

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
Programa de Pós graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP
Núcleo de Medicina

CLÁUDIA SIQUEIRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE LECTINAS TIPO C DE
VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops***

Porto Velho – RO

2015

CLÁUDIA SIQUEIRA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DE LECTINAS TIPO C DE
VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Experimental – PGBIOEXP da Universidade Federal de Rondônia - UNIR como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Dr. Leonardo de A. Calderon

Porto Velho – RO

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovada em: 09 de julho de 2015

Banca examinadora:

Membro titular: Dr. Leonardo de Azevedo Calderon
(Orientador - UNIR/FIOCRUZ-RO)

Membro titular: Dr. Andreimar Martins Soares
(Interno - FIOCRUZ-RO)

Membro titular: Dr. Jorge Luiz Lopes Lozano
(Externo - UNINORTE)

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Oliveira, Cláudia Siqueira de.

O482c

Caracterização bioquímica e funcional de lectinas tipo C de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*./Cláudia Siqueira de Oliveira, Porto Velho, 2015.

70 f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. Lectinas tipo C. 2. Gênero *Bothrops*. 3. Caracterização. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título

CDU: 598.115.33

Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça – CRB11/905

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois a sua palavra é lâmpada que ilumina os meus passos e luz que clareia o meu caminho.

Agradeço aos meus familiares: meu esposo Francisco, meu filho Gustavo, minha mãe Eládia, meus tios Elías, Wilson Roberto e Evanilde por terem me ensinado que juntos podemos ir mais longe.

Agradeço aos meus amigos de jornada: Rafaela Diniz, Cleópatra Caldeira, Tiago Bispo, Jeane, Leandro Dill, Jorge Alfonso, Anderson Maciel, Tainara Maiane, Geisiane, Luana Oliveira e Alef pela ajuda e amizade.

Agradeço aos colegas do grupo CEBio pelo apoio de todos os dias.

Agradeço ao Dr. Andreimar Soares por toda ajuda, conselho e sugestões.

Agradeço ao meu orientador Dr. Leonardo Calderon pela oportunidade e confiança.

Agradeço ao Dr. Anderson Kayano por sua generosidade e paciência.

Agradeço aos colegas de mestrado da turma 2013.

Agradeço ao Laboratório CEDIC por ceder o espaço para os testes antiparasitários;

Agradeço aos órgãos de fomento: CNPq e CAPES.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

As lectinas de venenos ofídicos pertencem a um grupo de proteínas não enzimáticas, de origem não imunológica, com capacidade de aglutinar células, interagindo de maneira reversível e não-covalente com polissacarídeos, glicoconjugados livres ou ligados à superfícies celulares. O presente estudo teve como objetivo caracterizar lectinas tipo C de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e compará-las quanto aos seus aspectos físico-químicos e biológicos. O trabalho foi realizado em etapas: (1) seleção de amostras, (2) isolamento e caracterização bioquímica, (3) caracterização estrutural e (4) caracterização funcional. Para a seleção, utilizou-se um lote com diferentes espécies botrópicas, selecionando-se aquelas que se mostraram ativas quanto à atividade hemaglutinante e foram inibidas por lactose. Os venenos selecionados foram submetidos a cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose. Nas condições experimentais, quatro apresentaram frações contendo lectina. Estas frações foram posteriormente aplicadas em coluna de fase reversa (Discovery - C18), para uma completa purificação, resultando em cinco lectinas isoladas: BaLec - lectina de *B. asper*; BjlL-lectina de *B. jararaca*; BjcuL - lectina de *B. jararacussu*, BIL - lectina de *B. leucurus* e BmL – lectina de *B. mattogrossensis*. Essas proteínas apresentaram perfis de migração semelhantes quando submetidos a SDS-PAGE, sendo evidente seu caráter dimerico, unidos por pontes dissulfeto. A massa molecular definida por espectrometria de massa também foi similar para todas as lectinas isoladas. O sequenciamento N-terminal por degradação de Edman, identificou os primeiros 26 resíduos de aminoácidos de BIL e os 54 de BaLec. O alinhamento múltiplo evidenciou elevada identidade quando comparadas com lectinas isoladas de outros venenos botrópicas. Todas as lectinas isoladas são dependentes de íon Ca^{2+} e perdem atividade na presença de agentes redutores. No contexto geral, considerando as informações experimentais obtidas, foram purificadas cinco Lectinas tipo C, com afinidade por galactosídeos. Este é o primeiro relato da sequência amino terminal da BIL, bem como a primeira descrição de lectina tipo C isolada do veneno de *B. asper* e *B. mattogrossensis*.

Palavras-chave: Lectinas tipo-C, gênero *Bothrops*, Caracterização.

ABSTRACT

Snake venom lectins belong to a group of non-enzymatic proteins, of non-immunological origin, with the ability to agglutinate cells interacting reversibly and non-covalently with polysaccharides, glycoconjugates that are free or attached to cell surfaces. This study aimed to characterize C-type snake venom lectins from the genus *Bothrops* and compare their physicochemical, chemical and biological aspects. The study was conducted in stages: (1) sample selection, (2) isolation and biochemical characterization, (3) structural characterization and (4) functional characterization. For the selection, we used a group of with venoms from different *Bothrops* species, selecting those that have proven active on hemagglutination activity and were inhibited by lactose. The venoms selected were subjected to affinity chromatography on an agarose-lactose column. Under the experimental conditions, four presented fractions containing lectin. These fractions were then applied to a reverse phase column (Discovery - C18), for complete purification, resulting in five isolated lectins: BaLec - lectin from *B. asper*; BJL - lectin from *B. jararaca*; BJcuL - lectin from *B. jararacussu*, BIL - lectin from *B. leucurus* and BmL – lectin from *B. mattogrossensis*. These proteins presented similar migration profiles when subjected to SDS-PAGE, making their dimeric nature evident, being joined by disulfide bonds. The molecular mass defined by mass spectrometry was also similar for all of the isolated lectins. N-terminal sequencing by Edman degradation identified the first 26 amino acid residues from BIL and the first 54 from BaLec. Multiple alignment showed high identity when compared to lectins isolated from other bothropic venoms. All isolated lectins are dependent Ca^{2+} íon and lose activity in the presence of reducing agents. In the overall context, considering the experimental data obtained, five C-type lectins with affinity for galactosides were purified. This is the first report of the N-terminal sequence of BIL, as well as the first description of a C-type lectin isolated from *B. asper* venom and *B. mattogrossensis*.

Keywords: Lectins C-type, Bothrops, Characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de interação entre lectinas e hidratos de carbono da superfície celular.....	18
Figura 2: Modelo tridimensional de uma lectina de veneno de serpente.....	20
Figura 3: Ensaio de hemaglutinação com venenos de serpentes do gênero Bothrops	31
Figura 4: Perfil cromatográfico em coluna de afinidade agarose-lactose	35
Figura 5: Cromatografia de fase reversa em coluna C18.....	39
Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e não redutoras	44
Figura 7: Determinação da massa molecular por espectrometria de massa em MALDI-TOF	45
Figura 8: Ensaio leishmanicida.....	56
Figura 9: Ensaio tripanocida.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Snaclecs que inibem a função plaquetária	21
Quadro 2: Snaclecs que ativam a função plaquetária	22
Quadro 3: Lectinas tipo C verdadeira	24
Quadro 4: Inibição do potencial hemaglutinante na presença de carboidratos	34
Quadro 5: Sequenciamento N-terminal das lectinas de venenos de <i>B. leucurus</i> e <i>B. asper</i>	48
Quadro 6: Sequenciamento de aminoácidos dos fragmentos peptídicos.....	50
Quadro 7: Alinhamento múltiplo das sequências N-terminais de aminoácidos entre as lectinas BmL, BIL, BaLec e outras lectinas de venenos ofídicos	51
Quadro 8: Alinhamento múltiplo das sequências N-terminais das cadeias α e β de Aspercetin e BaLec	52
Quadro 9: Ensaio de inibição da hemaglutinação por diferentes carboidratos, glicoproteína, quelante de íons e agente redutor	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

AMBIC – Bicarbonato de amônio

BiL – Lectina de *Bothrops insularis*

BjcuL – Lectina de *Bothrops jararacussu*

BjL – Lectina de *Bothrops jararaca*

BIL – Lectina de *Bothrops leucurus*

BLAST – Ferramenta de busca e alinhamento

BmL – Lectina de *Bothrops matogrossensis*

BpL – Lectina de *Bothrops pirajai*

BSA – Albumina bovina

ConA – Concanavalina A

CRD – Sítio de reconhecimento ao carboidrato

CTBS – Tampão de tris, cálcio e cloreto de sódio

DTNs – Doenças tropicais negligenciadas

DTT - Ditionitrito

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

MALDI-TOF – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

OMS – Organização mundial da saúde

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

PLA₂ - Fosfolipase

SBF – Soro fetal bovino

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TFA – Ácido trifluoracético

WHO – Organização mundial de saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Leishmaniose e Doença de Chagas	13
1.2 Gênero Bothrops	15
1.3 Lectinas: aspectos gerais	16
2 OBJETIVOS	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Venenos	26
3.2 Seleção de amostras	26
3.2.1 Avaliação da atividade hemaglutinante	26
3.2.2 Inibição da hemaglutinação por carboidratos	26
3.3 Purificação e caracterização bioquímica das proteínas isoladas	27
3.3.1 Cromatografia de afinidade.....	27
3.3.2 Cromatografia de fase reversa.....	27
3.3.3 Determinação quantitativa de proteínas	27
3.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	27
3.3.5 Espectrometria de massa.....	28
3.4 Estrutura primária	28
3.4.1 Sequenciamento de aminoácidos por degradação química de Edman	28
3.4.2 Determinação dos fragmentos peptídicos	28
3.5 Caracterização funcional e biológica	29
3.5.1 Concentração hemaglutinante mínima	29
3.5.2 Inibição da hemaglutinação	29
3.5.3 Atividade antiparasitária	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Seleção de amostras	30
4.2 Purificação e caracterização bioquímica das proteínas isoladas	35
4.3 Estrutura primária	48
4.4 Caracterização funcional e biológica	53
5 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose e Doença de Chagas

Leishmaniose e Doença de Chagas estão em um grupo composto por 17 doenças classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), que incluem cisticercose, dengue, doença do sono, dracunculíase, equinococose, esquistossomose, filariose linfática, hanseníase, helmintíases transmitidas pelo solo, hidrofobia, infecção alimentar por trematódeos, oncocercose, tracoma, treponematoses endêmicas e úlcera de buruli. Em 2012 a OMS emitiu o primeiro relatório sobre DTNs mostrando que estas doenças além de se proliferarem com mais facilidade em ambientes tropicais também estão fortemente associadas à pobreza, concentrando-se em áreas rurais remotas ou em favelas urbanas. Embora esteja comprovado que as DTNs prejudiquem cerca de um bilhão de pessoas em todo o mundo, ainda assim ocupam lugar secundário nas agendas nacionais e internacionais de saúde. Também é fato que doenças associadas à pobreza oferecem pouco incentivo às indústrias que não se estimulam a investir em produtos destinados a um mercado que não pode pagar por eles (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* transmitidos por mamíferos infectados ou por meio da picada de mosquitos flebotomíneos (CHOLEWIŃSKI; DERDA; HADAŚ, 2015; TANURE et al., 2015). A doença pode apresentar-se de duas formas: a Leishmaniose Visceral Americana conhecida como Calazar, capaz de atingir o sistema linfocitário de forma grave e a Leishmaniose Tegumentar Americana que pode apresentar lesão cutânea localizada (Leishmaniose cutânea) ou destruir extensões da mucosa (Leishmaniose mucosa) (PACE, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2014) as Leishmanioses são endêmicas em mais de 98 países afetando cerca de 1,6 milhões de pessoas por ano, dos quais 90% apresentam-se na forma visceral principalmente em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Sudão. Enquanto que Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria juntos são responsáveis por 70 a 75% da incidência dos casos globais de Leishmaniose Cutânea.

Por muito tempo as Leishmanioses foram tratadas com antimônios pentavalentes injetáveis, um tratamento prolongado, potencialmente tóxico e doloroso que tornou-se ineficaz em algumas partes do mundo devido ao desenvolvimento de resistência. Anfotericina B ou pentamidina são os medicamentos de segunda escolha mas também apresentam alta toxicidade. Atualmente, o medicamento de primeira linha para o tratamento da Leishmaniose Visceral é a anfotericina B lipossômica, altamente eficaz e praticamente sem efeitos colaterais. No entanto, apresenta um alto custo no mercado o que impede os países em desenvolvimento de o utilizarem em larga escala (CROFT; DAVIDSON; THORNTON, 1991; SUNDAR, 2001). Uma metodologia eficaz adotada para o controle da doença consiste em campanhas focadas na eliminação de reservatórios de hospedeiros e o uso de mosquiteiro impregnados com inseticida de longa duração. De forma geral, considerando o perfil epidemiológico o comportamento de transmissão de cada localidade é necessário pensar em estratégias e uso de controle específicos.

A Doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi* transmitido por meio das fezes de um inseto triatomíneo popularmente conhecido como barbeiro, também sendo transmitida de forma secundária por transfusão de sangue infectado, transmissão oral por alimentos contaminados e transplante de órgãos. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012; COURA, 2015). Os barbeiros infestam principalmente casas de regiões rurais e se infectam ao sugar o sangue de animais que tenham o parasito, como por exemplo, marsupiais, roedores e aves. Embora os barbeiros se alimentem desses animais, somente os mamíferos são infectados com *T. cruzi* (ARGOLO et al., 2008).

A doença pode se manifestar sob a forma aguda, indeterminada ou crônica. A forma aguda quando aparente, é caracterizada por uma miocardite que na maioria das vezes só é detectável eletrocardiograficamente, pode ou não apresentar edema ocular bipalpebral unilateral (Sinal de Romanã) ou lesão cutânea semelhante a um furúnculo que não sutura (Chagoma de Inoculação). Passada a fase aguda aparente ou inaparente, o paciente irá permanecer na forma indeterminada. Nessa fase, a doença é assintomática podendo nunca ser evidenciada ou manifestar-se anos após a infecção inicial. A forma crônica atinge o sistema cardíaco, sendo a principal causa de morte em pacientes chagásicos. Podem atingir ainda esôfago, colo do intestino,

sistema nervoso autônomo ou todos em conjunto na fase mais grave da doença (BRASIL, 2005).

Estima-se que a Doença de Chagas afete mais de quinze milhões de pessoas e provoque grande perda da população economicamente ativa por sua condição de doença incapacitante e por seu alto índice de mortalidade prematura. O tratamento da doença é realizado com uso de fármacos como benznidazol e nifurtimox que foram introduzidos ainda na década de 70, muito eficazes para tratar a fase aguda da doença, mas pouco eficaz para pacientes crônicos. Assim como no caso das leishmanioses, não há interesse das indústrias farmacêuticas em pesquisar e produzir medicamentos para essa doença, uma vez que sua demanda está restrito principalmente a populações de baixa renda. Mas é crescente o interesse sobre o assunto no meio acadêmico, principalmente entre estudantes e pesquisadores das universidades públicas da América Latina (CUNHA-FILHO et al., 2012).

1.2 Gênero *Bothrops*

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil registra por ano cerca de 29 mil acidentes ofídicos. Aproximadamente 85% dos casos são atribuídos a serpentes peçonhentas, 45% a não peçonhentas e 11% a espécies não identificadas (BRASIL, 2015). Esse número aumenta para 421 mil quando contabilizam-se as ocorrências a nível mundial, sendo dessa forma, considerado como um grave problema de saúde pública, com maior incidência nas áreas rurais de países tropicais e subtropicais (WHO, 2015). Geralmente as principais vítimas de acidentes ofídicos são trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade entre 15 e 49 anos sendo os membros inferiores as parte do corpo mais atingida. Nas regiões mais afastadas, a situação pode ser agravada devido às longas distâncias entre o local do acidente e a unidade de saúde (WARRELL, 2010). No Brasil, as serpentes mais relevantes do ponto de vista dos acidentes ofídicos pertencem aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. O gênero *Bothrops* é o de maior distribuição na América do Sul consequentemente sendo o responsável pelo maior número de acidentes (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

Cerca de 90% do peso seco dos venenos é representado por material proteico e os outros 10% são preenchidos por moléculas orgânicas como

aminoácidos livres, nucleotídeos, carboidratos e moléculas inorgânicas: cálcio, cobalto, cobre, ferro, entre outros (CALVETE et al., 2009). Algumas espécies de serpentes do gênero *Bothrops* tiveram seu proteoma descrito, como por exemplo, *Bothrops asper*, *Bothrops insularis* (VALENTE et al., 2009), *Bothrops jararaca* (ZELANIS et al., 2012), *Bothrops atrox* (GUÉRCIO et al., 2006) e *Bothrops jararacussu* (CORREA-NETTO et al., 2010) e vários trabalhos de caracterização e isolamento vem apresentando a presença e as características dessas moléculas que compõem o veneno, como fosfolipases (PLA₂) (MOURA et al., 2014), L-aminoácido oxidases (RODRIGUES et al., 2009) as proteases que podem ser metaloproteínases (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000) ou serinoproteínases (MENALDO et al., 2013), além de componentes não enzimáticos como as lectinas tipo C (CASTANHEIRA et al., 2013).

A caracterização dos efeitos locais proveniente da inoculação do veneno, culminam com alterações que podem ser atribuídas a ações isoladas ou sinérgicas das moléculas que compõem o veneno. Os efeitos podem ser locais como edema, dor, hemorragia e mionecrose ou sistêmicos alterando os sistemas cardiovascular, nervoso, respiratório e urinário; como por exemplo, hipotensão, choque, alterações na coagulação, hemólise, hemoconcentração e hipotermia (GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). O tratamento específico consiste na administração do soro antiofídico, por via intravenosa e na falta deste das associações antiofídico-crotálica ou antiofídico-laquélica (BRASIL MINISTERIO DE SAUDE, 2001).

1.3 Lectinas: aspectos gerais

No final do século XIX, pesquisadores que estudavam extratos de plantas começaram a observar, em seus experimentos, a presença de proteínas aglutinantes de eritrócitos. Acredita-se que as primeiras descrições para tal atividade sejam as relatadas nas teses de doutorado apresentadas, em meados de 1888, por Peter Hermann Stillmark e H. Hellin que demonstraram em seus trabalhos a hemaglutinação promovida por extratos de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*. A capacidade de aglutinação para as duas espécies vegetais foi atribuída a presença de toxinas denominadas respectivamente de ricina e abrina. Na década de 1890, Ricina e abrina tornaram-se objeto de estudo do imunologista Paul Ehrlich que por meio de testes *in vivo* conseguiu demonstrar a especificidade da resposta de

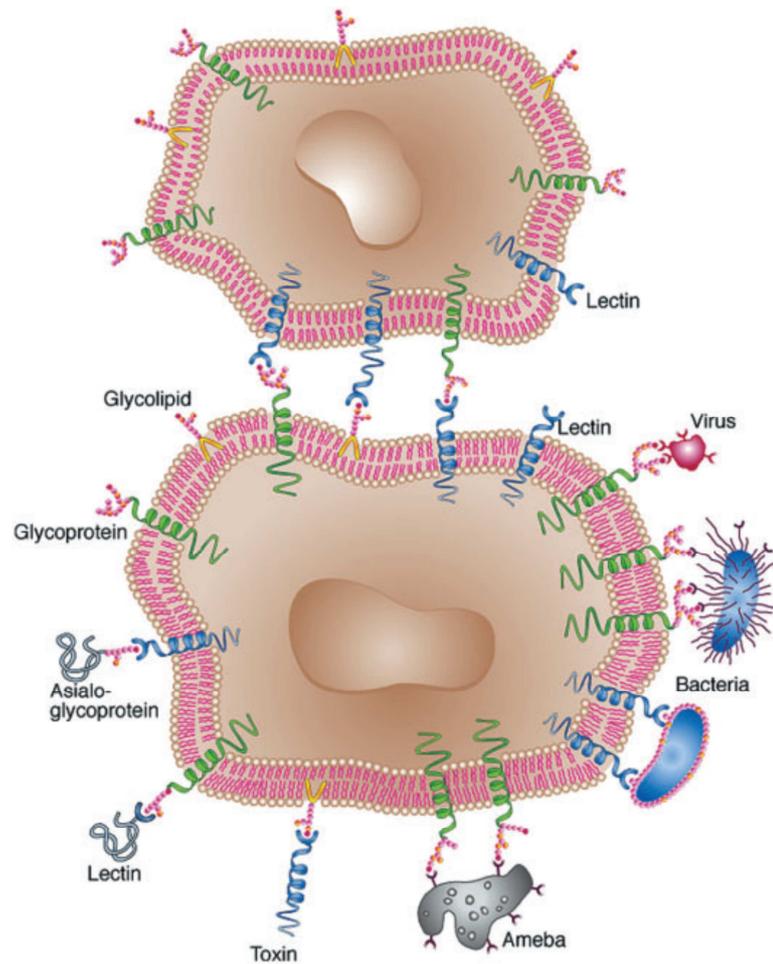
anticorpos, o fenômeno de memória imunológica, e a transferência da imunidade humoral a partir de uma matriz à sua descendência (SHARON; LIS, 2004).

Concanavalina A (ConA) obtida de sementes de *Canavalia ensiformes* foi a primeira aglutinina isolada na forma cristalina, sendo descrita, anos mais tarde após a sua descoberta, por Sumner e Howell (1936) por sua capacidade de precipitar glicogênio, mucoproteínas, aglutinar lipídios, glânulos de amidos, células de leveduras e bactérias, além das propriedades já descritas de aglutinar eritrócitos. No mesmo trabalho, os autores atribuem a ConA, o primeiro relato de inibição da atividade hemaglutinante na presença de um carboidrato.

Os estudos com aglutininas obtidas de sementes levaram Walter Morgan e Winifred Watkins (1952) a concluir que a especificidade das células que determinam os grupos sanguíneos em humanos derivam de carboidratos específicos aderidos a superfície celular. A afirmação partiu da observação de que a aglutinação de células vermelhas do tipo “A”, induzida por uma aglutinina de feijão, foi melhor inibida por N-acetil-D-galactosamina e que aglutinação de células do tipo “O” induzida pela lectina de *L. tetragonolobus* foi melhor inibida por L-fucose, levando-os a concluir que são estes os açúcares que conferem especificidade para os respectivos grupos sanguíneos. Estas são as primeiras evidências da presença de açúcares na superfície das células e seu potencial como marcadores de identidade.

Esse grupo de proteínas, até então, denominado como fitoaglutinina por terem sido descobertas primeiramente em plantas ou como hemaglutininas por sua capacidade em aglutinar hemácias. Passa a ser nomeado por Boyd (1954) como lectinas (do latim *lectus*, particípio passado de *legere* que significa selecionar). De modo geral, as lectinas atuam como moléculas de reconhecimento no interior das células, em superfícies celulares e em fluidos fisiológicos (**Figura 1**) (SHARON; LIS, 2004).

Figura 1: Modelo de interação entre lectinas e hidratos de carbono da superfície celular

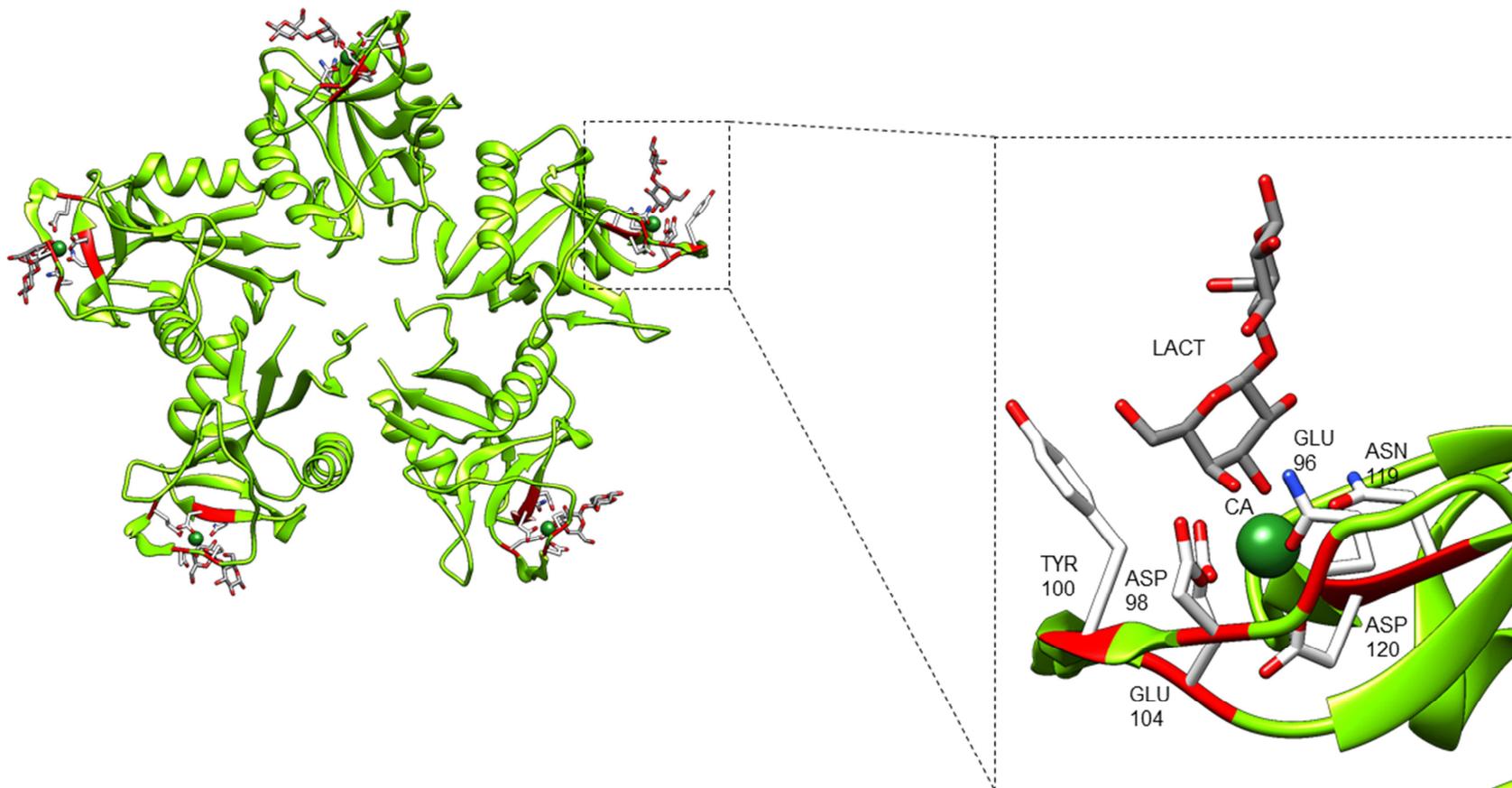


As lectinas servem como meios de fixação de diferentes tipos de células. Vírus podem fixar-se a células hospedeiras por meio da interação entre seus hidratos de carbono e as lectinas presente na superfície da própria célula. Em alguns casos, as lectinas da superfície celular ligam-se a glicoproteínas específicas, enquanto que em outros casos, os hidratos de carbono de glicoproteínas da superfície celular ou glicolipídios servem como sítios de ligação para moléculas biologicamente ativas. **Fonte: (SHARON; LIS, 2004).**

Com a introdução da cromatografia de afinidade como método de purificação de lectinas (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965), o ritmo de isolamento aumentou e desde então, numerosas lectinas de diferentes organismos tornaram-se disponíveis a partir de vírus, bactérias, plantas e animais. Provavelmente, a primeira atividade de lectina animal foi atribuída ao veneno de *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860), porém a primeira a ser isolada de um veneno de serpente foi obtida de *B. atrox* (GARTNER; STOCKER; WILLIAMS, 1980). Clemetson e colaboradores (2008), classificam as lectinas de venenos de serpentes em dois grandes grupos baseando-se na estrutura e propriedades funcionais. O primeiro grupo é denominado como lectinas tipo C dependentes de cálcio, ligantes de açúcares, com estruturas homodimericas ou multimericas, similares a selectinas e a proteínas ligantes de manose (**Quadro 3**). No segundo grupo, denominado como Snaclecs (*Snake venom C-type lectins*), estão as proteínas que embora apresentem sequências de aminoácidos semelhantes as lectinas tipo C, diferenciam-se por não demonstrarem afinidade por açúcar e a associação com o íon cálcio (quando existe) ocorre por uma via diferenciada da utilizada pelas lectinas do primeiro grupo. As snaclecs, geralmente são heterodimericas com duas subunidades α e β ligadas por uma única ponte dissulfeto podendo ser subdividida em categorias de acordo com o seu alvo: a) indutores de agregação plaquetária (**Quadro 1**) e b) inibidores de agregação plaquetária (**Quadro 2**).

Em 1988 Kurt Drickamer propôs que o sítio de ligação ao carboidrato (CRD) de praticamente todas as lectinas residia em um segmento polipeptídico composto por Gln96, Pro97 e Asp98. Guimarães-Gomes e colaboradores (2004) apontaram outros resíduos importantes envolvidos na ligação lectina/carboidrato que são altamente conservados na maioria das lectinas tipo c estudadas (Gly12, Cys31, Gly69, Thr82, Asp83, Thr87, Trp92, Tyr100, Glu104, Cys106, Gly114, Trp118, Asn119, Asp120, Gln121, Cys123 e Cys131). O CRD de todas as lectinas é carregado negativamente e apresenta uma forma côncava que acomoda o carboidrato é o íon Ca^{2+} (SARTIM; SAMPAIO, 2015). Na **Figura 2** está representado a estrutura tridimensional de uma lectina de serpente.

Figura 2: Modelo tridimensional de uma lectina de veneno de serpente



Estrutura pentamérica da lectina de *Crotalus atrox* (RsL). Em verde está representado o íon Ca^{2+} , carboidrato em cinza; resíduos envolvidos no processo de reconhecimento em branco.

Quadro 1: Snaclecs que inibem a função plaquetária

PROTEINA	ESPÉCIE	ALVO	REFERÊNCIA
Agkicetin C	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	GPIb	(CHEN; TSAI, 1995)
Akitonin	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	GPIb	(ZHA; LIU; XU, 2004)
CHH-A e B	<i>Crotalus horridus</i> <i>horridus</i>	GPIb	(ANDREWS et al., 1996)
Dabocetin	<i>Daboia russelli siamensis</i>	GPIb	(ZHONG et al., 2006)
Echicetin	<i>Echis carinatus</i>	GPIb	(POLGAR et al., 1997b; NAVDAEV et al., 2001b; JASTI et al., 2004)
GPIB-BP	<i>Bothrops jararaca</i>	GPIb	(FUJIMURA et al., 1995; KAWASAKI et al., 1996)
Lebecetin	<i>Macrovipera lebetina</i>	GPIb	(SARRAY et al., 2003)
TSV-GPIB-BP	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	GPIb	(LEE; ZHANG, 2003)
Tokaracetin	<i>Trimeresurus takarensis</i>	GPIb	(KAWASAKI et al., 1995)
Flavocetin-A	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	GPIb	(TANIUCHI et al., 1995; FUKUDA et al., 2000; SHIN et al., 2000)
SEM-16	<i>Echis multisquamatus</i>	A2β1	(MARCINKIEWICZ et al., 2000; HORII et al., 2003)
Rhodocetin	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	A2β1	(WANG; KINI; CHUNG, 1999; EBLE; TUCKWELL, 2003; EBLE et al., 2009)
VP12	<i>Vipera palaestinae</i>	A2β1	(STANISZEWSKA et al., 2009)

Quadro 2: Snaclecs que ativam a função plaquetária

PROTEINA	ESPÉCIE	ALVO	REFERÊNCIA
Botrocetin	<i>Bothrops jararaca</i>	VWF/GPIb	(USAMI et al., 1993; SEN et al., 2001; FUKUDA et al., 2002)
Bitiscetin	<i>Bitis arietans</i>	VWF/GPIb	(HAMAKO et al., 1996; HIROTSU et al., 2001; MAITA et al., 2003)
Aspercetin	<i>Bothrops asper</i>	GPIb, IgMk	(RUCAVADO et al., 2001)
Echicetin	<i>Echis carinatus</i>	GPIb	(POLGAR et al., 1997a, 1997b; NAVDAEV et al., 2001a, 2001b)
Mamushigin	<i>Gloydius halys blomhoffii</i>	GPIb	(SAKURAI et al., 1998)
Purpureotin	<i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>	GPIb	(LI et al., 2004)
Alboaggregin-B	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	GPIb	(PENG; LU; KIRBY, 1991; KOWALSKA et al., 1998)
Trimecetin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	GPIb	(CHEN et al., 2009)
Flavocetin-A	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	GPIb	(TANIUCHI et al., 1995; FUKUDA et al., 2000; SHIN et al., 2000)
Mucrocetin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	GPIb	(HUANG et al., 2004)
Mucetin	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>	GPIb	(WEI et al., 2002; LU et al., 2004)
Alboaggregin-C	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	GPIb	(PENG et al., 1992)
Agglucetin	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	GPIb	(WANG; HUANG, 2001)
Convulxin	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	GPVI, GPIb	(POLGAR et al., 1997a, 1997b; LEDUC; BON, 1998; MURAKAMI et al., 2003; BATUWANGALA et al., 2004)

Alboaggregin-A	<i>Trimeresurus albolabris</i>	GPIb, GPVI	(KOVALSKA et al., 1998; DÖRMANN et al., 2001)
Stejnulxin	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	GPVI	(LEE et al., 2003)
Ophioluxin	<i>Ophiophagus hannah</i>	GPVI	(DU et al., 2002a; 2002b)
Alboluxin	<i>Cryptelytrops albolabris</i>	GPIb, GPVI	(DU et al., 2002a; 2002b)
Aggretin/rhodocytin	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	CLEC-2 $\alpha 2\beta 1$, GPIb	(CHUNG; AU; HUANG, 1999; BERGMEIER et al., 2001; NAVDAEV et al., 2001a, 2001b; HOOLEY et al., 2008; WATSON; EBLE; O'CALLAGHAN, 2008)
Bilinexin	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	GPIb, $\alpha 2\beta 1$	(DU et al., 2001)
Agkisacutacin	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	-----	(CHENG et al., 1999)
Agkaggregin	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	-----	(LIU et al., 2002)
Rhodoaggregin	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	-----	(WANG et al., 2001)

Quadro 3: Lectinas tipo C verdadeira

PROTEINA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
Rsl	<i>Crotalus atrox</i>	(HIRABAYASHIS; KUSUNOKI; KASAI, 1991)
ApL	<i>Agkistrodon piscivorus</i>	(KOMORI; NIKAI; TOHKAI, 1999)
BaL	<i>Bitis arietans</i>	(NIKAI et al., 1995)
CrL	<i>Crotalus ruber</i>	(HAMAKO et al., 2007)
BiL	<i>Bothrops insularis</i>	(GUIMARÃES-GOMES et al., 2004)
BmLec	<i>Bothrops moojeni</i>	(BARBOSA PSF, 2010)
BpLec	<i>Bothrops pauloensis</i>	(CASTANHEIRA et al., 2013)
BjcuL	<i>Bothrops jararacussu</i>	(DE CARVALHO; MARANGONI; NOVELLO, 2002)
BpirL	<i>Bothrops pirajai</i>	(HAVT et al., 2005)
LmL	<i>Lachesis muta</i>	(ARAGÓN-ORTIZ; MENTELE; AUERSWALD, 1996)

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar as características bioquímicas, estruturais e funcionais de lectinas tipo C dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

2.2 Específicos

- Isolar lectinas tipo C com afinidade a lactose presente em venenos de serpentes do gênero *Bothrops*;
- Determinar a massa molecular e estrutura primária;
- Analisar a capacidade de hemaglutinação;
- Identificar a especificidade de ligação a carboidratos;
- Avaliar a atividade leishmanicida e tripanocida.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Venenos

Os venenos botrópicos utilizados nesse trabalho, foram obtidos do Banco de venenos do Centro de Estudos em Biomoléculas Aplicadas a Saúde – CEBio.

3.2 Seleção de amostras

3.2.1 Avaliação da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi realizada de acordo com a proposta de Gartner e Ogilvie (1984) com adaptações. Cerca de 5 mg de veneno foi diluído em 0.5 mL de soro fisiológico estéril (m/v) e centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos. 50 µL por poço do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços com fundo em V e acrescido com 50 µL de suspensão de hemácias (3%) em CTBS (Tris 20 mM; Cloreto de cálcio 5 mM; Cloreto de sódio 150 mM) pH 7,4. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado por três horas a temperatura ambiente. Como controle negativo foi utilizado soro fisiológico estéril. A atividade hemaglutinante foi observada pela formação de uma rede de hemácias.

3.2.2 Inibição da hemaglutinação por carboidratos

A inibição da hemaglutinação por carboidratos foi realizada de acordo com a proposta de Gartner e Ogilvie (1984) com adaptações. Para testar a inibição por carboidratos (lactose, glicose e galactosamina) preparou-se três soluções: A suspensão de hemácias (3%), B – suspensão de carboidratos: 100 mM em CTBS pH 7,4 e C – suspensão de venenos. Para uma placa de 96 poços com fundo em V, foi transferido 25 µL da solução A, 25 µL da solução B e 50 µL da solução C por poço. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado por três horas a temperatura ambiente. Como controle negativo foi utilizado soro fisiológico estéril. A inibição da atividade hemaglutinante foi observada pela ausência na formação da rede de hemácias.

3.3 Purificação e caracterização bioquímica das proteínas isoladas

3.3.1 Cromatografia de afinidade

Aproximadamente 100mg do veneno bruto de serpentes do gênero *Bothrops* foram diluídas em 1 ml de CTBS (Tris 20 mM pH 7,4, Cloreto de cálcio 5 mM, Cloreto de sódio 150 mM) e centrifugados a 13000 rpm. O sobrenadante foi aplicado em coluna de afinidade agarose-lactose (3 cm X 1 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão a um fluxo de 1ml/min e extensivamente lavada até que a absorbância medida em 280 nm retornasse aos níveis basais. O material retido na coluna foi eluído com uma solução de Lactose 100 mM diluída em CTBS. As frações coletadas foram liofilizadas em rotaevaporador e armazenadas a -20 °C para posterior análise.

3.3.2 Cromatografia de fase reversa

A fração II liofilizada proveniente da cromatografia de afinidade foi solubilizada em TFA 0,1% (solução A) e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C-18 (25 mm x 4,6 mm, Supelco), previamente equilibrada com a solução A e eluída sob gradiente 0 a 70% de solução B (acetonitrila 99,9% e TFA 0,1%) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 ml/min. A absorbância da eluição foi monitorada em 280 nm.

3.3.3 Determinação quantitativa de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com o método de (LOWRY et al., 1951). O ensaio é baseado na reação da proteína com uma solução de tartarato de cobre alcalino e reagente de Folin. Método foi adaptado para microplacas, sendo utilizados 25 µl da solução A (solução de tartarato de cobre alcalino), 200 µl da solução B (solução diluída do reagente Folin) e 5 µl da amostra, incubados a 37°C durante 15 minutos. Seguiu-se de leitura em espectrofotômetro em 750 nm. A curva padrão foi previamente preparada utilizando albumina bovina (BSA) em concentrações variando de 0,125 mg/mL a 1,5 mg/mL resultando em um coeficiente de correlação linear de 0,999.

3.3.4 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS

A eletroforese em gel de poli(acrilamida) 12,5 % SDS-PAGE, foi realizada conforme descrita por (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado sistema descontínuo de pH,

em condições redutoras e não redutoras. O gel foi fixado em solução aquosa com 40% metanol e 7% de ácido acético (7 %) por 30 minutos. As bandas de proteínas foram evidenciadas através da imersão em solução contendo 0,08% de *Coomassie Brilliant Blue*, 8,0% de sulfato de alumínio, 1,6% de ácido fosfórico e 20% de metanol. O excesso de corantes foi retirado por imersão em solução descorante contendo 4,0% de etanol e 7,0% de ácido acético em água. Várias trocas desta solução foram realizadas até a obtenção do gel com coloração adequada. A imagem dos géis foram obtidas com uso de equipamento *Image scanner*® (GE Healthcare Lifesc.).

3.3.5 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi realizada em equipamento de MALDI (ionização/ dessorção a laser assistida por matriz), com analisador TOF (Tempo de Voo) em um AXIMA TOF² (Shimadzu Biotech – Kratus), operando em modo linear e utilizando solução saturada de ácido sinapínico como matriz de ionização e 1µg de proteína (proporção 3:1, respectivamente). As massas moleculares das amostras foram determinadas por comparação com padrões externos de proteínas.

3.4 Estrutura primária

3.4.1 Sequenciamento de aminoácidos por degradação química de Edman

O sequenciamento da estrutura primária das lectinas isoladas foi realizado em microsequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu), o qual utiliza o processo químico de sequenciamento por clivagem N-terminal, derivado do método desenvolvido por Pehr Edman conforme descrito por Gray (1972).

3.4.2 Determinação dos fragmentos peptídicos

As proteínas foram reduzidas por tratamento com solução de ditioneitol (DTT) 20 mM em AMBIC 50 mM, por período de 1 hora a 30°C. Para alquilação dos grupos tiol dos resíduos de cisteína, a proteína reduzida foi incubada com iodoacetamida 150 mM em bicarbonato de amônio 50 mM por 1 hora, a 30 °C e ao abrigo da luz. Em seguida as amostras foram submetidas a digestão com uso de tripsina modificada por período de 18 horas, a 37 °C e ao abrigo da luz depois as amostras foram liofilizadas e armazenadas até o momento do uso. Os fragmentos peptídicos foram caracterizados por dissociação induzida por colisão em

espectrômetro de massa LCMS-IT-TOF (Shimadzu Biotech) em cooperação com o pesquisador Daniel Carvalho Pimenta, Laboratório de Bioquímica e Biofísica Molecular, Instituto Butantã.

3.5 Caracterização funcional e biológica

3.5.1 Concentração hemaglutinante mínima

A concentração mínima aglutinante foi determinada incubando 50 µL de amostras de lectinas isoladas (concentrações de 2,0, 5,0, 10 e 15 µg) com 50 µL de suspensão de hemácias a 3% em CTBS. O ensaio foi realizado em triplicata e incubado por três horas a temperatura ambiente. Como controle negativo foi utilizado soro fisiológico estéril. A concentração mínima hemaglutinante foi determinada pela menor concentração de lectina capaz de aglutinar as hemácias.

3.5.2 Inibição da hemaglutinação

Este ensaio foi realizado conforme protocolo descrito no item 3.1.2 sendo que os carboidratos utilizados foram frutose, arabinose, manose, maltose, galactose, sacarose, fucose e lactose; o agente redutor utilizado foi DTT (ditiotreitól); o agente quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e a glicoproteína utilizada foi a caseína.

3.5.3 Atividade antiparasitária

Para a realização deste teste, formas promastigotas de *L. infantum* e *T. cruzi* foram cultivadas em uma concentração de 1.5×10^6 parasitas/mL em placas de 96 poços, utilizando o meio de cultura Schneider, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF). A placa foi incubada a 26°C durante 48 horas, com diferentes concentrações de veneno bruto e proteína purificada (3.12 - 100 µg/mL). Cada concentração foi testada em triplicata. Posteriormente, foi adicionada uma solução de Resazurina, 3 mM. A placa foi novamente submetida a incubação a 26 °C durante 4 horas e por último, a absorbância foi monitorada a 570 e 600 nm utilizando um espectrofotômetro multimodal Synergy H1 (Biotek). A eficácia de cada composto testado foi estimada calculando a porcentagem de atividade anti promastigota e anti epimastigota. Para os controles positivos foi utilizado Benznidazol para *T. cruzi* e Pentamidina para *L. infantum*. Como controle negativo utilizou-se meio de cultura.

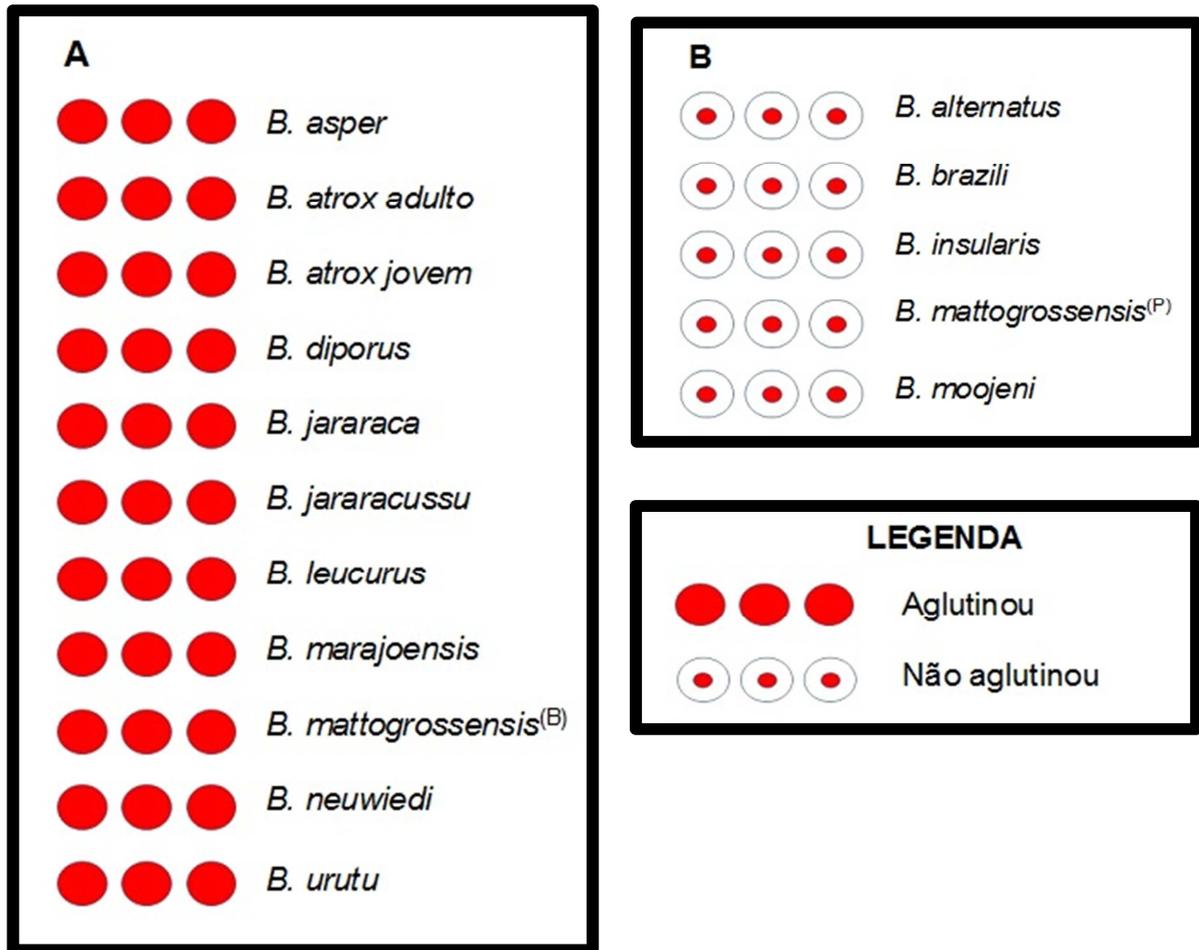
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de amostras

Em venenos animais, particularmente em venenos de serpentes, lectinas são agrupadas em aquelas capazes de atuar sobre a ativação ou inativação de plaquetas (Snaclecs) (CLEMETSON, 2010) e aquelas capazes de aglutinar eritrócitos (lectinas tipo C verdadeiras) (CLEMETSON; MORITA; KINI, 2008). Como o objetivo geral desse trabalho é o isolamento e a caracterização bioquímica comparativa entre lectinas tipo C (verdadeiras) de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, o primeiro passo foi selecionar entre vários lotes de venenos botrópicos depositados no banco de venenos do Centro de Estudos em Biomoléculas Aplicadas a Saúde – CEBio/UNIR/FIOCRUZ-RO, aqueles com capacidade de promover a aglutinação de eritrócitos humanos. Para tanto, foram separados 16 amostras de venenos, na sua maioria obtidos de espécimes adultos e provenientes do Brasil, incluindo uma amostra obtida de espécime jovem (*B. atrox*) e duas de regiões geográficas distintas, sendo uma de amostra de veneno de *Bothrops* do Panamá (*B. asper*) e outra de *Bothrops* do Paraguai (*B. mattogrossensis*).

Os resultados do ensaio de hemaglutinação mostraram que os venenos de *B. asper*, *B. atrox* adulto, *B. atrox* jovem, *B. diporus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, **B. mattogrossensis*^(B), *B. neuwiedi* e *B. urutu* apresentaram-se como hemaglutinantes (**Fig. 3A**) enquanto os venenos de *B. alternatus*, *B. brazili*, *B. insularis*, **B. mattogrossensis*^(P) e *B. moojeni* apresentaram-se como não hemaglutinantes (**Fig. 3B**).

Figura 3: Ensaio de hemaglutinação com venenos de serpentes do gênero *Bothrops*



Os venenos (5 mg/mL) foram incubados com suspensão de hemácias humanas (3 %) durante três horas, seguido de avaliação qualitativa. **(A)** Venenos que apresentaram atividade hemaglutinante, **(B)** Venenos que não apresentaram atividade hemaglutinante. ****B. mattogrossensis^(B)*** = Veneno de *B. mattogrossensis* proveniente do Brasil. ****B. mattogrossensis^(P)*** = Veneno de *B. mattogrossensis* proveniente do Paraguai

Os venenos de *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus* e *B. neuwiedi* são descritos na literatura por conter lectina tipo C na sua composição (GARTNER; STOCKER; WILLIAMS, 1980; CARVALHO et al., 1998b; DE-SIMONE; NETTO; JR, 2006; NUNES et al., 2011), por esse motivo, de fato, esperava-se que esses venenos aglutinassem hemácias humanas. *B. insularis* também é descrito por conter uma lectina tipo C na composição de seu veneno (GUIMARÃE-GOMES et al., 2004), no entanto diferente dos descritos acima, este veneno se comportou como não hemaglutinante.

Não há citação literária referente a aglutinação de eritrócitos promovida pelo veneno de *B. mattogrossensis*. No ensaio de hemaglutinação utilizado para selecionar as amostras desse trabalho, utilizou-se dois lotes de venenos obtidos dessa espécie de serpente, ambas provenientes de regiões geográficas distintas. Uma do Brasil (*B. mattogrossensis*^(B)) e outra do Paraguai (*B. mattogrossensis*^(P)). É interessante notar que os resultados apresentados pelos dois venenos foram totalmente opostos entre si. *B. mattogrossensis*^(B) aglutinou as hemácias humanas a qual foi submetido enquanto *B. mattogrossensis*^(P) não.

Muitas são as variantes que podem interferir na composição dos venenos animais, entre eles incluem-se variação geográfica, idade do animal, alimentação, habitat, gênero, entre outros. Como verificado nos estudos de Dias e colaboradores (2013) que observaram diferenças significativas entre os efeitos biológicos produzidos pelos venenos de *B. jararaca* obtidos de regiões geográficas diferentes. Saldarriaga e colaboradores (2003) que comprovaram que os venenos de serpentes juvenis das espécies *B. atrox* e *B. asper* são mais letais, hemorrágicos, formadores de edema e coagulantes do que os de animais adultos e Sousa e colaboradores (2015) que compararam os venenos coletados de serpentes em ambiente natural com os de serpentes mantidas em cativeiro detectando variabilidade quantitativa entre os componentes menos abundantes dos venenos.

O fato dos venenos de *B. mattogrossensis*^(B) e *B. mattogrossensis*^(P) terem apresentado resultados divergentes no ensaio de hemaglutinação, bem como o fato do veneno de *B. insularis* não ter aglutinado as hemácias ao qual foi exposto quando esperava-se que este fosse um veneno hemaglutinante, pode estar relacionado com as variações citadas no parágrafo acima. No entanto um estudo mais detalhado

referente as características do animal do qual o veneno foi coletado se faz necessário para uma conclusão mais apurada.

Das dezesseis amostras de venenos iniciais, onze apresentaram-se como aglutinantes de eritrócitos (**Fig. 3A**), estes foram então testados quanto a inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato. Três carboidratos foram utilizados para o ensaio (lactose, glicose e galactosamina). O experimento baseia-se no princípio de que se as lectinas presente nos venenos **não reconhecerem** os respectivos açúcares, estas irão se ligar aos carboidratos ou glicoconjugados presentes na membrana das hemácias em solução, promovendo o fenômeno de hemaglutinação. Caso contrário, se as lectinas presentes nos venenos **reconhecerem** os respectivos açúcares, estas irão se ligar a eles deixando as hemácias em solução livres que consequentemente migrarão para o fundo da placa, sendo visualmente observado um efeito não hemaglutinante.

Partindo do princípio acima, inicialmente esperava-se obter somente dois resultados distintos: 1) inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato ou 2) não inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato. Esses resultados foram muito claros para a maioria das amostras testadas, que se enquadraram perfeitamente na primeira ou na segunda classificação. No entanto, quando observado os poços com os venenos de *B. atrox* adulto e *B. atrox* jovem contendo suspensão de hemácias e lactose e comparando-os a todos os outros venenos nas mesmas condições, estes dois não puderam ser identificados com a primeira e nem com a segunda classificação, por não demonstrarem uma completa aglutinação das hemácias e nem uma completa migração das mesmas.

Dessa forma, os resultados obtidos com esse ensaio foram categorizados em: 1) inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato, 2) não inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato e 3) inibição parcial da atividade hemaglutinante por carboidrato. Os venenos de *B. atrox* adulto e *B. atrox* jovem foram os únicos a demonstrar inibição parcial da atividade hemaglutinante influenciado por um carboidrato, especificamente a lactose. Dados resumidos no **Quadro 4**.

Quadro 4: Inibição do potencial hemaglutinante na presença de carboidratos

ESPÉCIES	CARBOIDRATOS		
	Lactose	Galactosamina	Glicose
<i>B. asper</i>			
<i>B. atrox</i> adulto			
<i>B. atrox</i> jovem			
<i>B. diporus</i>			
<i>B. jararaca</i>			
<i>B. jararacussu</i>			
<i>B. leucurus</i>			
<i>B. marajoensis</i>			
<i>B. mattogrossensis</i> ^(B)			
<i>B. neuwiedi</i>			
<i>B. urutu</i>			



Inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato.



Não inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato.



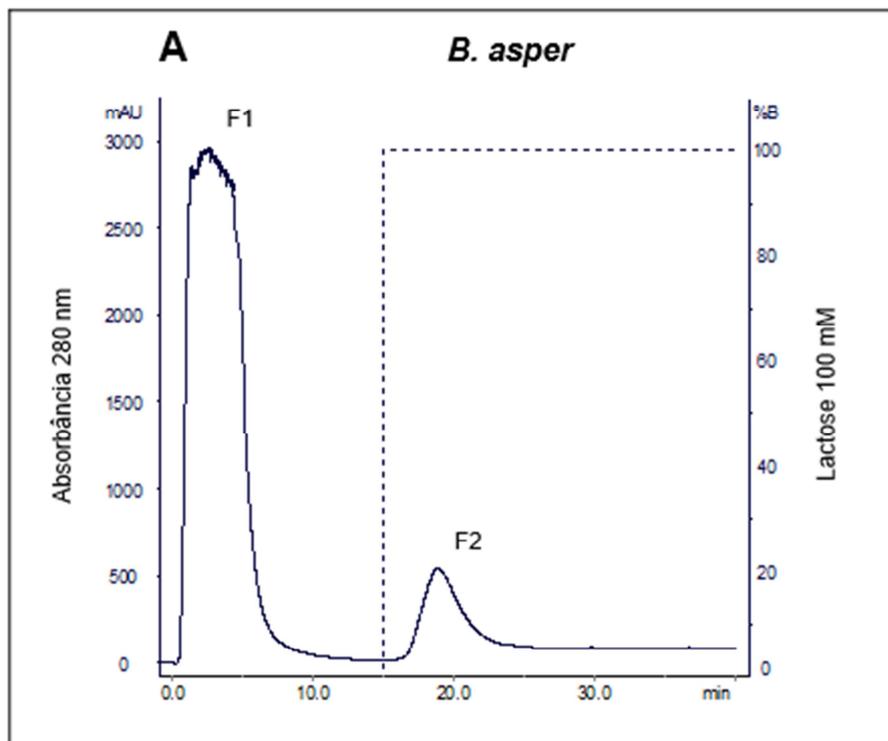
Pouca inibição da atividade hemaglutinante por carboidrato.

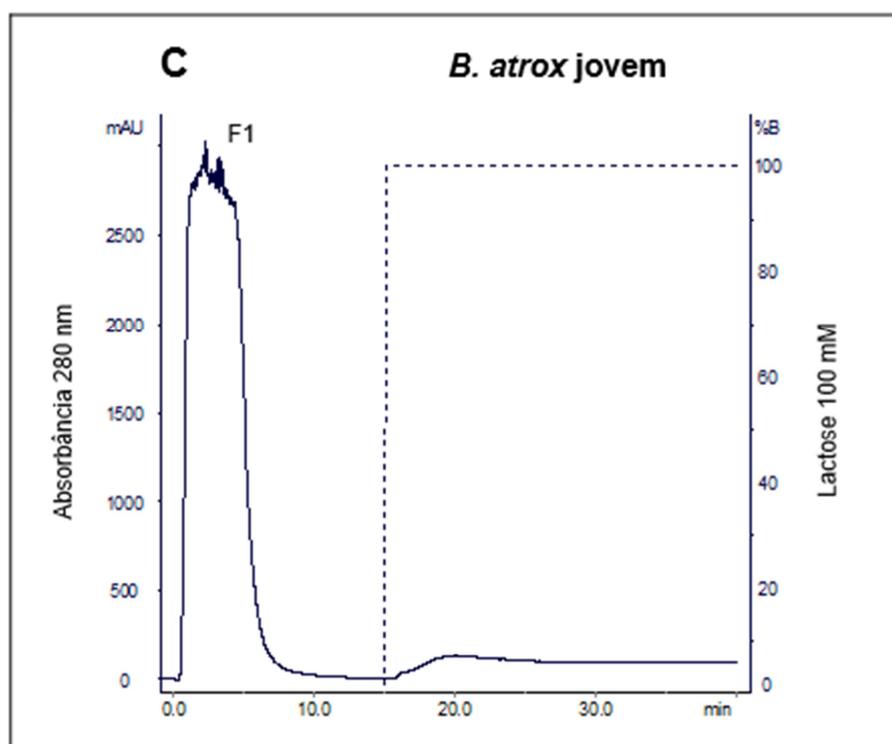
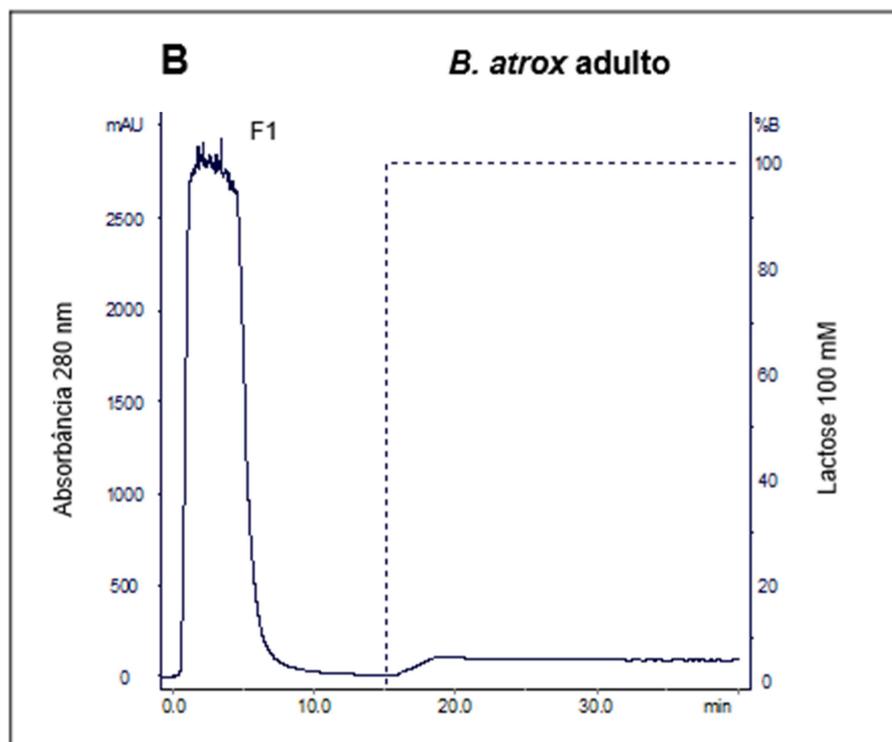
4.2 Purificação e caracterização bioquímica das proteínas isoladas

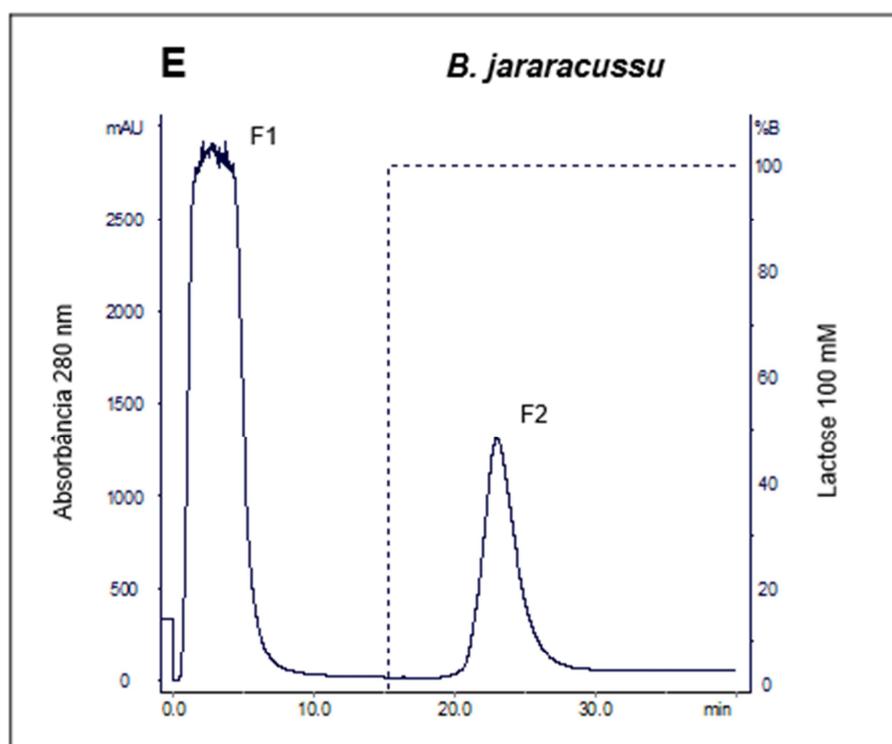
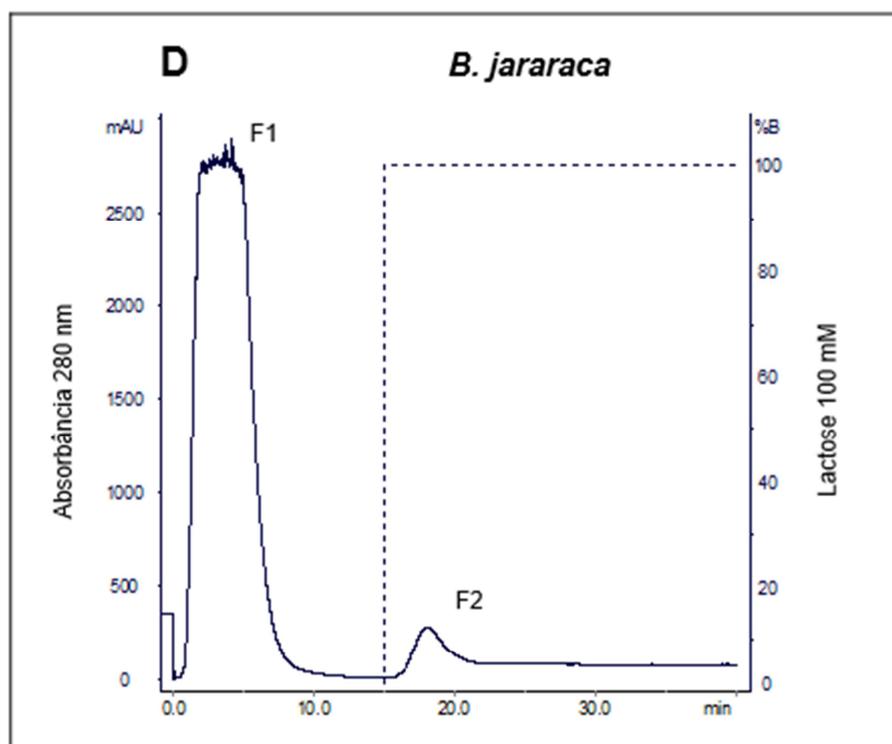
Os venenos que ao serem incubados com lactose perderam a total ou parcial capacidade de aglutinar hemácias (*B. asper*, *B. atrox* adulto, *B. atrox* jovem, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus* e *B. mattogrossensis*^(B)) foram selecionados para fracionamento em coluna de afinidade agarose-lactose.

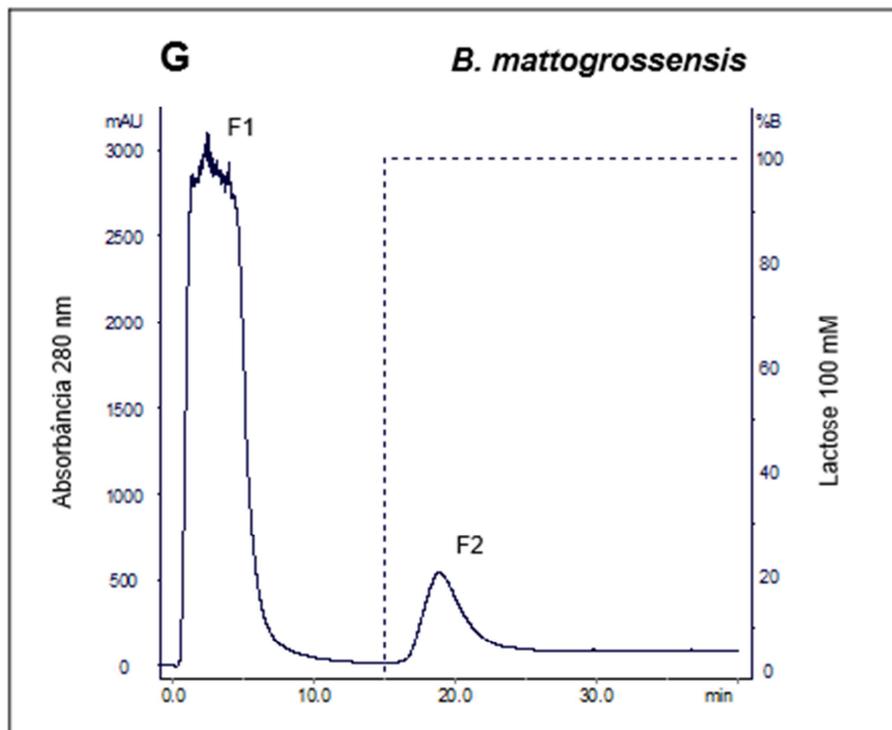
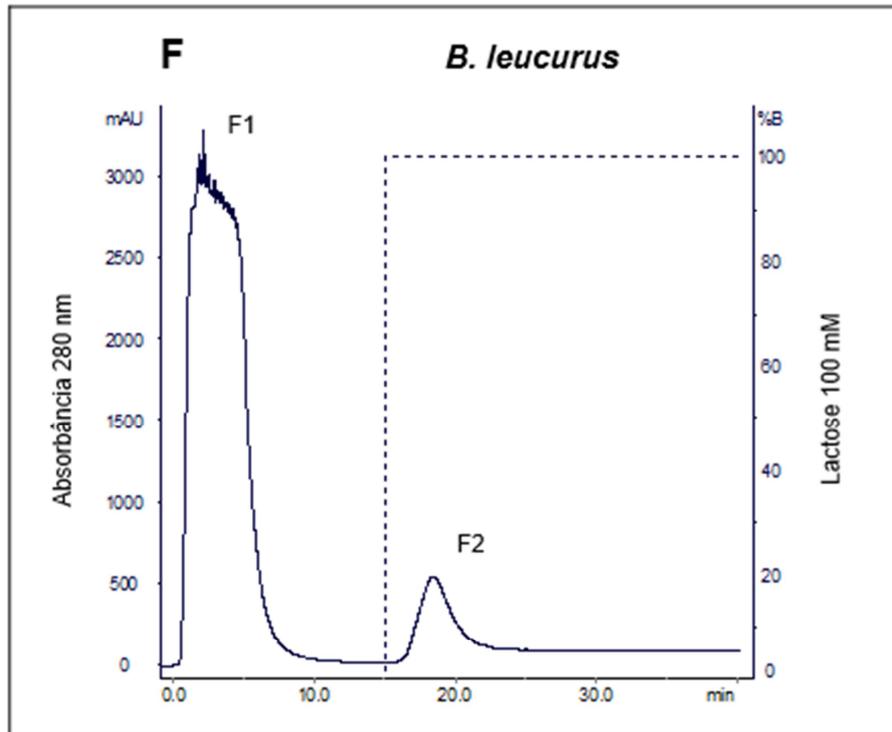
Os perfis cromatográficos obtido para os venenos de *B. asper*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus* e *B. mattogrossensis*^(B), revelaram duas frações que foram nomeadas como F1 e F2 (**Fig. 4A, D, E, F e G**). Os cromatogramas dos venenos de *B. atrox* adulto e *B. atrox* jovem apresentaram somente F1 (**Fig. 4B-C**). Considerando as características da coluna utilizada para o fracionamento, pode-se afirmar que F2 é a fração com atividade de lectina. Sendo esse dado posteriormente confirmado por meio dos experimentos, apresentados ao longo desse trabalho.

Figura 4: Perfil cromatográfico em coluna de afinidade agarose-lactose





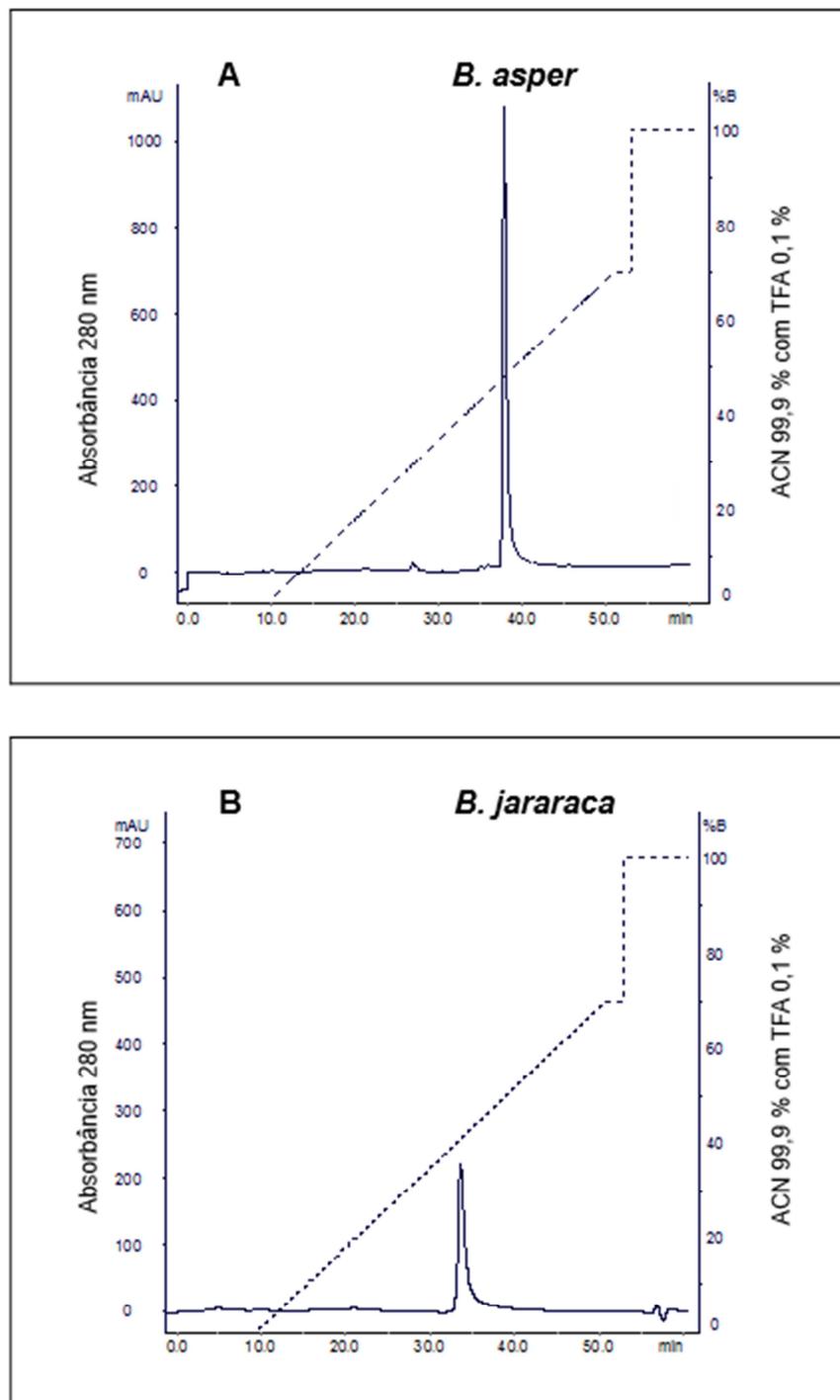


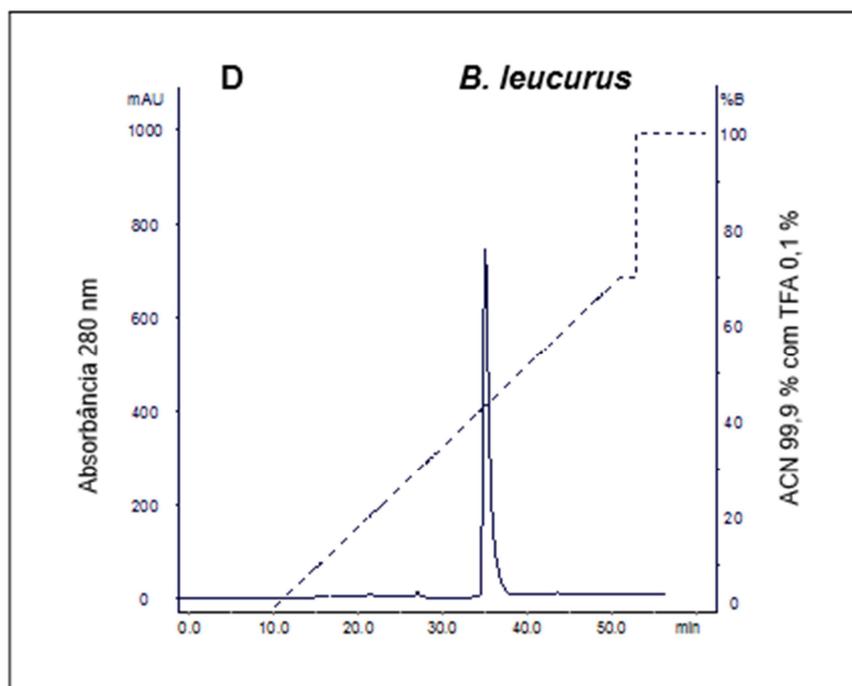
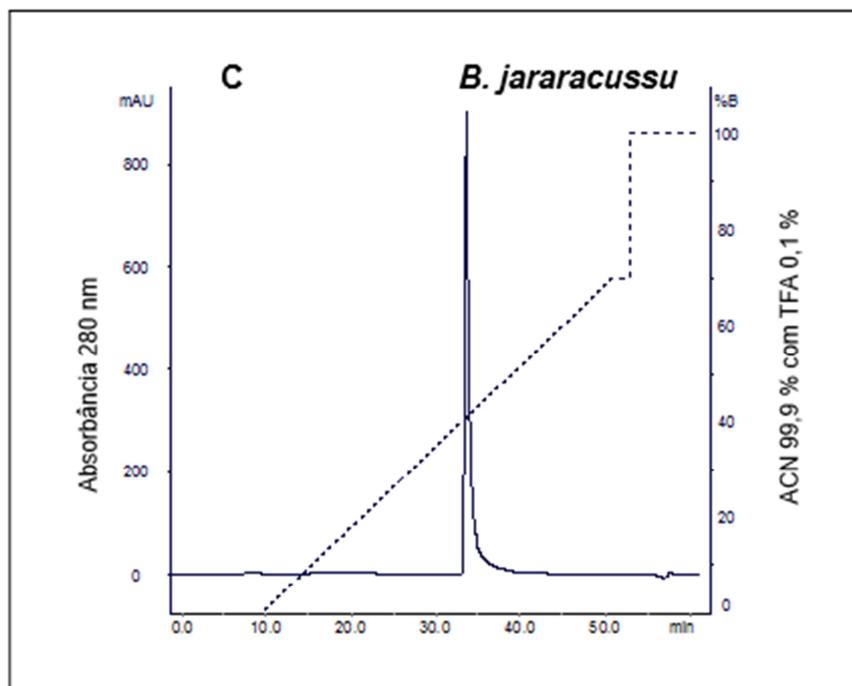


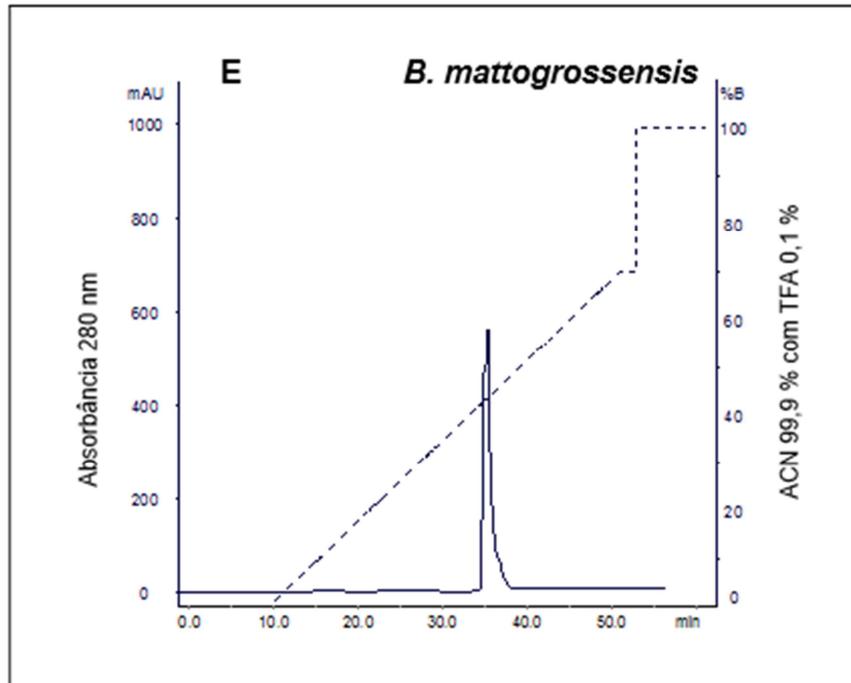
Cromatografia em coluna de agarose lactose (3 cm x 1 cm) equilibrada com tampão CTBS pH 7.4 dos venenos botrópicos que tiveram nenhuma ou pouca atividade hemaglutinante na presença de lactose. A cromatografia iniciou-se com um fluxo contínuo a 1 mL/min. do mesmo tampão de equilíbrio até que todo o material não retido na coluna (F1) atingisse o nível basal de absorbância lido em 280 nm. A fração contendo lectina (F2) foi obtida aplicando-se uma concentração de 100 % do tampão de lactose (100 mM) em CTBS pH 7.4. (A) *B. asper*, (B) *B. atrox* adulto, (C) *B. atrox* jovem, (D) *B. jararaca*, (E) *B. jararacussu*, (F) *B. leucurus*, (G) *B. mattogrossensis*^(B).

As frações nomeadas como F2 obtidas na cromatografia de afinidade (**Fig. 4A, D, E, F e G**) foram liofilizadas, ressuspendidas em 1 mL de TFA 0,1 % e aplicadas a cromatografia de fase reversa em coluna C18. Para melhorar o grau de pureza, todas as amostras foram recromatografadas nas mesmas condições, sendo obtido para cada um dos venenos, uma fração única ativa para atividade de lectina, conforme apresentado na **Figura 5**.

Figura 5: Cromatografia de fase reversa em coluna C18







Cromatografia em coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4.3 cm) equilibrada com solução de TFA 0,1% das frações nomeadas como F2 obtidas na cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose. Utilizou-se um gradiente de eluição linear de 0-70% de acetonitrila 99,9% em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/min. e níveis de absorbância lidos em 280 nm. **(A)** *B. asper*, **(B)** *B. jararaca*, **(C)** *B. jararacussu*, **(D)** *B. leucurus*, **(E)** *B. mattogrossensis*^(B)

Os procedimentos de purificação das lectinas tipo C podem ser conduzidos em uma única etapa utilizando cromatografia de afinidade, como no caso da trombolectina, BjL e BjcuL obtidas respectivamente dos venenos de *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Para a obtenção da trombolectina foi utilizado uma coluna de Asialofetuin Sepharose-4B eluída com 50 mM de lactose em tampão Tyrode pH 7.4 (GARTNER; STOCKER; WILLIAMS, 1980). A lectina de *B. jararaca* (BjL) foi isolada por meio de uma coluna TDG-Epoxy Sepharose 6B com 100 mM de lactose em tampão CTBS pH 7.5 (OZEKI et al., 1994). Esse mesmo tampão de eluição foi utilizado para obter a BjcuL, lectina de *B. jararacussu* em uma coluna de afinidade imobilizada com D-galactose (CARVALHO et al., 1998a).

Alguns pesquisadores empregam cromatografia de gel filtração após a afinidade, com o fim de retirar o carboidrato do tampão retido na amostra, como por exemplo Guimarães-Gomes e colaboradores (2004) que para obter a lectina de *B. insularis* (BiL) primeiro usaram uma coluna TDG-Epoxy Sepharose eluída com 100 mM de lactose em tampão CTBS pH 7.5 seguida por cromatografia de gel filtração em coluna Superdex G-75 equilibrada com tampão CTBS. MENDONÇA-FRANQUEIRO e colaboradores (2011) que do veneno de *B. atrox* isolaram uma lectina homóloga a Aspercetin, denominada de Galatrox por meio de uma coluna de afinidade Lactosil-Sepharose utilizando 100 mM de lactose em tampão PBS pH 7.4, seguido de gel filtração em coluna PD-10 equilibrada com PBS pH 7.4. Para verificar a homogeneidade, a lectina isolada foi aplicada a cromatografia de fase reversa em coluna Shodex ODP-50. Castanheira e colaboradores (2013), realizaram uma cromatografia de afinidade em coluna de agarose imobilizada com D-galactose, eluída com tampão CTBS pH 7.4 com 100 mM de lactose, seguida de uma G-25 equilibrada com AMBIC 0.1 M pH 7.8 e por último fase reversa em coluna C2C18 para obter a lectina de *B. pauloensis* (BpLec).

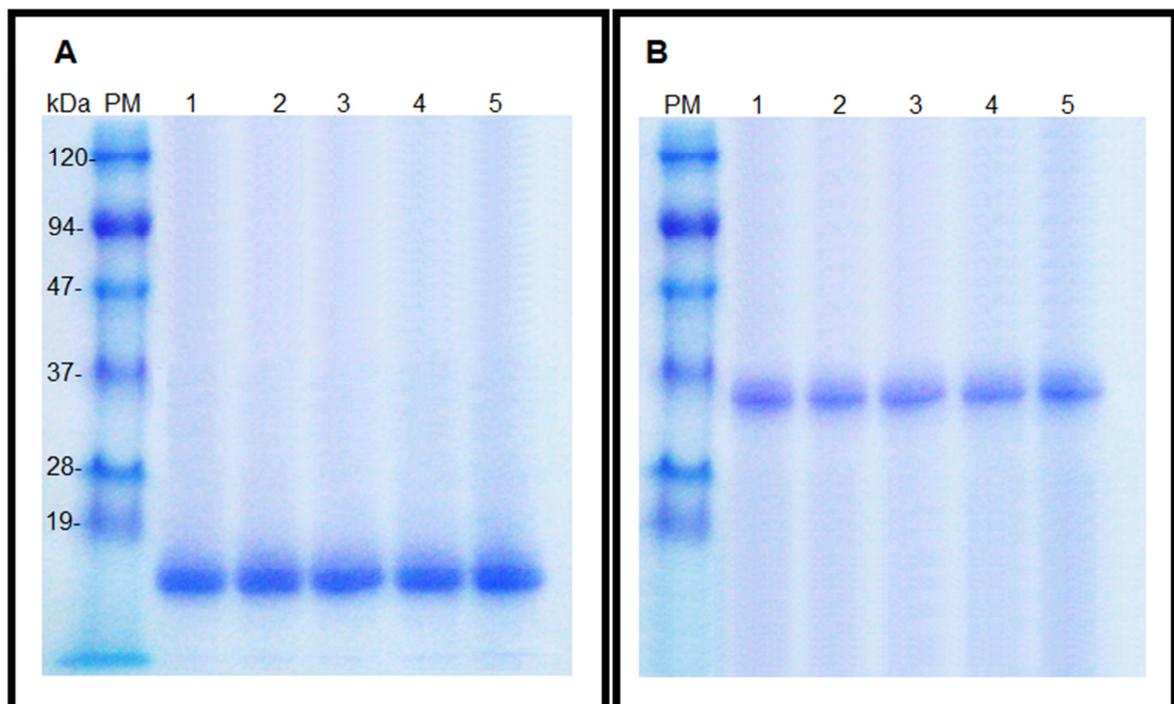
Embora a maioria das lectinas tipo C de venenos de serpentes sejam obtidas por meio de cromatografia de afinidade, Havt e colaboradores (2005) e Braga e colaboradores (2006), iniciaram seus experimentos com gel filtração em coluna Superdex 75. Segundo os autores, essa estratégia permite recuperar outros componentes importantes presentes no veneno, além do que a matrix da Superdex é baseada em polímeros de dextrano e agarose que tem alguma afinidade com as lectinas do veneno e a fração com atividade de lectina obtida da gel filtração quando

aplicada a afinidade possibilita uma melhor purificação com menos contaminação por glicoproteína. As lectinas obtidas por essa metodologia foram respectivamente BpL de *B. pirajai* e BiL de *B. insularis*.

A metodologia de purificação das lectinas de venenos botrópicos utilizadas nesse trabalho, foram eficientes para os venenos de *B. asper*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus* e *B. mattogrossensis*^(B), mas não para os venenos de *B. atrox* adulto e *B. atrox* jovem. Mas, como observado no ensaio de inibição do potencial hemaglutinante na presença de carboidrato, as amostras de *B. atrox* adulto e *B. atrox* jovem não demonstraram afinidade expressiva por lactose. É possível que as lectinas das amostras não tenham se ligado ao carboidrato da resina da coluna utilizada (agarose-lactose), sendo dessa forma eluída com todas as outras moléculas do veneno em uma fração única, como demonstrado nas **Figuras 4B e 4C**.

As cinco frações obtidas por meio da cromatografia de fase reversa em coluna C18, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %. A **Figura 6A** mostra o padrão eletroforético das moléculas na presença de agente redutor (DTT), observando-se bandas proteicas com peso molecular abaixo de 19 kDa, enquanto que na **Figura 6B** é apresentado o padrão eletroforético das mesmas moléculas na ausência de DTT e peso molecular abaixo de 37 kDa. Esse perfil pode ser comparado as lectinas tipo C isoladas de venenos botrópicos que variam entre 14.5 kDa a 16.2 kDa quando analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida acrescida de agentes redutores e de 26.3 kDa a 30 kDa na ausência destes, sendo condizente com proteínas que apresentam caráter dimerico ligados por pontes dissulfeto (GARTNER; STOCKER; WILLIAMS, 1980; OZEKI et al., 1994; CARVALHO et al., 1998b; HAVT et al., 2005; BRAGA et al., 2006; NUNES et al., 2011).

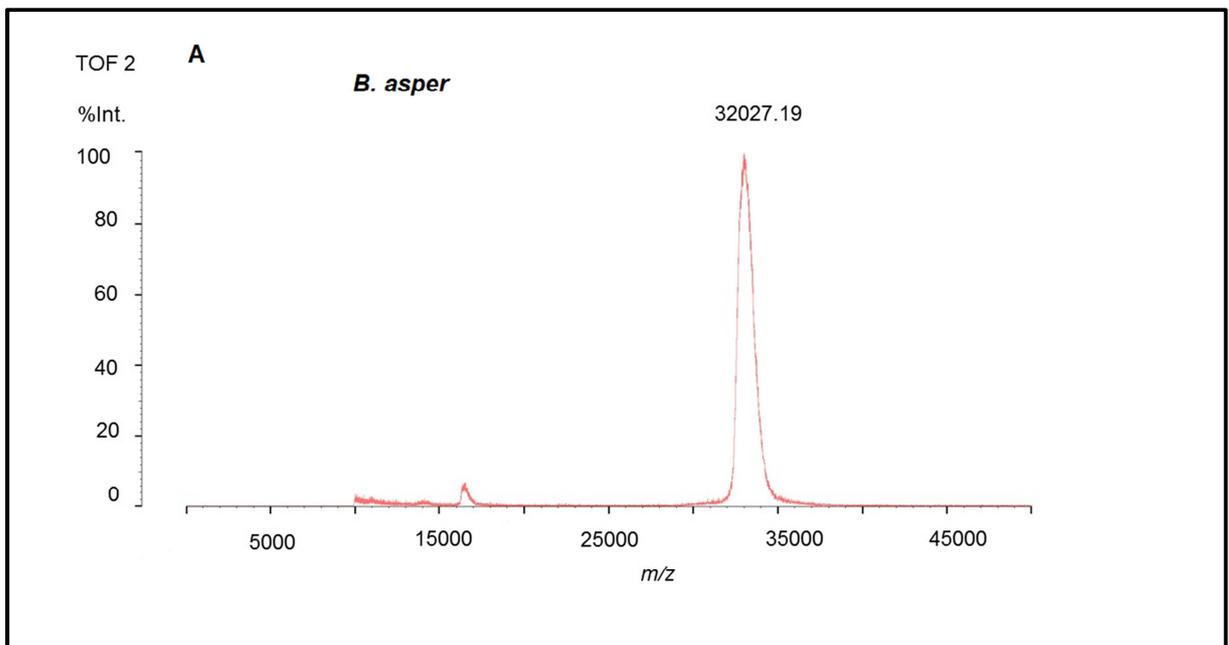
Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e não redutoras

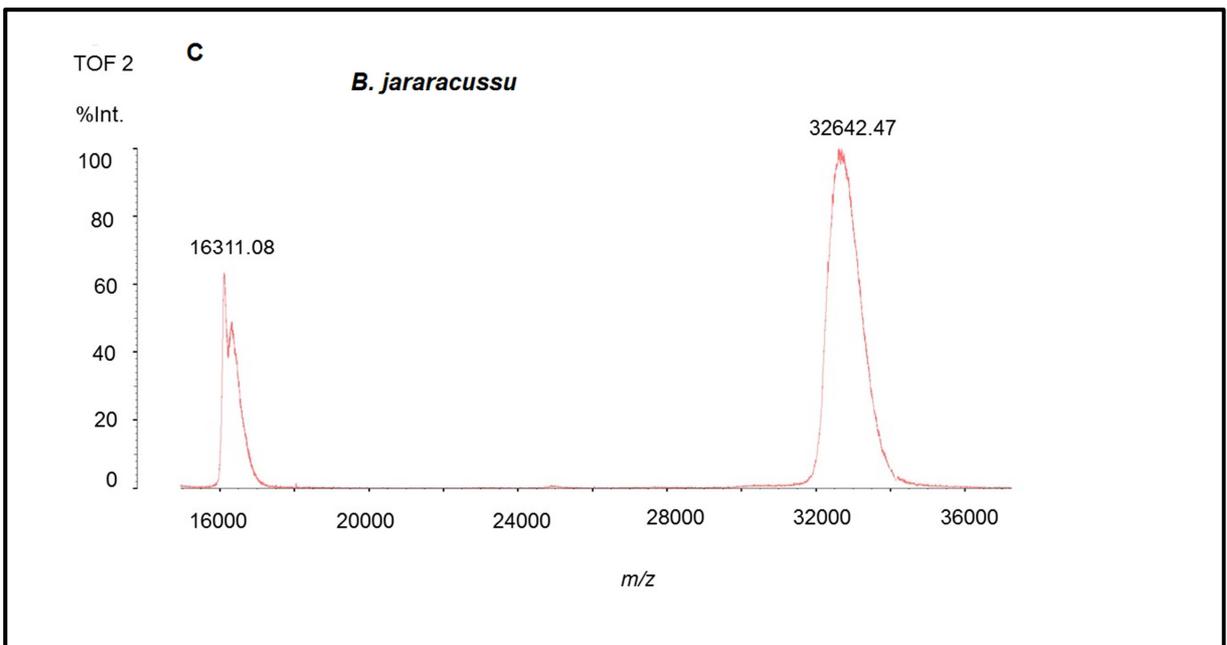
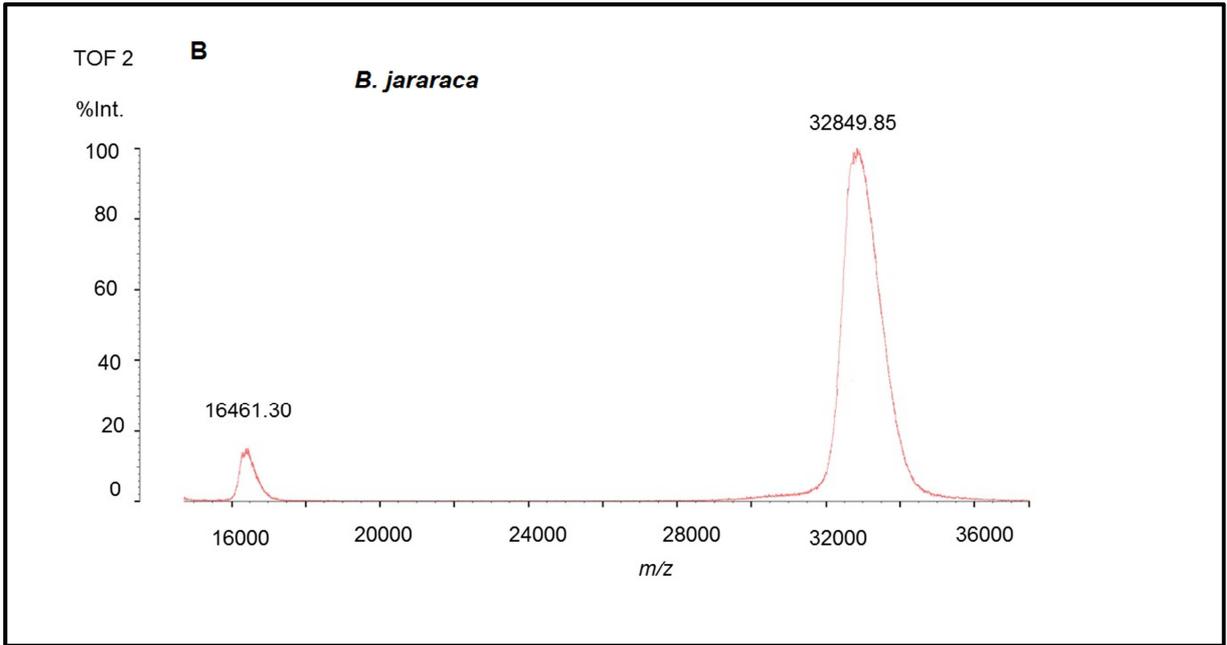


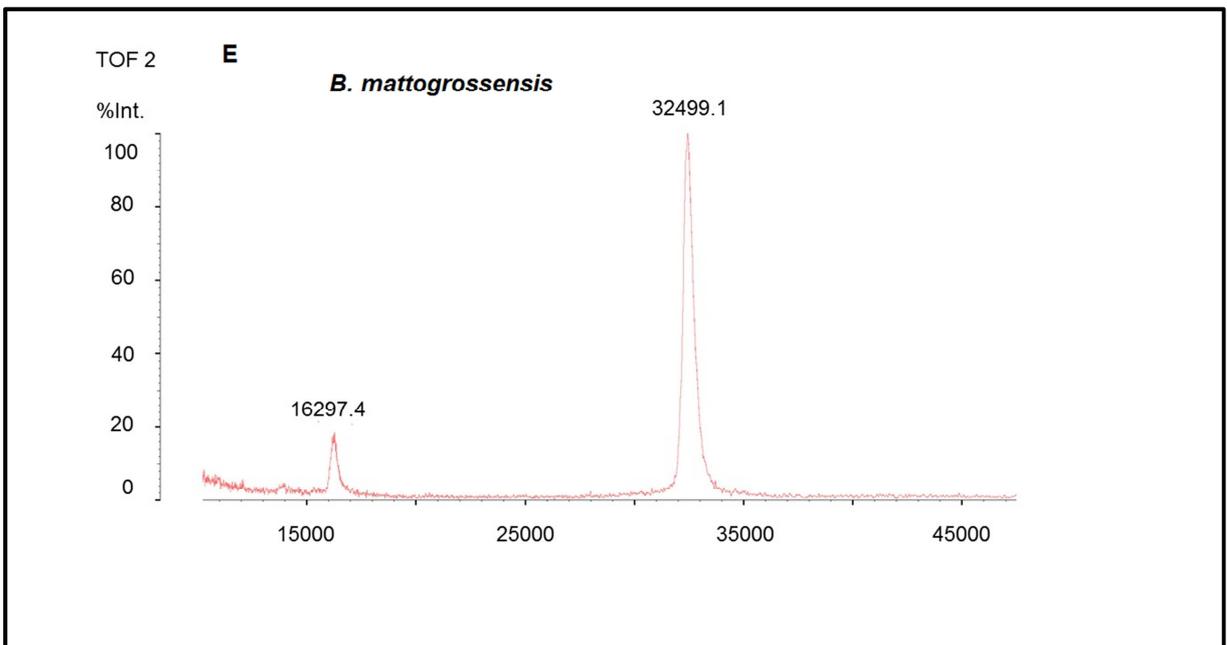
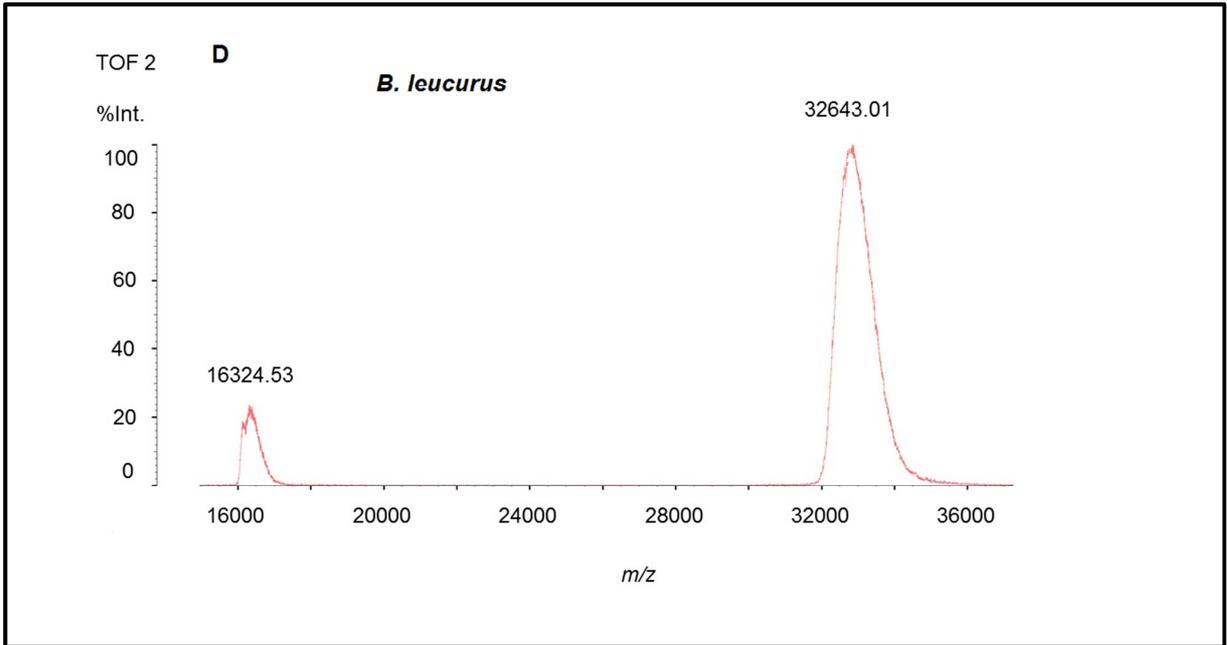
Gel de poliacrilamida 12,5 %. **A)** com DTT, **B)** sem DTT; PM – Padrão de peso molecular; 1 – lectina de *B. jararacussu*, 2 – lectina de *B. jararaca*, 3 – lectina de *B. mattogrossensis*^(B), 4 – lectina de *B. leucurus*, 5 – lectina de *B. asper*.

A análise por espectrometria de massa foi realizada pela técnica de ionização por MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*), dois picos com razão massa/carga foram gerados para cada espectro, sendo um referente ao íon com dupla carga e o segundo referente ao íon com apenas uma carga. Os valores de m/z obtidos foram similares para as cinco amostras analisadas (**Fig. 7**). Resultados parecidos com os aqui apresentados foram apontados por Castanheira e colaboradores (2013), Guimarães-Gomes e colaboradores (2004) e Mendonça-Franqueiro e colaboradores (2011) para as seguintes lectinas: BiL, Galatrox e BpLec que demonstraram respectivamente massa carga de 32,372 Da, 32,549 Da e 33.600 Da.

Figura 7: Determinação da massa molecular por espectrometria de massa em MALDI-TOF







Dois picos com razão massa/carga foram gerados para cada espectro, sendo um referente ao íon com dupla carga e o segundo referente ao íon com apenas uma carga. **(A)** *B. asper*: 32027.19 m/z; **(B)** *B. jararaca* - 32849.85 m/z, 16461.30 z; **(C)** *B. jararacussu* - 32642.47 m/z, 16311.08 z; **(D)** *B. leucurus* - 32643.01 m/z, 16324.53 z; **(E)** *B. mattogrossensis*^(B) - 32499.1 m/z, 16297.4 z.

4.3 Estrutura primária

Para a obtenção dos resíduos de aminoácidos das moléculas isoladas dos venenos de *B. leucurus* e *B. asper*, utilizou-se a junção de duas metodologias: fragmentação peptídica por dissociação induzida por colisão em espectrômetro de massa LCMS-IT-TOF e degradação química de Edman. Para a proteína isolada do veneno de *B. mattogrossensis*^(B) somente a primeira metodologia foi utilizada. As lectinas obtidas dos venenos de *B. jararacussu* e *B. jararaca*, denominadas respectivamente de BjcuL e BjL, possuem sequenciamento completo descrito na literatura e depositado em banco de dados, por esse motivo não foram submetidas a esse ensaio.

Por degradação química de Edman foram obtidos os primeiros 26 aminoácidos da sequência N-terminal da lectina de *B. leucurus* e os 54 primeiros aminoácidos da lectina de *B. asper* (**Quadro 5**).

Quadro 5: Sequenciamento N-terminal das lectinas de venenos de *B. leucurus* e *B. asper*

(A) Sequenciamento N-terminal dos 26 primeiros aminoácidos da lectina de <i>B. leucurus</i>					
01	10				
NNCPQDWLPMNGLCYKIFNELKAWKD					
N-terminal					
(B) Sequenciamento N-terminal dos 54 primeiros aminoácidos da lectina de <i>B. asper</i>					
01	10	20	30	40	50
NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWEDAEMFCRKYKPGCHLASIHLYQESLEIAEY					
N-terminal					

A lectina de *B. leucurus* (BIL), descrita por Nunes e colaboradores (2011), não havia sido relatada até a presente data, quanto a sua estrutura primária, sendo este trabalho o primeiro a relatar fragmentos de aminoácidos para a molécula. As lectinas obtidas dos venenos de *B. asper* e *B. mattogrossensis*^(B), são inéditas para a espécie e foram nomeadas respectivamente de BaLec e BmL.

Por LCMS-IT-TOF foram obtidos cinco peptídeos para BIL, dois peptídeos para BaLec e treze peptídeos para BmL. Correspondentes aos aminoácidos nas posições 17-25 e 117-135 (BIL); 17-22 e 127-135 (BaLec); 17-25, 27-31, 85-102 e 117-135 (BmL) (Dados não apresentados). Os aminoácidos das posições 17-25 de BIL e 17-22 de BaLec se sobrepõem aos obtidos com a metodologia de Degradação Química de Edman, sendo observado que os fragmentos apresentados são bem conservados para as três lectinas. No **Quadro 6C**, destaca-se a tríade QPD nas posições 96-98, correspondente ao sítio de ligação ao carboidrato, característico das lectinas de venenos ofídicos.

Com o objetivo de verificar a similaridade entre os resíduos de aminoácidos obtidos para as lectinas isoladas neste trabalho e outras lectinas de venenos ofídicos, os fragmentos obtidos tanto por Degradação química de Edman quanto por LCMS-IT-TOF para BmL, BIL e BaLec, foram agrupados, manualmente alinhados e comparados com as lectinas obtidas de venenos das seguintes espécies: RsL- *Crotalus atrox* (HIRABAYASHIS; KUSUNOKI; KASAI, 1991), ApL- *Agkistrodon piscivorus* (KOMORI; NIKAI; TOHKAI, 1999), BaL- *Bitis arietans* (NIKAI et al., 1995), CrL- *Crotalus ruber* (HAMAKO et al., 2007), BiL- *Bothrops insularis* (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004), BpLec- *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2012), BJcuL- *Bothrops jararacussu* (KASSAB et al., 2004), BpL- *Bothrops pirajai* (HAVT et al., 2005), LmsL- *Lachesis muta stenophrys* (ARAGÓN-ORTIZ; MENTELE; AUERSWALD, 1996). Os resultados mostraram importantes características estruturais conservadas (**Quadro 7**).

Quadro 6: Sequenciamento de aminoácidos dos fragmentos peptídicos

(A) Sequência de aminoácidos dos fragmentos peptídicos de BIL						
01	10	20	30	40	50	
-----IFNELKAWK-----						
51	60	70	80	90	100	

101	110	120	130			
-----LWNDQVCE SKNAFLCQCKF						
(B) Sequência de aminoácidos dos fragmentos peptídicos de BaLec						
01	10	20	30	40	50	
-----IFDELK-----						
51	60	70	80	90	100	

101	110	120	130			
-----NAFLCQCKF						
(C) Sequência de aminoácidos dos fragmentos peptídicos de BmL						
01	10	20	30	40	50	
-----IFNELKAWK-EMFCR-----						
51	60	70	80	90	100	
-----SCTDYLSWDKNQPDHY						
101	110	120	130			
QNK-----LWNDQVCE SKNAFLCQCKF						

Quadro 7: Alinhamento múltiplo das sequência N-terminal de aminoácidos entre as lectinas BmL, BIL, BaLec e outras lectinas de venenos ofídicos

	01	10	20	30	40	50	60	70
BmL	-----IFNELKAWK--EMFCR-----							
BIL	NNCPQDWLPMNGLCYKIFNELKAWKD-----							
BaLec	NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWEDAEMFCRKYKPGCHLASIHLYQESLEIAEY-----							
BiL	NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWKDAEMFCRKYKPGCHLASFHLYGESPEIAEYISDYHKQSEVWIGL							
BjcuL	NNCPQDWLPMNGLCYKIFNELKAWKDAEMFCRKYKPGCHLASIHLYGESPEIAEYISDYHKQSEVWIGL							
BjL	NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWKDAEMFCRKYKPGCHLASFHLYGESPEIAEYISDYHKQAEVWIGL							
BpL	NNCPGDWLPNGLCYKIFNELKAWEDAEMFCRKYKPGCHLASIHLYGESLEIAEYISDYHKQAEVWIGL							
BpLec	NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWKDAEMFCRKYKPGCHLASIHLYGESPEIAEYISDYHKQSEVWIGL							
Galatrox	NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWKDAEMFCRKYKPGCHLASIILYGESPEWAE-----GHSEVWLGL							
ApL	NNCPHDWLPNGLCYKIFDELKAWEDAERFCRKYKPGCHLASFHLYGESLEIAEYISDYHKQAEVWIGL							
BaL	NNCPDWLPMNGLCYKIFDELKAWEDAERFCRKYKPGCHLASFHLYGESLEIAEYISDYHKQAEVWIGL							
LmL	NNCPQDWLPMNGLCYKIFDEQKAWEDAEMFCRKYKPGCHLASFHRYGESLEIAEYISDYHKQAEVWIGL							
CrL	NNCPDWLPMNGLCYKIFNQLKTWEDAEMFCRKYKPGCHLASFHLYGESLEIAEYISDYHKQDNVWIGL							
RsL	NNCPDWLPMNGLCYKIFNQLKTWEDAEMFCRKYKPGCHLASFHRYGESLEIAEYISDYHKQENVWIGL							
	1	1	2	3				
	**** *****: : *:*:*****: * * * ***** :*****							
	71	80	90	100	110	120	130	
BmL	-----SCTDYLSWDKNQPDHYQNK-----LWNDQVCESKNAFLCQCKF							
BIL	-----LWNDQVCESKNAFLCQCKF							
BaLec	-----NAFLCQCKF							
BiL	WDKKKDFSWEWTDRSCTDYLSWDKNQPDHYQNKFCVELVSDTGYRLWNDQVCESKNAFLCQCKF							
BjcuL	CDKKKDFSWEWTDRSCTDYLSWDKNQPDHYQNKFCVELVSDTGYRLWNDQVCESKNAFLCQCKF							
BjL	WDKKKDFSWEWTDRSCTDYLTWDKNQPDHYEGKEFCVELVSLTGYRLWNDQVCESKNAFLCQCKF							
BpL	WDKKKDFSWEWTDRSCTDYLSWDKNQPDHYENKEFCVELVSLTGYRLWEDQVCESKNAFLCQCKF							
BpLec	WDEKKDFSWEWTDRSCTDYLSWDKNQPDHYKNKEFCVELVSYTGYRLWNDQVCESKNAFLCQCKF							
Galatrox	WDKKKDFSWEWTDRE-----							
ApL	WDKKKDFSWEWTDRSCTDYLTWDKNQPDVYQNKFCVELVSLTGYRLWNDQVCESKNAFLCQCKF							
BaL	WDKKKDFSWEWTDRSCTDYLTWDKNQPDHYQNKFCVELVSLTGYRLWNDQVCGSKNAFLCQCKF							
LmL	WDKKKDFSWEWTDRSCTDYLTWDKNQPDHYEGKEFCVELVSLTGYRLWNDQVCESKNAFLCQCKF							
CrL	WDKKKDFSWEWTDRSCTIDYLNWNKNQPDHYKNKEFCVELVSLSGYRLWNDQVCESKDAFLCQCKF							
RsL	RDKKKDFSWEWTDRSCTDYLTWDKNQPDHYQNKFCVELVSLTGYRLWNDQVCESKDAFLCQCKF							
				4	4	2	3	
	*:***** *:*:***** * ***** *****:*****							

Múltiplo alinhamento da sequência parcial de aminoácidos das lectinas de *B. mattogrossensis*^(B) (BmL), *B. leucurus* (BIL) e *B. asper* (BaLec) com outras lectinas de venenos de serpentes. BiL – *B. insularis* (GI: 82126834), BjcuL – *B. jararacussu* (GI: 519668669), BjL – *B. jararaca* (GI: 510120743), BpL – *B. pirajai* (GI: 510120660), BpLec – *B. pauloensis* (GI: 527504051), Galatrox – *B. atrox* (GI: 527525181), ApL – *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (GI: 510120659), BaL – *Bitis arietans* (GI: 34922645), LmsL - *Lachesis muta stenophrys* (GI: 1881829), CrL – *Crotalus ruber ruber* (GI: 118572769), RsL – *Crotalus atrox* (GI: 126130). Aminoácidos totalmente conservados (*); Aminoácidos similares (:). Em verde o domínio de reconhecimento de hidratos de carbono (CRD); Cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto são destacadas em vermelho; Os números em vermelho indicam as ligações dissulfetos entre as cisteínas.

Rucavado e colaboradores (2001) isolaram uma lectina do veneno de *B. asper*, essa lectina denominada de Aspercetin um mediador da agregação plaquetária e não aglutina eritrócitos em contraste com as lectinas tipo C de venenos de serpentes. De acordo com a classificação proposta por Clemetson e colaboradores (2008), Aspercetin é uma Snaclec. Do mesmo veneno, foi isolado nesse trabalho uma lectina denominada de BaLec. Para demonstrar que BaLec e Aspercetin são proteínas distintas, o sequenciamento N-terminal de ambas foram alinhados e analisados por meios da ferramenta de busca e alinhamento BLAST. Os resultados apontaram um grau de similaridade menor que 45% demonstrando de fato tratar-se de proteínas divergentes entre si (**Quadro 8**).

Quadro 8: Alinhamento múltiplo das sequências N-terminais das cadeias α e β de Aspercetin e BaLec

	1	10	20	30	40	Identidade (%)																																									
BaLec	N	C	P	Q	D	W	L	P	M	N	G	L	C	Y	K	I	F	D	E	L	K	A	W	E	D	A	E	M	F	C	R	K	Y	K	P	G	C	H	L	A	S	I	H	L	Y	Q	E
Aspercetin cadeia α	D	C	P	S	G	W	S	S	Y	E	G	H	C	Y	R	F	F	H	P	P	K	D	W	A	D	A	E	R	F	C	T	E	Q	A	K	G	G	A	L	V	S	I	Q	R	F	G	E
Aspercetin cadeia β	D	C	P	S	D	W	S	S	Y	E	G	H	C	Y	R	V	F	K	P	P	K	D	W	A	D	A	E	R	F	C	S	Q	Q	A	K	G	G	H	L	V	S	I	E	R	F		

Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos de BaLec com as cadeias α (GI: 374110681) e β (GI: 374110656) de Aspercetin. O sequenciamento foi realizado utilizando o programa de busca alinhamento Blast. Em vermelho estão representados os resíduos idênticos.

4.4 Caracterização funcional e biológica

Várias concentrações das cinco lectinas purificadas foram incubadas com eritrócitos humanos. Após três horas à temperatura ambiente observou-se que a dosagem mínima de 2,5 µg/mL de BjL, BjcL, BIL e BmL foi capaz de manter a atividade de aglutinação. Diferente das demais lectinas BaLec necessitou de uma concentração de 15 µg/mL para exercer o mesmo efeito.

Definida a dosagem mínima hemaglutinante, o próximo passo experimental teve por objetivo verificar a afinidade das lectinas isoladas por diferentes carboidratos (frutose, arabinose, manose, galactose, sacarose, fucose, lactose), bem como observar se haveria variação da atividade na presença de um agente redutor (DTT), um quelante de íons (EDTA) e de uma glicoproteína (caseína). Os resultados mostraram que BaLec, BjL, BIL e BmL têm afinidade por frutose, lactose, manose e sacarose. Nas soluções contendo BmL incubadas com arabinose e maltose e nas soluções contendo BjcL incubadas com frutose e manose observou-se uma aglutinação parcial das hemácias, sugerindo que a ligação entre estas lectinas e os respectivos carboidratos possa tratar-se de uma fraca interação. Entre todos os carboidratos testados, BjcL demonstrou boa afinidade somente por lactose. Não observou-se atividade hemaglutinante na presença de caseína, demonstrando que as lectinas podem ligar-se a proteínas glicosadas.

No ensaio de caracterização da atividade funcional verificou-se que a capacidade de aglutinar hemácias foi anulada frente ao agente redutor DTT e ao quelante de íons EDTA, demonstrando que tanto a forma dimerica como a presença de Ca^{+2} são necessários para a interação proteína/carboidrato.

O **Quadro 9** resume os dados obtidos no ensaio.

Quadro 9: Ensaio de inibição da hemaglutinação por diferentes carboidratos, glicoproteína, quelante de íons e agente redutor

Carboidratos	Lectinas				
	BaLec	BjL	BjcuL	BIL	BmL
Arabinose	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○
Frutose	○●○	○●○	○●○	○●○	○●○
Fucose	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
Galactose	●●●	●●●	●●●	●●●	●●●
Lactose	○●○	○●○	○●○	○●○	○●○
Maltose	●●●	●●●	●●●	●●●	○●○
Manose	○●○	○●○	○●○	○●○	○●○
Sacarose	○●○	○●○	●●●	○●○	○●○
Caseína	○●○	○●○	○●○	○●○	○●○
DTT	○●○	○●○	○●○	○●○	○●○
EDTA	○●○	○●○	○●○	○●○	○●○



Inibição da atividade hemaglutinante.



Não inibição da atividade hemaglutinante.

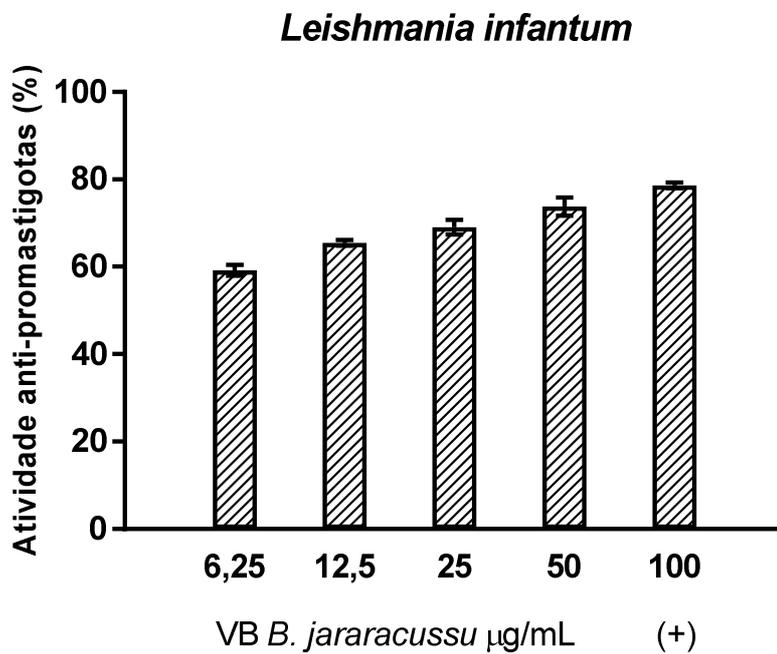
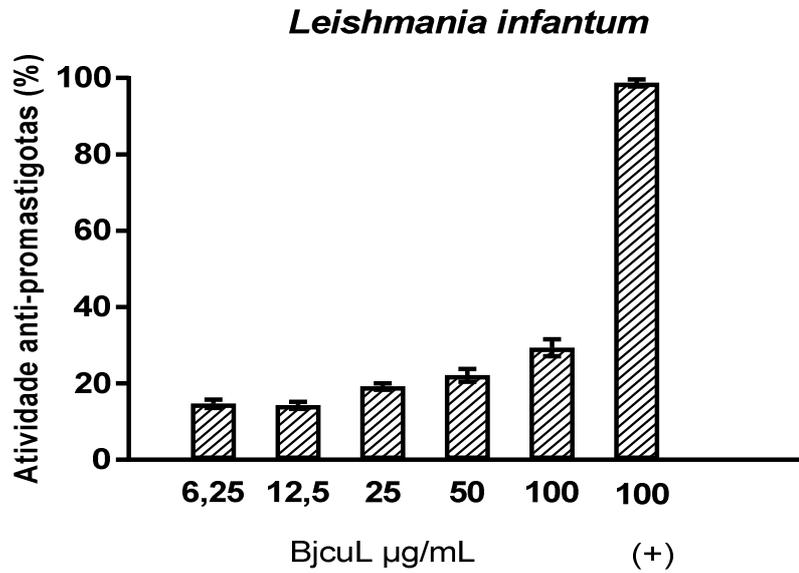


Pouca inibição da atividade hemaglutinante.

Entre as lectinas tipo C de venenos de serpentes, BjcUL é a que tem seus efeitos biológicos mais bem estudados e descritos na literatura, sendo capaz de inibir a formação de biofilme por agentes patogênicos envolvidos na mastite bovina incluindo diferentes estirpes de *Staphylococcus aureus*, *S. hycus*, *S. chromogenes*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* (KLEIN et al., 2015), promover edema e permeabilidade vascular em camundongos (PANUNTO et al., 2006) e atuar sobre células humanas induzindo a ativação de neutrófilos (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011). Alguns pesquisadores têm observado que BjcUL pode ser potencialmente utilizada para terapias que envolvam linhagens tumorais por sua capacidade de induzir apoptose em células de adenocarcinoma de cólon humano e carcinoma gástrico (NOLTE et al., 2012; DE CASTRO DAMASIO et al., 2014) e suprimir a adesão e o crescimento de células tumorais endoteliais (DE CARVALHO et al., 2001). Com o propósito de verificar se BjcUL pode ser potencialmente ativa frente a protozoários causadores de doenças negligenciadas, avaliamos seus efeitos sobre formas promastigotas de *Leishmania infantum* e formas epimastigotas de *Tripanossoma cruzi*.

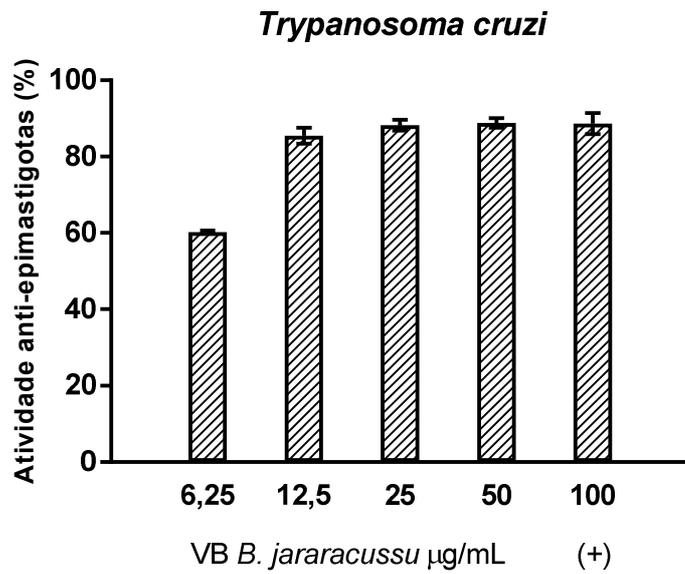
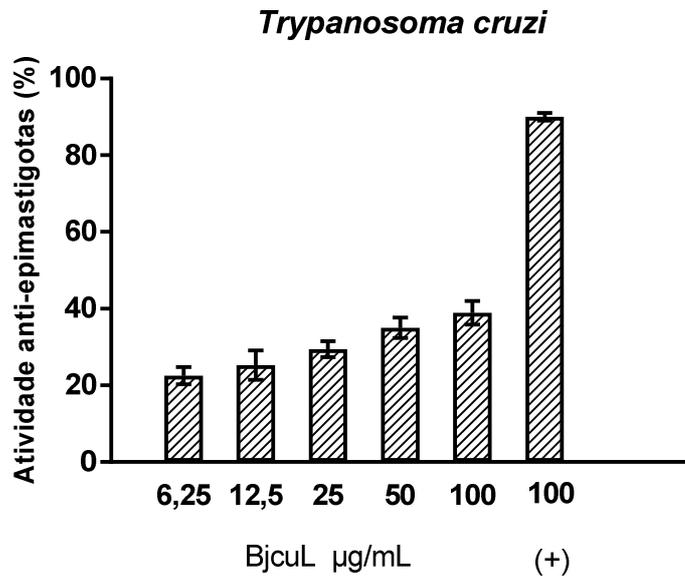
Utilizou-se no ensaio, tanto veneno bruto de *B. jararacussu* como a lectina isolada nas concentrações de 6,25 µg/mL a 100 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado Pentamidina para os testes com *Leishmania* e Benzonidazol para os testes com *Tripanossoma* ambos nas concentrações de 100 µg/mL. Os resultados mostraram que o veneno bruto na menor concentração foi capaz de inibir cerca de 60% do crescimento das cepas tanto de *L. infantum* quanto de *T. cruzi*. A concentração de 50 µg/mL do veneno bruto (metade do utilizado para o controle) atingiu um nível de inibição muito próximo ao observado com a Pentamidina, no ensaio com *L. infantum* (**Figura 8**). Para os testes com *T. cruzi* a concentração de 12,5 µg/mL do veneno bruto foi suficiente para exercer um efeito próximo ao observado com Benzonidazol (**Figura 9**). BjcUL, na sua concentração máxima (100 µg/mL), quando comparada aos controles, demonstrou uma inibição de 40% no crescimento de *T. cruzi* e menor que 40% no crescimento de *L. infantum*. De modo geral, observa-se que os efeitos tanto do veneno bruto de *B. jararacussu* quanto da lectina isolada são melhores frente a *T. cruzi* do que frente a *L. infantum*.

Figura 8: Ensaio leishmanicida



Atividade Leishmanicida com lectina de *B. jararacussu* frente a formas promastigotas de *Leishmania infantum*, nas concentrações de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$. Pentamidina na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada como controle positivo.

Figura 9: Ensaio tripanocida



Atividade tripanocida com lectina de *B. jararacussu* frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, nas concentrações de 6,25 µg/mL a 100µg/mL. Benzonidazol na concentração de 100µg/mL foi utilizada como controle positivo.

Castanheira e colaboradores (2015) observaram que BpLec, uma lectina obtida do veneno de *B. pauloensis*, foi capaz de inibir a replicação e adesão de *Toxoplasma gondii*, protozoário causador da toxoplasmose, uma doença negligenciada com altas taxas de infecção no Brasil, associada a morte em muitos casos (DUBEY et al., 2012). BpLec é descrita também por sua capacidade de inibir 50% do crescimento de uma bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) a uma concentração mínima de 31,25 µg/mL, mas não exerce nenhum efeito sobre Gram-negativa (*E. coli*) (CASTANHEIRA et al., 2013). Os autores sugerem que as lectinas não são capazes de atravessar a membrana externa das bactérias Gram-negativas e que a interação ocorre com os peptidoglicanos da parede celular de bactérias Gram-positivas. No mesmo trabalho, os autores observam que BpLec não foi citotóxico para formas promastigotas de *L. amazonensis*, no entanto 1 µg de BpLec foi suficiente para promover aglutinação dessas células que posteriormente forma inibidas por D-galactose e D-manose indicando que assim como ocorrido com as Gram-positivas, a interação entre a proteína e o parasita deve ocorrer por meio da interação entre o CRD da BpLec e alguns glicoconjugados presentes na superfície do parasita. São esses glicoconjugados que permitem a adesão do parasita à célula hospedeira. Outras lectinas citadas na literatura por promover a aglutinação de formas promastigotas de *Leishmania* (*L. chagasi*) foram isoladas das esponjas marinhas *Cinachyrella apion* (CaL) e *Cliona varians* (CvL). A capacidade das lectinas tipo C em aglutinar formas promastigotas de *Leishmania* sp. e não as amastigotas, fazem dessas proteínas uma potencial ferramenta para uso diagnóstico.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram utilizadas 16 amostras de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, coletadas no Brasil, Paraguai e Panamá, sendo consideradas de interesse aquelas que apresentassem atividade hemaglutinante inibida por lactose. O veneno das espécies *Bothrops asper*, *B. atrox* adulto, *B. atrox* jovem, *B. diporus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. mattogrossensis*^(B), *B. neuwiedi*, *B. urutu* apresentaram atividade hemaglutinante, sendo que apenas os venenos de *B. diporus*, *B. marajoensis*, *B. neuwiedi*, e *B. urutu* não foram inibidas por lactose.

Para isolamento das lectinas, foi utilizado cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose seguida de cromatografia em coluna C18 em sistema HPLC, sendo obtidas cinco lectinas em alto grau de pureza a partir dos venenos de *Bothrops asper* (BaLec), *B. jararaca* (BjL), *B. jararacussu* (BjcuL), *B. leucurus* (BIL) e *B. mattogrossensis*^(B) (BmL). Vale a pena ressaltar, que os venenos de *B. atrox* adulto e *B. atrox* jovem, apesar de apresentarem a capacidade hemaglutinante parcialmente inibida por lactose, não foi possível obter as lectinas com uso da estratégia adotada, (cromatografia de afinidade em coluna de agarose-lactose), sugerindo-se que as lectinas presentes na composição do veneno exibem baixa afinidade pelo carboidrato.

As lectinas BaLec, BjL, BjcuL, BIL, BmL apresentaram massa molecular aproximada de 23 a 24 kDa em SDS-PAGE sem adição de agente redutor, e 13 e 14 kDa com adição de agente redutor, sugerindo tratar-se de dois monômeros ligados por pontes dissulfeto. A análise por MALDI TOF demonstrou os seguintes valores de relação massa/carga: BaLec 32.027,18; BjL 32.849,84; BjcuL 32.642,46; BIL 32.643,00; e BmL 32.499,00.

As lectinas apresentaram atividade hemaglutinante mínima definida em 2,5 µg, exceto BaLec que necessitou de 15 µg para apresentar o mesmo resultado. Os efeitos da hemaglutinação foram inibidos por lactose, caseína, e EDTA, evidenciando dependência por íons Ca²⁺, característica das Lectinas do tipo C. Sendo que BaLec, BjL, BIL e BmL tiveram seu potencial de hemaglutinação inibidos ainda por frutose, manose, sacarose, enquanto BjcuL teve essa atividade parcialmente inibida por frutose e manose, mas não por sacarose. O uso de agente

reductor (DTT) inibiu com eficiência a capacidade hemaglutinante de todas as lectinas, com exceção de BIL, que foi parcialmente inibida.

Os testes de atividade biológicas das lectinas sobre do crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* e epimastigotas de *T. cruzi*, revelou baixa influência sobre o crescimento das células em cultura em comparação ao provocado pelo veneno bruto.

Referente a caracterização estrutural, foram obtidas as sequencias parciais dos resíduos de aminoácidos das lectinas de *B. leucurus* (BIL), *B. asper* (BaLec) e *B. mattogrossensis* (BmL) que apresentaram alta homologia com outras lectinas obtidas de venenos ofídicos. Este trabalho apresenta a caracterização parcial inédita da sequência de resíduos de aminoácidos das lectinas de *B. leucurus* (BIL), *B. asper* (BaLec) e *B. mattogrossensis* (BmL). Sendo que este é o primeiro registro de lectinas tipo-C cálcio dependente obtidas dos venenos de *B. asper* e *B. mattogrossensis*.

Pouco se sabe sobre o papel das lectinas tipo-C nos envenenamentos botrópicos, no entanto considerando as informações obtidas nas condições experimentais a que foram submetidas, observa-se que esta classe de proteínas apresentam-se como moléculas promissoras para o desenvolvimento de ferramentas de reconhecimento de carboidratos específicos expresso na superfície de diferentes modelos celulares.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of *concanavalin A* to cross-linked dextran gels. **The Biochemical journal**, v. 96, n. 3, p. 23–5, 1965.
- ANDREWS, R. K.; KROLL, M. H.; WARD, C. M.; ROSE, J. W.; SCARBOROUGH, R. M.; SMITH, A. I.; LOPEZ, J. A.; BERNDT, M. C. Binding of a novel 50-kilodalton alboaggregin from *Trimeresurus albolabris* and related viper venom proteins to the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. Effect on platelet aggregation and glycoprotein Ib-mediated platelet activation. **Biochemistry**, v. 35, n. 38, p. 12629–39, 1996.
- ARAGÓN-ORTIZ, F.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A. Amino acid sequence of a lectin-like protein from *Lachesis muta stenophrys* venom. **Toxicon**, v. 35, n. 7, p. 763-69, 1996.
- ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, 2008.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 493–504, 2010.
- BATUWANGALA, T.; LEDUC, M.; GIBBINS, J. M.; BON, C.; JONES, E. Y. Structure of the snake-venom toxin convulxin. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 1, p. 46–53, 2004.
- BERGMEIER, W.; BOUVARD, D.; EBLE, J. A.; MOKHTARI-NEJAD, R.; SCHULTE, V.; ZIRNGIBL, H.; BRAKEBUSCH, C.; FASSLER, R.; NIESWANDT, B. Rhodocytin (Aggretin) Activates Platelets Lacking $\alpha_2\beta_1$ Integrin, Glycoprotein VI, and the Ligand-binding Domain of Glycoprotein Ib α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 25121–126, 2001.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 07–16, 2003.
- BOYD, W.C. The proteins of immune reactions, In: NEURATH, H.; BAILEY, K. **The Proteins: Chemistry, Biological Activity and Methods**, Academic Press, New York, USA, v. 2, p. 765-844, 1954.
- BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; DANIELA, N. A.; DALGIMAR, B. de M.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S. F.; ALVES, R. de S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 859–867, 2006.
- BRASIL. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Brasília/DF, ed. 5, 2005.
- BRASIL. **Acidentes com animais peçonhentos: aspectos epidemiológicos**. Brasília/DF, 2015.
- BRASIL MINISTERIO DE SAUDE, F. N. de S. **Manual de diagnóstico e tratamento**

de acidentes por animais peçonhentos. Brasília/DF, ed. 2, 2001.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736-43, 2009.

CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 44, n. 5, p. 933–938, 1998.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C. de O.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, P. de S.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, R. S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; YONEYAMA, K. A. G.; RODRIGUES, V. M. 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.

CASTANHEIRA, L.; NAVES DE SOUZA, D. L.; SILVA, R. J.; BARBOSA, B.; MINEO, J. R.; TUDINI, K. A.; RODRIGUES, R.; FERRO, E. V.; DE MELO RODRIGUES, V. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.74, p. 568-74, 2015.

CHEN, Y. L.; TSAI, I. H. Functional and sequence characterization of agkicetin, a new glycoprotein Ib antagonist isolated from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 210, n. 2, p. 472-77, 1995.

CHENG, X.; QIAN, Y.; LIU, Q.; LI, B. X.; ZHANG, M.; LIU, J. Purification, characterization, and cDNA cloning of a new fibrinogenolytic venom protein, Agkisacutacin, from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, n. 2, p. 530–35, 1999.

CHOLEWIŃSKI, M.; DERDA, M.; HADAŚ, E. Parasitic diseases in humans transmitted by vectors. **Annals of parasitology**, v. 61, n. 3, p. 137–57, 2015.

CHUNG, C. H.; AU, L. C.; HUANG, T. F. Molecular cloning and sequence analysis of aggrexin, a collagen-like platelet aggregation inducer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 3, p. 723–27, 1999.

CLEMETSON, K. J. Snake C-type lectins (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1236-46, 2010.

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

CORREA-NETTO, C.; TEIXEIRA-ARAÚJO, R.; AGUIAR, A. S.; MELGAREJO, A. R.; DE-SIMONE, S. G.; 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, n. 7, p. 1222–1235, 2010.

COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.

CROFT, S. L.; DAVIDSON, R. N.; THORNTON, E. A. Liposomal amphotericin B in

the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 28 Suppl B, p. 111–118, 1991.

CUNHA-FILHO, M.; SÁ-BARRETO, L.; LEONARDI, D.; LAMAS, M.; SALOMÓN, C. Recentes avanços no tratamento da doença de Chagas. **Brasília Med**, v. 49, n. 4, p. 279–83, 2012.

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

DE CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1471-76, 2001.

DE CASTRO DAMASIO, D.; NOLTE, S.; POLAK, L. P.; BRANDT, A. P.; BONAN, N. B.; ZISCHLER, L.; STUELP-CAMPELO, P. M.; CADENA, S. M. S. C.; NORONHA, L. De; ELIFIO-ESPOSITO, S. L.; MORENO-AMARAL, A. N. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon**, v. 90, p. 299–307, 2014.

DE-SIMONE, S. G.; NETTO, C. C.; JR, F. P. S. Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins. **Journal of Chromatography B**, v. 838, p. 135–38, 2006.

DIAS, G. S.; KITANO, E. S.; PAGOTTO, A. H.; STEFANINI, S.; MARIA, M.; ROCHA, T.; ZELANIS, A.; SERRANO, S. M. T. Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 10, p. 4585-98, 2013.

DÖRMANN, D.; CLEMETSON, J. M.; NAVDAEV, A.; KEHREL, B. E.; CLEMETSON, K. J. Alboaggregin A activates platelets by a mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib. **Blood**, v. 97, n. 4, p. 929–936, 2001.

DU, X. Y.; CLEMETSON, J. M.; NAVDAEV, A.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 38, p. 35124–35132, 2002.

DU, X. Y.; MAGNENAT, E.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Alboluxin, a snake C-type lectin from *Trimeresurus albolabris* venom is a potent platelet agonist acting via GPIb and GPVI. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 87, n. 4, p. 692-8, 2002.

DU, X. Y.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; MAGNENAT, E.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Bilinexin, a snake C-type lectin from *Agkistrodon bilineatus* venom agglutinates platelets via GPIb and $\alpha 2\beta 1$. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 5, p. 1277-83, 2001.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375-1424, 2012.

EBLE, J. a; NILAND, S.; BRACHT, T.; MORMANN, M.; PETER-KATALINIC, J.;

- POHLENTZ, G.; STETEFELD, J. The alpha2beta1 integrin-specific antagonist rhodocetin is a cruciform, heterotetrameric molecule. **FASEB journal**, v. 23, n. 9, p. 2917–27, 2009.
- EBLE, J. A; TUCKWELL, D. S. The alpha2beta1 integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin alpha2 subunit proximal to the collagen-binding site. **The Biochemical journal**, v. 376, n. Pt 1, p. 77–85, 2003.
- ELIFIO-ESPOSITO, S.; TOMAZELI, L.; SCHWARTZ, C.; GIMENEZ, A. P.; FUGII, G. M.; FERNANDES, L. C.; ZISHLER, L. F. M.; STUELP-CAMPELO, P. M.; MORENO, A. N. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC immunology**, v. 12, n. 1, p. 10, 2011.
- FUKUDA, K.; DOGGETT, T. A.; BANKSTON, L. A.; CRUZ, M.; DIACOVO, T. G.; LIDDINGTON, R. C. Structural basis of von Willebrand factor activation by the snake toxin botrocetin. **Structure**, v. 10, n. 7, p. 943–50, 2002.
- FUKUDA, K.; MIZUNO, H.; ATODA, H.; MORITA, T. Crystal structure of flavocetin-A, a platelet glycoprotein Ib-binding protein, reveals a novel cyclic tetramer of C-type lectin-like heterodimers. **Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1915–23, 2000.
- GARTNER, T. K.; OGILVIE, M. L. Isolation and characterization of three Ca²⁺ -dependent O-galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochem. J**, v. 224, p. 301–07, 1984.
- GARTNER, T. K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D. C. Thrombolectin: A lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Letters**, v. 117, n. 1, p. 13-16, 1980.
- GUÉRCIO, R. A. P.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; PABA, J.; SOUSA, M. V.; RICART, C. A. O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome science**, v. 4, p. 11, 2006.
- GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; INÁCIO, I. De; DENIS, D. L.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, p. 1-11, 2004.
- GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, a. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841–850, 2000.
- HAMAKO, J.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; ITO, M.; MAKITA, K.; FUJIMURA, Y.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Purification and Characterization of Bitiscetin , a Novel von Willebrand Factor Modulator Protein from *Bitis arietans* Snake Venom. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, n. 1345, p. 273–79, 1996.
- HAMAKO, J.; SUZUKI, Y.; HAYASHI, N.; KIMURA, M. Amino acid sequence and characterization of C-type lectin purified from the snake venom of *Crotalus ruber*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 299–306, 2007.
- HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C. L.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. A new C-type

animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 1, p. 130-41, 2005.

HIRABAYASHIS, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K. Complete Primary Structure of a Galactose-specific Lectin from the Venom of the Rattlesnake. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 4, p. 2320–326, 1991.

HIROTSU, S.; MIZUNO, H.; FUKUDA, K.; QI, M. C.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; MORITA, T.; TITANI, K. Crystal structure of bitiscetin, a von Willebrand factor-dependent platelet aggregation inducer. **Biochemistry**, v. 40, n. 45, p. 13592–13597, 2001.

HOOLEY, E.; PAPAGRIGORIOU, E.; NAVDAEV, A.; PANDEY, A. V.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J.; EMSLEY, J. The crystal structure of the platelet activator aggrexin reveals a novel (alpha)₂ dimeric structure. **Biochemistry**, v. 47, n. 30, p. 7831–7837, 2008.

HORII, K.; OKUDA, D.; MORITA, T.; MIZUNO, H. Structural Characterization of EMS16, an Antagonist of Collagen Receptor (GPIa/IIa) from the Venom of *Echis multisquamatus*. **Biochemistry**, v. 42, n. 43, p. 12497–12502, 2003.

HUANG, K.-F.; HUNG, C.-C.; CHU, J.; H-J WANG, A.; CHIOU, S.-H. Crystal structure of a platelet-agglutinating factor isolated from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochem. J**, v. 378, n. 1, p. 399–407, 2004.

JASTI, J.; PARAMASIVAM, M.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Crystal structure of echicetin from *Echis carinatus* (Indian saw-scaled viper) at 2.4 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 1, p. 167–176, 2004.

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

KAWASAKI, T.; FUJIMURA, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MIURA, S.; SAKURAI, Y.; MAKITA, K.; TANIUCHI, Y.; HIRANO, K.; TITANI, K. Complete Amino Acid Sequence and Identification of the Platelet Glycoprotein Ib-binding Site of *Jararaca* GPIb-BP, a Snake Venom Protein Isolated from *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 271, n. 18, p. 10635–9, 1996.

KAWASAKI, T.; TANIUCHI, Y.; HISAMICHI, N.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; SAKAI, Y.; KAKU, S.; SATOH, N.; TAKENAKA, T.; ET AL. Tokaracetin, a new platelet antagonist that binds to platelet glycoprotein Ib and inhibits von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation. **The Biochemical Journal**, v. 308 (Pt 3), p. 947–53, 1995.

KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-30, 1995. .

KLEIN, R. C.; FABRES-KLEIN, M. H.; LICURSI DE OLIVEIRA, L.; FEIO, R. N.; MALOUIN, F.; DE OLIVEIRA BARROS RIBON, A. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts staphylococcal biofilms. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1-16, 2015.

- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TOHKAI, T. Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p . piscivorus* (Eastern cottonmouth). **Toxicon**, v. 37, n. 7, p. 1053–64, 1999.
- KOWALSKA M.A.; TAN, L.; HOLT, J. C.; PENG, M.; KARCZEWSKI, J.; CALVETE, J.J.; NIEWIAROWSKI, S. Alboaggregins A and B: structure and interaction with human platelets. **Thrombosis and Haemostasis** v. 79, n. 3, p. 609-13, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Reprinted from Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–85, 1970.
- LEDUC, M.; BON, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. **The Biochemical journal**, v. 333 (Pt 2), p. 389–93, 1998.
- LEE, W. H.; DU, X. Y.; LU, Q. M.; CLEMETSON, K. J.; ZHANG, Y. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent plateletagonist acting specifically via GPVI. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 90, n. 4, p. 662-71, 2003.
- LEE, W. H.; ZHANG, Y. Molecular cloning and characterization of a platelet glycoprotein Ib-binding protein from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 885–892, 2003.
- LI, X.; ZHENG, L.; KONG, C.; KOLATKAR, P. R.; CHUNG, M. C. M. Purpureotin: A novel di-dimeric C-type lectin-like protein from *Trimeresurus purpureomaculatus* venom is stabilized by noncovalent interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 1, p. 53–62, 2004.
- LIU, S.; ZHU, Z.; SUN, J.; ZHU, Z.; HUANG, Q.; TENG, M.; NIU, L. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of agkaggregin, a C-type lectin-likeprotein from *Agkistrodon acutus* venom. **Acta Crystallographica**, v. 58, n. 4, p. 675-8, 2002.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.
- LU, Q.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. GPIb is involved in platelet aggregation induced by mucetin, a snake C-type lectin protein from Chinese habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*) venom. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 6, p. 1168-76, 2004.
- MAITA, N.; NISHIO, K.; NISHIMOTO, E.; MATSUI, T.; SHIKAMOTO, Y.; MORITA, T.; SADLER, J. E.; MIZUNO, H. Crystal structure of von Willebrand factor A1 domain complexed with snake venom, bitiscetin: Insight into glycoprotein alphabeta binding mechanism induced by snake venom proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37777–81, 2003.
- MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R. R.; MARCINKIEWICZ, M. M.; DANIEL, J. L.; SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C.; WEINREB, P. H.; BEACHAM, D. A.; NIEWIAROWSKI, S. Isolation and characterization of EMS16, a C-lectin type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alphabeta1 integrin. **Biochemistry**, v. 39, n. 32, p. 9859–67, 2000.

MENALDO, D. L.; BERNARDES, C. P.; PEREIRA, J. C.; SILVEIRA, D. S. C.; MAMEDE, C. C. N.; STANZIOLA, L.; OLIVEIRA, F. De; PEREIRA-CROTT, L. S.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 764–71, 2013.

MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. D. P.; ALVES-PAIVA, R. D. M.; AURE, M.; CALLEJON, R.; PAIVA, H. H.; ANTONUCCI, G. A. Isolation , functional , and partial biochemical characterization of galatrox , an acidic lectin from *Bothrops atrox* snake venom. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, n. 3, p. 181–92, 2011.

MITCHELL, S. W. **Researches upon the venom of the rattlesnake: with an investigation of the anatomy and physiology of the organs concerned.** Smithsonian Institution, v. 135, 1861.

MOURA, A.; KAYANO, A. M.; OLIVEIRA, G. a.; SETÚBAL, S. S.; RIBEIRO, J. G.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; MOURA, L. a.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; DA SILVA, S. L.; FERNANDES, C. F. C.; ZULIANI, J. P.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

MURAKAMI, M. T.; ZELA, S. P.; GAVA, L. M.; MICHELAN-DUARTE, S.; CINTRA, A. C.; ARNI, R. K. Crystal structure of the platelet activator convulxin, a disulfide-linked $\alpha 4\beta 4$ cyclic tetramer from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 310, n. 2, p. 478-82, 2003.

NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; POLGAR, J.; KEHREL, B. E.; MARTIN, G.; MAGNENAT, E.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Aggretin, a heterodimeric C-type lectin from *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) stimulates platelets by binding to $\alpha 2\beta 1$ integrin and GPIb, activating Syk and PLCg2, but does not involve the GPVI/Fcg collagen receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 24, p. 20882–89, 2001a.

NAVDAEV, A.; DÖRMANN, D.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Echicetin, a GPIb-binding snake C-type lectin from *Echis carinatus*, also contains a binding site for IgMk responsible for platelet agglutination in plasma and inducing signal transduction. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2333–2341, 2001b.

NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; OHKURA, M.; OHIZUMI, Y.; SUGIHARA, H. Primary Structure of the Lectin From the Venom of *Bitis Arietans* (Puff-Adder). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 11, p. 1620–22, 1995.

NOLTE, S.; DE CASTRO DAMASIO, D.; BARRA, A. C.; GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; MELLO ZISCHLER, L. F. C.; STUERP-CAMPELO, P. M.; ELIFIO-ESPOSITO, S. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; REIS, C. A.; MORENO-AMARAL, A. N. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, v. 59, n. 1, p. 81–85, 2012.

NUNES, S.; ANGELA, M.; SOUZA, A. De; FERNANDO, A.; VAZ, D. M.; MARIA, G.; SANTANA, D. S.; SOARES, F.; CASSANDRA, L.; BARROSO, B.; MARIA, P.;

PAIVA, G.; MARIA, R.; SILVA-LUCCA, R. A.; LUIZA, M.; OLIVA, V.; CAMARGO, M.; TEREZA, M. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 159, n. 1, p. 57–63, 2011.

OMS. **Avanços para superar o impacto global de doenças. primeiro relatório da oms sobre doenças tropicais negligenciadas.** BRASIL, p. 172, 2012.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, E.; NISHIDA, S.; TITANI, K. C-Type Galactoside-Binding Lectin from *Bothrops jararaca* Venom: Comparison of Its Structure and Function with Those of Botrocetin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, n. 1, p. 306–10, 1994.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

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

PENG, M.; LU, W.; KIRBY, E. P. Characterization of three alboaggregins purified from *Trimeresurus albolabris* venom. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 67, n. 6, p. 702–7, 1992.

PENG, M.; LU, W.; KIRBY, E. P. Alboaggregin-B: a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib. **Biochemistry**, v. 30, n. 49, p. 11529–11536, 1991.

POLGAR, J.; CLEMETSON, J. M.; KEHREL, B. E.; WIEDEMANN, M.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Platelet Activation and Signal Transduction by Convulxin, a C-type Lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) Venom via the p62 / GPVI Collagen Receptor. **Biochemistry**, v. 272, n. 21, p. 13576–13583, 1997a.

POLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; SAQI, M. S.; CLEMETSON, K. J. Amino acid sequence of the alpha subunit and computer modelling of the alpha and beta subunits of echicetin from the venom of *Echis carinatus* (saw-scaled viper). **Biochem Journal**, v. 323 (Pt 2), p. 533–537, 1997b.

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; DE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; RODRIGUES, V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 9, p. 2707–2720, 2012.

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, n. 4, p. 490–501, 2009.

RUCAVADO, A.; SOTO, M.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. DAVID, G.; FOZ, J. W.; ESCALANTE, T.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of Aspercetin, a Platelet Aggregating Component from the Venom of the Snake *Bothrops asper* which Induces Thrombocytopenia and Potentiates Metalloproteinase-induced Hemorrhage. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 85, p. 710–5, 2001.

- SAKURAI, Y.; FUJIMURA, Y.; KOKUBO, T.; IMAMURA, K.; KAWASAKI, T.; HANDA, M.; SUZUKI, M.; MATSUI, T.; TITANI, K.; YOSHIOKA, A. The cDNA cloning and molecular characterization of a snake venom platelet glycoprotein Ib-binding protein, mamushigin, from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 79, n. 6, p. 1199-207, 1998.
- SALDARRIAGA, M. M.; OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; TORO, M. F.; DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 405–11, 2003.
- SARRAY, S.; SRAIRI, N.; HATMI, M.; LUIS, J.; LOUZIR, H.; REGAYA, I.; SLEMA, H.; MARVALDI, J.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. Lebecetin, a potent antiplatelet C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1651, n. 1-2, p. 30–40, 2003.
- SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 21, n. 1, p. 35, 2015.
- SEN, U.; VASUDEVAN, S.; SUBBARAO, G.; MCCLINTOCK, R. A.; CELIKEL, R.; RUGGERI, Z. M.; VARUGHESE, K. I. Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. **Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 345–352, 2001.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-63R, 2004. .
- SHIN, Y.; OKUYAMA, I.; HOSEGAWA, J.; MORITA, T. Molecular Cloning of Glycoprotein Ib-Binding. **Thrombosis Research**, v. 99, n. 3, p. 239–47, 2000.
- SOUSA, L. A. F.; AMAZONAS, D. R.; SOUSA, L. F.; ANNA, S. S. S.; SERRANO, S. M. T.; CHALKIDIS, H. M.; MOURÃO, R. H. V. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrahagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. **Biochimie**, v. 118, p. 60-70, 2015.
- STANISZEWSKA, I.; WALSH, E. M.; ROTHMAN, V. L.; GAATHON, A.; TUSZYNSKI, G. P.; CALVETE, J. J.; LAZAROVICI, P.; MARCINKIEWICZ, C. Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen receptors-dependent melanoma metastasis. **Cancer Biology and Therapy**, v. 8, n. 15, 2009.
- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of the Hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227–37, 1936.
- SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.
- TANIUCHI, Y.; KAWASAKI, T.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; SAKAI, Y.; KAKU, S.; HISAMICHI, N.; SATOH, N.; TAKENAKA, T.; HANDA, M.; SAWAI, Y. Flavocetin-A and B, two high molecular mass glycoprotein Ib binding proteins with high affinity purified from *Trimeresurus flavoviridis* venom, inhibit platelet aggregation at high shear stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1244, n. 2, p. 331-38, 1995.
- TANURE, A.; PEIXOTO, J. C.; AFONSO, M. M. dos S.; DUARTE, R.; PINHEIRO, A. da C.; COELHO, S. V. B.; BARATA, R. A. Identification of sandflies (diptera:

psychodidae: phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 321–4, 2015.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; OZEKI, Y.; NISHIO, K.; FUKUI, H.; TITANI, K. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 928–932, 1993.

VALENTE, R. H.; GUIMARÃES, P. R.; JUNQUEIRA, M.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; SOARES, M. R.; CHAPEAUROUGE, A.; TRUGILHO, M. R. O.; LEÓN, I. R.; ROCHA, S. L. G.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L. S.; LEÃO, L. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. *Bothrops insularis* venomomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 241–255, 2009.

WANG, W. J.; HUANG, T. F. A novel tetrameric venom protein, agglucetin from *Agkistrodon acutus*, acts as a glycoprotein Ib agonist. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 4, p. 1077–86, 2001.

WANG, R.; KINI, R. M.; CHUNG, M. C. M. Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan Pit Viper): Synergistic and noncovalent interaction between its subunits. **Biochemistry**, v. 38, n. 23, p. 7584–7593, 1999.

WANG, R.; KONG, C.; KOLATKAR, P.; CHUNG, M. C. M. A novel dimer of a C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). **FEBS Letters**, v. 508, n. 3, p. 447–453, 2001.

WARRELL, D. A. **Guidelines for the clinical management of snake bites WHO Library Cataloguing-in-Publication**, 2010.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825–6, 1952.

WATSON, A. A.; EBLE, J. A.; O'CALLAGHAN, C. A. Crystal structure of rhodocytin, a ligand for the platelet-activating receptor CLEC-2. **Protein Science: a publication of the Protein Society**, v. 17, n. 9, p. 1611–6, 2008.

WEI, Q.; LU, Q. M.; JIN, Y.; LI, R.; WEI, J. F.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. Purification and cloning of a novel C-type lectin-like protein with platelet aggregation activity from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1331–8, 2002.

ZELANIS, A.; ANDRADE-SILVA, D.; ROCHA, M. M.; FURTADO, M. F.; SERRANO, S. M. T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. 15–18, 2012.

ZHA, X.-D.; LIU, J.; XU, K.-S. cDNA cloning, sequence analysis, and recombinant expression of akitonin beta, a C-type lectin-like protein from *Agkistrodon acutus*. **Acta Pharmacol Sin**, v. 25, n. 3, p. 372–7, 2004.

ZHONG, S. R.; JIN, Y.; WU, J. B.; CHEN, R. Q.; JIA, Y. H.; WANG, W. Y.; XIONG, Y.

L.; ZHANG, Y. Characterization and molecular cloning of dabocetin, a potent antiplatelet C-type lectin-like protein from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 104–12, 2006.