



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Peptídeos derivados da peçonha de *Bothrops alternatus* que interferem na
agregação plaquetária**

MARIANA SANTOS MATIAS

**UBERLÂNDIA-MG
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Peptídeos derivados da peçonha de *Bothrops alternatus* que interferem na
agregação plaquetária**

Discente: Mariana Santos Matias

Orientadores: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Co-Orientadores: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

Profa. Dra. Carla Cristine Neves Mamede

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

UBERLÂNDIA-MG
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M433p Matias, Mariana Santos, 1989
2018 Peptídeos derivados da peçonha de *Bothrops alternatus* que
interferem na agregação plaquetária [recurso eletrônico] / Mariana
Santos Matias. - 2018.

Orientadora: Renata Santos Rodrigues.

Coorientador: Fábio de Oliveira.

Coorientadora: Carla Cristine Neves Mamede.

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

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.482>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. 2. Peptídeos. 3. Serpente peçonhenta - Peçonha. 4.
Bothrops. I. Rodrigues, Renata Santos, (Orient.). II. Oliveira, Fábio de,
(Coorient.). III. Mamede, Carla Cristine Neves. (Orient.). IV.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. V. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Peptídeos derivados da peçonha de *Bothrops alternatus* que interferem na
agregação plaquetária**

Mariana Santos Matias

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues

Examinadores:

Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho - UNESP

Profa. Dra. Johara Boldrini França – UFES

Prof. Dra. Fabiana de Almeida Araújo Santos - UFU

Prof. Dr. Jonny Yokosawa - UFU

Data da Defesa: 12/07/2018

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

Dra. Renata Santos Rodrigues

Dedico esse trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, minha irmã e meu noivo. O amor, o auxílio e a paciência que vocês tiveram comigo me deram força pra concluir essa etapa. Vocês são meu alicerce!

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia,

Instituição que proporcionou minha formação profissional e que tive a oportunidade de conviver com grandes profissionais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG),

Pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

Ao prof. Dr. Fábio de Oliveira,

Por todo conhecimento compartilhado desde a graduação, são quase oito anos de orientação, e me sinto honrada pela confiança e autonomia depositada. Obrigada por caminhar ao meu lado, me orientando e aconselhando. Agradeço por todo crescimento que vivenciei ao seu lado. Você é um exemplo de ser humano a ser seguido, e me espelho muito em seu modo de enxergar a vida. É uma honra ter tido você como orientador.

À prof. Dra. Carla Neves Mamede,

Que além de ser Co-Orientadora é uma grande amiga. Obrigada por aceitar o desafio de me auxiliar nessa etapa final, mesmo quando a vida pessoal passava por momentos tão distintos da conclusão de uma tese. Desejo que você e sua família sejam muito felizes.

À prof. Dra. Renata Santos Rodrigues,

Obrigada em aceitar assumir minha orientação nessa fase final de doutorado, sempre se colocando a disposição para o que precisava. O meu agradecimento.

À Deborah Fernanda,

Uma parceira de bancada e de vida. Obrigada por cada dia de experimento, de agregação, de desânimos, de reflexão, de conversas e de apoio. Agradeço pela amizade e pela oportunidade de dividir a minha rotina com você. Desejo muito sucesso e amor na sua vida, independente do caminho a ser trilhado.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Celular,

Agradeço a todos os integrantes, os que estão ativos e àqueles que concluíram suas etapas. Em especial a Júnia, Déborah, Edigar, Bruna, Mayara e Nádia. Obrigada por todo aprendizado compartilhado e pela companhia. A nossa forma de trabalho e convivência leve com certeza foram fundamentais para a superação dessa etapa. Tenho cada um como grandes pessoas e pesquisadores. Todo sucesso pra vocês. Muito obrigada!

Aos outros laboratórios e técnicos,

Que contribuíram com a estrutura necessária para execução de alguns testes.

À Janaína, secretária do Instituto de Biotecnologia,

Obrigada por cada informação e direcionamento. Se metade dos profissionais tivesse a sua dedicação, com certeza a parte burocrática dessa universidade seria mais fácil de ser solucionada.

Aos membros da banca,

Pela disponibilidade e contribuição para o enriquecimento desse trabalho. Muito obrigada.

Aos meus pais, em especial minha mãe Janice,

Agradeço pela imensa dedicação, pelos conselhos, paciência e cuidado. Por estarem ao meu lado, nos momentos bons e ruins, por não me abandonarem e me incentivarem a terminar o doutorado. Não consigo dizer em palavras o que vocês significam pra mim. Muito Obrigada por tudo. Eu amo vocês!

À minha irmã Larissa,

Minha companheira de vida. Obrigada pela alegria diária, pela compreensão, por toda nossa cumplicidade, auxílio e incentivo. Saber que tenho você na minha vida torna tudo mais leve. Desejo que você seja extremamente feliz. Conta comigo, sempre. Love you!

Ao meu noivo Bruno,

Obrigada por ser meu protetor e meu escudo. Eu me apaixono todos os dias pela pessoa que você é. Agradeço pela parceria, paciência e por todo apoio, especialmente nesse momento. A nossa forma de viver torna tudo mais fácil. Obrigada por dividir a vida comigo. Você e sua família são muito importantes pra mim. Eu te amo!

Aos meus amigos de longa data,

Tanto os próximos quanto os distantes. Tenham certeza que vocês contribuíram para a conclusão desse trabalho. As nossas conversas e reflexões, nossas risadas e amizade com certeza me deram força e ânimo para chegar até aqui. Obrigada.

E, por fim, agradeço a Deus,

Pela saúde, pela vida, por ser abraço e consolo. Por guiar meu caminho e me proteger de todo mal. Sua luz direciona minha vida.

Obrigada por tudo e todos que caminharam ao meu lado! Essa conquista é nossa!

Minha eterna Gratidão!

*“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si,
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti.
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós.
É saber se sentir infinito, num universo tão vasto e bonito é saber sonhar.
Então, fazer valer a pena cada verso daquele poema sobre acreditar.
Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações e assim ter amigos
contigo em todas as situações.
A gente não pode ter tudo, qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos e os presentes que a vida trouxe pra perto de mim.
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar, e sim sobre cada momento, sorriso a se
compartilhar
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás.
Segura teu filho no colo, sorria e abraça teus pais enquanto estão aqui
Que a vida é trem-bala, parceiro e a gente é só passageiro prestes a partir”.*

Música Trem Bala - Ana Vilela

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: A: Componentes e organização das plaquetas. B: Receptores e agonistas plaquetários.	5
Figura 2: Morfologia das plaquetas. A: plaquetas discoides, inativas ou em repouso. B: plaquetas ativas, com formação de pseudópodos.	3
Figura 3: Figura esquemática da atividade plaquetária.	5

CAPÍTULO II

Figura 4: Perfil cromatográfico do peptídeo sintético <i>Pep01</i>	25
Figura 5: Ensaio de agregação plaquetária induzida pelo colágeno, na presença do <i>Pep01</i>	26
Figura 6: Ensaio de quantificação da ativação plaquetária	27
Figura 7: Atividade trombolítica, <i>in vitro</i> , do <i>Pep01</i>	28
Figura 8: Perfil cromatográfico do peptídeo sintético <i>Pep15</i>	30
Figura 9: Ensaio de ativação plaquetária do <i>Pep15</i>	31

CAPÍTULO III

Figure 1: Platelet aggregation assay.	59
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Receptores encontrados na membrana plaquetária.	6
Tabela 2: Compostos bioativos derivados de peçonhas ofídicas	10
Tabela 3: Interação entre os peptídeos e o receptor $\alpha_2\beta_1$	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina difosfato

CRISP - Proteínas secretadas ricas em cisteínas

DAG - diacilglicerol

DCM – diclorometano

DCNT - doenças crônicas não transmissíveis

DIEA - N,N-Diisopropiletilamina

DMF - dimetilformamida

DNA - ácido desoxirribonucleico

doi - *digital object identifier*

FDA – *Food and Drug Administration*

FITC - isotiocianato de fluoresceína

FvW - fator de von Willebrand

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

IP3 - inositol-trifosfato

LAAOs - L-aminoácido oxidases

PARs - receptores ativados por protease

PKC - proteína-quinase C

PLC - fosfolipase C

PPP - plasma pobre em plaquetas

PRP - plasma rico em plaquetas

SVMPs - metaloproteases de peçonhas de serpentes, *snake venom*

metalloproteinases

SVSPs - serinoproteases de peçonhas de serpentes, *snake venom serine proteinases*

TIS - triisopropilsilano

TFA - ácido trifluoroacético

TxA2 - tromboxano A2

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
<i>CAPÍTULO I</i>	4
Função das plaquetas	1
Importância das plaquetas	6
Peçonha de serpentes	8
Compostos bioativos	9
<i>CAPÍTULO II</i>	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
Síntese dos peptídeos.....	18
Purificação dos peptídeos	18
Preparação do plasma	18
Ensaio de agregação plaquetária.....	19
Atividade anticoagulante	19
Atividade coagulante	20
Ensaio trombolítico <i>in vitro</i>	20
Ensaio antibacteriano.....	20
Quantificação da ativação plaquetária	21
Análise de bioinformática	21
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	32

CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	40
<i>CAPÍTULO III</i>	53
Abstract	55
Figures	59
References	60
ANEXOS	63

APRESENTAÇÃO

As doenças cardiovasculares são consideradas um grave problema de saúde pública mundial, fato determinado pela elevada incidência, alta taxa de mortalidade e número de internações hospitalares. O tratamento disponível atualmente é considerado restrito e algumas vezes ineficaz. A pesquisa de novos agentes antiagregante plaquetários se faz necessária, visto que a agregação plaquetária descontrolada está entre as causas dessas patologias. Por muitos anos, a pesquisa científica com peçonhas de serpentes tem sido realizada com foco nos componentes enzimáticos, porém essas peçonhas são uma rica fonte de peptídeos bioativos. A maior vantagem do uso de compostos peptídicos em relação aos biofármacos à base de proteínas é a sua menor complexidade e menor custo de produção. Esses compostos podem apresentar atividades farmacológicas sobre a hemostasia, por serem capazes de interagir com receptores plaquetários importantes nesse evento.

A presente tese foi redigida de acordo com as normas vigentes no Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia e foi estruturada em dois capítulos. O **Capítulo I** é referente a uma revisão bibliográfica sobre agregação plaquetária e peçonhas de serpentes. O **Capítulo II** é relacionado à síntese e caracterização de dois peptídeos capazes de interferir na função plaquetária. O primeiro, denominado *Pep01*, foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, além de possuir atividade trombolítica. O segundo, denominado *Pep15* e derivado do *Pep01*, foi capaz de induzir a agregação plaquetária e não apresenta atividade trombolítica. Ambos os peptídeos sintéticos apresentam um importante potencial para diagnóstico, prevenção e tratamento de distúrbios trombóticos. Os resultados do *Pep01* geraram um depósito de patente com o título “Heptapeptídeo da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*”. O **Capítulo III** é referente a uma *Short Communication* que será submetida à revista *Biochemical and Biophysical Research Communications*, relacionada a um peptídeo denominado *PepDC*, proveniente da hidrólise da *BaltDC*, uma desintegrina encontrada na peçonha de *Bothrops alternatus* capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por epinefrina, conforme o artigo está descrito em **Anexos**, a última parte da presente tese. Esse trabalho foi publicado durante o doutorado, no ano de 2017, no periódico *Journal of Venomous Animals and Toxins including*

Tropical Diseases, sob o título “*BaltDC: purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from Bothrops alternatus snake venom*”, e pode ser localizado pelo doi: 10.1186/s40409-017-0126-7.

Palavras-chave: Peptídeos, peçonha de serpentes, *Bothrops alternatus*, agregação plaquetária e síntese de peptídeos.

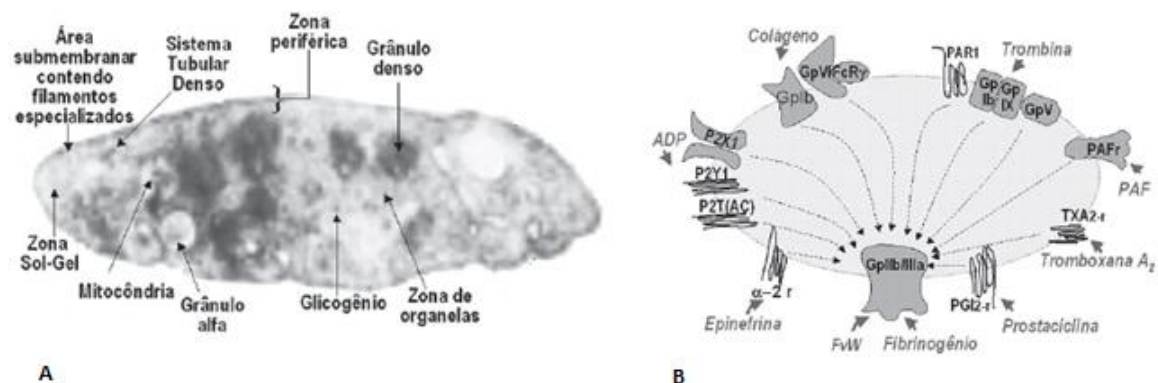
CAPÍTULO I

Fundamentação teórica

Estrutura das plaquetas

As plaquetas são partículas discoides, anucleadas, provenientes da fragmentação de megacariócitos da medula óssea. Possuem de 1 a 4 μm de diâmetro, circulam na sua forma inativa e possuem vida útil média de oito dias (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001; JURK; KEHREL, 2005). Apesar de não serem classificadas como células, as plaquetas possuem membrana plasmática, citoplasma organizado, citoesqueleto, mitocôndrias e grânulos de estocagem (Fig.1A) (RENDU; BROHARD-BOHN, 2001; FALCÃO *et al.*, 2013).

Figura 1: A: Componentes e organização das plaquetas. B: Receptores e agonistas plaquetários.



Fonte: Castro *et al.*, 2006.

A membrana plasmática das plaquetas é formada por uma bicamada fosfolipídica com diferentes glicoproteínas ancoradas. Essas glicoproteínas funcionam como receptores essenciais para o processo de adesão das plaquetas ao tecido subendotelial exposto, com consequente ativação e agregação plaquetária (Fig.1B). Esses receptores interagem com diferentes agonistas, como o colágeno, difosfato de adenosina (ADP), tromboxano A_2 (Tx A_2), trombina, epinefrina e serotonina, sinalizando em mudança de conformação das plaquetas,

aumento de afinidade dos receptores, gerando a transdução de mensagens no citoplasma da plaqueta (OFFERMANN, 2000; WILLOUGHBY; HOLMES; LOSCALZO, 2002; WALLACE; SMYTH, 2013).

Os principais receptores encontrados na membrana plaquetária são (i) integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, que interage com o fibrinogênio; (ii) integrina $\alpha_2\beta_1$ e GPVI, responsáveis por se ligar principalmente ao colágeno; (iii) complexo GPIb-V-IX, que se liga ao fator de von-Willebrand (FvW) e ao fibrinogênio; (iv) receptores ativados por proteases (PARs), que se ligam a trombina; (v) receptores P2Y₁ e P2Y₁₂, que se ligam ao ADP; (vi) receptor 5HT_{2A}, que se liga a serotonina; e α_{2A} -adrenérgico, que se liga a epinefrina. A tabela 1 apresenta os principais receptores plaquetários (KAMIGUTI, 2005; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2017).

Tabela 1: Receptores encontrados na membrana plaquetária, seus respectivos agonistas e ação.

Receptor	Ligante	Ação
$\alpha\text{IIb}\beta_3$	Fibrinogênio fator de von-Willebrand	adesão/ agregação
$\alpha_2\beta_1$	Colágeno	adesão
GPVI	Colágeno	adesão/ativação
GPIb-V-IX	fator de von-Willebrand	Adesão
PARs	trombina	ativação
P2Y	ADP	ativação/ agregação

Fonte: Adaptado de ZUERN *et al.*, 2010.

A integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ é o receptor mais expresso em plaquetas. É dependente de cálcio, formada por duas subunidades e desempenha um papel vital na hemostasia, sendo responsável por conectar o fibrinogênio plasmático e o FvW à

matriz extracelular (REDDY; SMITH; PLOW, 2008). Para exercer sua função, esse receptor necessita de uma ativação dependente de alteração conformacional, que permite uma adesão estável e recrutamento de outras plaquetas e, por consequência, agregação plaquetária (JURK; KEHREL, 2005; NIESWANDT; VARGA-SZABO; ELVERS, 2009).

A interação entre plaquetas e o colágeno, após uma lesão vascular, é mediada principalmente pela integrina $\alpha_2\beta_1$ e a GPVI (GAWAZ *et al.*, 2014). A integrina $\alpha_2\beta_1$, também denominada GPIa/IIa, é a segunda glicoproteína mais expressa na membrana plaquetária. É responsável por fortalecer o processo de adesão, atuando com menor relevância na ativação das plaquetas (NIESWANDT *et al.*, 2001), e permite a interação entre o colágeno e a GPVI, sinalização dependente da via tirosina quinase. A GPVI assume importante função na ativação e agregação das plaquetas (MOROI; JUNG, 2004). Essa interação com o colágeno é fundamental para o processo de ativação do receptor de fibrinogênio $\alpha_{IIb}\beta_3$, proporcionando a formação do agregado plaquetário (GAWAZ; NEUMAN; SCHOMIG, 1999).

O complexo GPIb-V-IX é um receptor multifuncional, constitutivamente ativo, composto por quatro subunidades glicoproteicas (GPIb α , GPIb β , GPV e GPIX). A ligação do FvW a esse complexo induz a liberação de ADP, aumentando a afinidade da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pelo FvW, contribuindo para adesão plaquetária e formação posterior do agregado plaquetário. É responsável por interagir com o FvW e o fibrinogênio, sendo decisivo na adesão plaquetária, no recrutamento de plaquetas circulantes para o local lesionado, facilitando a interação com outros receptores plaquetários e seus respectivos ligantes (WARE, 1998; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008).

A interação entre receptores PARs e a trombina é responsável pelo aumento de cálcio intracelular, contribuindo de forma eficaz para agregação plaquetária (ADAMS *et al.*, 2011; RWIBASIRA RUDINGA; KHAN; KONG, 2018). A trombina representa o mais potente ativador plaquetário e é responsável por converter o fibrinogênio em fibrina, estabilizando o agregado plaquetário (KIM *et al.*, 2002). Plaquetas humanas expressam os receptores PAR1 e PAR4, sendo que a trombina se liga ao PAR1 em baixas concentrações e PAR4 em altas concentrações (KAHN *et al.*, 1999).

Os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ interagem com o ADP no início da ativação. A ativação plaquetária via P2Y₁ ocorre por ativação de fosfolipase C (PLC) e alteração conformacional das plaquetas devido ao influxo de cálcio (DAVÌ; PATRONO, 2007). A ativação via P2Y₁₂ é responsável por sustentar esse evento. A ativação da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ é dependente dessas duas vias, porém esses receptores são incapazes de induzir a estabilização do tampão plaquetário (HOLLOPETER *et al.*, 2001; OQUELI; HISCOCK; DICK, 2007).

A serotonina é um potente ativador plaquetário e ao se ligar ao receptor 5HT_{2A} amplifica a agregação de plaquetas, porém essa interação é insuficiente para ativar a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (YANG *et al.*, 2000; DALE *et al.*, 2002). A epinefrina se liga ao receptor α_{2A} -adrenérgico, atuando como agonista e ativando as plaquetas por provocar a liberação de ácido araquidônico, sem provocar mudança conformacional (BERNARDI; MOREIRA, 2004). Em conjunto, a ativação desses receptores auxilia e reforça a agregação induzida por outros agonistas. Com exceção da epinefrina, todos os agonistas induzem o aumento de cálcio no citoplasma e a maioria dos agonistas da função plaquetária atua por meio de receptores acoplados à proteína G (OFFERMANN, 2006).

As plaquetas, ao serem ativadas, desencadeiam mudanças no citoesqueleto associadas a mudanças na conformação, contração, secreção dos conteúdos de seus grânulos e ativação de integrinas com o objetivo de sustentar a agregação plaquetária, por meio da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Dentre as substâncias liberadas pelos grânulos plaquetários encontram-se moléculas de adesão, fatores de crescimento e de coagulação, que amplificam o fenômeno de ativação (HERRICK, 2000; JURK; KEHREL, 2005).

Os três tipos de grânulos encontrados no citoplasma da plaqueta, denominados de grânulos densos, lisossomos e α -grânulos, são considerados as principais organelas. Estão relacionados diretamente com o processo de ativação e agregação plaquetária (GAWAZ, 2004). Os grânulos densos, ou grânulos δ , são responsáveis por estocar íons bivalentes, como cálcio, magnésio, fósforo e pequenas moléculas, como o trifosfato de adenosina (ATP), ADP e serotonina. Ao serem secretadas, essas substâncias exercem funções essenciais na ativação plaquetária. Os lisossomos estocam hidrolases ácidas, fosfolipases e granulofisinas responsáveis pela digestão do excesso de material dos agregados

plaquetários. E os α -grânulos estocam moléculas fundamentais para propagar a agregação das plaquetas, como fibrinogênio, fator 4-plaquetário, P-selectina, β -tromboglobulina, fatores de coagulação e fator FvW (HOLMSEN, 1994; ANITUA, 2004).

Função das plaquetas

A função das plaquetas está relacionada principalmente com a hemostasia por meio da formação do tampão hemostático inicial, mas também estão envolvidas no recrutamento de células de defesa, cicatrização de feridas, angiogênese e inflamação (BROOS *et al.*, 2011). Em situações fisiológicas, as plaquetas circulam nas proximidades da parede vascular protegidas da ativação pelo endotélio saudável. Este produz mediadores inibitórios à aderência de plaquetas, como o óxido nítrico e o heparan sulfato, fornecendo uma barreira natural à formação de trombos (CARVALHO *et al.*, 2001).

A integridade vascular e a fluidez do sangue são mantidas por um processo fisiológico denominado hemostasia. A hemostasia é caracterizada por eventos mecânicos e bioquímicos do organismo com a função de manter um equilíbrio entre plaquetas, endotélio, fatores de coagulação e fatores fibrinolíticos (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). Esse processo é constituído por três etapas: hemostasia primária, hemostasia secundária e fibrinólise (GLEESON; O'DONNELL; PRESTON, 2012).

A hemostasia primária constitui a ação entre plaquetas e endotélio, responsável pela formação do tampão plaquetário inicial. Após a lesão vascular, a matriz subendotelial é exposta, as células endoteliais provocam vasoconstrição e consequente redução do fluxo sanguíneo com o intuito de minimizar a hemorragia inicial (MITCHELL; COTRAN, 2000). A hemostasia secundária, também conhecida como rede de coagulação é uma sequência de reações responsáveis por converter o fibrinogênio circulante em polímeros de fibrina. A fibrina tem como função o fortalecimento do agregado plaquetário (GUYTON; HALL, 2011). E a fibrinólise é o processo responsável pela degradação do coágulo de fibrina e restauração da integridade do vaso lesionado. Essa dissolução ocorre pela ação local da plasmina, uma enzima proteolítica que atua sobre as redes de fibrina e remove o excesso do coágulo sanguíneo. Esse processo ocorre concomitante a hemostasia secundária, mantendo o equilíbrio entre a coagulação e a degradação do coágulo (GUYTON; HALL, 2011).

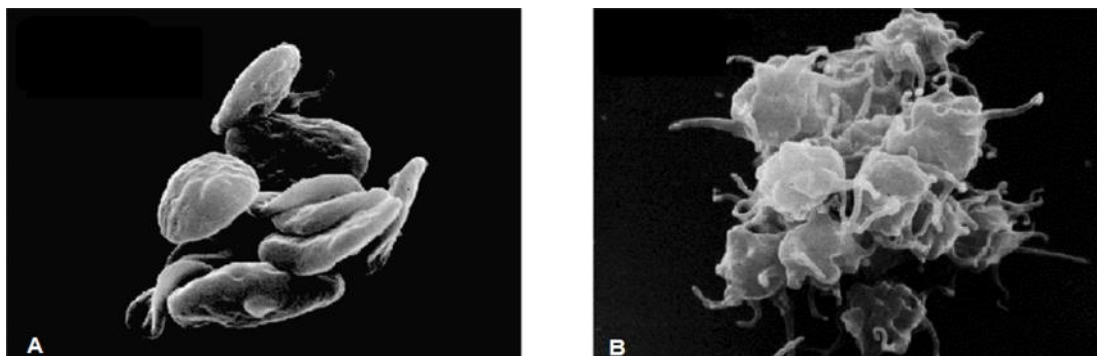
Em situações de desequilíbrio, como lesões ou alterações patológicas, a camada endotelial é rompida e estruturas subendoteliais são expostas, permitindo

a adesão de plaquetas ao local lesionado. Essa adesão é responsável por ativar fatores de coagulação e formar o agregado plaquetário, denominado trombo, com o objetivo de limitar a hemorragia e conter a lesão. Consequentemente, ocorrem mecanismos específicos para a dissolução do coágulo de fibrina, etapa fundamental para o retorno da fluidez do sangue no local reparado (RUGGERI, 1997; WIVIOTT; STEG, 2015).

A formação do trombo depende de três influências primárias: a lesão endotelial, a turbulência e a hipercoagulabilidade. A lesão endotelial é a influência dominante, capaz de gerar trombos devido à exposição do colágeno subendotelial e adesão plaquetária. A turbulência do fluxo aproxima as plaquetas do endotélio, ativa as células endoteliais e predispõe a formação de trombos. E a hipercoagulabilidade é causada por alterações na cascata de coagulação que predispõe a formação de trombos (MITCHELL; COTRAN, 2000).

Danos ao endotélio vascular geram exposição de componentes da matriz subendotelial, como fibras de colágeno e FvW, estimulando a formação de uma monocamada de plaquetas no local lesionado. Isso depende da baixa ou alta tensão de cisalhamento, sendo que em alto fluxo interage inicialmente pelo FvW, de forma rápida e reversível pelo complexo GPIb-V-IX e em baixo fluxo se liga aos receptores de colágeno (YIP *et al.*, 2005; RUGGERI, 2002). Uma das principais estruturas subendoteliais que reage diretamente com as plaquetas é o colágeno, oferecendo um substrato para a adesão e induzindo a ativação plaquetária (KEHREL, 1995). Essa adesão resulta em alterações morfológicas e bioquímicas nas plaquetas, que se tornam ativas e adquirem um formato esférico com extensões dendríticas (Fig.2) (KAHALEH; SCHARSTEIN; LEROY, 1985).

Figura 2: Morfologia das plaquetas. A: plaquetas discoides, inativas ou em repouso. B: plaquetas ativas, com formação de pseudópodos.



Fonte: Adaptado de WILLOUGHBY *et al.*, 2002.

Além disso, a adesão e ativação plaquetária desencadeiam a fosforilação de proteínas alvos, elevação de cálcio, sinalizam a secreção de serotonina, TxA_2 e ADP, responsáveis por amplificar a resposta plaquetária, reforçar a vasoconstrição, recrutar plaquetas adicionais e aumentar a afinidade das integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_2\beta_1$, contribuindo para a formação do trombo (GIBBINS, 2004; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). O TxA_2 é um potente mediador de plaquetas derivado da membrana das plaquetas. Após a ativação plaquetária, o TxA_2 é sintetizado a partir do ácido araquidônico pela ação da ciclooxygenase-1 (COX-1) plaquetária, uma enzima que é inibida irreversivelmente pela aspirina. O TxA_2 é conhecido por induzir a agregação plaquetária nos locais de ativação plaquetária (HALUSHKA, PAWATE, MARTIN, 1997).

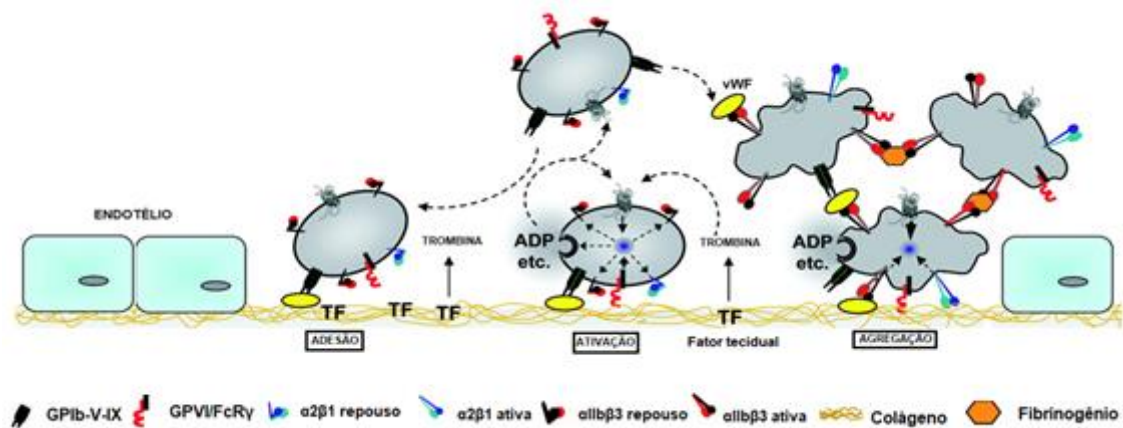
Após a ativação, a quantidade de receptores presentes na membrana da plaqueta é aumentada. Um conjunto desses receptores interage com proteínas citoplasmáticas, amplificando o sinal inicial dos agonistas e modulando a produção de segundos mensageiros como o diacilglicerol (DAG) e o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Esses eventos, por sua vez, são responsáveis por modificar a atividade de enzimas e de proteínas estruturais, sinalizando uma completa ativação plaquetária (FUSTER; SWEENEY, 2011; OZAKI *et al.*, 2005). A proteína quinase C (PKC) é ativada pelo DAG e tem como função estimular a secreção granular de substâncias fundamentais, que ativam o receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, aumentando

sua expressão na membrana plaquetária (WILLOUGHBY; HOLMES; LOSCALZO, 2002; OFFERMANN, 2006). A principal função do IP_3 é aumentar a concentração de cálcio no citoplasma plaquetário, ativando proteínas do citoesqueleto essenciais para a alteração morfológica da plaqueta. Além disso, o IP_3 é responsável por ativar fosfolipase A_2 (PLA_2) plaquetária, enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico, que interage com seus receptores por retroalimentação positiva (STASSEN; ARNOUT; DECKMYN, 2004; JURK; KEHREL, 2005).

A plaqueta ativa expõe em sua membrana externa a fosfatidilserina, um fosfolípido ácido responsável por ativar fatores de coagulação que convertem a protrombina em trombina. A trombina, então, se liga a PARs e é responsável pela secreção dos conteúdos granulares, intensificando a ativação plaquetária e ativando a integrina $\alpha II_b \beta_3$ (RANG *et al.*, 2011).

A adesão e ativação induzem respostas como formação e secreção de serotonina, ADP e TxA_2 , que amplificam a resposta plaquetária e funcionam como agentes pró-trombóticos (GIBBINS, 2004). Essas moléculas são capazes de aumentar a afinidade da integrina $\alpha II_b \beta_3$, que ao ser ativada expõe sítios de ligação ao fibrinogênio plasmático, permitindo a interação entre plaquetas ativas por meio de pontes de fibrinogênio. Essa etapa, denominada agregação plaquetária, é caracterizada pelo acúmulo de plaquetas interligadas entre si e tem as funções de estabilizar a adesão plaquetária e interromper o sangramento no vaso lesionado (Fig. 3) (JURK; KEHREL, 2005).

Figura 3: Figura esquemática da atividade plaquetária. A figura ilustra a adesão, ativação e agregação plaquetária após a lesão vascular. A adesão de plaquetas ao vaso lesionado requer a interação coordenada de receptores presentes na membrana das plaquetas e componentes da matriz extracelular. A ativação é modulada por agonistas, que ao interagirem com os receptores de membrana geram uma mudança conformacional na membrana plaquetária. Essa alteração desencadeia a liberação de conteúdo dos seus grânulos e a síntese de novos agonistas. A ativação das plaquetas induz ainda a exposição de fosfolipídios ácidos na superfície externa das plaquetas, promovendo a formação de trombina a partir da protrombina. A agregação plaquetária consiste na formação de um tampão hemostático através do acúmulo de plaquetas interligadas por moléculas de fibrinogênio.



Fonte: Adaptado de VARGA-SZABO, 2008.

Desequilíbrios nesse processo de agregação plaquetária são críticos em alguns distúrbios cardiovasculares. As plaquetas podem interagir com placas ateroscleróticas rompidas, estimulando a agregação plaquetária e favorecendo o desenvolvimento de distúrbios trombóticos que podem levar a consequências graves como trombose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e embolia pulmonar (RANG *et al.*, 2011; SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011).

Importância das plaquetas

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) incluem as doenças do sistema cardiovascular, diabetes, câncer e doença respiratória crônica. São responsáveis por 38 milhões de morte a cada ano em todo o mundo (OMS, 2015). Em 2008, ocorreram 57 milhões de mortes no globo terrestre, sendo que 63% foram em decorrência das DCNT (ALWAN *et al.*, 2010). No Brasil, as DCNT constituem o problema de saúde pública de maior amplitude, sendo o principal motivo de internações hospitalares e responsáveis por 72% das mortes no país. Destes, 31,3% são atribuídos a distúrbios cardiovasculares (SCHMIDT *et al.*, 2011).

Dentre os distúrbios cardiovasculares, destacam-se as doenças trombóticas e oclusivas, incluindo infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, embolia pulmonar e trombose venosa profunda. Os fatores de risco são diabetes, tabagismo, hipertensão, dislipidemia, imobilização e hipercoagulabilidade (REZENDE; DE BASTOS, 2009; PERLER, 2005).

A participação das plaquetas na hemostasia e trombose tem sido amplamente investigada nas últimas décadas. Elas desempenham um papel importante na fisiopatologia de distúrbios cardiovasculares. No local de uma placa de gordura vulnerável, as plaquetas podem se ligar à parede do vaso, gerando uma ativação excessiva dos processos hemostáticos e a formação de trombos sem a real necessidade de estancar um sangramento (GAWAZ, 2004). Esses trombos podem obstruir os vasos sanguíneos, com consequente redução do fluxo de sangue, gases e nutrientes, gerando complicações para diversos órgãos, como infarto do miocárdio, trombose e isquemia (JOHNSON, 2008). Além disso, pessoas que possuem uma predisposição para aumento de integrina $\alpha_2\beta_1$ nas plaquetas possuem risco elevado de sofrer infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (CARLSSON *et al.*, 1999).

Atualmente, a terapia disponível para esses distúrbios baseia-se no uso de fármacos antiplaquetários que agem inibindo a ação das ciclooxygenases, ou são antagonistas do receptor de ADP, ou da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (CATTANEO, 2003). E esses medicamentos antiplaquetários estão associados a efeitos colaterais

sistêmicos, como complicações hemorrágicas, hipersensibilidade, úlceras, dentre outros (JOHNSON, 2008; PATRONO *et al.*, 2017).

A Aspirina® (ácido acetilsalicílico) é um inibidor irreversível da enzima COX-1. Essa inibição reduz a formação de prostaglandina e, por consequência, diminui a produção de TxA₂, caracterizando o efeito antitrombótico desse medicamento. Porém, esse fármaco é contraindicado para pacientes com histórico de asma, hemofilias, hipertensão não controlada e úlcera gástrica (PATRONO *et al.*, 2005).

Atualmente, como exemplos de fármacos que bloqueiam o receptor de ADP têm-se o Bissulfato de Clopidogrel e o Ticagrelor. O Bissulfato de Clopidogrel é contraindicado para pessoas com histórico de sangramento patológico ativo, úlcera, insuficiência hepática grave ou hemorragia intracraniana (SANGKUHL *et al.*, 2011). O Ticagrelor pertence a uma classe de antiplaquetários com rápida ação, o que beneficia pacientes em quadros agudos. São relatados efeitos adversos como dispneia, aumento na taxa de ácido úrico e creatinina (WALLENTIN *et al.*, 2009).

E, como exemplo de potentes agentes antiplaquetários, têm-se o Tirofiban e o Eptifibatide, fármacos capazes de inibir a via final da agregação plaquetária, por serem antagonistas da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Indicado para pacientes com risco de morte por infarto, porém contraindicados para pacientes com histórico de acidentes vasculares cerebrais nos últimos dois anos, vasculite e cirurgia recente (BONACA *et al.*, 2009).

Espera-se que um agente antiplaquetário ideal afete a função plaquetária, sem induzir complicações como hemorragias (SEREBRUANY *et al.*, 2005). A busca de novas estratégias capazes de modular a função plaquetária e por consequência a formação do trombo indesejável, com menores efeitos colaterais, é crescente. Toxinas de serpentes que interferem na hemostasia surgem como potenciais alvos, uma vez que algumas podem interagir com receptores plaquetários específicos e afetar a agregação plaquetária, podendo direcionar a pesquisa de novos medicamentos antitrombóticos (KAMIGUTI, 2005; CHAN *et al.*, 2016).

Peçonha de serpentes

A peçonha ofídica é uma biblioteca de compostos bioativos, constituída por aminoácidos, carboidratos, componentes inorgânicos, citotoxinas, lectinas, fator de crescimento neural, desintegrinas, peptídeos, toxinas *three-finger*, proteínas de secreção ricas em cisteína (CRISP), enzimas como metaloproteases (SVMs), serinoproteases (SVSPs), PLA₂, hialuronidases, L-aminoácido-oxidases (LAAOs), colinesterases, dentre outros (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; LOMONTE; RANGEL, 2012). Estes componentes apresentam propriedades biológicas distintas em relação à toxicidade, imunogenicidade, características farmacocinética e farmacodinâmica, e atuam fisiologicamente afetando sinais vitais como respiração, mobilidade e circulação (OJEDA, 2017).

Os componentes da peçonha botrópica são responsáveis pelas alterações fisiopatológicas locais e sistêmicas decorrentes do acidente ofídico. Dentre as manifestações locais, observa-se a formação de edema, hemorragia e mionecrose. Em relação às manifestações sistêmicas, têm-se alterações renais, cardiovasculares e distúrbios da coagulação (QUEIROZ *et al.*, 2011; FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). A peçonha da serpente *Bothrops alternatus*, em particular, tem efeito na rede de coagulação, necrótico e induz reação inflamatória com liberação de mediadores endógenos, recrutamento de leucócitos, liberação de citocinas e óxido nítrico, contribuindo para a fisiopatologia tecidual do acidente ofídico (WARREL, 2004).

A pesquisa científica com peçonhas de serpentes foi realizada, por muitos anos, com foco nos componentes enzimáticos. Porém, essas peçonhas possuem uma rica fonte de peptídeos bioativos que ainda são pouco explorados (HARVEY, 2014). Nas últimas três décadas, pesquisas nas áreas de toxilogia, farmacologia, química e biologia estrutural permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos de ação e da relação entre estrutura e função desses componentes. Isso contribuiu para notáveis avanços científicos e para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (MCCLEARY; KINI, 2012; KOH; KINI, 2012).

Compostos bioativos

Peptídeos bioativos são moléculas estruturalmente simples, identificadas por meio de triagens de produtos naturais, com arquitetura molecular adequada para o desenvolvimento de novas drogas (HANCOCK; SAHL, 2006; UHLIG *et al.*, 2014). Os componentes da peçonha de serpentes, de forma nativa, não são utilizados como fármacos, porém podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de drogas antibacterianas, antifúngicas, antitumorais e antiagregante plaquetárias (DUTERTRE, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2016).

A maior vantagem do uso de compostos peptídicos, em relação aos biofármacos à base de proteínas, é devido a sua menor complexidade e custo de produção. O recente avanço da biotecnologia permitiu a obtenção de peptídeos miméticos ou modificados para produção de fármacos e ferramentas moleculares. Essa busca por novos medicamentos é baseada no desenvolvimento racional, modelagem molecular e síntese química de compostos de origem animal ou vegetal (UHLIG *et al.*, 2014; FOSGERAU; HOFFMANN, 2015).

A produção do peptídeo artificial inicia-se com a determinação da atividade biológica da molécula e determinação da estrutura primária. Algumas tecnologias como síntese química, sistemas de expressão, tecnologia do DNA recombinante ou animais transgênicos são metodologias que podem ser adotadas para produzir um produto sintético (MACHADO *et al.*, 2004).

Algumas moléculas derivadas das peçonhas de serpentes são usualmente comercializadas ou encontra-se em fase de testes clínicos. Eles interagem com receptores de membrana, transportadores e canais iônicos e suas atividades biológicas podem ser aprimoradas por modificação na sequência de aminoácidos em experimentos computacionais (LOMONTE *et al.*, 2010; MCCLEARY; KINI, 2012).

Atualmente, existem aproximadamente sessenta medicamentos com base polipeptídica aprovados no mercado mundial (ALMEIDA *et al.*, 2016). São exemplos comerciais a utilização de *Captopril*, *Waglerina*, *Eptifibatide*, *Tirofiban*, dentre outros (ALMEIDA *et al.*, 2016). Na tabela 2, estão descritas algumas aplicações dos polipeptídios comercializados, provenientes de peçonha de serpentes.

Tabela 2: Compostos bioativos derivados de peçonhas ofídicas

Fármaco	Serpente	Indicação
Captopril (Capoten®)	<i>Bothrops jararaca</i>	Hipertensão arterial
Cenderitide (Capricor®)	<i>Dendroaspis angusticeps</i>	Insuficiência cardíaca
Calciseptina	<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	Bloqueador do canal do Cálcio tipo L
Crotalphine	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Analgésico
Dendrotoxin-I	<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>	Bloqueador de canais de potássio 1.1 e 1.2
Eptifibatide (Integrilin®)	<i>Sistrurus miliaris barbour</i>	Inibidor da agregação plaquetária
Waglerin-1 (SYN® - AKE)	<i>Tropidolaemus wagleri</i>	Cosmetologia

Fonte: Adaptado de ALMEIDA *et al.*, 2016.

Pesquisadores demonstraram que um tripeptídeo, denominado pENW, com 429 Da, derivado da peçonha de *Agkistrodon acutus Guenther*, é capaz de aumentar o tempo de coagulação, inibir a agregação plaquetária induzida por múltiplos agonistas e inibir a formação de trombos (KONG *et al.*, 2009; XIONG *et al.*, 2009).

Em 1998, um fármaco antiplaquetário, por ser antagonista da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA): o Eptifibatide. Um heptapeptídeo cíclico sintético baseado em uma desintegrina da peçonha da serpente *Sistrurus miliaris barbour* utilizado para prevenir a formação do trombo e da agregação plaquetária em síndromes coronarianas agudas (HASHEMZADEH *et al.*, 2008; BONACA *et al.*, 2009).

Ferreira (1965) pesquisou peptídeos potenciadores de bradicinina da peçonha da serpente *Bothrops jararaca*. Seus estudos permitiram o desenvolvimento do Captopril, a primeira droga derivada de peçonha ofídica a obter a aprovação da FDA. Trata-se de um peptídeo sintético desenhado com o objetivo de inibir a enzima conversora de angiotensina. Seu mecanismo de ação

está associado à formação de um complexo com o íon Zn^{2+} presente no sítio ativo da enzima, impedindo a conversão de angiotensina I em angiotensina II, e consequentemente gerando vasodilatação e diminuição da pressão arterial. Comercialmente conhecido por Capoten® é um dos fármacos mais utilizados no mundo para o tratamento da hipertensão arterial e de insuficiência cardíaca congestiva (FERREIRA, 1965; SMITH, VANE, 2003).

O Dendroaspis-NP é um peptídeo natriurético de 15 aminoácidos, isolado da peçonha da serpente *Dendroaspis angusticeps* por Schweitz e colaboradores (1992). Esse peptídeo, unido a um peptídeo natriurético humano do tipo C, gerou uma molécula quimérica vasodilatadora, conhecida por Cenderitide (Capricor®). Esse fármaco é capaz de ativar os receptores guanilato ciclase, inibindo a agregação plaquetária e a coagulação, sendo útil no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva crônica (MCKIE, SANGARALINGHAM, BURNETT, 2010; DICKEY, POTTER, 2011).

O Waglerin-1, um peptídeo neurotóxico sintético de 22 aminoácidos, baseado em um componente da peçonha da serpente *Tropidolaemus wagleri*. É utilizado como base para a síntese de um tripeptídeo empregado em cremes antirrugas. Sua ação como antagonista do receptor nicotínico é capaz de bloquear a transmissão do sinal e promover relaxamento muscular (NIRTHANAN, GWEE, 2004; BALAEV; OKHMANOVICH; OSIPOV, 2014).

Estudos relacionados a moléculas que interferem com agregação plaquetária são de grande relevância, uma vez que desempenham importante papel na formação do trombo. Toxinas de serpentes surgem, atualmente, como o foco de pesquisa para a busca de moléculas possíveis de serem utilizadas como novos agentes antiplaquetários e antitrombóticos.

CAPÍTULO II

Peptídeos sintéticos que interferem na agregação plaquetária

RESUMO

As peçonhas de serpentes são consideradas uma biblioteca de proteínas e peptídeos que podem apresentar importantes ações farmacológicas. No presente trabalho, analisamos a interferência de dois peptídeos sintéticos, baseados em componentes da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*, sobre a hemostasia e sua capacidade de interferir com receptores plaquetários. Os peptídeos sintéticos foram denominados *Pep01* e *Pep15*. O primeiro foi capaz de afetar a função plaquetária, por inibir a agregação de plaquetas na presença do colágeno. Além de apresentar capacidade de reduzir a massa de um coágulo sanguíneo pré-existente. E o segundo, demonstrou capacidade em promover a agregação plaquetária. Esses componentes surgem como moléculas em potencial para serem utilizadas para o desenvolvimento de novos agentes antiagregante e antitrombóticos.

Palavras chave: Peptídeos, agregação plaquetária, antitrombóticos.

ABSTRACT

Snake venoms are considered a library of proteins and peptides that may present important pharmacological actions. In the present work, we analyzed the interference of two synthetic peptides, based on components of the venom of the snake *Bothrops alternatus*, on hemostasis and its ability to interfere with platelet receptors. Synthetic peptides were named *Pep01* and *Pep15*. The *Pep01* was able to affect platelet function by inhibiting platelet aggregation in the presence of collagen. In addition to being able to reduce the mass of a pre-existing blood clot. And the second, demonstrated ability to promote platelet aggregation. These components appear as potential molecules to be used for the development of novel antiaggregant and antithrombotic agents.

Key words: Peptides, platelet aggregation, antithrombotics.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar peptídeos sintéticos derivados de um peptídeo da peçonha de *Bothrops alternatus* com capacidade de interferir na agregação plaquetária, avaliando o seu potencial terapêutico e farmacológico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar e purificar o *Pep01*, um heptapeptídeo derivado da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*.
- Sintetizar e purificar o *Pep15*, um peptídeo derivado do *Pep01*.
- Avaliar os peptídeos sintéticos na agregação plaquetária.
- Investigar a ação biológica e o potencial farmacológico dos peptídeos sintéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese dos peptídeos

Ambas as sínteses foram realizadas utilizando um sintetizador semiautomático via micro-ondas (CEM Discover). A síntese foi realizada em fase sólida utilizando resina NovaSynTGR com a estratégia F-moc. A cada ciclo, foi adicionado o novo aminoácido com HBTU (2- (1H-benzotriazol-1), e DIEA como solução ativadora. A desproteção foi realizada utilizando piperidina 20% em dimetilformamida (DMF). As lavagens foram realizadas com diclorometano (DCM) e DMF para remoção do excesso de reagentes. Todas as etapas de acoplamento e desproteção foram confirmadas utilizando o teste de Kaiser. Após a síntese, o coquetel de clivagem contendo ácido trifluoracético (TFA) 95%, triisopropilsilano (TIS) 2,5% e água ultrapura 2,5% foi adicionado. Posteriormente, o produto sintético foi precipitado utilizando éter de petróleo gelado e recuperado por centrifugação 5 x 1000 x g por oito minutos e re-suspendido em água ultrapura. Posteriormente, os peptídeos foram liofilizados e submetidos a passos de purificação.

Purificação dos peptídeos

Os peptídeos sintéticos foram solubilizados em água, aplicados a uma coluna de fase reversa Source 15 RPC ST (4.6x100 mm) utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Cerca de 1 mg dos peptídeos sintéticos aplicados à coluna previamente equilibrada com 0,065% de TFA (solvente A) e eluída com gradiente de concentração de 0 a 100% de 70% acetonitrila em 0,1% de TFA (solvente B), a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min.

Preparação do plasma

As coletas foram realizadas por profissional habilitado. A fim de avaliar a agregação plaquetária, sangue humano de voluntários foi coletado em tubo com citrato de sódio a 3,8%. Para o ensaio trombolítico, o sangue humano foi coletado livre de anticoagulantes.

Os critérios de seleção dos doadores foram: idade entre 18 e 65 anos, saudável, peso superior a 50 kg, não apresentar distúrbios hemostáticos e não

ingerir álcool ou medicamentos que interfiram na hemostasia 48 horas antes da coleta. O sangue total foi centrifugado a 100 x *g* por 12 min, a fase superior foi recuperada e denominada plasma rico em plaquetas (PRP). O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido a partir da fase inferior da centrifugação anterior após centrifugação por 15 min a 1000 x *g*. Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para pesquisas em humanos e aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa Humana da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, de Protocolo número 1.627.982/2016.

Ensaio de agregação plaquetária

O ensaio de agregação plaquetária foi realizado utilizando agregômetro de quatro canais, AggRAM™ version 1.1, (Helena Laboratories, EUA) baseado no protocolo de Queiroz e colaboradores (2014). Para avaliar a inibição da agregação plaquetária, 200 µL de PRP foram incubados por 10 minutos a 37 °C, com diferentes doses dos peptídeos sintéticos (10 a 30 µg) diluídos em 25 µL de solução salina. Posteriormente, foi adicionado 20 µL do agonista colágeno (10 µg/mL) e a extensão da agregação plaquetária foi mensurada durante 10 minutos. Para avaliar a capacidade do peptídeo sintético em induzir a agregação plaquetária, diferentes doses dos peptídeos (10-50 µg) diluídas em 20 µL de água ultrapura foram adicionadas a 200 µL do PRP e a agregação plaquetária foi avaliada, durante 10 minutos, a 37 °C.

Atividade anticoagulante

O ensaio anticoagulante *in vivo* foi realizado de acordo com o método de Gene e colaboradores (1989). Seis camundongos Swiss (18-20 g) foram divididos em dois grupos. O grupo tratamento recebeu, por via intraperitoneal, 30 µg dos peptídeos sintéticos previamente dissolvidos em 100 µL de salina. Os animais do grupo controle receberam apenas 100 µL de salina. Após 1 h, os animais foram anestesiados (cetamina + xilazina), eutanasiados e punção cardíaca foram

realizadas. O sangue total foi colocado em tubos e foram incubados a 25°C para observação de coagulação.

Atividade coagulante

A atividade coagulante foi avaliada no equipamento coagulômetro (CLOTIMER, Brazil). O efeito coagulante foi testado pela adição de 30 µg dos peptídeos sintéticos dissolvidos em 50 µL de água ultrapura, à 200 µL de plasma, por 2 minutos a 37 °C.

Ensaio trombolítico *in vitro*

A atividade trombolítica do *Pep01* foi avaliada segundo Gremski e colaboradores (2007). Coágulos formados com 500 µL de sangue humano fresco, foram incubados em placas de 24 poços com quantidades crescentes do *Pep01* (10 a 60 µg) dissolvidos em 100 µL de solução salina. Após 24 h de incubação, os coágulos foram retirados da placa e seus pesos foram mensurados. Os experimentos foram realizados em triplicata e as diferenças entre o grupos tratamento e controle foram analisadas pelo teste One-Way ANOVA, software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

Ensaio antibacteriano

A atividade antibacteriana foi realizada pelo teste de difusão em ágar. Amostras de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Escherichia coli* (ATCC25922) foram semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton em duplicata. A sensibilidade foi testada com 30 µg do *Pep01*, embebidos em cada disco de papel de filtro estéril de 5 mm de diâmetro. Discos contendo oxacilina (1 µg) para *S. aureus* e ampicilina (10 µg) para *E.coli* foram utilizados como controles positivos. Para controle negativo, foram utilizados discos brancos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e o diâmetro das zonas de inibição foram mensuradas.

Quantificação da ativação plaquetária

Esse experimento foi realizado utilizando citometria de fluxo (FACSCanto, Biosciences, CA, EUA). O efeito do peptídeo sintético na ativação plaquetária foi mensurado com base na expressão da fosfatidilserina na membrana externa das plaquetas. O PRP foi tratado com agonista colágeno (10 µg/20 µL) e com o *Pep01* (30 µg/25 µL). Após 20 min, 2 µL de um marcador de fosfatidilserina denominado Anexina-V-FITC foi adicionada e a quantificação da ativação plaquetária foi representada pela porcentagem de plaquetas positivas para Anexina-V-FITC. Análises estatísticas foram realizadas com o Software FlowJo (Biosciences, CA, EUA) e o teste *t de Student*.

Análise de bioinformática

A análise *in silico* foi realizada para verificar a interação dos peptídeos com os receptores de colágeno. Inicialmente, as estruturas de cristais dos principais receptores de colágeno ($\alpha_2\beta_1$ e GPVI) foram adquiridos na plataforma do PDB data bank (<https://www.rcsb.org/>), sendo registrados sob os códigos 1AOX e 2GI7, respectivamente. O acoplamento molecular entre o *Pep01* e a 1AOX e 2GI7 foi realizado pela plataforma CLUSPRO (<https://cluspro.bu.edu/login.php>). Para validação do acoplamento, primeiramente foi avaliado o cálculo da área de interface realizado pelo PDBePISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) e fator B feito na plataforma ResQ (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ResQ/>). Os resultados desse fator revelam que valores abaixo de -10 sugerem interações verdadeiras e, portanto, indicam uma maior possibilidade de interação. Foi realizada a verificação dos resíduos (G score), que avalia a qualidade da distribuição dos ângulos de interação. (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>).

Diferentes sequências peptídicas foram pré-selecionadas a partir do *Pep01* e denominadas de *Pep02* a *Pep15*. O programa PEPITOPE (<http://pepitope.tau.ac.il/>) foi utilizado para verificar a possibilidade de interação entre os peptídeos pré-selecionados e os receptores. Para o acoplamento

molecular, o modelo 3D dos peptídeos foram criados pelos programas PEP FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) para peptídeos acima de 5 aminoácidos, e FLEXPEP (https://www.rosettacommons.org/docs/latest/application_documentation/docking/flex-pep-dock) para sequência menores do que 5 aminoácidos.

Para validação do acoplamento, primeiramente foi avaliado o cálculo da área de interface realizado pelo PDBePISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>) e fator B feito na plataforma ResQ (<https://zhanlab.ccmb.med.umich.edu/ResQ/>). E a interação entre os peptídeos e o receptor foi avaliada pelo programa LIGPLOT (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LIGPLOT/>).

RESULTADOS

No presente trabalho, descrevemos, pela primeira vez, a síntese e caracterização de um heptapeptídeo, denominado *Pep01*, baseado em um peptídeo da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* e também de um de seus derivados, um tripeptídeo denominado *Pep15*. Ambos foram capazes de interferir na agregação plaquetária. Enquanto o *Pep01* foi capaz de diminuir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, curiosamente o *Pep15* apresentou uma ação oposta, induzindo a agregação plaquetária.

Salientamos que parte dos resultados obtidos nesse trabalho se encontra em processo de patenteamento, e de acordo com as instruções e normativas da Diretoria de Inovação e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, a defesa dessa tese deverá ser realizada em sigilo e os membros da banca assinarão um termo firmando o compromisso de não expor as informações apresentadas. Também, tomamos o cuidado de não apresentar na tese informações detalhadas dos resultados encontrados, pelo menos nesse momento. Entretanto, temos a convicção de que a forma da redação não prejudicará o entendimento por parte do leitor e da própria banca.

O *Pep01* foi sintetizado com base na sequência de um peptídeo nativo, previamente isolado em nosso laboratório por Simamoto (2017), denominado de BaltPAi (inibidor da agregação plaquetária da peçonha de *Bothrops alternatus*). Esse peptídeo nativo demonstrou ser eficaz em inibir a agregação plaquetária na presença do colágeno, sendo, portanto, uma molécula peptídica com uma interessante ação hemostática. Frente a isso, decidiu-se prosseguir a pesquisa com essa molécula, porém investigaríamos a ação do peptídeo sintético baseado na sequência do BaltPAi. A síntese do peptídeo foi realizada utilizando um sintetizador via micro-ondas e o mesmo foi purificado em coluna de fase reversa Source 15 RPC ST 4.6/100 em um sistema de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Todas as frações foram testadas em ensaios de inibição da agregação plaquetária na presença do colágeno, e a fração indicada pela seta representou a molécula sintética de estudo neste trabalho, uma vez que demonstrou capacidade de inibir a agregação, de forma similar ao peptídeo nativo. Essa fração foi denominada *Pep01* (Fig. 4).

Posteriormente, demonstramos o efeito do *Pep01* sobre a agregação plaquetária, de maneira dose-dependente (10, 20, 30 µg/ 30 µL), onde cerca de

20 µg/30 µL do *Pep01* foram capazes de reduzir a agregação plaquetária induzida pelo colágeno em aproximadamente 80%, tratando-se, portanto, de um peptídeo com evidente ação antiagregante (Fig. 5).

Figura 4: Perfil cromatográfico do peptídeo sintético aplicado em coluna de Fase Reversa Source 15 RPC ST (4.6 X 100 mm) equilibrada com 0,065% de ácido trifluoracético e eluída com gradiente de concentração de 0-100% de 70% acetonitrila em 0.1% TFA. A seta indica a molécula de *Pep01*.

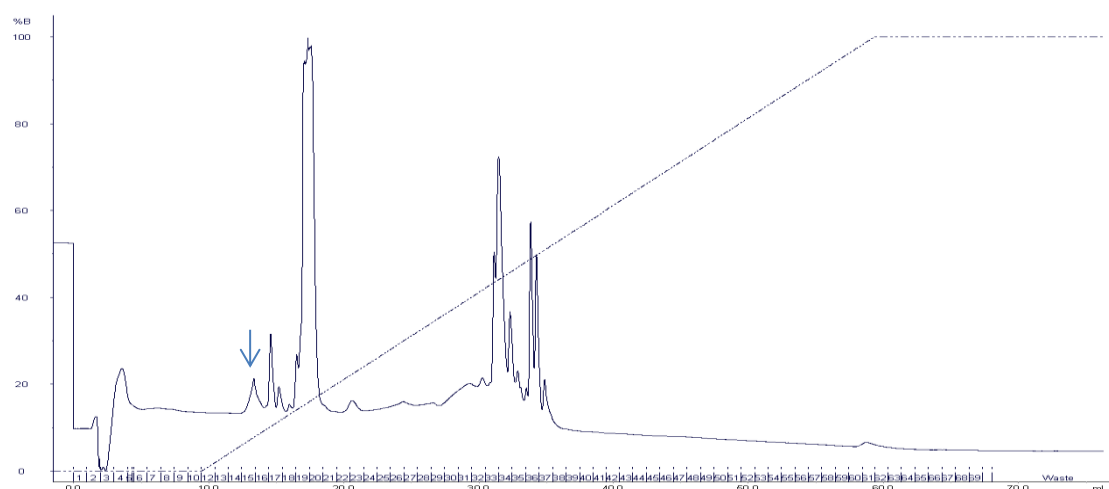
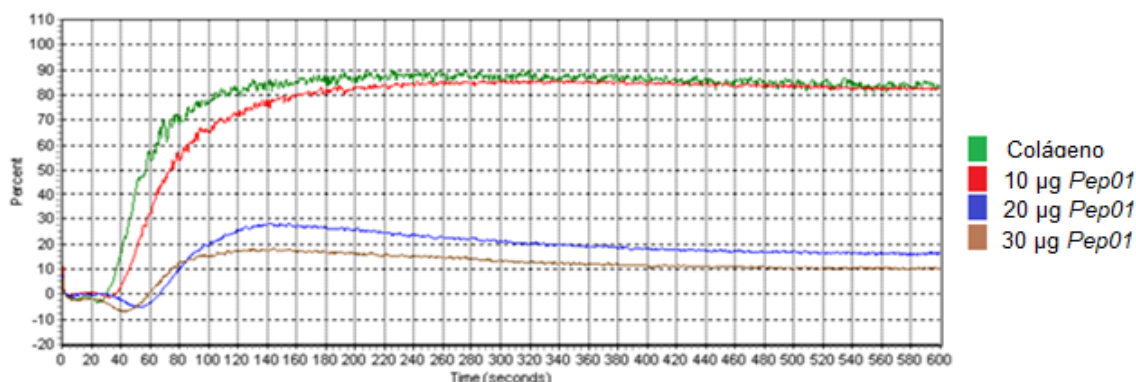


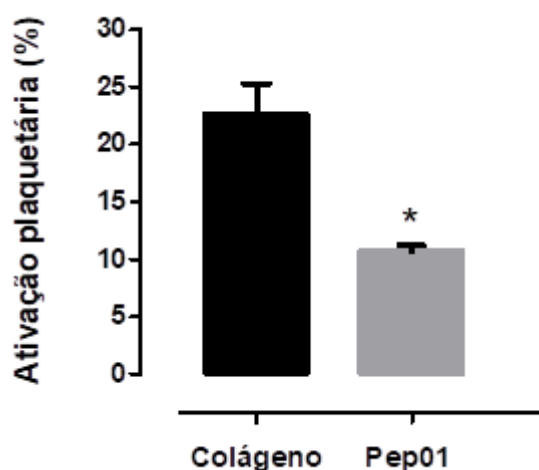
Figura 5: Ensaio de agregação plaquetária induzida pelo colágeno, na presença do *Pep01*. O PRP foi pré-incubado com o *Pep01*, por 10 minutos a 37° C, previamente a adição do colágeno. A agregação plaquetária foi registrada em um sistema óptico com quatro canais (AggRAM). Os resultados foram expressos como um aumento na transmissão da luz. Experimentos controle foram realizados utilizando apenas agonistas plaquetários.



Para quantificar a ativação plaquetária, de maneira específica, e confirmar a atividade antiagregante do *Pep01* foi realizado o ensaio em citometria de fluxo. Observou-se uma redução média de 47 % na porcentagem de ativação de plaquetas, onde se obteve um resultado de 22,6 % de plaquetas positivas no grupo tratado apenas com colágeno (controle) e 10,7 % de plaquetas positivas para o grupo teste (*Pep01* + colágeno) (Fig. 6).

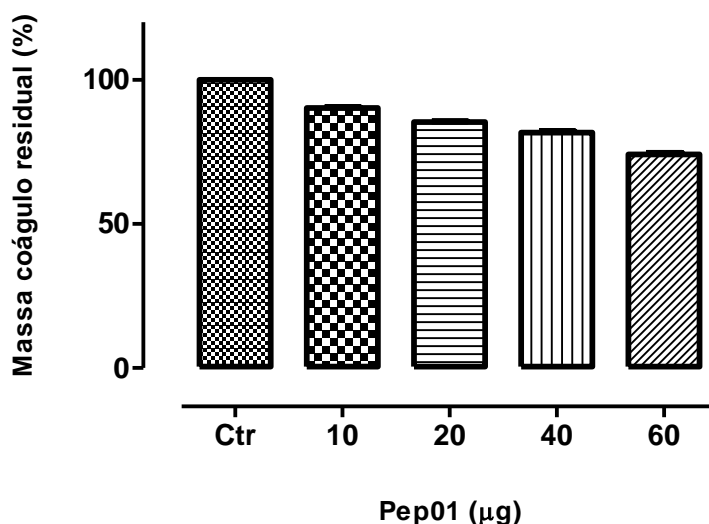
A interferência do *Pep01* sobre as atividades coagulantes, antimicrobiana e desfibrinogenante (ação anticoagulante *in vivo*) foram analisadas. O *Pep01* não foi capaz de coagular o plasma sanguíneo, não inibiu a multiplicação de bactérias em meios de cultura e não tornou o sangue de camundongos incoagulável.

Figura 6: Ensaio de quantificação da ativação plaquetária em citometria de fluxo. O PRP foi tratado com o *Pep01* (30 µg/ 30 µL). Após 20 min, Anexina V-FITC foi adicionada e plaquetas identificadas como positivas estão representadas em porcentagem. Barra preta: Grupo controle, tratado apenas com colágeno. Barra cinza: grupo tratado, incubados com *Pep01*. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).



Além disso, a ação trombolítica do *Pep01* foi investigada. Esse ensaio, realizado *in vitro*, demonstrou que diferentes doses do *Pep01* foram eficientes em reduzir a massa de um coágulo sanguíneo pré-existente, na qual cerca de 60 µg / 100 µL salina do *Pep01* foram capazes de desfazer 25% do coágulo (Fig. 7).

Figura 7: Atividade trombolítica, *in vitro*, do *Pep01*. Coágulos formados de forma espontânea, a partir de 500 μ L de sangue humano fresco, foram incubados com quantidades crescentes do *Pep01*, de 10 a 60 μ g/100 μ L de solução salina. Após 24 h, a massa dos coágulos foi mensurada. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*).



No presente trabalho, análises de bioinformática foram realizadas com a finalidade de melhor investigar a interação entre o *Pep01* e os principais receptores de colágeno (GPVI e $\alpha_2\beta_1$). Para análise do acoplamento molecular, estruturas em cristais da GPVI e da $\alpha_2\beta_1$ foram obtidas na PDB *protein data bank* e registrada sobre os códigos 2GI7 e 1AOX, respectivamente. A análise do acoplamento entre o *Pep01* e os receptores de colágeno foi confirmada pelo fator B. O fator B gerado da interação do *Pep01* com o receptor GPVI foi 62.37, enquanto da interação entre o *Pep01* e o receptor $\alpha_2\beta_1$ foi -101.68. Com base neste resultado, podemos sugerir que o *Pep01* interage preferencialmente com o receptor $\alpha_2\beta_1$, uma vez que valores abaixo de -10 indicam possibilidades de interações verdadeiras.

A partir desses resultados, consideramos a hipótese de peptídeos menores, derivados do *Pep01*, serem mais eficientes na inibição da agregação plaquetária. Para tanto, um estudo de bioinformática avaliou a interação entre peptídeos derivados (denominados de *Pep02* até *Pep15*) e o receptor $\alpha_2\beta_1$. Essa

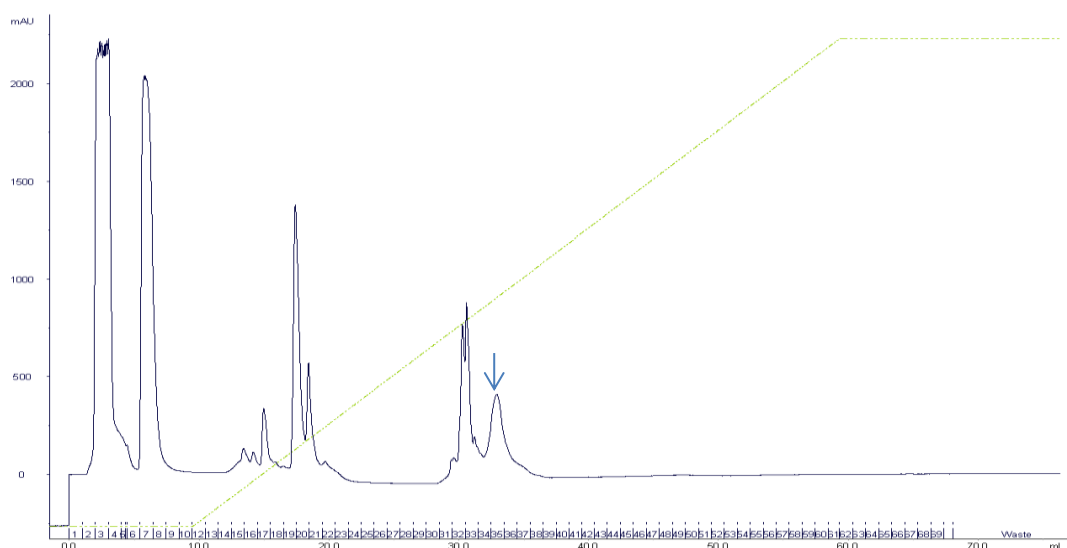
análise revelou que sete sequências interagiram com o receptor $\alpha_2\beta_1$ de forma semelhante ao *Pep01*. Os peptídeos derivados que demonstraram atividade estão descritos na tabela 3. Destes, o *Pep02* e o *Pep15*, com base no parâmetro G score obtiveram um valor de 0.06, enquanto o *Pep01* foi 0.04. No entanto, o valor do δ ASA referente ao *Pep15* foi de 4322.0, superior a todos os derivados e ao *Pep01* (4303,5).

Sendo assim, o *Pep15* foi escolhido para ser sintetizado, caracterizado e analisado quanto a sua capacidade de afetar a função plaquetária. O *Pep15*, um tripeptídeo foi sintetizado e purificado pelas mesmas técnicas utilizadas para o *Pep01* (Fig. 8).

Tabela 3: Interação entre os peptídeos e o receptor $\alpha_2\beta_1$

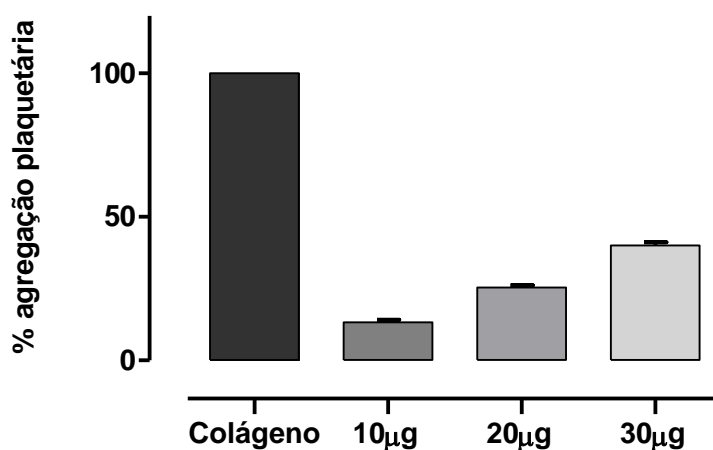
Peptídeos	(G score)	δ ASA
<i>Pep01</i>	0,04	4303,5
<i>Pep02</i>	0,06	4285,5
<i>Pep04</i>	0,04	4289,0
<i>Pep05</i>	0,05	4312,7
<i>Pep09</i>	0,05	4285,9
<i>Pep12</i>	0,05	4300,7
<i>Pep15</i>	0,06	4322,0

Figura 8: Perfil cromatográfico do peptídeo sintético bruto aplicado em coluna de Fase Reversa Source 15 RPC ST (4.6 X 100 mm) previamente equilibrada com 0,065% de TFA e eluída com gradiente de concentração de 0-100% de 70% acetonitrila em 0.1% TFA. A seta indica a fração que mostra ter atividade na agregação plaquetária.



Todas as frações da cromatografia foram dosadas e testadas em experimentos de inibição da agregação plaquetária na presença do colágeno. No entanto, observou-se que não foram capazes de inibir a agregação plaquetária. Curiosamente, a última fração, indicada pela seta, demonstrou percentual de agregação plaquetária (cerca de 120%) superior ao controle colágeno e, portanto, foi avaliada em experimentos de indução da agregação plaquetária. Foi observado que cerca de 30 μ g do *Pep15* foram capazes de induzir a agregação plaquetária em aproximadamente 30% (Fig. 9).

Figura 9: Ensaio de ativação plaquetária do *Pep15*. Doses dependentes (10, 20, 30 µg/ 30 µL) do *Pep15* foram adicionadas à 200 µL de PRP e a agregação plaquetária foi registrada em um sistema óptico. Experimento controle foi realizado utilizando o agonista colágeno.



Como os peptídeos apresentaram atividades sobre a agregação plaquetária de formas distintas, análises no programa LIGPLOT foram realizadas para melhor compreender os possíveis sítios de ligação do *Pep01* e do *Pep15* ao receptor $\alpha_2\beta_1$. Essa análise demonstrou que o *Pep01* interage principalmente com ASN274, ARG277, SER305, ILE306, ARG310, ARG312, GLU336 e GLY338, enquanto que o *Pep15* interage principalmente com ARG137, SER139, SER142, THR246, ILE335 e THR339. Por essa análise verificamos que os resíduos de aminoácidos participantes dos pontos de interação entre os peptídeos e o receptor podem ser modelos distintos.

DISCUSSÃO

As plaquetas desempenham um papel fundamental na hemostasia e estão ativamente envolvidas em distúrbios trombóticos (GREGG; GLODSCHIMIDT-CLERMONT, 2003). Alterações na função plaquetária geram desequilíbrios nos mecanismos que controlam o crescimento do trombo, um dos fatores que favorecem o desenvolvimento de doença trombótica (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). Por esse motivo, componentes capazes de modular a ativação e agregação plaquetária são atualmente utilizados para tratar e prevenir esses distúrbios (KOH; KINI, 2012).

As peçonhas de serpentes são constituídas por uma complexa mistura de componentes inorgânicos, aminoácidos, proteínas enzimáticas e não enzimáticas. Essas proteínas são capazes de interagir com receptores específicos que alteram a atividade plaquetária (OJEDA, 2017; HOOLEY *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2004; ANDREWS; BERNDT, 2004). As toxinas que interferem na função plaquetária podem ser divididas em duas categorias principais: aquelas que inibem a agregação plaquetária (QUEIROZ *et al.*, 2014; SILVEIRA *et al.*, 2013; DELLA-CASA *et al.*, 2011) e aquelas que a ativam (VILCA-QUISPE *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2009). Ambas as categorias apresentam um elevado interesse científico e atraem pesquisadores. A primeira, por interesse médico, como uma ferramenta para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para prevenção e tratamento de distúrbios trombóticos, e a segunda, como uma ferramenta para o tratamento de doenças hemorrágicas que envolvam disfunções plaquetárias (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011; BRAUD; BOM; WISNER, 2000).

A interação entre as plaquetas e o colágeno subendotelial representa um importante componente trombogênico, conhecida como a primeira fase de formação do trombo, mediada principalmente por meio dos receptores $\alpha_2\beta_1$ e GPVI (GAWAZ *et al.*, 2014; MISRA *et al.*, 2018). A pesquisa por compostos capazes de bloquear a interação entre o colágeno e seu receptor é crescente e tem recebido considerável atenção nos últimos anos (FARNDAL *et al.*, 2004).

Toxinas de serpentes que inibem a função plaquetária, principalmente aquelas direcionadas aos receptores de colágeno, podem ser utilizadas como agentes antitrombóticos por serem capazes de bloquear os processos iniciais da formação do trombo (ANDREWS; BERNDT, 2004; MANON-JENSEN; KJELD;

KARSDAL, 2016; CHAN *et al.*, 2016). Algumas toxinas ofídicas que inibem a agregação plaquetária induzida pelo colágeno foram descritas. Como exemplos dessas moléculas, temos a *Catrocollastatin* (ZHOU; DANGELMAIER; SMITH, 1996) e a *Jararhagin* (LAING; MOURADA-SILVA, 2005) metaloproteases isoladas da peçonha de *Crotalus atrox* e *Bothrops jararaca*, respectivamente, que são capazes de se ligar e clivar o receptor $\alpha_2\beta_1$ (KAMIGUTI *et al.*, 1996). A EMS16 e a Sochicetina-A são exemplos de lectinas tipo-C isoladas da peçonha de *Echis multisquamatus* e *E. sochureki* capazes de interferir com a integrina $\alpha_2\beta_1$ e inibir a agregação plaquetária (CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2005; JAKUBOWSKI *et al.*, 2013). Até o momento, não há na literatura trabalhos relacionados com peptídeos sintéticos, oriundos de peçonhas de serpentes, de baixa massa molecular, capazes de atuar como antagonistas do receptor de colágeno e inibir, efetivamente, a agregação plaquetária.

A membrana plaquetária apresenta distribuição assimétrica de fosfolipídios. Em plaquetas não ativadas, 90% da fosfatidilserina localizam-se na porção interna da bicamada lipídica. Durante a ativação, as plaquetas sofrem alterações bioquímicas e morfológicas e exposição de fosfatidilserina em sua superfície. O *Pep01*, um dos peptídeos de estudo do presente trabalho, foi sintetizado, purificado e testado em relação à capacidade de afetar a função plaquetária. Esse peptídeo demonstrou inibir a ativação e agregação plaquetária induzida por colágeno.

Com isso, para melhor analisar a interação entre o *Pep01* e os principais receptores de colágeno, análises de bioinformática foram realizadas. Dentre essas análises, algumas foram obtidas na plataforma CLUSPRO e validadas pelo fator B (JIANG *et al.*, 2013). Os resultados demonstraram que o *Pep01* interage preferencialmente com a integrina $\alpha_2\beta_1$. Isso pode ser explicado, porque interações com valores abaixo de -10 indicam maior possibilidade de afinidade, sugerindo interações verdadeiras (LIU; LI; LI, 2014). Resultados descritos na literatura consideram a integrina $\alpha_2\beta_1$ como o principal receptor da adesão de plaquetas ao colágeno, e essa interação seria responsável por facilitar a interação com outros receptores de menor afinidade, como a GPVI (SIXMA *et al.*, 1997; NIESWANDT *et al.*, 2001). Outro estudo com camundongos deficientes para a porção α_2 do receptor $\alpha_2\beta_1$ foi realizado com o objetivo de investigar a importância

desse receptor para a adesão e agregação plaquetária. Para isso, uma lesão na artéria carótida dos animais foi induzida e observou-se que o recrutamento de plaquetas ao local lesionado foi tardio, bem como uma menor estabilidade do trombo (GRÜNER *et al.*, 2003). Portanto, acredita-se que a integrina $\alpha_2\beta_1$, especificamente a subunidade α_2 , pode contribuir efetivamente para a interação entre plaquetas e o colágeno subendotelial exercendo um papel essencial no fortalecimento da adesão plaquetária (SAELMAN *et al.*, 1994; CLEMETSON; CLEMETSON, 2001).

A mesma sequência de eventos que leva à formação do trombo durante a hemostasia normal resulta em doenças trombóticas, principal causa de mortalidade na sociedade ocidental (ANDREWS; BERNDT, 2004; GAWAZ, 2004; WIDIMSKY *et al.*, 2013). Uma das estratégias para o tratamento de distúrbios trombóticos é a interferência na função plaquetária (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). Toxinas ofídicas capazes de degradar coágulos, bem como impedir a formação de novos coágulos são consideradas drogas em potenciais para busca de novos agentes para o tratamento de distúrbios trombóticos (KAMIGUTI, 2005). A Alfimeprase, isolada da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix*, bem como a Batroxase, isolada de *Bothrops atrox*, são metaloproteases capazes de reduzir o tamanho do trombo (TOOMBS, 2001; DEITCHER; TOOMBS, 2005; CINTRA *et al.*, 2012). No presente estudo, o *Pep01* demonstrou ser eficaz em diminuir a massa de um coágulo pré-existente, de maneira dependente da dose. Isso nos permite sugerir que o *Pep01* trata-se de uma molécula com potencial para ser utilizada como uma nova abordagem de terapia antitrombótica. Testes futuros são necessários para melhor compreender o mecanismo de ação dessa degradação.

Em suma, relatamos neste trabalho, a caracterização parcial do *Pep01*, um peptídeo sintético derivado da peçonha de *Bothrops alternatus* que demonstrou evidente ação trombolítica, além de ser capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por colágeno, possivelmente por ser um antagonista do receptor $\alpha_2\beta_1$. Deste modo, o *Pep01* surge como um promissor candidato para a produção de fármacos antiplaquetários e antitrombóticos.

No presente trabalho, também foi sintetizado e caracterizado um tripeptídeo, derivado do *Pep01*, denominado de *Pep15*. Esse peptídeo por sua

vez, demonstrou ser eficaz em induzir a agregação plaquetária. Ainda não há publicações na literatura sobre peptídeos sintéticos, de baixa massa molecular, derivados de componentes da peçonha de serpentes capazes de ativar a agregação plaquetária.

Alguns componentes encontrados na peçonha de serpentes são capazes de induzir a agregação plaquetária (ANDREWS; BERNDT, 2004; MATSUI; HAMAKO, 2005). Essas toxinas pertencem à classe de metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases, lectinas tipo-C e L-aminoácido oxidases (LAAOs). Alguns exemplos dessas moléculas promotoras da agregação plaquetária são a BthTX-II, uma PLA₂ isolada da peçonha de serpentes *B. jararacussu* (FULY *et al.*, 2004), a Trombocitina, uma serinoprotease encontrada na peçonha da serpente *B. atrox* (SANTOS *et al.*, 2000) e a BpirLAAO-I, uma LAAO encontrada em *B. pirajai* (IZIDORO *et al.*, 2006). Estudos anteriores demonstraram que algumas proteínas ofídicas são potentes ativadores plaquetários por atuarem de forma semelhante ao colágeno. Alguns destes, incluindo a Trimucitina de *Trimeresurus mucrosquamatus* (TENG *et al.*, 1993) e Aggretin de *Calloselasma rhodostoma* (HUANG *et al.*, 1995), são conhecidas por interagirem com a integrina $\alpha_2\beta_1$ nas plaquetas.

Análises de moléculas por bioinformática permitem estabelecer possíveis sítios de ligação e identificar compostos propensos à determinada atividade, possibilitando cálculos computacionais (OJEDA, 2017). Essas análises demonstraram que o *Pep15* possivelmente interage com o receptor $\alpha_2\beta_1$, uma vez que apresentou um escore favorável para o desenvolvimento de atividade biológica (LIU; LI; LI, 2014; MOONEY *et al.*, 2012). Outra análise realizada pelo programa LigPlo demonstrou que os prováveis pontos de interação entre *Pep01* e o receptor $\alpha_2\beta_1$ são distintos daqueles da interação entre o *Pep15* e $\alpha_2\beta_1$. Portanto, o *Pep15* induziu a agregação plaquetária, possivelmente por interagir com o receptor de colágeno, promovendo a liberação de substâncias dos grânulos plaquetários, ativando o receptor $\alpha IIb\beta_3$, e, conseqüentemente, gerando a agregação de plaquetas.

O *Pep15* surge, então, como uma molécula de fácil síntese, baixo custo de produção, capaz de agir como agonista da integrina $\alpha_2\beta_1$, com potencial

terapêutico para o tratamento de desordens hemorrágicas relacionadas às plaquetas.

CONCLUSÃO

Em conclusão, descrevemos a caracterização de dois peptídeos, o *Pep01*, um antagonista da integrina $\alpha_2\beta_1$, que inibiu a adesão e a agregação plaquetária, e o *Pep15*, um agonista da agregação plaquetária. Dessa forma, essas moléculas peptídicas sintéticas possuem um grande potencial clínico para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para prevenção e tratamento de doenças relacionadas a alterações na função plaquetária.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. N. et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford. v. 130, n. 2, p. 248-82, 2011.

ALMEIDA, J. R. et al. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. **Toxicon**, Oxford. v. 120, p. 147-58, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.007>

ALWAN, A. et al. Monitoring and surveillance of chronic non communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries. **Lancet**, London. v. 376, n. 9755, p. 1861-68, 2010. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61853-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61853-3)

ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis research**, New York. v. 114, n. 5, p. 447-53, 2004.

ANITUA, E. Autologous platelet as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart. v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.

BALAEV, A. N.; OKHMANOVICH, K. A.; OSIPOV, V. N. A shortened, protecting group free, synthesis of the anti-wrinkle venom analogue Syn-Ake® exploiting an optimized Hofmann-type rearrangement. **Tetrahedron Lett**, Oxford. v. 55, n. 42, p. 5745-47, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.08.117>

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*, v. 82, p. 851-859, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01178-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01178-0)

BERNARDI, P.S.; MOREIRA, H.W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso do ácido acetil salicílico comparados a doadores de sangue. *Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia*, v. 26, p. 239-244, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842004000400003>

BONACA, M. P. et al. Antithrombotics in acute coronary syndromes. **Journal of the American College of Cardiology**, New York. v. 54, p. 969-84, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.03.083>

BROOS, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. **Blood Reviews**, New York. v. 25, n. 4, p. 155-67, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2011.03.002>

CATTANEO, M. The platelet P2Y receptors as targets for new antithrombotic drugs. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford. v. 1, n. 6, p. 1133-35, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00286.x>

CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, São Paulo. v. 8, n. 1, p. 76-88, 2001.

CARLSSON L.E.; SANTOSO S.; SPITZER C.; KESSLER C.; GREINACHER A. The alpha2 gene coding sequence T807/A873 of the platelet collagen receptor integrin alpha2beta1 might be a genetic risk factor for the development of stroke in younger patients. **Blood**, New York. v. 93, n. 11, p. 3583-6, 1999.

CHAN, Y. S. et al. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin. v.100, n. 14, p. 6165-81, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7610-9>

CINTRA, A. C. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from B. atrox snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, Oxford. v. 60, n. 1, p. 70-82, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018>

CLEMETSON, K. J.; CLEMETSON, J. M. Platelet collagen receptors. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart. v. 86, n. 1, p. 189-97, 2001.

CLEMETSON, K. J.; LU, Q.; CLEMETSON, J. M. Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, Basel. v. 34, n. 4, p. 150-55, 2005.

DALE, G. L. et al. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. **Nature**, London. v. 415, p. 175-179, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/415175a>

DAVÌ, G.; PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston. v. 357, n. 24, p. 2482-94, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMr071014>

DECKMYN, H. et al. Inhibitors of the Interactions Between Collagen and Its Receptors on Platelets. **Handbook of experimental pharmacology**, Berlin. v. 210, p. 311-37, 2012. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_13

DEITCHER, S. R.; TOOMBS, C. F. Non-clinical and clinical characterization of a novel acting thrombolytic: alfineprase. **Pathophysiology of haemostasis and thrombosis**, Basel. v. 34, n. 4, p. 215-20, 2005.

DELLA-CASA, M. S. et al. Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins. **Toxicon**, Oxford. v. 57, n. 1, p. 125-33, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.013>

DICKEY, D. M.; POTTER, L. R. Dendroaspis natriuretic peptide and the designer natriuretic peptide, CD-NP, are resistant to proteolytic inactivation. **Journal of molecular and cellular cardiology**, London. v. 51, n. 1, p. 67-71, 2011.

DUTERTRE, S. Venomics in medicinal chemistry. *Future medicinal chemistry*, London. v. 6, n. 15, p. 1609-10, 2014.

FALCÃO, F. J. A. et al. Receptores plaquetários P2Y₁₂: importância na intervenção coronariana percutânea. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo. v. 101, n. 3, p. 277-82, 2013.

FARNDAL, R. W. et al. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford. v. 2, p. 561-73, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00665.x>

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) presente in the venom of *Bothrops jararaca*. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, London. v. 24, n.1, p. 163-69, 1965.

FOSGERAU, K.; HOFFMANN, T. Peptide therapeutics: current status and future directions. **Drug Discovery Today**, Kidlington. v. 20, n. 1, p. 122-28, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. **Acidente Botrópico**. In: CARDOSO, J.L.C. et al. (Orgs.). *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, p. 81-95, 2009.

FULY, A. L. et al. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 phospholipase A2 isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, Paris. v. 86, p. 731-39, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.07.001>

FUSTER, V.; SWEENEY, J. M. Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. **Circulation**, Hagerstown. v. 123, n. 7, p. 768-78, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.963843>

GAWAZ, M.; NEUMAN, F. J.; SCHÖMIG, A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. **Circulation**, Hagerstown. v. 99, n. 1, p. 1-11, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.1.e1>

GAWAZ, M.; LANGER, H.; ANDREAS, E. M. Platelets in inflammation and atherogenesis. **The American Society for Clinical Investigation**, New Haven. v. 115, n. 12, p. 3378-84, 2004.

GAWAZ, M. et al. Implications of glycoprotein VI for theranostics. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart. v. 112, n. 01, p. 26-31, 2014.

GENE, J. A. et al. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venom and their neutralization by polyvalent antivenom. **Toxicon**, Oxford. v. 27, p. 841-48, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(89\)90096-2](https://doi.org/10.1016/0041-0101(89)90096-2)

GIBBINS, J. M. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. **Journal of cell science**, London. v. 117, p. 3415-25, 2004.

GLEESON, E. M.; O'DONNELL, J. S.; PRESTON, R. J. S. The endothelial cell protein C receptor: cell surface conductor of cytoprotective coagulation factor signaling. **Cellular and molecular life sciences**, Basel. v. 69, n. 5, p. 717-26, 2012.

GREMSKI, L. H. et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from Bothrops leucurus snake venom. **Toxicon**, Oxford. v. 50, p. 120-34, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.03.002>

GREGG, D.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. Cardiology patient page. Platelets and cardiovascular disease. **Circulation**, Dallas. v. 108, n. 13, p. 88-90, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000086897.15588.4B>

GRÜNER, S. et al. Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. **Blood**, New York. v. 102, n. 12, p. 4021-27, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1391>

GUTIÉRREZ, J. M. et al. An Alternative in vitro Method for Testing the Potency of The Polyvalent Antivenom Produced in Costa Rica. **Toxicon**, Oxford. v. 26, n. 4, p. 411-13, 1988. Disponível: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90010-4)

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1151, 2011.

HALUSHKA, P. V.; PAWATE, S.; MARTIN, M. L. **Thromboxane A2 and other eicosanoids**. In: BRUCHHAUSEN, F. V.; AUTHI, K. S.; WALTER U. Platelets and their factors. Springer Verlag, Heidelberg, 1997. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-60639-7_21

HANCOCK, R. E.; SAHL, H. G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature biotechnology**, New York. v. 24, n. 12, p. 1551-57, 2006.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, Oxford. v. 92, p. 193-200, 2014.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.020>

HASHEMZADEH, M. et al. Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: a review. **Experimental and clinical cardiology**, Oakville. v. 13, n. 4, p. 192-97, 2008.

HERRICK, A. L. Vascular function in systemic sclerosis. **Current opinion in rheumatology**, Philadelphia. v. 12, n. 6, p. 527-33, 2000.

HOLLOPETER, J. et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. **Nature**, London. v. 409, n.6817, p. 202-07, 2001. Disponível: <https://doi.org/10.1038/35051599>

HOLMSEN, H. **Platelet secretion and energy metabolism**. In: COLMAN, R.; HIRSH, J.; MARDER, V.; SALZMAN, E.: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice, 3rd ed. Philadelphia: JB Lipincott, 1994.

HOOLEY, E. et al. The crystal structure of the platelet activator aggretin reveals a novel (alphabeta)₂ dimeric structure. **Biochemistry**, Washington. v. 47, n. 30, p. 7831-37, 2008.
Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi800528t>

HUANG T.F.; LIU C.Z.; YANG S.H. Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from snake (*Calloselasma rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a glycoprotein Ia/IIa agonist. **The Biochemical Journal**, London. v. 1, n. 309, p. 1021-7, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj3091021>

IZIDORO, L. F. M. et al. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford. v. 14, n. 20, p. 7034-43, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.025>

JAKUBOWSKI, P. et al. Identification of inhibitors of $\alpha 2\beta 1$ integrin, members of C-lectin type proteins, in *Echis sochureki* venom. **Toxicology and applied pharmacology**, New York. v. 269, n. 1, p. 34-42, 2013.

JIANG, S. et al. Putative conformations of the receptor-binding domain in S protein of hCoV-EMC in complex with its receptor dipeptidyl peptidase-4. **The Journal of infection**, London. v. 67, n. 2, p. 156-58, 2013.

JOHNSON, S. Known knowns and known unknowns: risks associated with combination antithrombotic therapy. **Thrombosis Research**, New York. v. 123, n. 1, p. 7-11, 2008.
Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2008.08.011>

JURK, K.; KEHREL, B.E. Platelets: Physiology and Biochemistry. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, New York. v. 31, n. 4, p. 381-92, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2005-916671>

KAHALEH, M. B.; SCHARSTEIN, K. K.; LEROY, E. C. Enhanced platelet adhesion to collagen in scleroderma. Effect of scleroderma plasma and scleroderma platelets. **The journal of rheumatology**, Toronto. v. 12, n. 3, p. 468-71, 1985.

KAHN, M. L. et al. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. **The journal of Clinical Investigation**, New Haven. v. 103, n. 6, p. 879-87, 1999.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **The Biochemical journal**, London. v. 320, p. 635-41, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.026>

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

KEHREL, B. Platelet receptors for collagen. **Platelets**, New York. v. 6, n. 1, p. 11-6, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/09537109509013256>

KIM, S. et al. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate G_i signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of G_i signaling. **Blood**, New York. v. 99, p. 3629-36, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3629>

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics - cardiovascular examples. **Toxicon**, Oxford. v. 59, n. 4, p. 497-506, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.03.017>

KONG, Y. et al. A novel anti-platelet aggregation tripeptide from Agkistrodon acutus venom: isolation and characterization. **Toxicon**, Oxford. v. 54, n. 2, p. 103-09, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.03.027>

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, Oxford. v. 45, p. 987-96, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.013>

LIU, Q.; LI, Z.; LI, J. Use B-factor related features for accurate classification between protein binding interfaces and crystal packing contacts. **BMC bioinformatics**, London. 15, S3, 2014.

LOMONTE, B. et al. Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A2 homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. **Current pharmaceutical design**, Schiphol. v. 16, n. 28, p. 3224-30, 2010. Disponível em:

<https://doi.org/10.2174/138161210793292456>

LOMONTE, B.; RANGEL J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, Oxford. v. 60, n. 4, p. 520-30, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>

LU, Q. et al. GPIb is involved in platelet aggregation induced by mucetin, a snake C-type lectin protein from Chinese habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*) venom. **Thrombosis and Haemostasis**, Oxford. v. 91, n. 6, p. 1168-76, 2004. Disponível em:

<https://doi.org/10.1160/TH03-12-0747>

MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, São Paulo. v. 27, n. 5, p.781-89, 2004. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500018>

MANON-JENSEN, T.; KJELD, N. G.; KARSDAL, M. A. Collagen-mediated hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford. v. 14, p. 438-48, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/jth.13249>

MATSUI, T. HAMAKO, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. **Toxicon**, Oxford. v. 45, n. 8, p. 1075-87, 2005.

MCCLEARY, R. J.; KINI, R. M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. **Toxicon**, Oxford. v. 62, p.56-74, 2012.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.008>

MCKIE, P. M.; SANGARALINGHAM, S. J.; BURNETT JR, J. C. CD-NP: an innovative designer natriuretic peptide activator of particulate guanylyl cyclase receptors for cardiorenal disease. **Current heart failure reports**, Philadelphia. v. 7, n. 3, p.93-9, 2010.

MISRA, A. et al. Anti-thrombotic efficacy of S007-867: Pre-clinical evaluation in experimental models of thrombosis in vivo and in vitro. **Biochemical pharmacology**, Oxford. v. 148, p. 288-97, 2018.

MITCHELL, R. N.; COTRAN, R. S. **Distúrbios hemodinâmicos, trombose e choque**. In: COTRAN RS, KUMAR V, ROBBINS S.L. (EDS) - Robbins patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 107-116, 2000.

MOONEY, C. et al. Towards the improved discovery and design of functional peptides: common features of diverse classes permit generalized prediction of bioactivity. **PloS one**, San Francisco. v. 7, e45012, 2012.

MOROI, M.; JUNG, S. M. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. **Thrombosis research**, New York. v. 114; n. 4, p. 221-33, 2004.

NIESWANDT, B. et al. Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. **The EMBO Journal**, Eynsham. v. 20, n. 9, p. 2120-30, 2001.

NIESWANDT, B.; VARGA-SZABO, D.; ELVERS, M. Integrins in platelet activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford. v. 7, n. 1, p. 206-09, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03370.x>

NIRTHANAN, S.; GWEE, M. C. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. **Journal of pharmacological sciences**, Kyoto. v. 94, n. 1, p. 1-17, 2004.

OFFERMANN, S. The role of heterotrimeric G proteins in platelet activation. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore. v. 381, n. 5, p. 389-96, 2000.

OFFERMANN, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. **Circulation Research**, Baltimore. v. 99, n. 12, p. 1293-304, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000251742.71301.16>

OJEDA, P. G. Computational Studies of Snake Venom Toxins. **Toxins**, Basel. v. 10, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins10010008>

OQUELI, E.; HISCOCK, M.; DICK, R. Clopidogrel resistance. **Heart, lung and circulation**, Carlton. v. 16, p. 17-28, 2007.

OZAKI, Y. et al. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford. v. 3, p. 1745-51, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01379.x>

PATRONO, C. et al. Drug therapy: low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. **The New England Journal of Medicine**, Boston. v. 353, p. 2373-83, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMr052717>

PATRONO, C. et al. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of coronary atherothrombosis. **Journal of the American College of Cardiology**, New York. v. 70, n. 14, p. 1760-76, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.08.037>

PERLER, B. Thrombolytic therapies: the current state of affairs. **Journal of Endovascular Therapy**, Phoenix. v. 12, n. 2, p. 224-32, 2005.
Disponível em: <https://doi.org/10.1583/04-1438.1>

QUEIROZ, M. R. et al. Biological characterization of a myotoxin phospholipase A2 homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu. v. 17, n.1, p. 49-58, 2011.

QUEIROZ, M. R. et al. Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation. **BioMed Research International**, New York. p. 1-7, 2014.

QUEIROZ, M. R. et al. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. **Toxicon**, Oxford. v. 133, p. 33-47, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.013>

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology C, Toxicology and Pharmacology**, New York. v. 142, n. 3, p. 328-46, 2006.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 768, 2011.

REDDY, K.B.; SMITH, D. M.; PLOW, E. F. Analysis of Fyn function in hemostasis and α IIb β 3- integrin signaling. **Journal of cell sciences**, London. v. 121, n. 10, p. 1641-48, 2008.

RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, New York. v. 12, n. 5, p. 261-73, 2001.
Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09537100120068170>

REZENDE, S. M.; DE BASTOS, M. **Distúrbios tromboembólicos**. In: AMATO NETO, A. C. L. V. (Org.). Tratado de Clínica Médica. 2a ed. São Paulo: Roca, v. 2, p. 2044-58, 2009.

RODRIGUES, R. S. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, Paris. v. 91, n. 4, p. 490-501, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.004>
RUGGERI, Z. M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart. v. 78 n. 1, p. 611-16, 1997.

RUGGERI, Z. M. Platelets in atherothrombosis. **Nature Medicine**, New York. v. 8, n. 11, p. 1227-34, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm1102-1227>

RWIBASIRA RUDINGA, G.; KHAN, G. J.; KONG, Y. Protease-Activated Receptor 4 (PAR4): A Promising Target for Antiplatelet Therapy. **International journal of molecular sciences**, Basel. v. 19, n. 2, pii: E573, 2018.

SAELMAN, E. U. et al. Platelet adhesion to collagen and endothelial cell matrix under flow conditions is not dependent on platelet glycoprotein IV. **Blood**, New York. v. 83, n. 11, 3240-44, 1994.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, Oxford. v. 57, n. 5, p. 627-45, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006>

SANGKUHL, K. et al. Platelet aggregation pathway. **Pharmacogenetics and genomics**, Hagerstown. v. 21, n. 8, p. 516-21. 2011.

SANTOS, B. F. et al. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS letters**, Amsterdam. v. 477, p. 199-202, 2000.

SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, London. v. 377, n. 9781, p. 1949-61, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60135-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60135-9)

SCHWEITZ, H. et al. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). **The Journal of biological chemistry**, Baltimore. v. 267, n. 20, p. 13928-32, 1992.

SEREBRUANY, V. L. et al. Hypothesis: antiplatelet effects of selective serotonin reuptake inhibitors cause clinical benefits on cardiovascular disease and increase risks of bleeding. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, Naperville. v. 10, n. 3, p.163-64, 2005.

SILVEIRA, L. B. et al. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford. v. 73, p. 35-43, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.04.008>

SIMAMOTO, B. B. S. **Identificação e caracterização de peptídeos da peçonha de serpentes botrópicas que interferem na agregação plaquetária**. 2017. 111 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SIXMA, J. J. et al. Platelet adhesion to collagen: an update. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart. v. 78, n.1, p. 434-8, 1997.

SMITH, C. G.; VANE, J. R. The discovery of captopril. **FASEB Journal**, Bethesda. v. 17, n. 8, p. 788-89, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.03-0093life>

STASSEN, J. M.; ARNOUT, J.; DECKMYN, H. The hemostatic system. **Current medicinal chemistry**, Schiphol. v.11, n. 17, p. 2245-60, 2004.

TENG C.M.; KO F.N.; TSAI I.H.; HUNG M.L.; HUANG T.F. Trimucytin: a collagen-like aggregating inducer isolated from Trimeresurus mucrosquamatus snake venom. **Thrombosis and haemostasis**, Germany, v. 69, n. 3, p. 286-92, 1993.

TOOMBS, C. F. Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. **Haemostasis**, Basel. v. 31, n. 3, p. 141-47, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000048057>

UHLIG, T. et al. The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation. **EuPA Open Proteome**, Amsterdam. v. 4, p. 58-69, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.euprot.2014.05.003>

VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, Dallas. v. 28, n. 3 p. 403-412, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.150474>

VILCA-QUISPE, A. et al. Isolation and characterization of a new serine protease with thrombin-like activity (TLBm) from the venom of the snake *Bothrops marajoensis*. **Toxicon**, Oxford. v. 55, n. 4, p. 745-53, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.006>

XIONG, J. et al. Anticoagulant and antithrombotic activity of a new peptide pENW (pGlu-Asn-Trp). **The Journal of pharmacy and pharmacology**, London. v. 61, n. 1, p. 89-94, 2009.

WALLACE, E. L.; SMYTH, S. S. Targeting platelet thrombin receptor signaling to prevent thrombosis. **Pharmaceuticals**, Basel. v. 6, p. 915-28, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph6080915>

WALLENTIN, L. et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. **The New England Journal Medicine**, Boston. v. 361, n. 11, p. 1045-57, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904327>

WARE, J. Molecular analyses of the platelet glycoprotein IbIXV receptor. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart. v. 79, p. 466-78, 1998.

WARRELL, D. A. **Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management**. In: LAMAR, W. W, CAMPBELL, J. A. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ed: Cornell University Press: Ithaca, NY, USA, p. 709-61, 2004.

WIDIMSKÝ, P. et al. Acute myocardial infarction and acute stroke: What are the differences? Focus on reperfusion therapy. **Cor et Vasa**, Elsevier v. 55, p. 111-16, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2013.02.002>

WILLOUGHBY, S.; HOLMES, A.; LOSCALZO, J. Platelets and cardiovascular disease. *European journal of cardiovascular nursing*, Amsterdam. v. 1, n. 4, p. 273-88, 2002.

WIVIOTT, S. D.; STEG, P. G. Clinical evidence for oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes. **Lancet**, London. v. 386, n. 9990, p. 292-302, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60213-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60213-6)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Noncommunicable diseases prematurely take 16 million lives annually**, WHO urges more action, 2015.

YANG, J. et al. Loss of signaling through the G protein, G_z, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington. v. 97, n. 18, p. 9984-89, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.180194597>

YIP J.; SHEN Y.; BERNDT M.C.; ANDREWS R.K. Primary platelet adhesion receptors. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology life**, London. v. 57, n.2, p. 103-8, 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. Hematologia: fundamentos e prática. São Paulo. **Atheneu**, 2001.

ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C.; SMITH, J. B. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York. v. 219, n. 3, p. 720-26, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0301>

ZUERN, C. S. et al. Platelet pharmacogenomics. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford. v. 8, n. 6, p. 1147-58, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03791.x>

CAPÍTULO III

(Short communication)

IDENTIFICATION OF AN ANTIPLATELET FRAGMENT DERIVED FROM BaltDC, A DISINTEGRIN PURIFIED FROM *Bothrops alternatus* SNAKE VENOM

Mariana Santos Matias¹, Déborah Fernanda da Cunha Pereira¹, Júnia de Oliveira Costa⁴,
Edigar Henrique Vaz Dias¹, Bruna Barbosa de Sousa Simamoto^{1,5}, Carla Cristine Neves
Mamede^{3,5}, Fábio de Oliveira^{2,5*}

¹Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil ³Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil ⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro, Campus Ituiutaba, Ituiutaba-MG, Brazil ⁵Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), Belo Horizonte-MG, Brazil.

*Corresponding author: Av. Pará, 1720, Bairro Umuarama; CEP 38400-902 - Uberlândia, MG - Brazil. E-mail address: fabio@ufu.br

Abstract

In this paper, the pool of the trypsinized BaltDC fragments inhibited epinephrine-induced platelet aggregation. For enzymatic hydrolysis, trypsin was dissolved in 20 μ L ammonium bicarbonate buffer and added to 500 μ g of BaltDC and the mixture was incubated for 16 hours. Sequencing of pool showed one amino acid sequence LPQSDTDVGDDGLK, named PepDC, which revealed homology with snake venom disintegrins. This peptide may be of great interest for the development of novel therapeutic agents for the prevention and treatment of various thrombotic diseases.

The snake venom is composed of proteins, biologically active peptides and other molecules that act mainly for defense and to capture preys (Ramos and Selistre-de-Araújo 2006). It is constituted of metalloproteases (Queiroz et al 2014), phospholipases (Santos-Filho et al 2008), serine proteases (Costa et al 2010), L-amino acid oxidase (Rodrigues et al 2008), disintegrins (Calvete et al 2003), among other molecules.

In recent decades, the snake venoms have arisen great interest and application in the fields of biotechnology and medicine since they interfere in the dynamics of various cellular processes in the organism (McCleary and Kini 2012; Chan et al 2016). Some of these pharmacologically active compounds present potential therapeutic use since they have antiplatelet (Sousa et al 2017), antimicrobial (Mello et al 2017), antihypertensive (Silveira et al 2013) and antitumor activities (Guimarães et al 2017).

Among these components, the disintegrins, known as platelet integrin receptor antagonist molecules, are effective in inhibiting platelet aggregation (Calvete 2003; Higuchi et al 2011). Ophidic compounds capable of affecting platelet function provide ample opportunities and a diverse molecular architecture to design and agents of therapeutic interest for the prevention and treatment of thrombotic disorders (Chan et al 2016; Koh and Kini 2012; McCleary and Kini 2012). In the present work, we describe a fragment derived from disintegrin purified from *Bothrops alternatus* snake venom (BaltDC), that is capable of inhibiting epinephrine-induced platelet aggregation (Matias et al 2017).

The *B. alternatus* snake venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Batatais, São Paulo, Brazil) which is registered with the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA - nº 471.301). The purification of BaltDC was carried out in only two steps (anion exchange and molecular exclusion chromatography) according to Matias et al (2017).

For enzymatic hydrolysis, trypsin (0.5 µg) was dissolved in 20 µL ammonium bicarbonate buffer (0.1 M), pH 7.8. The solution was then added to 500 µg of BaltDC and the mixture was incubated at 37 °C for 16 hours. The reaction was stopped by the addition of 5 µL of trifluoroacetic acid 100 % (TFA) and then the sample was lyophilized and stored at -20 °C.

Human blood was obtained in accordance with the current guidelines for human research, established by the Committee for Ethics in Human Research of Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil (CEP/UFU, Protocol number 1.627.982/2016). Blood was obtained from 10 voluntary donors aged 18-65 years, weighing more than 50 kg, without signs or symptoms of disease, no hemostasis disorders, malnutrition or dehydration, with no use of any medication that interferes with hemostasis, no use of illicit drugs, no alcohol consumption in the last 24 h prior to the experiment.

Platelet aggregation assays were performed on human platelet-rich plasma (PRP) and measured using an automated four channel aggregometer (AggRAM™ version 1.1, Helena Laboratories, USA) as described by Queiroz et al (2014). Aggregation was analyzed with epinephrine agonist (300 µM) and with hydrolyzed BaltDC (10, 20 and 50 µg) to verify the ability of the fragments to inhibit aggregation in the presence of epinephrine (Fig. 1). As a negative control, 50 µL of the hydrolysis solution (trypsin + TFA) was used.

Hydrolyzed BaltDC were analysed by an Agilent 6520 Q-TOF mass spectrometer equipped with an HPLC electrospray driven by a 1260 Infinity LC system (Agilent Technologies). The primary structures of the sequenced peptides were compared to the sequences of other related proteins and peptides using the BLAST (Basic Local Alignment Search) program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Our results showed that the pool of the trypsinized BaltDC fragments inhibited epinephrine-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner. Figure 1 show that 10, 20 and 50 µg the trypsinized BaltDC fragments were able to inhibit aggregation over 28, 37 and 43%, respectively. Among the peptides that were sequenced to identify which peptide is responsible for the antiplatelet activity. One sequence caught our interest: LPQSDTDVGDDGLK ($[M+H]^+ = 1458.6$), which was named PepDC.

This sequence exhibited the VGD (valine-glycine-aspartic acid) sequence, homologous to the RGD (arginine-glycine-aspartic acid) sequence present in ophidian toxin molecules that are responsible for inhibiting platelet aggregation (Calvete et al 2003; Eble 2010). PepDC showed high homology with snake venom disintegrins such as VLO5, isolated from *Vipera lebetina* venom (Calvete et al

2003), Halystatin, isolated from *Agkistrodon halys* venom (Fujisawa et al 1994), Trimucrin, isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom (Tsai et al 1994), Flavoridin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom (Kishimoto et al 2002), and Jerdonatin, from *Trimeresurus jerdonii* venom (Zhou et al 2004).

Studies related to molecules capable of modulating platelet adhesion, activation and aggregation, by specific action on membrane receptors or their ligands, may contribute to the elucidation of the phenomenon involving platelet aggregation and, therefore, may be a focus for the search for new antithrombotic agents (Kamiguti 2005; Lu et al 2005). For many years, scientific research with snake venoms has been conducted with focus on the enzymatic components. However, these venoms are a rich source of bioactive peptides. Important advantages of the use of peptidic compounds in relation to protein-based biopharmaceuticals are their lower complexity, low immunogenicity and lower production cost (Kamiguti 2005; Hooley et al 2008; Lu et al 2005).

The results shown here suggest that PepDC represents a fragment of BaltDC disintegrin that showed anti-platelet aggregation activity. This peptide may be of great interest in medical application as a novel drug for the development of novel therapeutic agents for the prevention and treatment of various thrombotic diseases.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgements

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

Figures

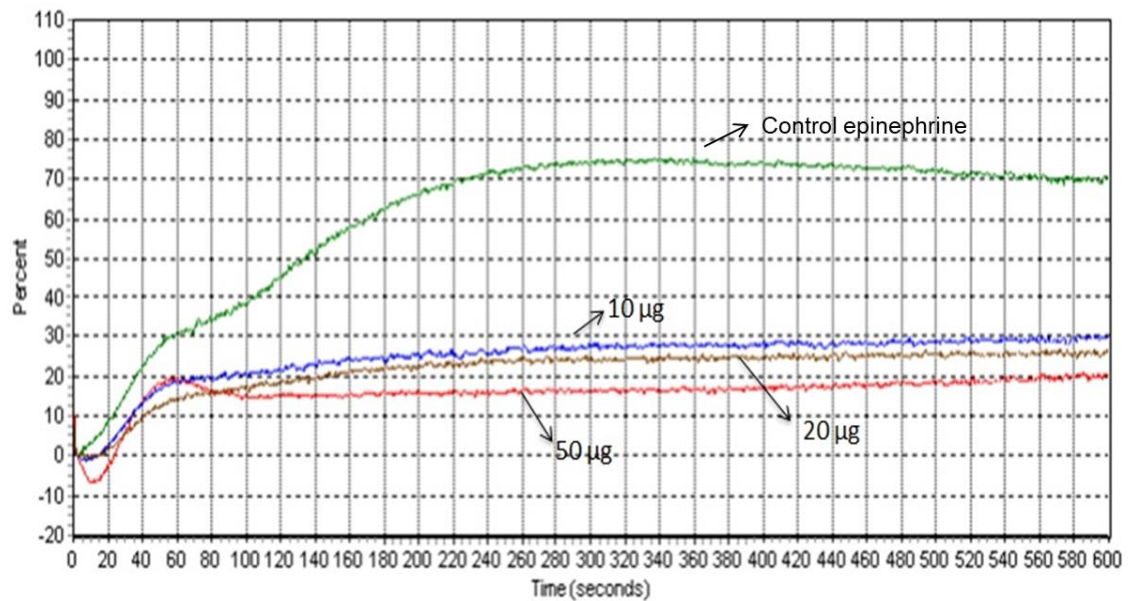


Figure 10: Platelet aggregation assay. Effect of different amounts of trypsinized BaltDC fragments (10, 20, 50 µg) to human PRP. Platelet aggregation was recorded for 10 minutes in an automated four-channel Aggregometer (AggRAM™ version 1.1) (Helena Laboratories, USA). Results were expressed as an increase in light transmission, where PPP represents the maximum response (100%). Hydrolysis buffer was used as negative control.

References

- Calvete, J.J. et al. (2003) Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochemical Journal*. v. 372, p. 725-734. doi: 10.1042/BJ20021739.
- Chan, Y. S. et al. (2016) Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin. v. 100(14), p. 6165-81. doi: 10.1007/s00253-016-7610-9.
- Costa J. O.; Fonseca K.C.; Mamede C.C.; Beletti M.E.; Santos-Filho N.A.; Soares A.M.; Arantes E.C.; Hirayama S.N.; Selistre-de-Araújo H.S.; Fonseca F.; Henrique-Silva F, Penha-Silva N, Oliveira F. (2010) Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.014.
- Eble JA. (2010) Matrix biology meets toxinology. *Matrix Biology*. v. 29, n. 4, p. 239–247. doi: 10.1016/j.matbio.2010.01.004.
- Fujisawa Y.; Kuroda S.; Notoya K. (1994) Halystatin, a novel disintegrin from *Agkistrodon halys* is a potent inhibitor of a bone resorption and platelet Agregation. *Journal of the Takeda Research Laboratories*. v. 53. p. 39-56. ID: 200902165871928445
- Guimarães D.O.; Lopes D.S.; Azevedo F.V.; Gimenes S.N.; Silva M.A.; Achê D.C.; Gomes M.S.; Vecchi L.; Goulart L.R.; Yoneyama K.A.; Rodrigues R.S.; Rodrigues V.M. (2017) In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Int J Biol Macromol*. v. 97, p. 770-777. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.064.
- Higuchi D.A.; Almeida M.C.; Barros C.C.; Sanchez E.F.; Pesquero P.R.; Lang E.A.; Samaan M.; Araujo R.C.; Pesquero J.B.; Pesquero J.L. (2011) Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. *Toxicon*. v. 58(1):123-9. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.05.013.
- Hooley E, Papagrigoriou E, Navdaev A, Pandey AV, Clemetson JM, Clemetson KJ, Emsley J. (2008) The crystal structure of the platelet activator aggregrin reveals a novel (alpha beta)₂ dimeric structure. *Biochemistry*. v.47, n. 30, p.7831-7. doi: 10.1021/bi800528t

Kamiguti, A.S. (2005) Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. v. 45, p. 1041-1049. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.02.026

Kishimoto M.; Takahashi T. (2002) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding flavoridin, a disintegrin from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *Toxicon*. v. 40. p. 1033-1040. doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00081-8.

Koh, C. Y., Kini, R. M. (2012) From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. *Toxicon*. v. 59, p. 497-506. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.03.017.

Lu, Q., Navdaev, A., Clemetson, J. M., Clemetson, K. J. (2004) 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. doi:10.1160/TH03-12-0747.

Matias M., Sousa B., Pereira D., Dias E., Mamede C., Queiroz M., Silva A., Dantas N., Soares A., Costa J., Oliveira F. (2017) BaltDC: purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. v. 28, p. 23:36. doi: 10.1186/s40409-017-0126-7.

McCleary, R. J., Kini, R. M. (2012) Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon*. v. 62, p. 56-74. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.008.

Mello C.P.; Lima D.B.; Menezes R.R.; Bandeira I.C.; Tessarolo L.D.; Sampaio T.L.; Falcão C.B.; Rádis-Baptista G.; Martins A.M. (2017) Evaluation of the antichagasic activity of batroxidin, a cathelicidin-related antimicrobial peptide found in *Bothrops atrox* venom gland. *Toxicon*. v. 130, p.56-62. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.02.031

Queiroz, M. R., Mamede, C. C. N., Fonseca, K. C., Morais, N. C., Sousa, B. B., Santos-Filho, N. A., Beletti, M. E., Arantes, E. C., Stanziola, L., Oliveira, F. (2014) Rapid purification of a new pi class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with antiplatelet activity. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2014/352420.

Ramos, O.H.P.; Selistre-de-Araújo, H.S. (2006) Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 142, p. 328-346. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.005.

Rodrigues R.S.; da Silva J.F.; Boldrini França J.; Fonseca P.; Otaviano A. R.; Henrique Silva F.; Hamaguchi A.; Magro A.J.; Braz A.S.; Dos Santos J. I.; Homs-Brandeburgo M. I.; Fontes M.R.; Fuly A.L.; Soares A.M.; Rodrigues V.M. (2008) 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. doi: 10.1016/j.biochi.2008.12.004.

Santos-Filho NA, Silveira LB, Oliveira CZ, Bernardes CP, Menaldo DL, Fuly AL, Arantes EC, Sampaio SV, Mamede CC, Beletti ME, de Oliveira F, Soares AM. (2008) A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicon*. v. 52, n. 8, p. 908-17. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.08.020.

Silveira L. B.; Marchi-Salvador D. P.; Santos-Filho N. A.; Silva F.P. Jr.; Marcussi S.; Fuly A. L.; Nomizo A.; da Silva S. L.; Stábeli R. G.; Arantes E. C.; Soares A. M. (2013) Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. *J Pharm Biomed Anal*. v. 25, n. 73, p. 35-43. doi: 10.1016/j.jpba.2012.04.008.

Sousa B. B.; Mamede C. C. N.; Matias M. S.; Pereira D. F. C.; Queiroz M. R.; Dias E.H.V.; Silva A. C. A.; Dantas N.O.; Costa J. O.; de Oliveira F. (2017) A New Platelet-Aggregation-Inhibiting Factor Isolated from *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Biomed Res Int*. doi.org/10.1155/2017/4315832

Tsai I.H, Wang Y.M, Lee Y.-H. (1994) Characterization of a cDNA encoding the precursor of platelet aggregation inhibitor and metalloproteinase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1200. p. 337-340. doi.org/10.1016/0304-4165(94)90177-5

Zhou X.D.; Ding C.H.; Tai H.; Jin Y.; Chen R.Q.; Lu Q.M.; Wang W.Y.; Xiong Y.L. (2004) A novel disintegrin, jerdonatin, inhibits platelet aggregation and sperm-egg binding. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. v.139, n. 1, p.117-22. Doi: 10.1016/j.cbpc.2004.06.012.

ANEXOS

Artigo publicado:

BaltDC: purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom

RESEARCH

Open Access



BaltDC: purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom

Mariana Santos Matias¹, Bruna Barbosa de Sousa^{1,8}, Déborah Fernanda da Cunha Pereira¹, Edigar Henrique Vaz Dias¹, Carla Cristine Neves Mamede^{2,8}, Mayara Ribeiro de Queiroz⁸, Anielle Christine Almeida Silva⁴, Noelio Oliveira Dantas⁴, Andreimar Martins Soares^{5,6}, Júnia de Oliveira Costa^{1,7*} and Fábio de Oliveira^{3,8}

Abstract

Background: Snake venoms are a complex mixture of proteins, organic and inorganic compounds. Some of these proteins, enzymatic or non-enzymatic ones, are able to interact with platelet receptors, causing hemostatic disorders. The possible therapeutic potential of toxins with antiplatelet properties may arouse interest in the pharmacological areas. The present study aimed to purify and characterize an antiplatelet DC protein from *Bothrops alternatus* snake venom.

Methods: The protein, called BaltDC (DC protein from *B. alternatus* snake venom), was purified by a combination of ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacel column and gel filtration on Sephadex G-75. The molecular mass was estimated by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The amino acid sequence of the N-terminal region was carried out by Edman degradation method. Platelet aggregation assays were performed in human platelet-rich plasma (PRP). Infrared (IR) spectroscopy was used in order to elucidate the interactions between BaltDC and platelet membrane.

Results: BaltDC ran as a single protein band on SDS-PAGE and showed apparent molecular mass of 32 kDa under reducing or non-reducing conditions. The N-terminal region of the purified protein revealed the amino acid sequence IISPPVCGNELLEVGECDCTPENCQNECCDA, which showed identity with other snake venom metalloproteinases (SVMPs). BaltDC was devoid of proteolytic, hemorrhagic, defibrinating or coagulant activities, but it showed a specific inhibitory effect on platelet aggregation induced by ristocetin and epinephrine in PRP. IR analysis spectra strongly suggests that PO_3^{2-} groups, present in BaltDC, form hydrogen bonds with the PO_2^- groups present in the non-lipid portion of the membrane platelets.

Conclusions: BaltDC may be of medical interest since it was able to inhibit platelet aggregation.

Keywords: Snake venom, *Bothrops alternatus*, DC protein, Platelet aggregation

* Correspondence: juniacosta@iftm.edu.br

¹Postgraduate Program in Genetics and Biochemistry, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil

⁷Federal Institute of Education, Science and Technology of Triângulo Mineiro (IFTM), Campus Ituiutaba, Ituiutaba, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Isolation and characterization of pharmacologically active compounds present in snake venoms have been the focus of numerous scientific research studies. Approximately 90% of snake venom dry weight is constituted of protein components, including peptides and enzymes. The non-protein fraction of the venom is composed by low-mass organic molecules, such as carbohydrates, lipids, free amino acids and inorganic compounds including calcium, phosphorus, magnesium, potassium, sodium and zinc [1, 2].

Snake venoms are rich sources of metalloproteinases, a group of enzymes that are the primary factors responsible for hemorrhage and may also interfere with the hemostatic system [3–6]. Snake venom metalloproteinases (SVMPs) have been classified into three classes, from PI to PIII, according to their multi-domain structure [7]. The PIII SVMPs are the largest among all the classes of metalloproteinases. They are composed of an N-terminal metalloproteinase domain, a disintegrin-like domain (D) and a Cys-rich C-terminus (C). PIII SVMPs may undergo proteolytic processing, releasing the catalytic domain (metalloproteinases) [7]. D and C domains are linked by disulfide bonds, so they are released as a unique molecule (DC protein). This molecule is able to interact with integrins present on the cell surface and may trigger numerous cellular processes such as platelet aggregation; angiogenesis; metastasis; tumor growth; adhesion, migration and proliferation of cells [8–12].

In this work, we describe the purification, characterization and IR spectra of an antiplatelet DC protein, called BaltDC, isolated from *B. alternatus* snake venom.

Methods

B. alternatus snake venom

Desiccated *B. alternatus* snake venom was purchased from Bioagents Serpentarium (Brazil). This serpentarium is registered in the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA – n. 471,301). The crude venom was dried in a vacuum desiccator at room temperature immediately after milking and then stored at -20°C .

Animals

Swiss male mice (20–25 g) were provided by the Center of Animal Facilities and Animal Experimentation (CEBEA) of the Federal University of Uberlândia (Uberlândia, MG, Brazil). The animals were maintained under conditions of controlled temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and 12-h light/dark cycles with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU, protocol number 108/12).

Human blood

Human blood was obtained by means of donation from volunteers. The criteria for selection of donors were: be in good state of health, have 18 to 65 years old, weighing at least 50 kg, no use of any medication that interferes with hemostasis, no use of illicit drugs and no alcohol consumption for at least 24 h before donation. The experiments were carried out according to the current guidelines for research with humans established by the Committee for Ethics in Human of the Federal University of Uberlândia (CEP/UFU – protocol number 1.627.982/2016).

Isolation of BaltDC

B. alternatus crude venom (300 mg) was dissolved in 2.0 mL of 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8) and applied to a DEAE-Sephacel column (2.5×20 cm). The samples were eluted using a linear gradient (0.05–1.0 M) of the same buffer. The ninth peak was pooled, lyophilized and applied to a Sephadex G-75 column (1.0×100 cm) previously equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (pH 7.8). All peaks were monitored by measuring absorbance at 280 nm on a spectrophotometer BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech, Japan) at a flow rate of 20 mL/h and fractions of 3.0 mL/tube were collected. The purified protein was named BaltDC. To confirm the degree of purity, BaltDC was submitted to reverse-phase Source 15RPC ST column (4.6×100 mm) using the ÄKTApurifier™ HPLC system. The column was equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (solvent A) and eluted with a linear concentration gradient from 0 to 100% of 70% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (solvent B) at a flow rate of 0.3 mL/min. Absorbance was monitored at 280 nm.

Estimation of protein concentration

Protein concentration was determined by the method previously described by Bradford [13], using bovine serum albumin as standard.

Electrophoretic analysis

Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) was performed as described by Laemmli [14] using 14% (w/v) gels. Electrophoresis was carried out at 20 mA/gel in Tris-glycine buffer (pH 8.3) containing 0.01% SDS. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactalbumin (14.4 kDa). Gels were stained with Coomassie blue R-250, 0.2% (w/v).

N-terminal sequencing

A PPSQ-33A (Shimadzu) automated sequencer was used for the N-terminal sequencing according to the methodology described by Rodrigues et al. [15]. The identity of the primary sequence of BaltDC, compared with other proteins, was evaluated using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Platelet aggregation assay

Platelet aggregation assays were performed in PRP and measured using the automated Aggregometer 4 channels (AggRAMTM version 1.1, Helena Laboratories, USA) as described by Queiroz et al. [16]. Human blood, collected in the presence of sodium citrate (3.2%), was centrifuged at $100\times g$ for 12 min at room temperature to obtain PRP. Platelet-poor plasma (PPP) was obtained from the residue by centrifugation of citrated blood at $1000\times g$ for 15 min. Assays were carried out using 200 μ L of PRP maintained at 37 °C under continuous stirring in siliconized glass cuvettes. Aggregation was triggered with collagen (10 μ g/mL), ADP (20 μ M), ristocetin (1.5 mg/mL) or epinephrine (300 μ M) with BaltDC (20, 40 and 80 μ g). One hundred percent (100%) aggregation was expressed as the percentage absorbance relative to PPP aggregation. Control experiments were performed using only platelet agonists. All experiments were carried out in triplicate.

Infrared spectra

IR spectra of the samples were recorded at room temperature using a Shimadzu Fourier Transform IR (FT-IR) spectrophotometer (Vertex 70, Bruker Optik) in the spectral range 440 to 4000 cm^{-1} via a total attenuated reflectance element coupled (ATR) with resolution of 2 cm^{-1} .

Results and discussion

In Brazil, the *B. alternatus* snake, popularly known as *urutu cruzeiro* or *cruzeira*, is found in swamps, marshes and other humid local. It is also commonly found in sugarcane plantations [17]. In this work, we described the purification (chromatographic steps), electrophoretic profile, N-terminal sequence and IR spectra of an anti-platelet DC protein from this snake venom. The protein was isolated by only two steps of purification (ion-exchange and gel filtration chromatography). *B. alternatus* crude venom (300 mg) was applied on a DEAE-Sephacel column and produced ten main protein peaks (Fig. 1a). The ninth peak was further fractionated by size exclusion chromatography (Sephadex G-75), resulting in three main peaks (Fig. 1b). The second peak of this chromatography, which was named BaltDC, was devoid of proteolytic, hemorrhagic, defibrinating or coagulant

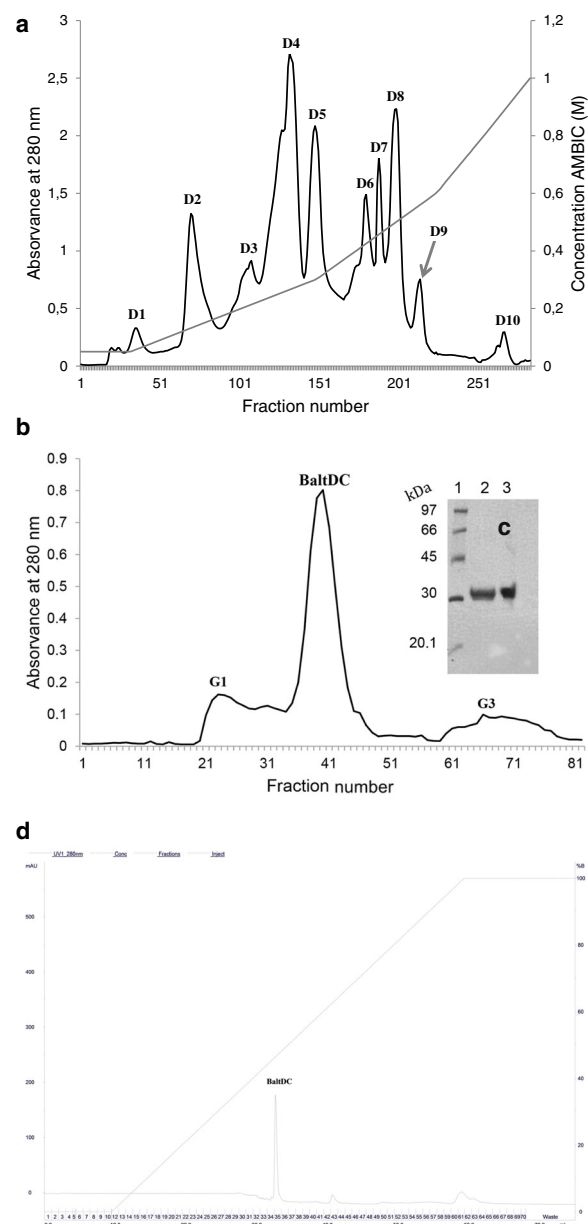


Fig. 1 Purification of BaltDC. **(a)** Anion-exchange chromatography of *B. alternatus* crude venom on a DEAE-Sephacel column (2.5 \times 20 cm) equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate (pH 7.8) and eluted with a convex concentration gradient of the same buffer (0.05–1 M). **(b)** Gel filtration on Sephadex G-75 column (1.0 \times 100 cm): ninth peak was applied to the column and eluted with 0.05 M ammonium bicarbonate. Fractions of 3.0 mL/tube were collected and the absorbance was read at 280 nm. **(c)** SDS-PAGE: Lane 1 – standard proteins; lane 2 – BaltDC under non-reducing conditions; lane 3 – BaltDC under reducing conditions. The molecular mass standard proteins used were phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa) and soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa). Gels were stained with Coomassie blue R-250, 0.2%. **(d)** Reverse-phase HPLC on a Source 15RPC ST column (4.6 \times 100 mm) equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) and eluted with a linear concentration gradient from 0 to 100% of solution B (70% acetonitrile in 0.1% TFA)

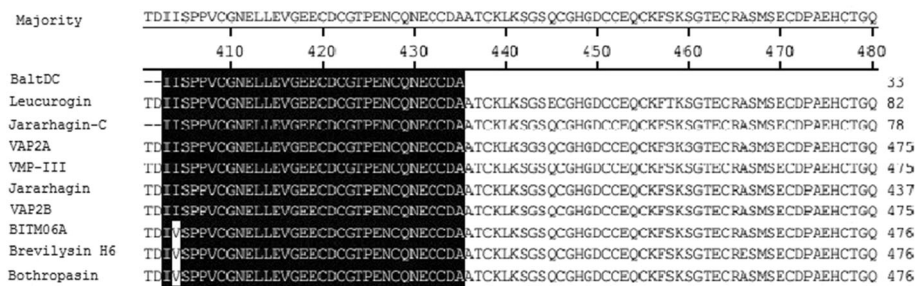


Fig. 2 Sequence alignment of BaltDC and members of the PIII SVMPs: jararhagin-C (AAB30855.1), leucurogin (P0DJ87.1), VAP2A (A4PBQ9.1), VMP-III (C9E1R8.1), jararhagin (P30431.1), VAP2B (Q90282.1), BITM06A (Q8QG88.1), brevilysin-H6 (P0C7B0.2) and bothropasin (O93523.2). The conserved residues are shown in black. The alignment and figure were generated and evaluated using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

activities (data not shown), but it is able to interfere on platelet aggregation.

Electrophoretic (SDS-PAGE) analysis under denaturing and reducing conditions indicated that BaltDC had an apparent molecular mass of 32 kDa (Fig. 1c). The high degree of purity of BaltDC was confirmed by reverse-phase HPLC chromatography on a Source 15RPC ST column, revealing a unique major peak (Fig. 1d). Comparison of the N-terminal sequence of BaltDC (IISPPVCGNELLE

VGEECDGTPENCQNECCDA) showed similarity with other PIII SVMPs from *Bothrops* genus. The N-terminal of BaltDC is similar to the middle of others metalloproteinases skipping the catalytic domain such as leucurogin, jararhagin-C, VAP2A, VMP-III, jararhagin, bothropasin and others (Fig. 2) [18–23].

The PIII SVMPs are high molecular mass proteins that have a proteinase domain followed by disintegrin-like (D) and cysteine-rich (C) domains. Jia et al. [24] and

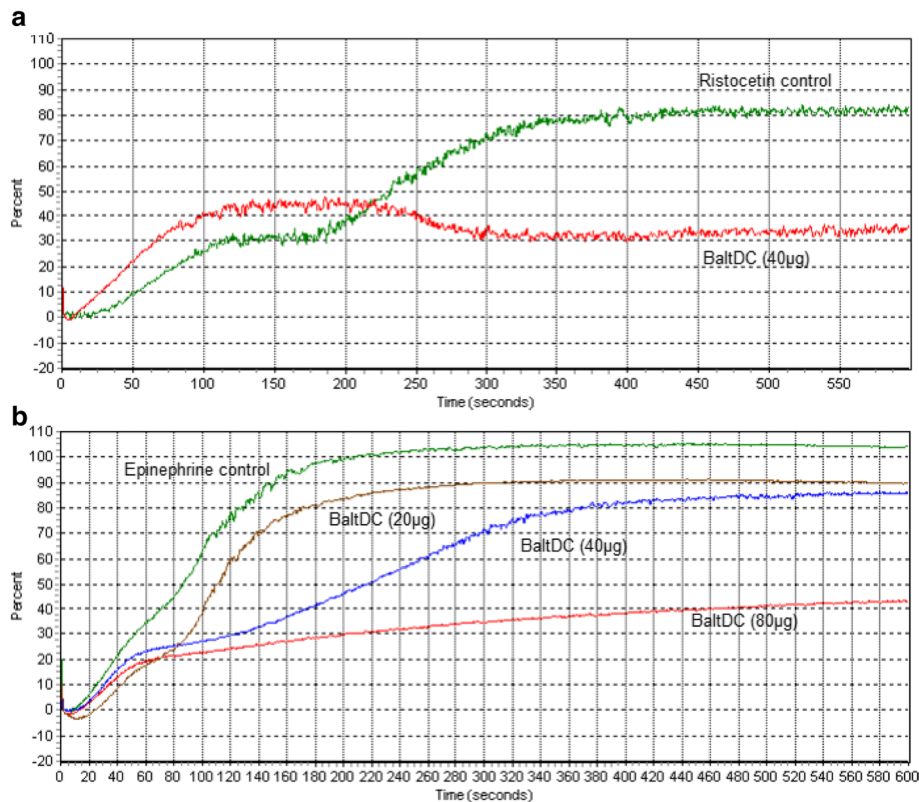


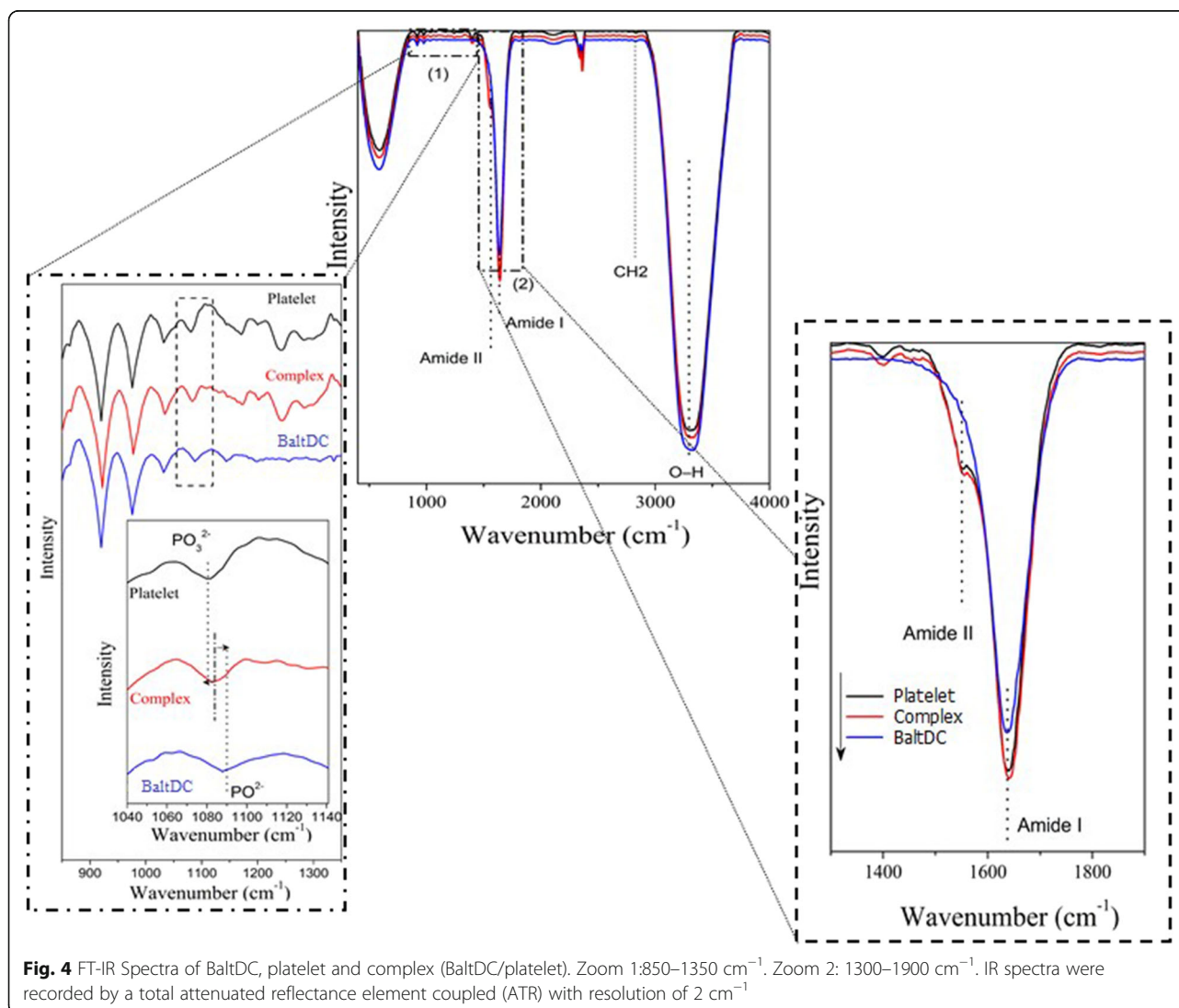
Fig. 3 Effect of BaltDC on (a) ristocetin and (b) epinephrine-induced platelet aggregation. PRP was preincubated with BaltDC for 30 min at 37 °C before adding agonists. Platelet aggregation was recorded for 10 min in an AggRAM platelet aggregation system with four-channel laser optics (Helena Laboratories, EUA). Results were expressed as an increase in light transmission. Control experiments were performed using only platelet agonists

Serrano et al. [25] reported the hypothesis that the DC domain contributes to the proteolytic specificity of PIII SVMPs, since it is targeted to bind to critical protein substrates. On the other hand, studies with synthetic peptides, such as the one by Pinto et al. [26], suggest that the C domain of the jararhagin binds to vWF. According to Fox and Serrano [27], some proteinases from snake venom may generate biologically active intact polypeptides of approximately 30 kDa that correspond to the DC protein, which may be released from their precursor forms by proteolytic processing.

Brevilysin-H6, bothropasin, leucurolysin B and jararhagin are PIII SVMPs composed of a metalloproteinase domain associated with a DC domain, which may be released from auto-proteolytic events [5, 22, 23, 28]. BaltDC is similar to jararhagin C (28 kDa), acucetin (30 kDa) and alternagin-C (29 kDa), which are DC proteins released through auto-proteolysis from *B. jararaca*,

A. acutus and *B. alternatus*, respectively [12, 19, 29]. As jararhagin C, acutin and alternagin-C, BaltDC has no enzymatic activity. These results associated with the N-terminal sequence leads us to believe that the BaltDC may be a fragment of class PIII SVMPs, in which the DC domain was processed from proteinase domain, as proposed by Fox and Serrano [7].

DC proteins are known to bind to different platelet integrins that mediate platelet aggregation. A number of DC proteins have been used in the studies of modulators of platelet adhesion receptors and their ligands [12, 30, 31]. In this work, we characterized the interference of BaltDC on platelet aggregation using collagen, ADP, epinephrine and ristocetin as agonist. Our results showed that 40 μ g and 80 μ g of BaltDC was able to inhibit approximately 60% of platelet aggregation induced by ristocetin and epinephrine, respectively (Fig. 3a and b). On the other hand, BaltDC had little or



no effect on platelet aggregation induced by collagen or ADP (data not shown). These results suggest that BaltDC inhibits platelet aggregation by a possible common pathway for ristocetin and epinephrine. Another PIII SVMs, such as acurhagin, purified from the venom of *Agkistrodon acutus*, also inhibits the ristocetin-induced platelet aggregation by hydrolyzing the vWF [32]. Our results strongly suggest that BaltDC inhibits platelet aggregation by preventing the binding of vWF and epinephrine to their respective receptors since it does not have a catalytic effect. Probably, BaltDC does not interact with the $\alpha\text{IIb}\beta_3$, $\alpha\text{V}\beta_3$ or $\alpha_2\beta_1$ integrins since it does not inhibit the aggregation induced by ADP or collagen. However, more data are needed to elucidate the mechanism of action of BaltDC.

Here, we also show some results that may contribute to the understanding of a type of interaction that occurs between BaltDC and the platelet membrane. In order to elucidate these interactions, we used the IR spectroscopy. This methodology is not invasive and it has been used as an extremely useful tool for the investigation of interactions between lipids and proteins and other biological and biomedical studies [33–38].

Fig. 4 shows the FT-IR spectra of BaltDC and platelet alone and when they are complexed. In the region 850–1350 cm^{-1} (zoom 1), we observed a variety of characteristic IR group frequencies similar in all spectra. This same figure shows that the spectrum of BaltDC has a band at 1087 cm^{-1} while the spectrum of platelet has a band at 1080 cm^{-1} , which are characteristics of PO_2^- and PO_3^{2-} symmetric stretching vibrations, respectively [39, 40]. Interestingly, the spectrum of BaltDC/platelet complex showed a band at 1083 cm^{-1} , which presented a change of the frequencies relative to the spectra of BaltDC and platelet, when they are separated. These results support the hypothesis that the PO_3^{2-} groups, present in BaltDC, make hydrogen bonds with the PO_2^- groups present on the non-lipid portion of the membrane platelets [41–43]. We believe that the PO_2^- groups are part of protein complexes, which are buried in the lipid bilayer since these groups are not commonly found in the plasma membrane. In addition, no changes were observed in the characteristic spectral bands of phosphate groups generally found in the membrane phospholipids [44].

In the region 1300–1900 cm^{-1} (zoom 2), we observed in both FT-IR spectra, BaltDC and platelets, a band at 1640 cm^{-1} , located in amide I region, which indicates α -helical conformation [38, 45]. The spectrum of protein/platelet complex shows that the bands corresponding to amide I and II regions remained unchanged. These results suggest that the interaction between BaltDC and platelets causes no conformational changes in membrane, prevailing the α -helix structure [46]. These findings support the hypothesis that BaltDC does not act

catalytically and therefore it could act as an antagonist of the ristocetin and epinephrine receptors.

Conclusions

We presented the purification, characterization and IR spectrum of BaltDC, a DC protein (32 kDa) originated from autolysis of a PIII SVMs from *B. alternatus* snake venom. This protein was able to inhibit platelet aggregation induced by ristocetin and epinephrine and, therefore, it may be of medical interest as a novel therapeutic antiplatelet agent.

Abbreviations

BaltDC: DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom; DC protein: D (disintegrin-like) and C (Cys-rich C-terminus) domains are released as a unique molecule; HPLC: High performance liquid chromatography; IR: Infrared; PPP: Platelet-poor plasma; PRP: Platelet-rich plasma; SDS-PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate; SVM: Snake venom metalloproteinase

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil, and would like to thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities. Thanks are also due to the Center for the Study of Venoms and Venomous Animals (CEVAP) of UNESP for enabling the publication of this paper (Editorial Toxinologia CAPES no. 063/2010, Process no. 230.38.006285/2011-21, AUXPE Toxinologia 1219/2011).

Funding

This work was supported by the State of Minas Gerais Research Foundation (FAPEMIG), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Ministry of Science and Technology (MCT) of Brazil, National Institute of Science and Technology on Toxins (INCTTOX), Funding Authority for Studies and Projects (FINEP), Rondonia Foundation for the Support to the Development of Scientific and Technological Actions, and the State of Rondonia Research Foundation (FAPERJ), Brazil.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the first author (MMS) on reasonable request.

Authors' contributions

MSM, BBS, DFCP, EHVD, CCNM and MRQ performed the experiments. ACAS and NOD performed the infrared experiments. AMS performed the N-terminal sequence. JOC participated in the analysis and discussion of the results and performed a critical revision of the work. FO was responsible for the design of the work and supervised all experiments. All authors contributed to writing of this manuscript and approved the final version.

Ethics approval and consent to participate

The experimental protocol involving animals was approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFGO), Minas Gerais, Brazil (protocol number 108/12). The experiments were also performed in accordance with the current guidelines for research with humans, established by the Committee for Ethics in Human Research of Federal University of Uberlândia (CEP/UFGO), Minas Gerais, Brazil (protocol number 1.627.982/2016).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Postgraduate Program in Genetics and Biochemistry, Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil. ²Institute of Agricultural Sciences, Federal University of Uberlândia (UFU), Monte Carmelo, MG, Brazil. ³Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil. ⁴Institute of Physics, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil. ⁵Center for the Study of Biomolecules Applied to Health (CEBio), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz – Rondônia) and Health Group, Federal University of Rondônia (UNIR), Porto Velho, RO, Brazil. ⁶University Center São Lucas (UniSL), Porto Velho, RO, Brazil. ⁷Federal Institute of Education, Science and Technology of Triângulo Mineiro (IFTM), Campus Ituiutaba, Ituiutaba, MG, Brazil. ⁸National Institute of Science and Technology in Nanobiopharmaceutics (N-Biofar), Belo Horizonte, MG, Brazil.

Received: 27 March 2017 Accepted: 12 July 2017

Published online: 28 July 2017

References

- Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998; 36(12):1749–800.
- Matsui T, Fujimura Y, Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1–2):146–56.
- Gay CC, Maruňak SL, Teibler P, Ruiz R, Acosta de Pérez OC, Leiva LC. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. *Toxicon*. 2009;53(1):53–9.
- Girón ME, Guerrero B, Salazar AM, Sánchez EE, Alvarez M, Rodríguez-Acosta A. Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. *Toxicon*. 2013;74:116–26.
- Sanchez EF, Gabriel LM, Gontijo S, Gremski LH, Veiga SS, Evangelista KS, et al. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 468(2):193–204.
- Sanchez EF, Richardson M, Gremski LH, Veiga SS, Yarleque A, Niland S, et al. A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettysin-I from *Bothrops barnetti* (Barnett's pitviper) snake venom with anti-platelet properties. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(3):542–56.
- Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J*. 2008;275(12):3016–30.
- Limam I, Bazaa A, Srairi-Abid N, Taboubi S, Jebali J, Zouari-Kessentini R, et al. Leberagin-C, A disintegrin-like/cysteine-rich protein from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits alphavbeta3 integrin-mediated cell adhesion. *Matrix Biol*. 2010;29(2):117–26.
- Menezes MC, de Oliveira AK, Melo RL, Lopes-Ferreira M, Rioli V, Balan A, et al. Disintegrin-like/cysteine-rich domains of the reprolysin HF3: Site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues. *Biochimie*. 2011;93(2): 345–51.
- Ramos OH, Terruggi CH, Ribeiro JU, Cominetti MR, Figueiredo CC, Bérard M, et al. Modulation of *in vitro* and *in vivo* angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. *Arch Biochem Biophys*. 2007;461(1):1–6.
- Sant'Ana EM, Gouvêa CM, Nakaie CR, Selistre-de-Araújo HS. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. *Arch Biochem Biophys*. 2008;479(1):20–7.
- Selistre-de-Araújo HS, Cominetti MR, Terruggi CHB, Mariano-Oliveira A, de Freitas MS, Crepin M, et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates α2β1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. *Braz J Med Biol Res*. 2005;38(10):1505–11.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.
- Rodrigues RS, Izidoro LF, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, et al. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon*. 2007;50(1):153–65.
- Queiroz MR, Mamede CCN, Fonseca KC, de Moraes NCG, de Sousa BB, Santos-Filho NA, et al. Rapid purification of a new P-I class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with antiplatelet activity. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 352420. doi:10.1155/2014/352420.
- Campbell JA, Lamar WW. The venomous reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press; 2004. <http://www.cornellpress.cornell.edu/book/?GCOI=80140100664830>
- Higuchi DA, Almeida MC, Barros CC, Sanchez EF, Pesquero PR, Lang EA, et al. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. *Toxicon*. 2011;58(1):123–9.
- Usami Y, Fujimura Y, Miura S, Shima H, Yoshida E, Yoshioka A, et al. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201(1):331–9.
- Masuda S, Maeda H, Miao JY, Hayashi H, Araki S. cDNA cloning and some additional peptide characterization of a single-chain vascular apoptosis-inducing protein, VAP2. *Endothelium*. 2007;14(2):89–96.
- Jia Y, Pérez JC. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding metalloproteinases from snake venom glands. *Toxicon*. 2010;55(2–3):462–9.
- Paine MJ, Desmond HP, Theakston RD, Crampton JM. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J Biol Chem*. 1992;267(32):22869–76.
- Mandelbaum FR, Reichel AP, Assakura MT. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon*. 1982;20(6):955–72.
- Jia LG, Wang XM, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. *J Biol Chem*. 1997;272(20):13094–102.
- Serrano SM, Kim J, Wang D, Dragulev B, Shannon JD, Mann HH, et al. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *J Biol Chem*. 2006; 281(52):39746–56.
- Pinto AF, Terra RM, Guimarães JA, Fox JW. Mapping von Willebrand factor A domain binding sites on a snake venom metalloproteinase cysteine-rich domain. *Arch Biochem Biophys*. 2007;457(1):41–6.
- Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45(8):969–85.
- Fujimura S, Oshikawa K, Terada S, Kimoto E. Primary structure and autoproteolysis of brevilysin H6 from the venom of *Gloydus hals bredicaudus*. *J Biochem*. 2000;128(2):167–73.
- Zang J, Zhu Z, Yu Y, Teng M, Niu L, Huang Q, et al. Purification, partial characterization and crystallization of acucetin, a protein containing both disintegrin-like and cysteine-rich domains released by auto-proteolysis of a P-III-type metalloproteinase AaH-IV from *Agkistrodon acutus* venom. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003;59(12):2310–2.
- Oliveira AK, Paes Leme AF, Assakura MT, Menezes MC, Zelanis A, Tashima AK, et al. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 2009;53(7–8):797–801.
- Petretski JH, Kanashiro MM, Rodrigues FR, Alves EW, Machado OL, Kipnis TL. Edema induction by the disintegrin-like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;276(1):29–34.
- Wang WJ, Huang TF. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thromb Haemost*. 2002;87(4):641–50.
- Yoshida S, Koike K. Chapter one - Lipid and Membrane Dynamics in Biological Tissues - Infrared Spectroscopic Studies. In: Iglic A, editor. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. United States: Academic Press; 2011. p. 1–32.
- Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains. *Prog Biophys Mol Biol*. 2000;74(3–5):141–73.
- Dritsa V. In: Theophile T, editor. *Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences*, InTech; 2012. doi:10.5772/2655.
- Jagadeesan G, Kavitha AV, Subashini J. FT-IR Study of the influence of *Tribulus terrestris* on Mercury intoxicated mice, *Mus musculus* liver. *Trop Biomed*. 2005;22(1):15–22.

37. Liu KZ, Xu M, Scott DA. Biomolecular characterisation of leucocytes by infrared spectroscopy. *Br J Haematol.* 2007;136(5):713–22.
38. Roque A, Ponte I, Suau P. Secondary structure of protamine in sperm nuclei: an infrared spectroscopy study. *BMC Struct Biol.* 2011;11:14.
39. Barth A, Haris PI. *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy.* Amsterdam: IOS Press BV; 2009.
40. Barčot O, Balarin M, Gamulin O, Ježek D, Romac P, Brnjas-Kraljević J. Investigation of spermatozoa and seminal plasma by fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc.* 2007;61(3):309–13.
41. Dai J, Liu J, Deng Y, Smith TM, Lu M. Structure and protein design of a human platelet function inhibitor. *Cell.* 2004;116(5):649–59.
42. Díaz A, Saxena V, González J, David A, Casañas B, Carpenter C, et al. Zirconium phosphate nano-platelets: a novel platform for drug delivery in cancer therapy. *Chem Commun (Camb).* 2012;48(12):1754–6.
43. Redfern DA, Gericke A. Domain formation in phosphatidylinositol monophosphate/phosphatidylcholine mixed vesicles. *Biophys J.* 2004;86(5):2980–92.
44. Morris MD, Finney WF. Recent developments in Raman and infrared spectroscopy and imaging of bone tissue. *Spectroscopy.* 2004;18(2):155–9.
45. Wolkers WF, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH. Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology.* 2001;42(2):79–87.
46. Liu KZ, Bose R, Mantsch HH. Infrared spectroscopic study of diabetic platelets. *Vib Spectrosc.* 2002;28(1):131–6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

