: 10 janeiro 2017.

SGRINOLLI, L.; MENDES, G.; CARLOS, G.; BURDMANN, E. Acute kidney injury caused by Bothrops snake venom. **Nephron Clinical Practice**. v. 119, p. 131-7, 2011.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. v. 14, n. 11, p. 53R–62R. 2004.

SILVA JR, F. P.; ALEXANDRE, G. M.; RAMOS, C. H.; DE-SIMONE, S. G. On the quaternary structure of a C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom–BJ-32 (BjcuL). **Toxicon**. v. 252, n. 8, p. 944–953, 2008.

SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas**. Disponível em: http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home. Acesso em: 10 de janeiro de 2017

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. A. M., *et al.* A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu beans) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate polymers**. v. 46, p. 191-193. 2001.

STALKER, T. J.; TRAXLER, E. A.; WU, J.; WANNEMACHER, K. M.; CERMIGNANO, S. L.; VORONOV, R.; DIAMOND, S. L.; BRASS, L. F. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. **Blood**. v. 121, n. 10, p. 1875–1885, 2013.

STOCKERT, R. J.; MORELL, A. G.; SCHEINBERG, I. H. Mammalian hepatic lectin. **Science**. v. 186, n. 4161, p. 365-366, 1974.

TAKEDA, A. A.; DOS SANTOS, J. I.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an acidic phospholipase A(2) complexed with p-bromophenacyl bromide and alpha-tocopherol inhibitors at 1.9- and 1.45-Å resolution. **Biochimica Et Biophysica Acta-proteins and Proteomics**. Amsterdam: Elsevier B.V. v. 1699, n. 1-2, p. 281-284, 2004.

TOMAIUOLO, M.; BRASS, L. F.; STALKER, T. J. Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. **Interventional Cardiology Clinics**. v. 6, n. 1 p. 1-12, 2017.

UETZ, P. **The Reptile Database**. Disponível em <<http://www.reptile-database.org>>. Acessado em 10 janeiro 2017

VAKRI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; ETZLER, M. E.; SUROLIA, A.; CUMMINGS, R. D. **Essential of glycobiology**. Chapter 29 L- type lectins. 2nded. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; p. 341-5, 2009.

VARKI, A. Multiple changes in sialic acid biology during human evolution. **Glycoconjugate Journal**. v. 26, n. 3, p. 231–45, 2009.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17, p. 575-692. 1998.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE G.; VAN DAMME, E. J. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**. v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 2011.

VINE, A. K. Recent Advances in Haemostasis and Thrombosis. **Retina**. v. 29, p. 1 – 7, 2009.

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.

WANG, H. X.; NG, T. B. Purification of Castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression & Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**. v. 169, p. 825–826, 1952.

WEIS W. I.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K: The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunological Reviews**. v. 163, p. 19-34, 1998.

YAMANAKA M.; KATO Y.; ANGATA T.; NARIMATSU H. Deletion polymorphism in *SIGLEC14* and its functional implications. **Glycobiology**. v. 19, p. 841–846, 2009.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Snake Venom Components Affecting Blood Coagulation and the Vascular System: Structural Similarities and Marked Diversity. **Current Pharmaceutical Design**. v. 13 p. 2872-2886, 2007.

YOUNG, N. M.; VAN FAASSEN, H.; WATSON, D. C.; MACKENZIE, C. R. Specificity analysis of the C-type lectin from rattlesnake venom, and its selectivity towards Gal- or GalNAc-terminated glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**. v. 28, n. 6, p. 427–435, 2011.

ZARBOCK, A.; LEY, K.; MCEVER, R. P.; Hidalgo, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. **Blood**. v. 118, p. 6743-6751, 2011.

ZENTENO, R.; VAZQUEZ L.; SIERRA, C.; PEREYRA, A.; SLOMIANNY, M. C.; BOUQUELET, S.; ZENTENO, E. Chemical characterization of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by Maldi-Tof. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**. v. 127, p.243-250, 2000.