



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

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FUNCIONAIS DA BHALTERNINA,
IDENTIFICAÇÃO E SÍNTESE DA REGIÃO PEPTÍDICA INIBIDORA DA
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

Aluna: Déborah Fernanda da Cunha Pereira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Carla Cristine Neves Mamede

UBERLÂNDIA - MG

2019



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

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES FUNCIONAIS DA BHALTERNINA,
IDENTIFICAÇÃO E SÍNTESE DA REGIÃO PEPTÍDICA INIBIDORA DA
AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

Aluna: Déborah Fernanda da Cunha Pereira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a 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

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

- P436
2019
- Pereira, Déborah Fernanda da Cunha, 1991-
Avaliação das atividades funcionais da bhalternina,
identificação e síntese da região peptídica inibidora da agregação
plaquetária. [recurso eletrônico] / Déborah Fernanda da Cunha
Pereira. - 2019.
- Orientadora: Anielle Christine Almeida Silva.
Coorientadora: Carla Cristine Neves Mamede.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Genética e Bioquímica.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2019.2519>
Inclui bibliografia.
1. Genética. I. Silva, Anielle Christine Almeida, 1989-, (Orient.).
II. Mamede, Carla Cristine Neves, 1986-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 21/2019/PPGGB				
Data:	Dezessete de dezembro de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	17:10
Matrícula do Discente:	11523GBI006				
Nome do Discente:	Déborah Fernanda da Cunha Pereira				
Título do Trabalho:	Avaliação das atividades funcionais de Bhalternina, identificação e síntese da região peptídica inibidora da agregação plaquetária.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e função de proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Caracterização funcional de uma fosfolipase A ₂ da peçonha da serpente <i>Bothrops alternatus</i> com ação na agregação plaquetária e em células tumorais.				

Aos dezessete dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Bloco 2A, Sala de Práticas Virtuais nº 112, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof^ª. Dr^ª. Johara Boldrini França, Prof. Dr. Fábio de Oliveira, Dr^ª. Isabela Pacheco Borges, Prof. Dr. Jonny Yokosawa e Prof^ª. Dr^ª. Anielle Christine Almeida Silva, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Prof^ª. Dr^ª. Anielle Christine Almeida Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata:

APROVADA.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Jonny Yokosawa, Professor(a) do Magistério Superior**, em



17/12/2019, às 17:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fábio de Oliveira, Usuário Externo**, em 17/12/2019, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Johara Boldrini França Stringari, Usuário Externo**, em 17/12/2019, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Pacheco Borges, Usuário Externo**, em 17/12/2019, às 17:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anielle Christine Almeida Silva, Usuário Externo**, em 17/12/2019, às 17:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1700799** e o código CRC **FC85C58C**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de desenvolver este trabalho, por estar sempre iluminando meu caminho, me dando força e determinação, e pelo crescimento profissional e pessoal que esta etapa me proporcionou.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT), por oferecerem estrutura e condições financeiras para que este trabalho fosse desenvolvido.

Agradeço aos examinadores da banca, pela disponibilidade em participar da avaliação e por poderem contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira, por me acolher no laboratório, por confiar em mim, e por compartilhar seus conhecimentos e conselhos, que vão muito além da formação acadêmica. Você é um exemplo de dedicação, sabedoria, paciência e humildade. Me sinto extremamente honrada de ter sido sua aluna e levarei sempre comigo seus ensinamentos!

À professora Dr^a. Carla Cristine Neves Mamede, por ter sido uma excelente co-orientadora. Obrigada por acreditar em mim (e por me ajudar a fazer o mesmo), por compartilhar seus ensinamentos e por me auxiliar nessa etapa final. Sem você teria sido muito mais difícil desenvolver este trabalho.

À professora Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva, por aceitar assumir minha orientação e por se colocar à disposição para o que fosse necessário.

À Dr^a Mariana Santos Matias, pela parceria profissional dentro e fora do laboratório, sempre me auxiliando nos experimentos e em tudo que fosse do seu alcance, mas sobretudo pela parceria de vida. Obrigada por sua amizade, pelas conversas inspiradoras, por ouvir meus prantos e por me aconselhar e apoiar sempre.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Bruna, Edigar, Júnia, Mayara e Nádia. Obrigada pelo apoio, auxílio, compartilhamento de experiências e pelas conversas e momentos divertidos que passamos juntos. É com imenso prazer que chamo vocês de família LabMoc, pois mesmo não tendo mais a convivência diária, sabemos que podemos contar uns com os outros para o que for necessário. Amo vocês!

À Tamires, pela parceria com experimentos fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada pela disposição em auxiliar, sempre com muito humor e dedicação.

À Isabela, pela parceria e pela amizade, que me ajudou muito a superar obstáculos para a conclusão deste trabalho.

Aos professores e técnicos do Instituto de Genética e Bioquímica e do Instituto de Ciências Biomédicas, que sempre se disponibilizaram para colaborar no que fosse necessário.

À minha família, Hudson, Rosângela e Ana Laura por acreditarem em mim e sempre me incentivarem. Agradeço especialmente ao meu marido, Murilo, pelo apoio, confiança, companheirismo, paciência e compreensão durante todo o processo de mestrado e doutorado.

"Viver é a coisa mais rara do mundo. A maioria das pessoas existe, e isso é tudo."

Oscar Wilde

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Peçonha de serpentes.....	2
1.2 Plaquetas	4
1.3 Disfunções plaquetárias e alvos terapêuticos.....	16
1.4 Proteínas e peptídeos de peçonha de serpente que interferem na função plaquetária	21
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivos gerais	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3. MATERIAL E MÉTODO.....	29
3.1 Purificação da bhalternina	29
3.2 Cultura de Células	30
3.2.1 Ensaio de Citotoxicidade.....	30
3.2.2 Ensaio de Migração Celular.....	31
3.2.3 Ensaio de Adesão Celular.....	31
3.3 Ensaio de Agregação Plaquetária.....	31
3.4. Bioinformática	32
3.4.1 Interação entre bhalternina e receptores P2Y1 e P2Y12.....	32
3.4.2 Interação dos peptídeos com o receptor P2Y12	33
3.4 Síntese do Peptídeo	33
3.5 Purificação do Peptídeo.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5. CONCLUSÃO	53
6. REFERÊNCIAS	54
ANEXO.....	77

RESUMO

As plaquetas exercem importantes funções na hemostasia primária, a qual é responsável pela formação do tampão hemostático na presença de uma injúria vascular. Os processos exercidos pelas plaquetas consistem em adesão, ativação e agregação plaquetária, e desequilíbrios nesses mecanismos provocam oclusão vascular, com consequente ocorrência de doença trombótica. Esta é considerada grave problema de saúde pública, devido a sua alta incidência e elevada taxa de mortalidade, e os tratamentos disponíveis possuem várias limitações, como o aumento de risco de sangramento e a não responsividade pelos pacientes. A pesquisa de novos componentes que atuem na função plaquetária é de extrema importância para o diagnóstico e tratamento destas doenças, e as peçonhas de serpentes possuem em sua composição substâncias capazes de interferirem na função das plaquetas. São várias as classes de proteínas ofídicas que interagem com receptores plaquetários, entretanto os peptídeos presentes na peçonha têm ganhado destaque devido a sua menor complexidade e menor custo de produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interferência da bhalternina, uma serinoprotease isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*, na agregação plaquetária. Foi constatado que a proteína, após ser desnaturada, foi capaz de inibir a agregação plaquetária ao interagir com o receptor de ADP P2Y₁₂. Ademais, a região peptídica responsável por essa atividade foi identificada e denominada BhaltPIP, a qual foi sintetizada e está em processo de patenteamento. Também foi avaliado o efeito da bhalternina em células tumorais *in vitro*, onde se notou que a proteína interfere no crescimento de célula tumoral de próstata sem atuar sobre o crescimento de células normais. Assim, conclui-se que a bhalternina apresenta funções tanto em células tumorais como na agregação plaquetária, sendo que o peptídeo BhaltPIP, derivado desta proteína, possui potencial terapêutico para tratamento e diagnóstico de distúrbios hemostáticos.

Palavras-chave: Agregação plaquetária; Peçonha de serpente; Peptídeos; Peptídeos sintéticos.

ABSTRACT

Platelets play important roles in primary hemostasis, which is responsible for hemostatic plug formation in the presence of vascular injury. The processes exerted by platelets consist of platelet adhesion, activation and aggregation, and imbalances in these mechanisms cause vascular occlusion, with consequent occurrence of thrombotic disease. This is considered a serious public health problem due to its high incidence and high mortality rate, and the available treatments have several limitations, such as increased risk of bleeding and unresponsiveness by patients. The search for new components that act on platelet function is extremely important for the diagnosis and treatment of these diseases, and snake venoms present substances capable of interfering with platelet function. There are several classes of ophidic proteins that interact with platelet receptors, and the peptides present in venom have stood out due to their lower complexity and lower production cost. The aim of this study was to evaluate the interference of bhalternin, a serinoprotease isolated from *Bothrops alternatus* venom, on platelet aggregation. As a result, it was found that the protein, after denatured, was able to inhibit platelet aggregation by interacting with the P2Y₁₂ ADP receptor. In addition, the peptide region responsible for this activity has been identified and designated BhaltPIP, which has been synthesized and is in patenting process. The effect of bhalternin on tumor cells was also evaluated, and was noted that the protein interferes with prostate tumor cell growth without acting on the growth of normal cell. Thus, it is concluded that bhalternin has functions on both tumor cells and platelet aggregation, and the BhaltPIP peptide derived from this protein has therapeutic potential for treatment and diagnosis of hemostatic disorders.

Key words: Platelet aggregation; snake venom; peptides; synthetic peptides.

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, do Instituto de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia.

De forma concomitante ao desenvolvimento da tese, foi realizada a síntese de um peptídeo isolado da peçonha de *Bothrops moojeni*, bem como a sua caracterização na agregação plaquetária, que culminaram no depósito da patente denominada “Decapetídeo da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*”, depositada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) sob número de processo BR 10 2018 012555 9 (Anexo I).

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os efeitos da bhalternina, uma serinoprotease isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*, em células tumorais e na agregação plaquetária, e posteriormente identificar a região da proteína responsável pela agregação das plaquetas. Após identificada a região peptídica, esta foi sintetizada e, devido a seu importante potencial terapêutico para prevenção e tratamento de distúrbios trombóticos, esta sequência se encontra em fase de patenteamento.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de Uberlândia, em parceria com o Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfieldz Camargo”, que colaborou com os testes de bioinformática.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Peçonha de serpentes

Serpentes são animais vertebrados com grande diversidade morfológica e fisiológica (VITT; CALDWELL, 2014). Mais de 3000 espécies são encontradas em várias regiões do mundo, sendo que no Brasil são encontradas 442 espécies divididas em 10 famílias (COSTA; BERNILS, 2018).

Algumas serpentes possuem a capacidade de produzir, armazenar e inocular uma secreção tóxica, denominada peçonha. Esta é produzida e armazenada em glândulas e inoculadas por dentes modificados que contêm canais abertos ou fechados, conhecidos como presas (WARREL, 2010; ZAHER *et al.*, 2009). A principal função da peçonha é proporcionar a alimentação e defesa das serpentes. Através de um ferimento causado por seus dentes, a serpente é capaz de inocular a peçonha, a qual induz rápidas alterações fisiológicas e bioquímicas que causam perturbação no funcionamento dos músculos, nervos e sistema cardiovascular da presa (FRY, 2012; KING, 2011).

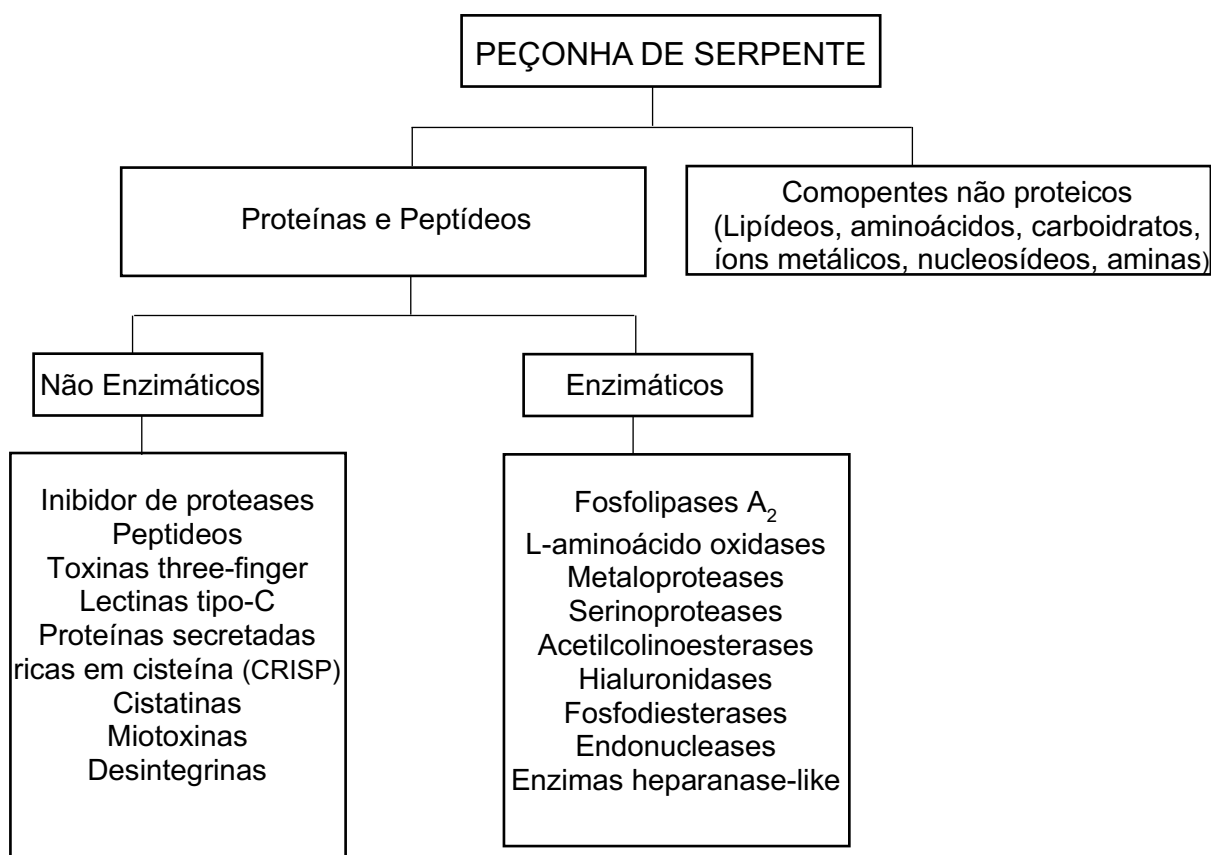
Quando a vítima de serpentes é o homem, caracteriza-se como acidente ofídico, o qual pode causar morbidade e levar a morte se não tratado (WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017). Tal acidente ocorre com grande frequência na América Latina, com maiores números de casos no Brasil, o que o caracteriza como um grave problema de saúde pública e confere às serpentes peçonhentas grande importância médica (BRASIL, 2001). No Brasil, as serpentes peçonhentas estão distribuídas em duas principais famílias: Elapidae e Viperidae, representadas por cerca de 60 espécies, às quais pertencem a 6 gêneros: *Micrurus*, *Leptomicrurus* (Elapidae), *Bothrops*, *Bothrocophias*, *Lachesis* e *Crotalus* (Viperidae) (COSTA; BERNILS, 2018).

Segundo os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o maior número de acidentes ofídicos no Brasil é causado pelas serpentes do gênero *Bothrops*. As serpentes pertencentes a este gênero são encontradas em todo o território nacional, e são popularmente conhecidas por jararaca, jararacuçu, urutu-cruzeiro, combóia e caíçaca. Os acidentes com estas serpentes são caracterizados por apresentarem efeitos locais, como dor, edema, hemorragia

local, formação de bolhas e necrose tecidual; e sistêmicos, como distúrbio na coagulação sanguínea, hemorragia sistêmica, alterações cardiovasculares, hipotensão arterial, hematúria, epistaxes e hematêmese (GUTIÉRREZ *et al.*, 2009, 2011).

Os efeitos de envenenamento são provocados por compostos presentes na peçonha das serpentes. Em geral, as peçonhas de serpentes são compostas por uma mistura de proteínas, peptídeos, cátions inorgânicos, lipídios, carboidratos, aminoácidos livres, e aminas biogênicas (Figura 1). Entretanto, as proteínas e peptídeos são responsáveis pela maioria dos efeitos (WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017). Os principais componentes proteicos da peçonha botrópica são as fosfolipases A₂, metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, L-aminoácido oxidases, lectinas, precursores de peptídeos bioativos e peptídeos potenciadores de bradicinina (MUNAWAR *et al.*, 2018).

Figura 01: Composição das peçonhas de serpente. Fonte: adaptado de Munawar *et al.*, 2018.



Dentre os diversos efeitos das proteínas e peptídeos de peçonha ofídica, a interferência na hemostasia se destaca pela sua importância médica, tanto pelos efeitos de envenenamento, quanto pelas propriedades terapêuticas de seus agentes. Um grupo de proteínas que atua na hemostasia são as serinoproteases, as quais seus efeitos fisiológicos estão relacionados à ativação e inibição de fatores da coagulação sanguínea, interferência no sistema fibrinolítico e na agregação plaquetária (KANG *et al.*, 2011; KINI, 2005).

As SVSPs¹ são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, e que contêm um resíduo de serina altamente reativo em seu sítio ativo, estabilizado por um resíduo de histidina e aspartato (BARRETT; RAWLINGS, 1995). Em geral, elas apresentam massa molecular que varia entre 26 e 67 kDa, e são agrupadas de acordo com suas funções. O primeiro grupo compreende as SVSPs que apresentam atividades fibrinolíticas e/ou fibrinogenolíticas, chamadas de “trombina-like”. O segundo grupo consiste de SVSPs que liberam bradicinina a partir de cininogênios, como a calicreína de mamíferos (ou kininogenase), chamadas de “calicreína-like” (BAJARNASON, 1983; DI CERA, 2009). Há ainda as SVSPs que ativam o fator V, proteína C, plasminogênio e plaquetas (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000).

A bhalternina uma SVSP de *Bothrops alternatus* com potencial ação antitrombótica, foi descrita por Costa *et al.*, 2010. Tal proteína apresenta 236 resíduos de aminoácidos em sua composição e possui peso molecular de 31,5 kDa e 27 kDa sob condições reduzidas e não reduzidas, respectivamente. Ela apresenta atividade alfa-fibrinogenase, sendo que esse efeito ocorre na faixa de temperatura entre 30 e 40° C. A bhalternina pertence ao grupo “trombina-like, pois apresenta efeito coagulante *in vitro* e efeito desfibrinogenante quando administrada por via intraperitoneal em camundongos.

1.2 Plaquetas

A hemostasia compreende um conjunto de processos fisiológicos que tem como finalidade manter o sangue em um estado fluido e livre de coágulos nos vasos

¹ SVSPs: sigla do inglês *snake venom serine proteases*.

sanguíneos e, na ocorrência de lesão vascular, induzir o tampão hemostático de forma rápida e localizada para evitar hemorragia² (GALE, 2011). É dividida em hemostasia primária, secundária e fibrinólise, sendo que a hemostasia primária é definida pela formação do tampão plaquetário a partir de uma série de mecanismos desencadeados em poucos segundos após a ocorrência de uma lesão vascular (GRIMALDO-GÓMEZ, 2017).

O principal efector dos processos da hemostasia primária são as plaquetas. Estas são fragmentos plasmáticos anucleados produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea (ITALIANO; HARTWIG, 2002). Seu tamanho varia entre 1 e 4 µm de diâmetro e apresentam meia vida de 8 a 12 dias, sendo eliminadas da circulação por fagocitose mediada por macrófagos (GUYTON; HALL, 2006). Além da hemostasia, as plaquetas participam de outros processos, como na manutenção da integridade vascular, inflamação e cicatrização de feridas (CHATTERJEE; GEISLER, 2016; OPNEJA; KAPOOR; STAVROU, 2019).

As plaquetas apresentam estrutura discoide e são divididas em quatro regiões com distintas funções (WHITE, 2013). A zona periférica inclui as membranas interna e externa, compostas por fosfolipídios e glicoproteínas, que participam em vários estágios da coagulação sanguínea (COLLER *et al.*, 2010; HARTWIG, 2002), e o sistema canicular aberto, responsável pela troca de moléculas com o meio externo (WHITE, 2013; HARTWIG, 2002). A zona sol-gel é constituída pelo citoesqueleto, responsável por fornecer sustentação à forma discoide, e pelo sistema contrátil, que quando ativado permite a mudança da forma discoide, o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação do conteúdo presente nos grânulos (HARTWIG, 2002). A zona de organelas é formada pelos grânulos α, grânulos densos, lisossomos e mitocôndria. A presença dessas organelas permite que as plaquetas possuam metabolismo próprio (COLLER *et al.*, 2010; FLAUMENHAFT, 2003; HARTWIG, 2002). O sistema membranal inclui o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático rugoso e o sistema tubular denso, onde está concentrado o cálcio, que possui importante papel para a função das

² Os processos hemostáticos são balanceados por substâncias anticoagulantes, as quais são encontradas na corrente sanguínea e impedem a coagulação quando o sangue circula normalmente no interior dos vasos, e substâncias pró-coagulantes, as quais são ativadas nos locais da lesão tecidual e nesta situação predominam sobre as primeiras, a fim de promover a coagulação para estancar o sangramento (GUYTON, 2011).

plaquetas, participando dos eventos enzimáticos, e na adesão, ativação e agregação plaquetária (GREMMEL; FRELINGER; MICHELSON, 2016; HARTWIG, 2002).

A membrana plaquetária consiste em uma bicamada de fosfolipídios que possui em sua superfície receptores e glicoproteínas (GP) que repelem a aderência das plaquetas no endotélio normal, porém quando necessário reparar um dano vascular, eles são ativados e favorecem a aderência e a agregação das plaquetas à área lesionada (GUYTON; HALL, 2006). Na superfície da membrana das plaquetas também se encontram integrinas, as quais são proteínas transmembranas compostas por duas subunidades de glicoproteínas, que interagem com regiões RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), KGD (valina-glicina-ácido aspártico) e VGD (valina-glicina-ácido aspártico) das moléculas ligantes. As integrinas conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto, permitindo interações célula-célula e célula-matriz, e também permitem a ligação da célula com ligantes extracelulares, como colágeno, laminina e fibronectina, exercendo um importante papel na adesão na agregação de plaquetas (BENNETT; BERGER; BILLINGS, 2009; GUYTON; HALL, 2006).

Os grânulos α e densos também são fundamentais para as funções hemostáticas. Em seu interior se encontram diferentes agonistas, ligantes, fatores plaquetários, e fatores envolvidos na coagulação. O grânulo α contém fibrinogênio, fibronectina, fatores V e VIII, fator plaquetário 4, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator transformante de crescimento α (TGF- α). Os grânulos densos contêm ATP, ADP, cálcio ionizado, histamina, serotonina e epinefrina (KUMAR *et al.*, 2013). Ambos grânulos se encontram distribuídos uniformemente nas plaquetas em repouso e quando estas são ativadas, eles centralizam e se fundem com a membrana plaquetária, secretando seu conteúdo por exocitose (FLAUMENHAFT, 2003).

As plaquetas fluem continuamente dentro dos vasos sanguíneos, sem interagir com a parede vascular, se este se encontrar intacto. Quando há um rompimento da integridade vascular, as plaquetas são submetidas a uma resposta em série, participando da hemostasia primária para prevenir a perda de sangue (HARRISON, 2004). A resposta das plaquetas consiste em adesão, ativação e agregação plaquetária (LÖWENBERG; MEIJERS; LEVI, 2010).

O primeiro processo exercido pelas plaquetas para reparar uma injúria vascular é a adesão à matriz subendotelial, interagindo com componentes da matriz extracelular expostos na parede do vaso sanguíneo, tais como laminina, fibronectina, colágeno e Fator de von Willebrand (FvW) (VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). Esta interação é mediada por glicoproteínas e integrinas presentes na superfície da membrana das plaquetas (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais receptores e ligantes envolvidos na adesão plaquetária. Fonte: VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008; JURK; KEHREL, 2005.

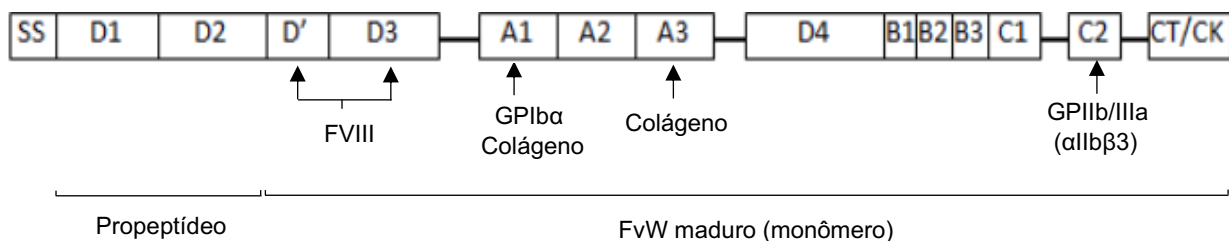
Receptores	Ligantes
GPIb-V-IX	FvW
GPVI, $\alpha_2\beta_1$	Colágeno
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogênio
$\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$	Fibronectina
$\alpha_v\beta_3$	Vitronectina
$\alpha_6\beta_1$	Laminina

A interação dos receptores plaquetários com os ligantes da matriz extracelular depende da tensão de cisalhamento. Em injúrias em artérias e arteríolas, onde há alta força de cisalhamento, a interação das plaquetas com o endotélio é mediada pelo FvW, que se liga ao complexo GPIb-V-IX presente na superfície das plaquetas e ao colágeno exposto na matriz subendotelial (VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). Essa interação inicia a captura de plaquetas circulantes e é uma etapa crucial para uma sequência de eventos de sinalização e adesão que permite a formação do plug plaquetário primário (NOWAK *et al.*, 2012).

O FvW é uma proteína adesiva sintetizada pelos megacariócitos e pelas células endoteliais, e é armazenado por estas nos corpos de Weibel-Palade ou nos grânulos α das plaquetas (RUGGERI, 2003). É composto de subunidades interligadas que resultam em multímeros com massa molecular que varia de 500 a 20000 kDa (SADLER, 1998). A presença de grande quantidade de cisteína em sua

estrutura, resulta em ligações dissulfeto que interligam as subunidades e são fundamentais pra formação de diferentes domínios e de suas funções características (YEE; KRETZ, 2014). Cada subunidade apresenta múltiplos domínios com sítios de ligações para moléculas específicas (Figura 2). Três domínios (A1, A2 e A3) participam do processo de adesão plaquetária. O domínio A1 possui a capacidade de se ligar à GPIIb α do complexo GPIb-V-IX. Essa ligação é ativada após o domínio A3 se ligar ao colágeno fibrilar e provocar uma mudança conformacional no domínio A2 (ANDREWS; BERNDT, 2004; HUANG *et al.*, 2019). O domínio A1 também pode se ligar ao colágeno. O domínio C2 interage com a integrina plaquetária α IIb β ₃ (YEE; KRETZ, 2014). O FvW também está relacionado à hemostasia secundária pois se liga ao fator VIII da coagulação, promovendo a associação entre suas cadeias leves e pesadas e protegendo-o da degradação proteolítica plasmática (PERUTELLI *et al.*, 1997; VLOT *et al.*, 1996).

Figura 2: Representação simplificada de uma subunidade do FvW. Nota-se os diferentes domínios e os locais de ligação à GPIIb α , ao colágeno, à GPIIb/IIIa e ao Fator VII. Fonte: adaptada de YEE; KRETZ, 2014.



O Complexo GPIb-V-IX é formado por glicoproteínas ricas em leucina e é expresso em plaquetas e megacariócitos. É composto por subunidades GPIIb α e GPIIb β , que são ligadas por pontes dissulfeto, e forma um complexo por ligação não covalente com as glicoproteínas V e IX (CLEMETSON; CLEMETSON, 1995). A ligação com o FvW ocorre na extremidade N-terminal da subunidade Iba (ANDREWS *et al.*, 1999).

A ligação do FvW à GPIIb α não é suficiente para induzir uma agregação estável pois apresenta rápida taxa de dissociação. Entretanto, essa ligação é fundamental para o início da agregação plaquetária, pois recruta outras plaquetas para o local da lesão e reduz sua velocidade para que outros receptores possam interagir com

seus ligantes. (VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). Tal ligação também aumenta a afinidade da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ pelo FvW, o que aumenta a adesão plaquetária e contribui para a posterior formação do agregado plaquetário (GIBBINS, 2004; KASIRER-FRIEDE *et al.*, 2004).

Em regiões com baixa força de cisalhamento, como em veias e grandes artérias, as plaquetas interagem diretamente com o colágeno, laminina e fibronectina expostos através das integrinas β_1 . Tais interações estimulam e sustentam a adesão plaquetária (KAMIGUTI, 2005).

A interação das plaquetas com o colágeno endotelial é mediada pela GPVI, e reforçada pela integrina $\alpha_2\beta_1$. (NIESWANDT *et al.*, 2001; VARGA-SZABO; PLEINES; NIESWANDT, 2008). A GPVI é expressa nas plaquetas e nos megacariócitos enquanto a integrina $\alpha_2\beta_1$ é expressa exclusivamente em plaquetas. Esta possui grande importância na estabilização da ligação das plaquetas ao colágeno, porém não é essencial para que ocorra a adesão plaquetária (NIESWANDT *et al.*, 2001).

Após a adesão das plaquetas à matriz endotelial, há uma rápida transdução de sinal que desencadeia uma série de eventos, mudanças no citoesqueleto, contração e secreção dos conteúdos granulares e ativação de integrinas, que sustentarão a adesão e proporcionarão a agregação de plaquetas na região lesionada (ANDREWS; BERNDT, 2004).

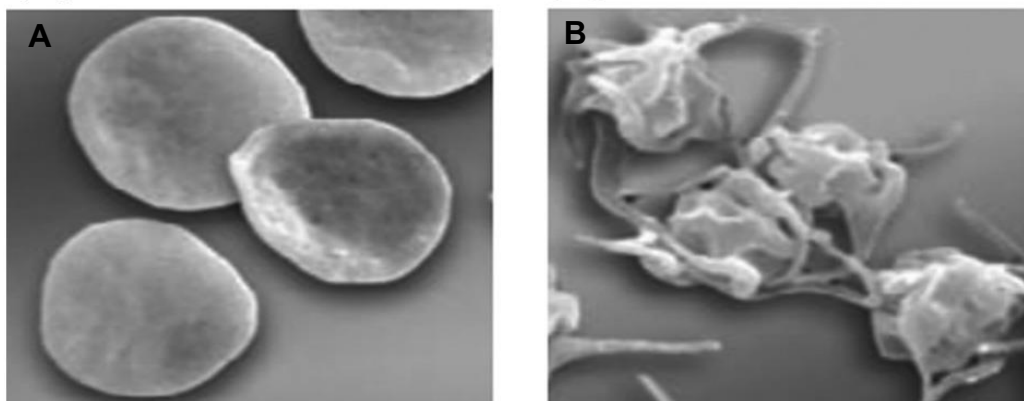
As plaquetas também podem ser ativadas pela ligação de diversos agonistas plaquetários a receptores de superfície específicos (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais receptores e agonistas envolvidos na ativação plaquetária. Fonte: adaptado de JURK; KEHREL, 2005.

Receptores	Ligantes
P2Y ₁ , P2Y ₁₂	ADP
TP α , TP β	TxA ₂
PAR1, PAR4, GPIb/V/IX	Trombina
α_{2A}	Epinefrina
5-HT _{2A}	Serotonina

A adesão ao endotélio e os agonistas plaquetários ativam uma série de eventos bioquímicos que culminam na concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}), proveniente do efluxo deste do sistema tubular denso ou do influxo do meio extracelular para o citosol. O cálcio então se associa à calmodulina, promovendo um rearranjo estrutural no citoesqueleto e uma modificação estrutural das plaquetas, passando estas de uma forma discoide para uma forma irregular, com emissão de pseudópodes que facilitam sua deposição nos locais de injúria vascular (Figura 3) (KANNAN; AHMAD; SAXENA, 2019; VANNI *et al.*, 2007). O aumento dos níveis do Ca^{2+} citosólico também propicia a ativação de PLA_2s^3 plaquetárias, uma reorganização na bicamada de fosfolipídios, a ativação das integrinas plaquetárias e a secreção das moléculas presente nos grânulos α e densos (JURK; KEHREL, 2005; STASSEN; ARNOUT; DECKMYN, 2004).

Figura 03: Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia das plaquetas (A) Plaquetas não ativadas com forma discoide. (B) Plaquetas ativadas com numerosos e longos pseudópodes. Fonte: adaptado de KANNAN; AHMAD; SAXENA, 2019, reprodução de Platelets, 2ª Edição.



As substâncias liberadas pelos grânulos modulam as funções das plaquetas aderentes, sustentam e amplificam a resposta plaquetária inicial e estimulam o recrutamento das plaquetas circulantes para a formação de agregados plaquetários (JURK; KEHREL, 2005).

³ PLA_2s : abreviação em inglês de phospholipases A_2 .

O ADP⁴, armazenado e secretado pelos grânulos densos, é um importante mediador da ativação e da amplificação plaquetária. Sua interação com as plaquetas se dá através dos receptores purinérgicos acoplados à proteína G, P2Y₁ e P2Y₁₂. (GREMMEL *et al.*, 2016). A ligação do ADP ao P2Y₁ mobiliza o Ca²⁺ a partir dos estoques internos, o que provoca uma mudança conformacional nas plaquetas e resulta em uma rápida, transitória e reversível agregação. A ligação do ADP ao receptor P2Y₁₂, amplifica e sustenta a resposta plaquetária, e ativa a integrina αIIbβ3 (CATTANEO, 2019; JANTZEN *et al.*, 2001). A coativação de ambos receptores é necessária para que haja uma completa agregação plaquetária induzida pelo ADP (CATTANEO, 2019; GACHET, 2005). Tais receptores também estão envolvidos na amplificação da agregação plaquetária induzida por outros agonistas, sendo a atuação do P2Y₁ menor, exceto no caso da agregação induzida por colágeno (HECHLER; GACHET, 2011). P2Y₁ e P2Y₁₂ também participam da função pró-coagulante das plaquetas, atuando indiretamente na exposição da P-selectina, e o P2Y₁₂ ainda atua diretamente na exposição de fosfatidilserina na superfície das plaquetas (LÉON *et al.*, 2003; LÉON *et al.*, 2001; STOREY *et al.*, 2000).

O TxA₂⁵ é formado a partir do ácido araquidônico proveniente da quebra dos fosfolipídios das membranas plaquetárias pelas PLA₂, que são ativadas pelo aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular (JURK; KEHREL, 2005; SMYTH, 2010). Ele possui ação vasoconstritora, promovendo uma redução do fluxo sanguíneo e interage com as plaquetas através dos receptores acoplados a proteína G TPα, TPβ (NAKAHATA, 2011; OFFERMANN, 2006). A ligação do TxA₂ a seus receptores desencadeia uma série de reações no interior das plaquetas que culminam na acumulação de Ca²⁺ e, provoca uma mudança conformacional nas plaquetas, ativando-as. Sua ação funciona como um *feedback* positivo para a ativação plaquetária (NAKAHATA, 2011).

A trombina é o principal agonista plaquetário (ESTEVEZ *et al.*, 2015). Ela é formada a partir da protrombina após a exposição de fosfolipídios ácidos na superfície externa das plaquetas, induzida pela ativação plaquetária (RANG *et al.*, 2011). Sua interação com as plaquetas se dá através da clivagem dos receptores

⁴ ADP: abreviação de adenosina difosfato.

⁵ TxA₂: abreviação de Tromboxano A₂.

ativados por proteases acoplados a proteína G PAR1 e PAR4 e pela ligação à GPIb do complexo GPIb/V/IX (ESTEVEZ *et al.*, 2015). A ligação da trombina a seus receptores induz mudança conformacional, aumento na concentração de Ca^{2+} e liberação dos conteúdos granulares (RWIBASIRA RUDINGA; KHAN; KONG, 2018). PAR1 tem alta afinidade pela trombina, sendo que baixas doses desse agonista podem ativar a agregação (MUMAW, 2016). A ligação da trombina ao PAR1 causa um rápido aumento de Ca^{2+} intracelular que é sustentado pela ligação da trombina ao PAR4, que causa uma lenta ativação do Ca^{2+} com consequente lenta clivagem por outras moléculas de trombina, resultando em uma agregação prolongada e sustentável (COVIC, GRESSER, KULIOPULOS, 2000; KAHN *et al.*, 1999; MUMAW, 2016;). A trombina também é responsável pela estabilização do agregado plaquetário através da conversão do fibrinogênio em fibrina (KIM *et al.*, 2002).

A epinefrina, secretada pelos grânulos densos, é um importante agonista que sozinha não consegue ativar a agregação, mas potencializa a ação de outros agonistas (LIN *et al.*, 2015). Sua interação com as plaquetas ocorre por meio do receptor adrenérgico acoplado à proteína G, α_{2A} (SPALDING *et al.*, 1998). A ligação ao receptor não provoca mudança conformacional nas plaquetas, mas ela atua sinergicamente com outros agonistas e induz a secreção dos grânulos α e densos e ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (BERNARDI; MOREIRA, 2004; FÄLKER *et al.*, 2019).

A serotonina é armazenada e secretada pelos grânulos densos e se liga às plaquetas através do receptor 5-HT_{2A}. Ao interagir com o receptor, inicia-se uma sinalização dependente de proteína G que culmina no aumento da concentração de Ca^{2+} e que induz a liberação dos conteúdos granulares (MERCADO *et al.*, 2013). A ligação da serotonina intensifica a ativação induzida por outros agonistas, como o ADP (LI *et al.*, 1997). A serotonina possui outras importantes funções para a coagulação, atuando como um forte vasoconstritor, e propiciando o aumento da retenção de proteínas pró coagulantes, como fibrinogênio e trombospondina, na superfície das plaquetas (DALE, 2002).

Após a adesão ao endotélio e concomitante ativação das plaquetas, é iniciado o terceiro processo da hemostasia primária, o qual consiste na formação do agregado de plaquetas na região lesionada, chamado de tampão hemostático (JURK; KEHREL, 2005). Os processos que antecedem a agregação convergem

para a ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, capacitando-a a interagir com seus ligantes como o fibrinogênio e o FvW (BLEDZKA *et al.*, 2013; SAVAGE; CATTANEO; RUGGERI, 2001).

A integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (anteriormente denominada GPIIb/IIIa) é a principal proteína integral de membrana das plaquetas, sendo encontradas 80.000 a 100.000 cópias por plaqueta (WAGNER *et al.*, 1996). Ela também é encontrada nos grânulos α e pode ser expressa após a ativação plaquetária (WENCEL-DRAKE *et al.*, 1986; WOODS; WOLFF; KELLER, 1986). É um heterodímero formado pelas subunidades αIIb e $\beta 3$ que estão dispostas nas superfícies das plaquetas, com a região N-terminal direcionada para o meio extracelular e a região C-terminal para o citosol (BLEDZKA *et al.*, 2013; FUJIMURA; PHILLIPS, 1983). Nas plaquetas em repouso o domínio extracelular se encontra em um estado de baixa afinidade por seus ligantes (GOGGS; POOLE, 2012; TAKAGI, 2002). Entretanto, quando as plaquetas são ativadas, proteínas intracelulares, como a talina e a kindlina, interagem com a região citoplasmática da integrina, provocando uma alteração estrutural do domínio extracelular, que ativa a integrina, fazendo com que tenha alta afinidade pelos seus ligantes, num processo chamado de sinalização *inside-out* (do meio intracelular para o meio extracelular) (HUANG *et al.*, 2019).

A ligação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ a seus ligantes promove a interação plaqueta-plaqueta, formando o agregado plaquetário. Os principais ligantes da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ é o fibrinogênio e o FvW, porém ela pode se ligar a outras moléculas (Tabela 3). A ligação à vitronectina, fibronectina, ou trombospondina-1 estabilizam, amplificam e regulam a agregação plaquetária. Tais ligantes compartilham a sequência RGD, a qual a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ se liga (BLEDZKA *et al.*, 2013; JURK; KEHREL, 2005).

Tabela 3 – Principais receptores e agonistas envolvidos na agregação plaquetária.
 Fonte: adaptado de BLEDZKA *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2019; JURK; KEHREL, 2005.

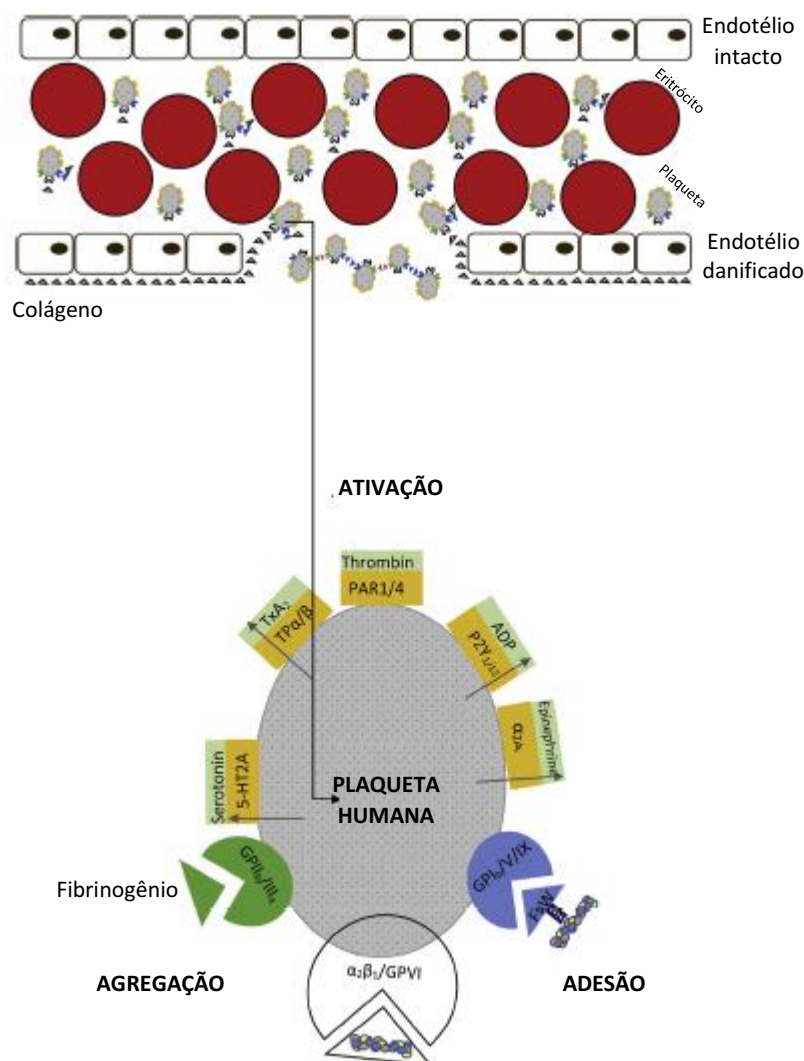
Receptores	Ligantes
$\alpha\text{IIb}\beta 3$	Talina,
$\alpha\text{IIb}\beta 3$	Kindlina
$\alpha\text{IIb}\beta 3$ ativado	Fibrinogênio
$\alpha\text{IIb}\beta 3$ ativado; GPIb/V/IX	FvW
$\alpha\text{IIb}\beta 3$ ativado	Trombospondina-1
$\alpha\text{IIb}\beta 3$ ativado	Fibronectina
$\alpha\text{IIb}\beta 3$ ativado	Vitronectina

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática composta por dois pares de três cadeias unidas por ligações dissulfeto ($A\alpha$, $B\beta$ e γ) (SORIA *et al.*, 2019). A interação com a integrina se dá a partir de duas sequências RGD localizadas na cadeia $A\alpha$, embora ela também interaja com a sequência KQAGDV presente na região C-terminal da cadeia γ do fibrinogênio, sendo esta ligação importante para a agregação plaquetária (SPRINGER; ZHU; XIAO, 2008). A ligação ao fvW ocorre no domínio C2, onde está presente a sequência RGD (YEE; KRETZ, 2014). A sua ligação à integrina contribui para o contato inicial entre as plaquetas, porém não garante uma agregação estável, sendo necessária a presença do fibrinogênio para estabilizar a formação do agregado plaquetário (DAVÌ; PATRONO, 2007).

A ligação do fibrinogênio à integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ desencadeia uma sinalização *outside-in* (do meio extracelular para o meio intracelular), que gera uma cascata de eventos de sinalização intracelular que medeiam uma adesão estável e irreversível, a reorganização do citoesqueleto e a agregação plaquetária irreversível, com consequente crescimento do trombo (HUANG *et al.*, 2019). A figura 4 apresenta um resumo dos processos de adesão, ativação e agregação plaquetária.

Além do seu papel na hemostasia primária, as plaquetas possuem importante papel na propagação e estabilização do coágulo. Quando são ativadas, sua superfície fica carregada negativamente e há a exposição da fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana. Essa exposição controla a formação de trombina, fornece sítios de ligação para os fatores Xa e Va, e atua na catálise da via extrínseca da cascata da coagulação (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Figura 04: Diagrama esquemático da adesão, ativação e agregação plaquetária após lesão vascular. Fonte: adaptado de QUEIROZ *et al.*, 2017.



1.3 Disfunções plaquetárias e alvos terapêuticos

As plaquetas estão diretamente envolvidas em importantes patologias, desde síndromes a graves quadros trombóticos (GHOSH *et al.*, 2005; GREGG, D.; GLODSCHIMIDT-CLERMONT, 2003). As patologias podem ser resultado de anormalidades no número ou na composição das plaquetas, de desordens granulares, da deficiência da secreção plaquetária, de distúrbios na interação com fatores da coagulação, por anormalidades em fatores plasmáticos, e por defeitos nos receptores plaquetários (GHOSH *et al.*, 2005; GUNAY-AYGUN; HUIZING, 2004; KOTTKE-MARCHANT; CORCORAN, 2002; WARE, 2004). Sendo assim, as plaquetas, especialmente seus receptores e respectivos ligantes são importantes alvos terapêuticos.

A Síndrome de Bernard-Soulier é uma doença hereditária caracterizada por um decréscimo ou ausência do complexo GPIb-V-IX, o que afeta a ligação do FvW às plaquetas e consequente ineficiência da adesão plaquetária (ALAMELU; LIESNER, 2010). A deficiência deste complexo também impede a ativação plaquetária por baixas concentrações de trombina (PEITSIDIS *et al.*, 2010). Os portadores desta síndrome apresentam plaquetas maiores, mas em menor número, tempo de sangramento prolongado e agregação anormal diante do antibiótico ristocetina (GHOSH *et al.*, 2005).

A Trombastenia de Glanzmann também é uma síndrome hereditária. É caracterizada pela ausência ou diminuição das integrinas $\alpha\text{IIb}\beta_3$, porém não é evidenciado alteração no número, tamanho, forma e tempo de vida das plaquetas (STEVENS; MEYER, 2002). A alteração na integrina pode ser quantitativa (tipo 1 e tipo 2) ou qualitativa (tipo 3). A deficiência deste receptor leva à incapacidade da formação de agregados plaquetários e do tampão hemostático primário (GRAINGER; THACHIL; WILL, 2018).

A Síndrome da plaqueta cinza e a Desordem de Quebec são distúrbios relacionados a anormalidades na capacidade de estocagem de moléculas no interior dos grânulos plaquetários (FLAUMENHAFT, 2003). A Síndrome da plaqueta cinza é caracterizada pela deficiência de armazenamento de proteínas, como fator IV plaquetário, β -tromboglobulina, fibrinogênio e fator de crescimento derivado da plaqueta, nos grânulos α , fazendo com que a zona periférica das

plaquetas apresente coloração acinzentada (HANDIN, 2005). Na Desordem de Quebec há um defeito na lise do conteúdo proteico dos grânulos α e na multimerina α granular, uma proteína ligada ao fator V no interior do grânulo, implicando em uma diminuição do conteúdo desta e de outras proteínas, como fibrinogênio e o FvW (CASTRO *et al.*, 2006). Em outras ocasiões, há o perfeito armazenamento dos conteúdos granulares, porém há uma deficiência na secreção, que pode ser causado por anormalidades na transdução de sinal, nas vias metabólicas e nos mecanismos de secreção após a ativação plaquetária (FLAUMENHAFT, 2003).

Anormalidades nos fatores plasmáticos também provocam distúrbios plaquetários. A afibrinogenemia é uma rara desordem hereditária ou adquirida, na qual os níveis de fibrinogênio são extremamente baixos ou ausentes. Nesta síndrome a interação entre plaquetas é comprometida ocasionando tempo de sangramento prolongado, diminuição do número de plaquetas e anormalidade no perfil de agregação (CASTRO *et al.*, 2006).

A doença de von Willebrand é uma disfunção quantitativa e/ou qualitativa do FvW (RODEGHIERO; CASTAMAN; DINI, 1987). Ela pode ser hereditária ou adquirida, pois lesões vasculares que aumentam a tensão de cisalhamento das paredes dos vasos arteriais podem acarretar em uma fragmentação da estrutura multimérica do FvW (CASTRO *et al.*, 2006). Os portadores dessa doença apresentam manifestações hemorrágicas que são dependentes do tipo da doença, que pode ser do tipo 1, 2 e 3, sendo que o tipo 2 é subdividido em quatro subtipos, 2A, 2B, 2M e 2N. Os subtipos 1 e 3 são defeitos quantitativos do FvW, enquanto o subtipo 2 (2A, 2B, 2M e 2N) é qualitativo (SADLER, 1994). Os principais sintomas são padrões de sangramento espontâneo ou provocado, e tendência para formação de hematomas, epistaxes frequentes e menorragia (BARBOSA; CUNHA; BARBOSA, 2007; MARQUES *et al.*, 2010).

Essa desordem é a mais comum dentre as doenças hemorrágicas hereditárias. Sua ocorrência é de 2% na população mundial, e no Brasil representa mais de 30% dos transtornos hemorrágicos notificados, porém sua ocorrência pode ser bem maior, pois demonstra ser uma doença subdiagnosticada em razão das apresentações clínicas variáveis e ao custo e complexidade de testes laboratoriais que dificultam o diagnóstico (BARBOSA; CUNHA; BARBOSA, 2007; BRASIL, 2017; ECHAHDI *et al.*, 2017). O tratamento consiste na elevação dos níveis

plasmáticos do FvW, através do medicamento desmopressina, e na infusão de um concentrado de fator VIII com FvW, porém não são suficientes pois parte dos portadores da doença não são responsivos, além de apresentarem vários efeitos colaterais (BRASIL, 2008; RODEGHIERO; CASTAMAN, 2005).

Além dos distúrbios hereditários, as plaquetas desempenham importante papel no desenvolvimento de doença trombótica, em consequência da oclusão vascular causada por desequilíbrios nos mecanismos de regulação que controlam o crescimento do trombo (MICHELSON, 2004; RANG *et al.*, 2011). Irregularidades na agregação plaquetária se traduz em um amplo espectro de doenças patológicas e suas complicações como doenças renais, tumorigênese, doenças trombóticas, incluindo a trombose venosa e arterial, embolia, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e quadros relacionados com *diabetes mellitus* (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014; NIESWANDT; AKTAS; MOERS, 2005; RANG *et al.*, 2011; RUGGERI, 1997; SHIN *et al.*, 2017; WATALA, 2005).

A função plaquetária, juntamente com os receptores plaquetários são importantes alvos terapêuticos (SAJEVIC; LEONARDI; KRIZAJ, 2011). Vários agentes antiplaquetários são utilizados no tratamento e profilaxia de doenças trombóticas. Ao limitar a agregação plaquetária, tais agentes ajudam a prevenir a formação de trombos que podem bloquear os vasos sanguíneos e levar ao infarto agudo do miocárdio ou ao acidente vascular cerebral (AVC). (CASTRO *et al.*, 2006). Eles possuem como alvo os receptores na superfície das plaquetas, as glicoproteínas, e enzimas plaquetárias (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018).

A enzima cicloxigenase plaquetária (COX-1) participa da formação do TxA₂, que ativa as plaquetas, a partir do ácido araquidônico proveniente dos fosfolipídios da membrana plaquetária. Essa enzima é alvo da aspirina (ácido acetilsalicílico), o agente antiplaquetário mais antigo e mais utilizado (CAPONE *et al.*, 2010). A aspirina inibe irreversivelmente o sítio de ligação do ácido araquidônico, impedindo a formação de tromboxano A₂ e consequentemente inibindo a agregação plaquetária (CATELLA-LAWSON *et al.*, 2001). Embora demonstre alta taxa de eficácia, a aspirina pode causar toxicidade, causando um aumento no sangramento, principalmente hemorragia gastrointestinal e alguns pacientes podem apresentar uma síndrome de "resistência à aspirina" (GOODMAN; FERRO; SHARMA, 2008; HUANG *et al.*, 2011).

O receptor de ADP P2Y₁₂ é o principal alvo dos agentes antiplaquetários orais, devido sua ativa participação na amplificação da resposta plaquetária necessária para a formação do trombo (FALCÃO *et al.*, 2013). Os fármacos utilizados para inibição da agregação por esse receptor são os tienopiridínicos, que incluem a ticlopidina, o clopidogrel, e o prasugrel, e se ligam aos receptores de maneira covalente e irreversível (CATTANEO, 2010; YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018); e fármacos pertencentes à classe dos ciclopentil-triazolopirimidinas, que incluem o cangrelor e o ticagrelor, que interagem de forma reversível com o receptor e inibem a ativação plaquetária mediada pelo ATP (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018).

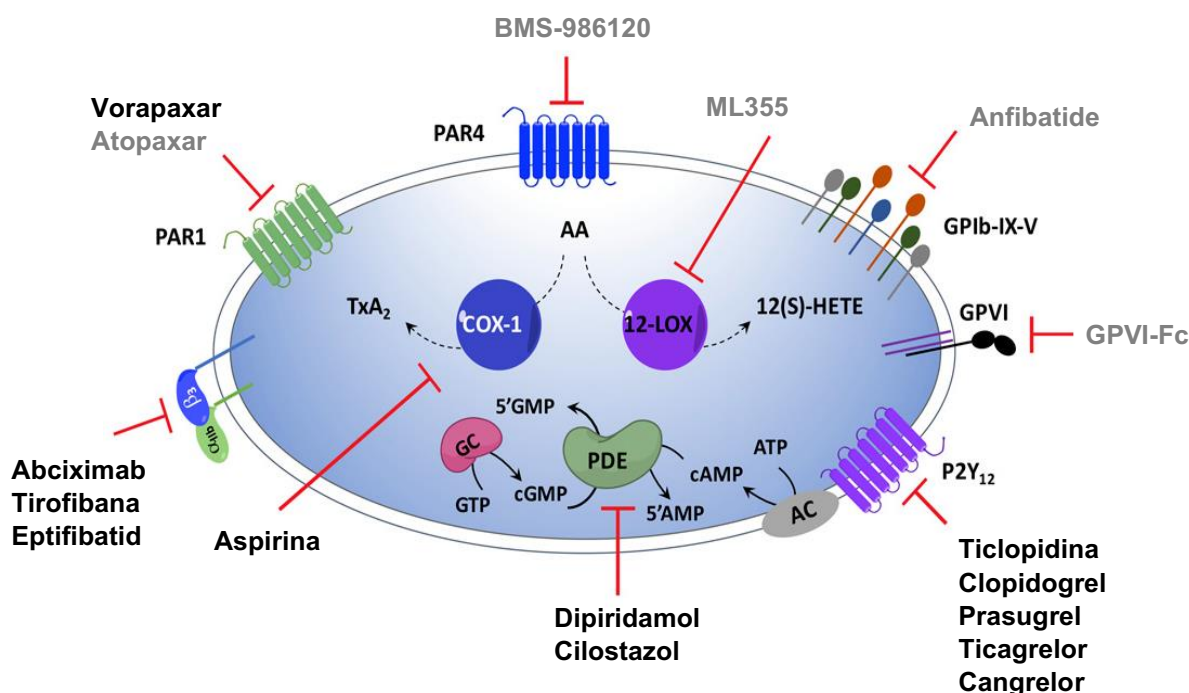
A integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ é alvo de fármacos como tirofiban, eptifibatide e abciximab. Essas moléculas impedem a ligação do fibrinogênio à integrina, bloqueando a formação de agregados plaquetários (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018). Por atuarem na via final comum da agregação plaquetária, são capazes de inibir a agregação induzida por diversos agonistas (KAMIGUTI, 2005; VORCHHEIMER; BECKER, 2006). O abciximab é um anticorpo monoclonal recombinante que permanece ligado às plaquetas por um período prolongado, o que faz com que tenha uma longa ação. Ele também possui a capacidade de se ligar a outras integrinas plaquetárias, como a $\alpha_v\beta_3$, o que pode estar associado a efeitos adversos. A tirofibana é uma molécula não peptídica sintética, desenvolvido com base no motivo RGD da desintegrina echistatin da peçonha da serpente *Echis carinatus*, que age como um mimético da sequência RGD. O eptifibatide é um heptapeptídeo cíclico baseado na sequência KGD da desintegrina barbourin da peçonha da serpente *Sistrurus miliarius barbouri*. Ambos competem com o fibrinogênio pelo sítio de ligação da $\alpha\text{IIb}\beta_3$ e inibem a agregação plaquetária (KEREIAKES *et al.*, 2000; LAZAROVICI; MARCINKIEWICZ; LELKES, 2019; YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018).

Os receptores PAR-1 e PAR-4 são importantes alvos terapêuticos pois ao inibir a ação da trombina, há também o bloqueio da liberação de mediadores secundários como ADP e TxA₂. Além disso, a inibição dos receptores PARs não interfere na função de produção de fibrina induzida pela trombina na hemostasia secundária, o que permite um efeito seletivo e reduz o risco de sangramento (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018). O vorapaxar é um composto tricíclico sintético que age como um antagonista reversível do PAR-1 (KOSOGLOU *et al.*, 2012), porém estudos clínicos revelam complicações hemorrágicas após seu uso em alguns pacientes. O

atopaxar também é um antagonista do PAR-1, porém ainda se encontra em fase de investigação para uso clínico (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018). A molécula BMS-986120 é um antagonista do receptor PAR-4 e se encontra em fase de estudo para uso em doenças trombóticas. Acredita-se que a inibição do PAR-4 possa inibir a agregação plaquetária com menos interferência na hemostasia secundária (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018; WONG *et al.*, 2017).

A figura 05 mostra os principais alvos terapêuticos e suas respectivas drogas.

Figura 05 – Os principais alvos antiplaquetários. Medicamentos inibem receptores de superfície, glicoproteínas, oxigenases e fosfodiesterases para regular a função plaquetária. Os agentes escritos em preto são atualmente aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), enquanto os medicamentos escritos em cinza estão sob investigação nas fases pré-clínica ou clínica. Fonte: adaptado de Yeung, Li, Holinstat, 2018.



Metade dos medicamentos utilizados atualmente são provenientes de produtos naturais, visto que eles possuem a capacidade de atuar em vários mecanismos fisiológicos, incluindo a hemostasia primária (BUTLER, 2005; PATERSON; ANDERSON, 2005; SANCHEZ *et al.*, 2017). As peçonhas de serpentes são uma rica fonte de moléculas com propriedades terapêuticas, sendo que as proteínas e os peptídeos nelas presentes apresentam potencial para o desenvolvimento de novas drogas antitrombóticas (LAZAROVICI; MARCINKIEWICZ; LELKES, 2019).

1.4 Proteínas e peptídeos de peçonha de serpente que interferem na função plaquetária

Vários componentes proteicos isolados de peçonhas ofídicas são capazes de atuar na função das plaquetas, inibindo ou ativando a agregação plaquetária através de diferentes mecanismos. As proteínas que interferem na hemostasia primária são pertencentes às famílias das SVMPs⁶, SVSPs, PLA₂s, SV-LAAOs⁷, lectinas tipo *C-like* (snaclecs), além das desintegrinas e outros peptídeos (CLEMETSON, LU, CLEMETSON, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2017).

As SVMPs são proteases dependentes de metais, os quais desempenham crítico papel nas atividades proteolítica e biológica dessas enzimas (FOX; SERRANO, 2009). A interferência na agregação plaquetária por essas enzimas ocorre através de vários mecanismos de ação. Elas atuam por ação estrutural ou enzimática sobre receptores das plaquetas, como α IIb β 3, α 2 β 1 e GPIb, ou sobre proteínas adesivas como o colágeno e FvW, inibindo a agregação plaquetária (KAMIGUTI, 2005; KINI; KOH, 2016).

Embora a maioria das SVMPs inibam as plaquetas, duas metaloproteases foram descritas como agonistas da agregação plaquetária, a aborhagina, isolada da peçonha de *Trimeresurus albolabris* e a crotarhagina, isolada da peçonha de *Crotalus horridus*, que interagem com o receptor GPIV e ativam as plaquetas (WIJEYEWICKREMA *et al.*, 2007). Outras metaloproteases atuam como antagonistas da agregação plaquetária, como a jararhagina, isolada da peçonha de

⁶ SVMPs: sigla do inglês *snake venom metalloproteinases*.

⁷ SV-LAAO: sigla do inglês *L-Amino acid oxidase*.

Bothrops jararaca, que age hidrolisando o FvW e se ligando à integrina e $\alpha\beta 1$, inibindo a agregação induzida por ristocetina e pelo colágeno (LAING; MOURA-DASILVA, 2005); e a kistomina, isolada da peçonha de *Agkistrodon rhodostoma* que atua clivando a GPIb complexo GPIb-X-IX e a GPIV inibindo a agregação induzida por trombina e colágeno (HUANG *et al.*, 1993; HSU; WU; HUANG, 2008).

Algumas SVSPs atuam sobre as plaquetas através de um mecanismo semelhante ao da trombina, pela clivagem dos receptores PAR-1 e PAR-4 e por interagirem com o receptor GPIb α , induzindo a agregação plaquetária. Sabe-se que essas enzimas induzem mobilização de Ca^{2+} nas plaquetas, entretanto, o mecanismo de ação de várias SVSPs que interferem na agregação plaquetária não é bem elucidado (CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2007; MARRAKCHI *et al.*, 1997; QUEIROZ *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2000; SERRANO, 2013).

As serinoproteases PA-BJ, isolada da peçonha de *B. jararaca*, e thrombocytina, isolada da peçonha de *B. atrox* ativam a agregação plaquetária através da clivagem de PAR-1 (SANTOS *et al.*, 2000). Bothrombin, isolada de *B. jararaca* interagem com o receptor GPIb α e também ativa as plaquetas. BpirSP27 e BpirSP4, isolada de *B. pirajai* (MENALDO *et al.*, 2012) e moojase, isolada de *B. moojeni* (AMORIM *et al.*, 2018) também ativam as plaquetas, porém o mecanismo de ação da atuação dessas enzimas ainda não foi elucidado. Embora a maioria das SVSPs ativem a agregação de plaquetas, testes com a serinoprotease uruprot, isolada da peçonha de *B. alternatus*, mostraram que ela não ativa a agregação plaquetária, porém é capaz de inibir a agregação induzida por ristocetina (RIBEIRO, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2003). A ristocetina é um antibiótico que funciona como indutor não fisiológico da adesão das plaquetas e é utilizado em testes *in vitro* de agregação plaquetária (DONG *et al.*, 2001; NAVDAEV *et al.*, 2014).

As PLA₂s são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster dos fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (DIAZ; ARM, 2003). Sua interferência na função plaquetária se dá por diferentes mecanismos. Elas podem hidrolisar os fosfolipídios presentes na membrana das plaquetas, que culmina na liberação de ácido araquidônico e de TxA₂, induzindo assim a ativação das plaquetas (MARKLAND, 1998; MOUNIER *et al.*, 1994). Elas podem também hidrolisar alguns subprodutos do ácido araquidônico, inibindo a agregação plaquetária (CLEMETSON, LU, CLEMETSON, 2007). As PLA₂s podem também

agir por mecanismos independentes de ação enzimática. Estudos sugerem que essa ação se dê através de alterações na morfologia das plaquetas causadas por ruptura do citoesqueleto (HUANG *et al.*, 1987; MARKLAND, 1998).

Devido aos diferentes mecanismos de atuação na agregação plaquetárias, as PLA₂s são divididas em três grupos (KINI; EVANS, 1990). No primeiro grupo se encontram as PLA₂s que ativam a agregação, como a Bthtx-II, isolada da peçonha de *Bothrops jararacuçu*. No segundo grupo estão as PLA₂s que inibem a agregação, como a BaltPLA₂, purificada de peçonha de *B. alternatus*, que inibe a agregação induzida por epinefrina e ADP (DIAS *et al.*, 2018), e a BmooPLA₂s, isolada da peçonha de *B. moojeni*, que inibe a agregação induzida por colágeno e ADP (SILVEIRA *et al.*, 2013). No terceiro grupo se encontram as PLA₂s que apresentam efeito bifásico sobre as plaquetas, induzindo a agregação em baixas concentrações ou quando incubadas por um curto período, e inibindo a agregação em altas concentrações ou após longo período de incubação (MARKLAND, 1998). Nesse grupo se encontra uma PLA₂ isolada de *Vipera russelii* (TENG; CHEN; OUYANG, 1984).

As SV-LAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos ao α -cetoácido correspondente, com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (GUO *et al.*, 2012; IZIDORO *et al.*, 2014; ZULIANI *et al.*, 2009). Estas proteínas podem ativar ou inibir a agregação plaquetária, porém seus efeitos são controversos e os mecanismos de ação ainda não foram bem elucidados (ZULIANI *et al.*, 2009). Alguns autores sugerem que a ativação plaquetária ocorre em razão da formação de TxA₂ causada pelo peróxido de hidrogênio formado na reação catalisada pelas LAOs (DU; CLEMETSON, 2002). Já a inibição da agregação plaquetária pode estar relacionada à inibição da interação do fibrinogênio com a integrina α IIb β 3, pela contínua formação de H₂O₂, ou à redução da ligação do ADP nas plaquetas quando são expostas ao H₂O₂ (BELISARIO *et al.*, 2000; DU; CLEMETSON, 2002; SAKURAI *et al.*, 2001; TAKATSUKA *et al.*, 2001). Balt-LAAO-I, isolada da peçonha de *B. alternatus* (STÁBELI *et al.*, 2004), BmooLAAO-I, isolada da peçonha de *B. moojeni* (STÁBELI *et al.*, 2007) e Bp-LAAO, isolada da peçonha de *B. pauloensis* (RODRIGUES *et al.*, 2009) são exemplos de SV-LAOs que ativam a agregação plaquetária. Enquanto que as SV-LAOs que inibem a agregação plaquetária podem ser exemplificadas

pela BI-LAAO, isolada da peçonha de *B. leucurus* (NAUMANN *et al.*, 2011), ABU-LAO, isolada da peçonha de *Agkistrodon blomhoffiussurensis* (WEI *et al.*, 2007), e pela M-LAO, isolada da peçonha de *A. halys blomhoffii* (TAKATSUKA *et al.*, 2001).

As lectinas tipo C-like, ou snakecs (do inglês, *snake C-type lectins*), são pequenas proteínas não enzimáticas que possuem o domínio de reconhecimento de carboidratos (CDR), que é característico das lectinas, incompleto ou ausente, e portanto não se ligam a carboidratos (KOH; ARMUGAN; JEYASEELAN, 2006; ZELENSKY; GREARY, 2005).

Seu principal efeito biológico é na hemostasia, e sua interação se dá com receptores de membrana, fatores da coagulação e outras proteínas hemostáticas (ARLINGHAUS; EBLE, 2012; KINI, 2011; SARRAY *et al.*, 2013). Elas podem ativar ou inibir a agregação plaquetária, através da ligação a vários receptores de plaquetas como a GPIb, GPVI, recptor de lectina tipo-C (CLEC-2) e integrina $\alpha_2\beta_1$, e também ao FvW (CLEMETSON, 2010; KINI, 2011). Botrocetina, isolada da peçonha de *B. jararaca* e bitiscetina, isolada da peçonha de *Bitis arietans* são snakecs que ativam a agregação plaquetária através da ligação simultânea ao FvW e à GPIb (HAMAKO *et al.*, 1996; READ *et al.*, 1989). Já a vixapatina, isolada da peçonha de *Vipera xantina palestina* e sochicetina-A, isolada da peçonha *Echis sochureki*, são snakecs que inibem a agregação plaquetária ao interagirem com o receptor de colágeno $\alpha_2\beta_1$ (JAKUBOWSK *et al.*, 2013; MOMIC *et al.*, 2012; STANISZEWSKA *et al.*, 2009).

Os peptídeos de peçonha de serpente são um grupo de polipeptídeos não enzimáticos que geralmente formam domínios monoméricos e possuem menos que 100 resíduos de aminoácidos (MUNAWAR *et al.*, 2018). São moléculas altamente estáveis⁸, já que resistem à atividade proteolítica das proteínas presentes na peçonha (LEWIS; GARCIA, 2003).

As desintegrinas são peptídeos com baixo peso molecular, não enzimáticos, ricos em cisteína, e que apresentam a sequência RGD ou semelhante em sua composição (CLEMETSON, LU, CLEMETSON, 2007; MCLANE *et al.*, 1998; SCHLONDORFF; BLOBEL, 1999). Elas agem sobre a agregação plaquetária,

⁸ A estabilidade dos peptídeos é proporcionada por modificações pós traducionais e por formação de pontes dissulfeto (LEWIS; GARCIA, 2003).

induzem citotoxicidade e apoptose, e interferem na função das integrinas, alterando vários processos celulares, como migração, adesão e proliferação (CESAR *et al.*, 2019). As desintegrinas atuam na inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas através da interação da sequência RGD ou sequências homólogas, com a integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, o que impede a ligação de fibrinogênio e a consequente agregação (KUO; CHUNG; HUANG, 2019). A bothrostatina, isolada da peçonha de *B. jararaca* (FERNANDEZ *et al.*, 2005), e a colombistatina, isolada da peçonha de *B. colombiensis* (SÁNCHEZ *et al.*, 2009) são exemplos de desintegrina de peçonha de serpente que inibem a agregação plaquetária.

Outros peptídeos isolados da peçonha de serpente atuam na agregação plaquetária e possuem potencial para o desenvolvimento de novas drogas antitrombóticas. Dois tripeptídeos isolados da peçonha de *Deinagkistrodon acutus*, Pt-A e Pt-B, inibem a agregação plaquetária induzida por ADP. Esses peptídeos parecem ter grande responsabilidade pelo efeito anticoagulante do “vinho de cobra”, utilizado na Medicina Tradicional Chinesa na profilaxia e reabilitação de pacientes com doenças cardiovasculares (DING *et al.*, 2015; RENGASAMY *et al.*, 2019). O octapeptídeo DAA-8 é outro peptídeo isolado da mesma peçonha. Ele inibe a agregação plaquetária induzida por trombina, ADP, colágeno, e por um agonista do receptor PAR-1 (KONG *et al.*, 2018). Dois grupos de polipeptídeos, lebetina 1 e lebetina 2, isolados da peçonha de *Vipera lebetina*, (BARBOUCHE *et al.* 1998; BARBOUCHE *et al.* 1996), formam a libetina, uma família de peptídeos que inibem a agregação plaquetária. Esses peptídeos inibem a agregação plaquetária induzida por vários agonistas, porém o mecanismo de ação dessa atividade não é bem estabelecido. Eles inibem a ligação do fibrinogênio com as plaquetas, porém não apresentam a sequência RGD e sua estrutura não apresenta semelhança com as desintegrinas (MOSBAH *et al.*, 2019; RENGASAMY *et al.*, 2019; WILLIAMS, 1992). Um peptídeo proveniente da hidrólise da peçonha de serpente *Agkistrodon acutus*, denominado ACH-11 também é capaz de inibir a agregação plaquetária, tendo efeito inibitório sobre a agregação induzida por ADP (CHEN *et al.*, 2015).

Embora possuam potencial terapêutico, os peptídeos nativos possuem algumas limitações para serem utilizados como fármacos, sendo a principal delas a baixa biodisponibilidade, além das dificuldades de purificação (MACHADO

et al., 2004). Portanto, se faz necessário a utilização de metodologias de sínteses destes peptídeos para produção de drogas, como a tecnologia de DNA recombinante, sistemas de expressão, utilização de plantas e animais transgênicos, síntese enzimática e síntese química (KATZEN; CHANG; KUDLICKI, 2005; MACHADO *et al.*, 2004).

A tabela 4 mostra um resumo da ação dos componentes proteicos de peçonha de serpente sobre as plaquetas.

Tabela 4 – Mecanismo de ação das moléculas proteicas de peçonha de serpente nas plaquetas.

CLASSE	AÇÃO SOBRE AS PLAQUETAS	MECANISMO
SVMPs	Ativa ou Inibe	Ação enzimática ou estrutural sobre $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, GPIb, colágeno e FvW
SVSPs	Ativa ou Inibe	Clivagem de PAR-1 e PAR-4, interação com GPIb
PLA2s	Ativa ou Inibe, Ativa e inibe	Hidrólise de fosfolipídios liberando TxA_2 , hidrólise de subprodutos do ácido araquidônico, mecanismos independentes de ação catalítica
SV-LAAOs	Ativa ou Inibe	Formação de TxA_2 a partir do H_2O_2 , inibição da interação do fibrinogênio- $\alpha\text{IIb}\beta 3$, redução da ligação do ADP às plaquetas
DESINTEGRINAS	Inibe	Interação com $\alpha\text{IIb}\beta 3$
PEPTÍDEOS	Inibe	Desconhecido

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar atividades funcionais da bhalternina, uma serinoprotease isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*, identificar e sintetizar a região responsável por sua ação na agregação plaquetária.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as atividades antitumoral e antiplaquetária da bhalternina;
- Investigar a região peptídica da bhalternina responsável por atuar na agregação plaquetária;
- Sintetizar o peptídeo derivado da bhalternina e avaliar seu efeito na agregação plaquetária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Purificação da bhalternina

A peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus* foi adquirida do Serpentário Bioagents (Batatais - SP). Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo, à temperatura ambiente, e conservada a -20°C até o momento do uso.

O isolamento da bhalternina foi realizado através de três passos cromatográficos. Inicialmente, a peçonha bruta (300mg) foi dissolvida em 4,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M, pH=7,8, e a solução foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos à temperatura ambiente. A peçonha foi então submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel (2,5 cm x 20 cm). As amostras foram eluídas em gradiente de concentração de AMBIC (0,05M – 1M, pH 7,8) e foram obtidas oito frações. A segunda fração (A2) foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 (1,0 x 100 cm), na qual a amostra foi eluída com AMBIC (0,05 M) pH 7,8 e foram obtidas três frações. Em seguida, a segunda fração (G2) foi submetida a uma cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl-Sepharose (1,5 cm x 2,5 cm) com gradiente decrescente de NaCl (4 a 0 M), pela qual se obteve a bhalternina na principal fração. Em todas as cromatografias as frações foram coletadas em um fluxo de 20,0 mL/hora por um coletor de frações (Bio Rad, EUA). A absorbância foi acompanhada à 280 nm em um espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Japão). Após análise das absorbâncias foi construído um perfil cromatográfico e as frações foram liofilizadas e armazenadas à -20°C.

A fração contendo a bhalternina foi quantificada a 280 nm pelo equipamento BioDrop (Analítica) e analisada por SDS-PAGE 14% comparada com um padrão de massa molecular LMW (Low Molecular Weight), o qual continha fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

3.2 Cultura de Células

Linhagens de células derivadas de câncer de próstata (PC3), de câncer de mama (MDA-MB-231), de carcinoma de colo uterino humano (HeLa), células normais de próstata humana (RWPE-1) e de rim de macaco (VERO) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Virologia e Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Brasil) suplementado com soro fetal bovino (BFS) a 10%, 2 mM de glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e foram mantidos como cultura de monocamada em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C.

3.2.1 Ensaio de Citotoxicidade

Os efeitos da bhalternina na viabilidade de células tumorais e não tumorais foram testados com base na oxidação mitocondrial do reagente MTT (brometo de 3- [4,5- dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-2H-tetrazólio; azul de tiazolil) (Amresco), de acordo com Mosmann (1983), com algumas modificações. As células PC3, MDA-MB-231, HeLa, RWPE-1 e Vero (1 x 10⁴ células/poço) foram plaqueadas em placa de cultura de 96 poços. Após 24h as células foram incubadas com meio na ausência (células controle) ou presença de diferentes concentrações de bhalternina (100, 50 e 25 µg/mL) a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h, foi adicionado o reagente de MTT (50 µl; 1 mg/mL) e a placa foi incubada a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µL de DMSO e a absorbância foi medida a 560 nm em um leitor de placas (Multiskan GO Thermo Scientific, EUA). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, considerando como 100% de viabilidade a absorbância das células incubadas apenas com meio RPMI. Este ensaio foi realizado em triplicata e as análises estatísticas foram realizadas pelo método two-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni.

3.2.2 Ensaio de Migração Celular

O ensaio de inibição da migração de PC3 foi realizado como descrito por Chiu *et al.* (2011), com algumas modificações. As células (2×10^5 células/poço) foram colocadas em placas de 24 poços e mantidas a 37 °C até atingir confluência. O meio foi então descartado e as monocamadas de células de cultura foram riscadas usando uma ponteira de plástico para criar uma área desprovida de células. Após este processo, as células foram incubadas com meio na ausência (células controle) ou presença da bhalternina (100 µg/mL). A avaliação da migração foi realizada após 24 h e a confluência das células foi analisada em um microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100) com fotografias tiradas em 0 e 24 h.

3.2.3 Ensaio de Adesão Celular

O efeito de bhalternina na adesão de células PC3 foi medido como descrito por Guimarães *et al.* (2017). As células (2×10^4 células/poço) foram incubadas com a bhalternina (100 µg/mL) ou com apenas meio (controle) por 30 min a 37°C. Após a incubação, as células foram adicionadas a uma placa de 96 poços. Após 2 h, as células destacadas foram removidas por duas lavagens com PBS. As células aderentes foram quantificadas pelo ensaio MTT como descrito anteriormente

3.3 Ensaio de Agregação Plaquetária

O sangue humano foi obtido de voluntários que atendiam os critérios de possuir idade entre 18 e 65 anos, peso superior a 50 kg, não apresentar distúrbios hemostáticos e não ter ingerido álcool ou medicamentos que interferem na hemostasia até 48 horas antes da coleta. Os experimentos foram realizados de acordo com as atuais diretrizes de pesquisa com seres humanos, estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal

de Uberlândia (CEP/UFU), Minas Gerais, Brasil (Protocolo número 1.627.982/2016).

A coleta de sangue foi realizada em tubo contendo citrato de sódio a 3,8%. Em seguida o sangue foi centrifugado a 100 x g por 12 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Após a retirada do sobrenadante o sangue foi submetido a nova centrifugação a 1000 x g por 15 minutos e foi obtido o plasma pobre em plaquetas (PPP).

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados utilizando um agregômetro turbidimétrico de quatro canais, AggRAM™ version 1.1 (Helena Laboratories, USA), como descrito por Queiroz *et al.*, 2014. Esse teste é avaliado através da mudança da absorbância no PRP sob agitação constante utilizando indutores da agregação plaquetária (agonistas).

Para os testes com a bhalternina, a proteína foi desnaturada por meio de aquecimento a 100°C por 10 minutos. Após o aquecimento, 25 µg de bhaltenina foi incubada com 200 µl de PRP por 20 minutos a 37°C. Posteriormente foi adicionado o agonista (ADP (20 µM), epinefrina (300 µM) ou colágeno (10 µg/mL)). Os testes com o peptídeo sintético foram feitos com diferentes doses (50, 30 e 20 µg) e tempos de incubação com PRP (0 e 20 min) e com o agonista ADP (20 µM). Os controles foram feitos utilizando apenas PRP e agonista.

3.4. Bioinformática

3.4.1 Interação entre bhalternina e receptores P2Y₁ e P2Y₁₂

Para avaliar a possível interação entre a bhalternina e os receptores de ADP P2Y₁ e P2Y₁₂, primeiramente, as suas estruturas foram modeladas e validadas pelo programa Phyre2 (Structural Bioinformatics Group, 2015, disponível em: <<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>>). Em seguida, foi realizado o docking proteico, pelo software PatchDock (versão 1.3, 2018, disponível em: <<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/index.html>>).

Para validar o docking, foi utilizado o programa PDB Sum/Procheck (EMBL-EBI, 2018, disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/thornton>

srv/software/PROCHECK/), onde foi gerado o gráfico Ramachandran e o também o fator G. Ainda para validar o docking, foi realizado o cálculo do RMSD pelo programa Swiss PDBview (Swiss Institute of Bioinformatics, disponível em <<https://spdbv.vital-it.ch/>>). Ademais, foi realizado o cálculo do fator B, o qual determina o gasto energético da interação entre as moléculas, pelo programa ResQ (Zhanglab, disponível em: <<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ResQ/>>).

3.4.2 Interação dos peptídeos com o receptor P2Y₁₂

Após a seleção do receptor que melhor interage com a bhalternina, as regiões interagentes foram utilizadas para determinar os peptídeos. Para verificar o peptídeo que possuía melhor afinidade com o receptor, foi realizado uma predição de afinidade dos peptídeos através do software DSX (v0.88, Gerd Neudert, Hans Velec, Peter Block, Gerhard Klebe 2002-2011, disponível em: <http://pc1664.pharmazie.uni-marburg.de/drugscore/ds_joblist.php>) e pelo programa Bind Prof X (Zhang Lab, 2017, disponível em: <<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/BindProfX/>>). Feito isso, a estrutura do peptídeo foi feita no programa PEPITOPE (Bioinformatics Unit, disponível em <<http://pepitope.tau.ac.il/>>). Em seguida foi realizado o docking do peptídeo selecionado com o receptor, como descrito anteriormente. A comparação entre as interações do peptídeo e proteína com o receptor foi feita no programa Discovery Studio (Software package (BIOVIA Inc)).

3.4 Síntese do Peptídeo

O peptídeo foi sintetizado através da síntese química em fase sólida. A síntese foi realizada utilizando um sintetizador manual via micro-ondas (CEM Discover). Foi utilizado a resina NovaSyn TGR e a estratégia de proteção da região N-terminal e das cadeias laterais reativas dos aminoácidos foi a Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil).

Inicialmente, 0,5 g de resina foi ressuspensa em DMF (*N,N*-Dimetilformamida) e deixada em repouso por 15 minutos para que seus ligantes

fossem expostos, no processo denominado solvatação. Em seguida, foi feita a desproteção dos ligantes da resina no sintetizador com uma solução de piperidina 20% em DMF. Após a verificação da desproteção, o primeiro aminoácido, com a região N-terminal protegida, foi ativado e adicionado à matriz. O agente acoplador utilizado foi HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio) e a solução ativadora foi composta de DMF e DIEA (*N,N*-Diisopropylethylamina). Em seguida foi feita a desproteção dos ligantes do aminoácido e esse ciclo foi repetido até o acoplamento do último aminoácido, intercalados por lavagens de DCM (Diclorometano) e DMF para remoção do excesso de reagentes. Os ciclos de desproteção e acoplamento tiveram sua eficiência verificada através do método de ninhidrina (teste de Kaiser), o qual detecta a presença de aminas livres. No final da síntese, a cadeia polipeptídica e os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos foram clivados da matriz com uma solução contendo 82,5% de TFA (ácido trifluoracético), 5% de thianisole, 5% de água ultrapura, 5% de fenol e 2,5% de EDT (etano-1,2-ditiol). Em seguida o peptídeo foi extraído da resina por sucção com auxílio de uma bomba de vácuo e para que houvesse limpeza dos reagentes de clivagem o peptídeo foi precipitado por meio 4 repetições de centrifugação com éter etílico a 3000 rpm por 8 minutos. Após a precipitação o peptídeo foi resuspendido em água ultrapura e liofilizado.

3.5 Purificação do Peptídeo

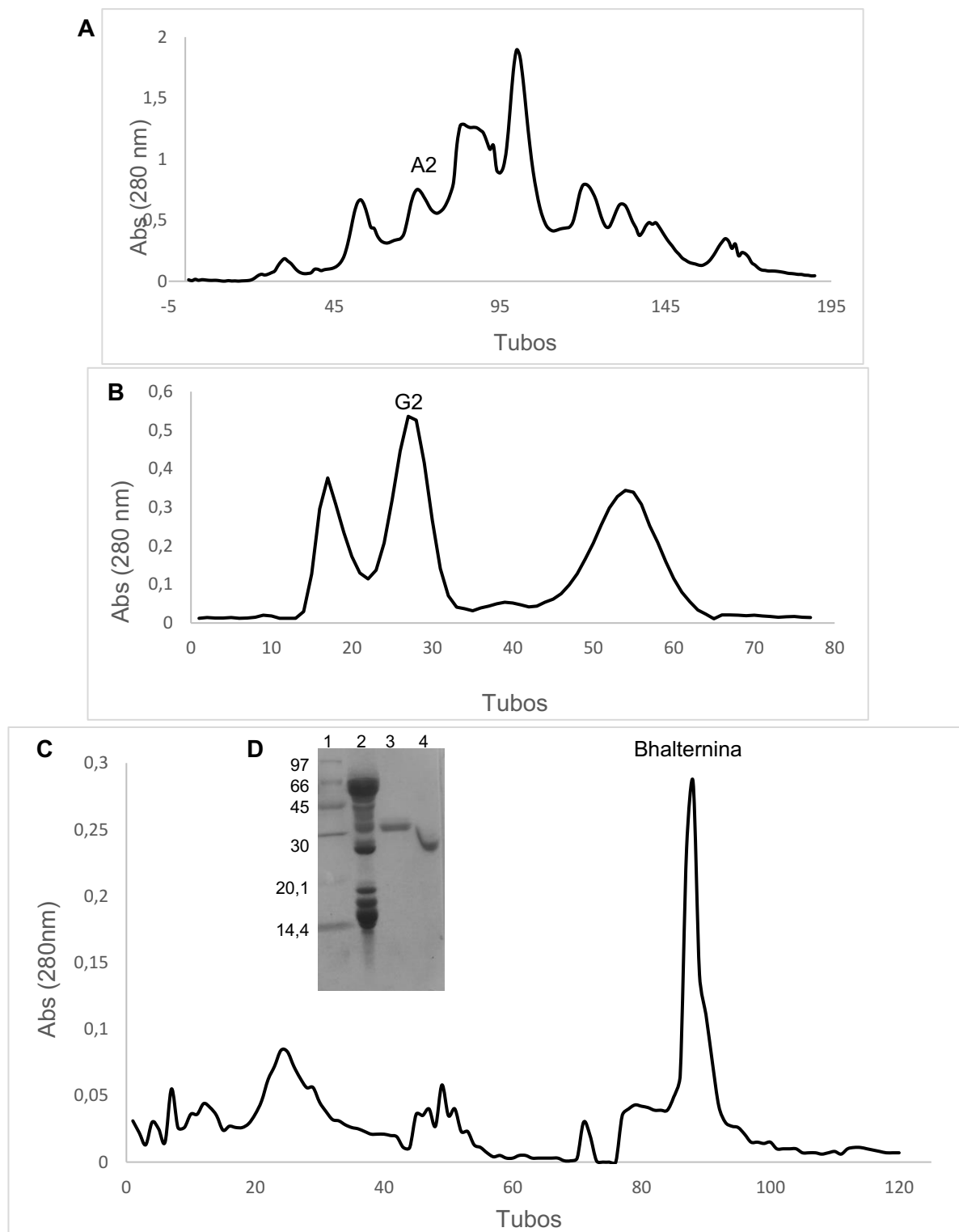
O peptídeo sintético foi solubilizado em H₂O e submetido à purificação em coluna de fase reversa Source 15 RPC ST (4.6x100 mm) utilizando sistema de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). O peptídeo sintético bruto foi aplicado à coluna previamente equilibrada com 0,065% de TFA (tampão A) e eluída com gradiente de concentração de 0 a 100% de 70% acetonitrila em 0,1% de TFA (tampão B), em um de fluxo de 1,0 mL/min. A fração principal representa o peptídeo, o qual foi quantificado pelo equipamento BioDrop (Analítica).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, inicialmente foram avaliadas algumas atividades funcionais, como atividade sobre células tumorais e sobre a agregação plaquetária, da balthernina, uma serinoprotease da peçonha de *Bothrops alternatus* previamente isolada por Costa *et al.*, 2010. A sequência responsável pela atividade na agregação plaquetária foi então sintetizada, e se encontra em processo de patenteamento. Em decorrência disso, de acordo com as instruções normativas da Diretoria de Inovação e Transferência de Tecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, a sequência peptídica não será apresentada, porém não implicará em prejuízo de entendimento por parte do leitor.

A purificação da proteína ocorreu de acordo com Costa *et al.*, 2010, porém com algumas modificações. Foram utilizados três passos: cromatografia de troca iônica em resina aniônica DEAE-Sephacel, cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-75 e cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose, na qual o pico principal representa a balthernina. O resultado do SDS-PAGE mostrou uma massa molecular de cerca de 31 e 27 kDa sob condições redutoras e não redutoras, respectivamente (Figura 6).

Figura 6 - Purificação da bhalternina a partir da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*. (A) Cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephacel da peçonha bruta. (B) Cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-75 da fração A2. (C) Cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl Sepharose da fração G2. (E) SDS-PAGE a 14%: linha 1 - padrão de peso molecular, linha 2 – peçonha bruta de *Bothrops alternatus*, linha 3 – bhalternina em condição desnaturante, linha 4 – bhalternina em condição não desnaturante.



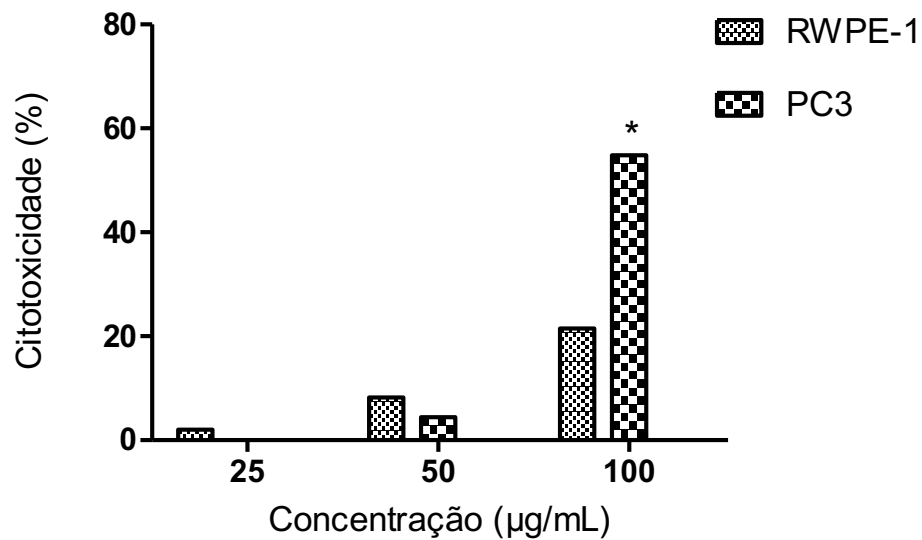
As peçonhas de serpente são fontes de compostos biologicamente ativos, representados em sua maioria por proteínas e peptídeos. Essas moléculas são responsáveis pela maioria dos efeitos tóxicos do envenenamento, porém devido à avanços tecnológicos, é possível transformá-las em ferramentas terapêuticas (WAHEED; MOIN; CHOUDHARY, 2017). Essas toxinas têm potencial para exercerem atividades antitumorais, antimicrobianas, anticoagulantes e analgésicas e muitas delas já são utilizadas como base para produção de medicamentos na indústria farmacêutica moderna (LI; HUANG; LIN, 2018)

Várias proteínas isoladas e caracterizadas a partir de peçonhas de serpentes possuem como alvo vias moleculares específicas de células tumorais, sendo em geral potencialmente mais tóxicas nestas células do que em células normais (CALDERON *et al.*, 2014). Desintegrinas, metaloproteases, LAAOs e PLA₂s são as classes de proteínas mais bem estudadas quanto aos seus efeitos antitumorais. Os mecanismos de ação dessas proteínas são amplos, compreendendo alteração da viabilidade celular, prevenção de proliferação celular, inibição da adesão e migração das células, indução de apoptose, atividade antiangiogênica, dentre outros (CHWETZOFF *et al.*, 1989; GABRIEL *et al.*, 2012; GEBRIM, *et al.*, 2009; SCHMITMEIER *et al.*, 2005; ZHANG; WU, 2008).

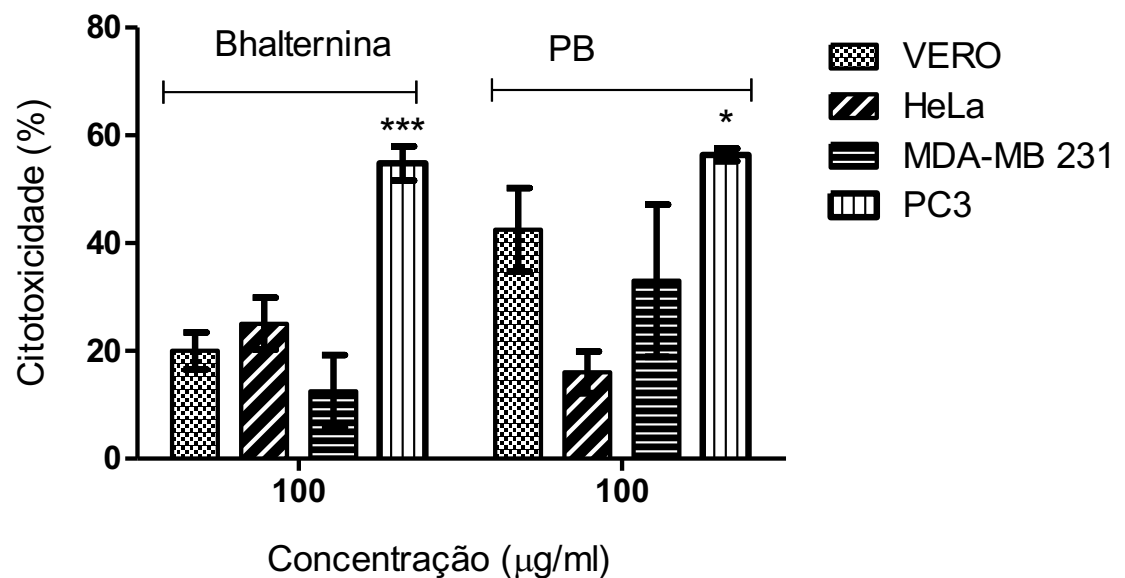
Com a finalidade de avaliar o efeito da bhalternina em células tumorais, foi realizado o ensaio de MTT. Testes realizados com linhagem de próstata, mostraram que a bhalternina apresenta citotoxicidade significativa nas células PC3 (linhagem tumoral), com aproximadamente 60% de citotoxicidade a 100 µg/mL após 24h do tratamento, e apresenta menor efeito nas células RWPE-1 (células prostáticas normais) (Figura 7A). Quando submetida a testes com outras linhagens tumorais, a proteína não apresentou efeito citotóxico sobre MDA-MB-231 e HeLa, mostrando certa especificidade para as células tumorais da próstata. A bhalternina também não mostrou efeito citotóxico na linhagem normal VERO (Figura 7B).

Figura 7 - Análise da citotoxicidade da bhalternina em diferentes linhagens celulares pelo método de MTT. **A** - Citotoxicidade da bhalternina nas células prostáticas PC3 e RWPE-1. **B** - Comparação da citotoxicidade da bhalternina e da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* (PB) nas células PC3, VERO, HeLa e MDA-MB-231. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. (*) se refere a $p < 0,05$ e (***) a $p < 0,001$.

A



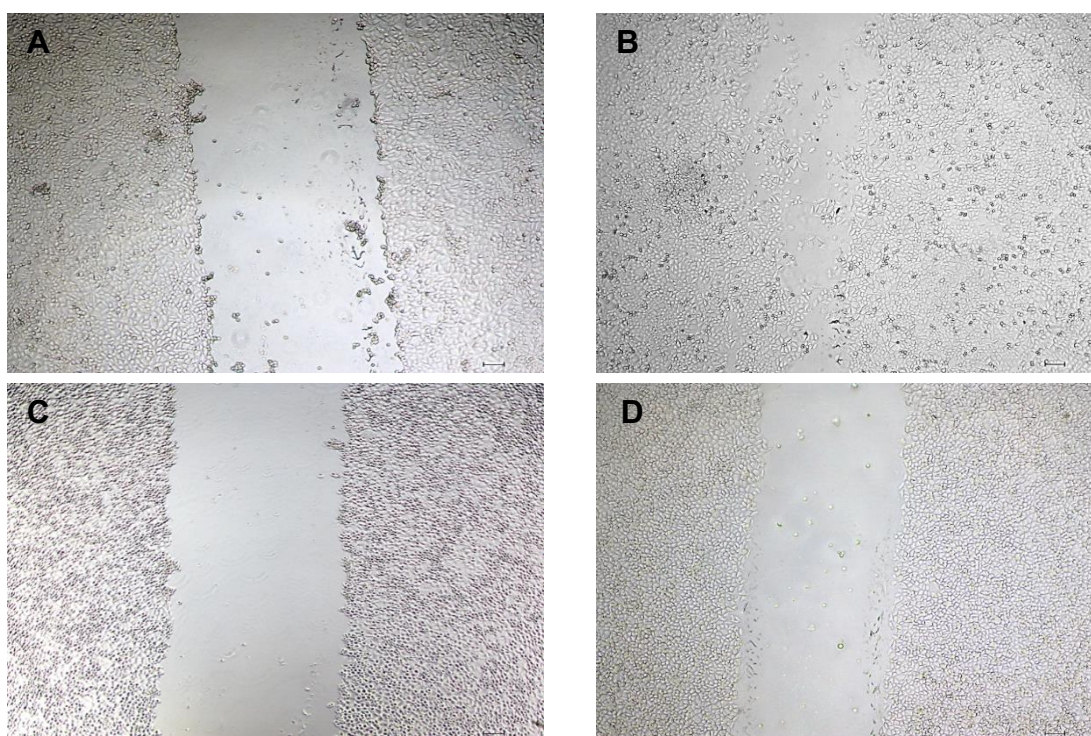
B



O potencial antitumoral das serinoproteases de peçonha de serpente ainda não foi bem explorado, sendo conhecidas poucas proteínas desta classe que atuam sobre células tumorais. A crotalase, purificada da peçonha de *Crotalus adamanteus* é uma serinoprotease capaz de inibir o crescimento de células de melanoma da linhagem B16 (MARKLAND Jr, 1986); e a batroxobina, uma “trombina-like” de *Bothrops moojeni* foi capaz de inibir metástase pulmonar através do seu efeito de desfibrinogênização em conjunto com atividade de células NK (SHIBUYA *et al.*, 1990).

A metástase é uma propriedade de células cancerígenas malignas, na qual as células migram de seu local de origem, invadem o tecido adjacente, se aderem e iniciam a formação de uma nova colônia de células, em processos de proliferação, migração e adesão celular (GUPTA; MASSAGUE, 2006). A interferência da bhalternina na adesão e migração de células PC3 foi investigada, e os resultados mostraram que a bhalternina não inibiu a adesão de células PC3 (dados não mostrados), mas inibiu a migração celular quando comparada com o controle não tratado ao longo de 24 h (Figura 8).

Figura 8 - Efeito da bhalternina na migração celular de PC3. (A e C) Células PC3 na ausência ou na presença de bhalternina, respectivamente, logo após uma linha ser riscada através da monocamada celular (0h). (B e D) Células PC3 na ausência ou presença de bhalternina, respectivamente, após 24 h, para avaliar as capacidades de migração celular.



Os mecanismos de adesão e migração celular geralmente envolvem integrinas expressas na superfície celular (ALBELDA, 1993; FERRAZ; FERNANDEZ, 2012). Proteínas de peçonha de serpente que inibem a migração interagem com essas integrinas, e pertencem às classes desintegrinas e metaloproteases, como a bothropoidina, isolada da peçonha *Bothrops alternatus* (GUIMARÃES *et al.*, 2017; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). No entanto, outros receptores de membrana podem estar envolvidos no processo de migração de células tumorais, como os receptores VEGFR⁹, PDGFR- α e PDGFR- β ¹⁰ e P2Y₁₂, dentre outros (HAYNES *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2012). Diante dos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que há interação entre a bhalternina e receptores da superfície das células PC3, causando a diminuição da viabilidade celular e a inibição da migração celular. Alguns estudos mostram que receptores purinérgicos P₂ participam de vias responsáveis pelo crescimento de tumores. Sarangi *et al.*, 2013 verificaram que um antagonista do receptor P₂Y₁₂ é capaz de inibir o crescimento tumoral. Eles mostraram que o efeito do agente quimioterápico cisplatina é aumentado quando administrado juntamente com um inibidor do receptor P₂Y₁₂ em tumores de linhagens de carcinoma mamário murino (4T1), tornando tal receptor um potencial alvo para aumentar a eficácia de medicamentos antineoplásicos.

Apesar das toxinas ofídicas possuírem diversos efeitos terapêuticos, sua principal atuação é na hemostasia, com diversas classes de proteínas capazes de atuar sobre a função plaquetária. Tal fato afirma a importância do estudo destas toxinas, já que o desenvolvimento de doenças relacionadas com distúrbios vasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral são umas das principais causas de morte no mundo ocidental (QUEIROZ *et al.*, 2017).

As SVSPs têm uma heterogeneidade funcional relacionada à hemostasia. Elas podem afetar a coagulação, a pressão arterial, interferir nos níveis de fibrinogênio e na agregação plaquetária (CASTRO; RODRIGUES, 2006; MENALDO *et al.*, 2012; MENALDO *et al.*, 2013). Devido a essa ampla gama de funções, essas toxinas tem grande potencial biotecnológico para o

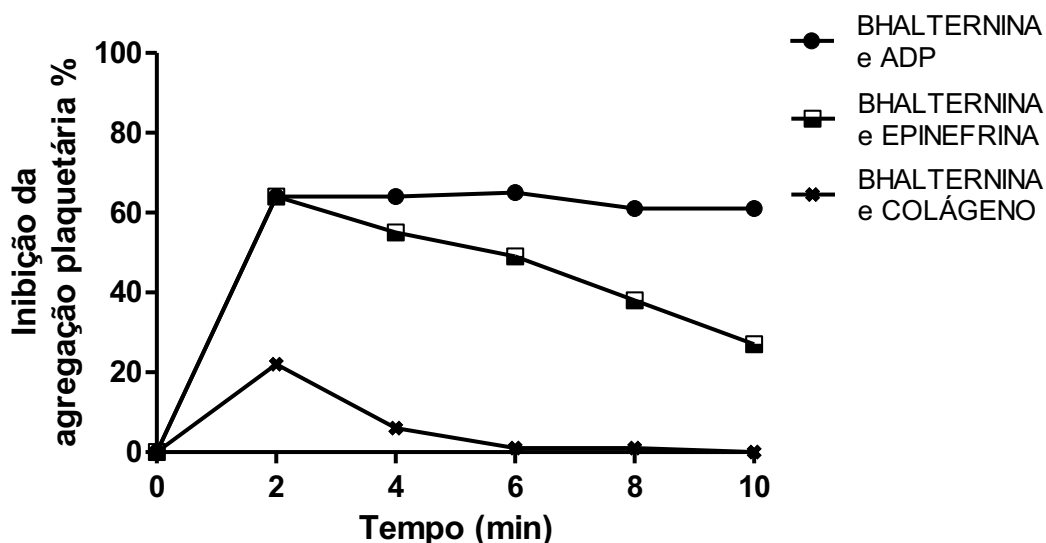
⁹ VEGFR: Receptor de fator do crescimento do endotélio vascular.

¹⁰ PDGFR: Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

desenvolvimento de medicamentos para distúrbios na coagulação sanguínea. Já são comercializados alguns fármacos derivados de SVSPs, como o Reptilase®, utilizado para prevenção e tratamento de hemorragia, que tem como principais compostos a Haemocoagulase, uma “trombina-like”, e uma proteína semelhante à tromboplastina, ambas isolada da peçonha de *Bothrops atrox*. O Defibrase®, derivado da Batroxobin, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, é utilizado para tratamento de infarto cerebral agudo, isquemia causada por doenças vasculares oclusivas (PENTAPHARM, 2019).

O efeito da bhalternina na função plaquetária foi avaliado. Os resultados mostraram que a proteína é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP. Após um processo de aquecimento para sofrer desnaturação, 25 µg da bhalternina inibiram aproximadamente 60% da agregação plaquetária induzida por ADP, quando pré-incubada com PRP por 20 min. 25 µg de bhalternina também inibiram a agregação plaquetária induzida pela epinefrina, porém em menor proporção, com aproximadamente 30% de inibição. A proteína mostrou pouco ou nenhum efeito na agregação plaquetária induzida pelo colágeno (Figura 9).

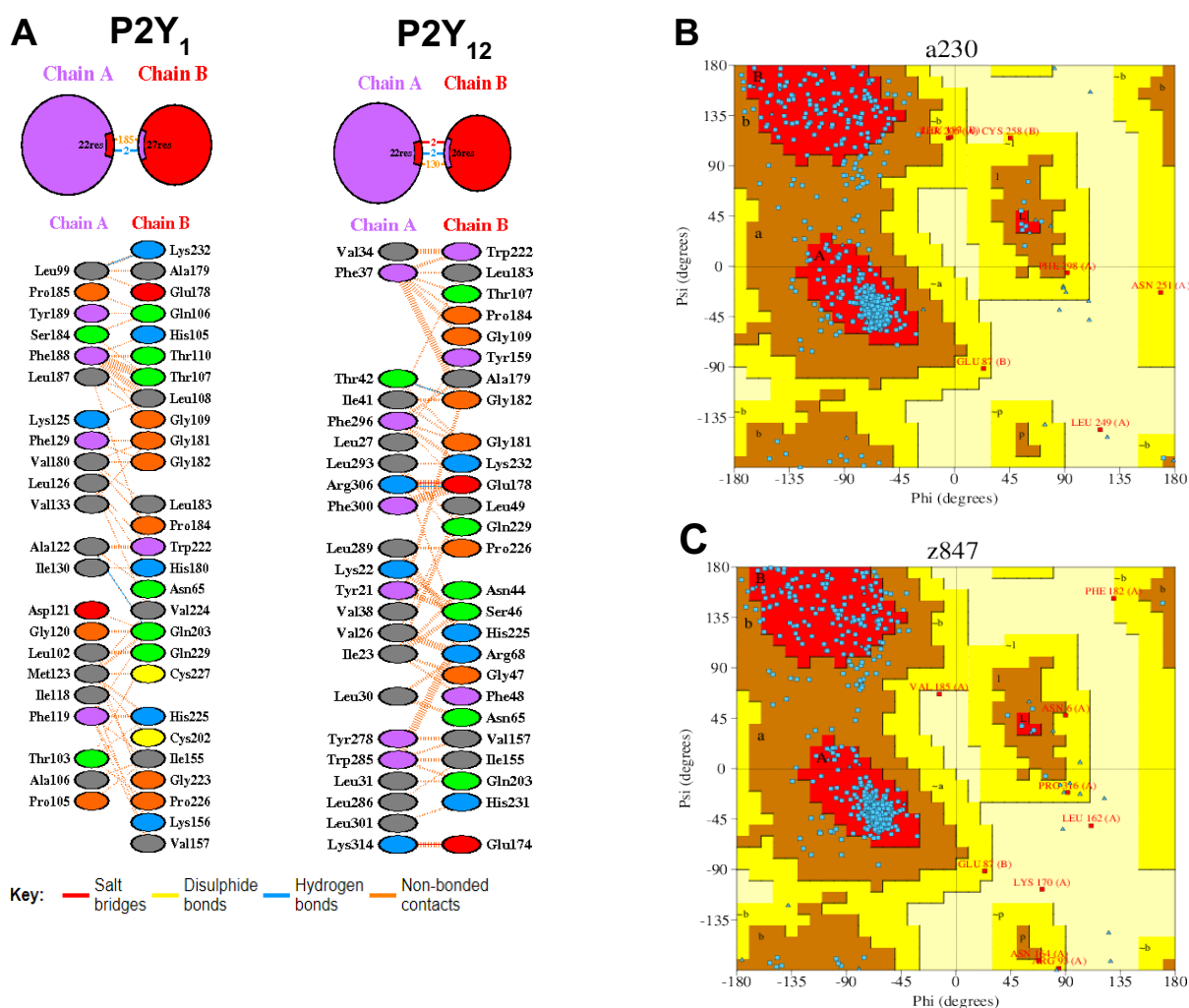
Figura 9 - Efeito da bhalternina na agregação plaquetária. 25 µg de bhalternina desnaturada foram incubados com plasma por 20 minutos e em seguida foi adicionado o agonista (ADP, epinefrina ou colágeno). Os resultados da inibição da agregação plaquetária foram expressos em porcentagem relativa à diminuição da agregação plaquetária comparada ao controle (apenas agonista) que representa 100% de agregação.



O efeito das SVSPs nas plaquetas geralmente está associado à ativação da agregação plaquetária de uma maneira semelhante à trombina, através da clivagem dos receptores PAR-1 e PAR-4 ou por ligação à GPIb α (MENALDO *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2000). Como a bhalternina é uma “trombina-like” e promove a coagulação do plasma, ela passou por um processo aquecimento a 100° C para desnaturação e consequente perda de sua atividade proteolítica, para então ser incubada com o plasma e sua atividade na função plaquetária ser avaliada. O tempo de incubação com o plasma também foi determinante para essa atividade, já que quando não incubada com o plasma, a bhalternina não apresentou efeito sobre as plaquetas. Infere-se então que a atividade desta proteína na agregação não é enzimática, mas sim está relacionada com a interação de alguma região desta com receptores da superfície plaquetária, possivelmente com os receptores de ADP, já que a agregação induzida por esse agonista foi altamente inibida.

Para investigar a possível interação da bhalternina com os receptores de ADP, P2Y₁ e P2Y₁₂, foram realizados testes de bioinformática. A avaliação foi realizada a partir de sua composição de aminoácidos, previamente descrita por Costa *et al.*, 2010. Inicialmente a modelagem estrutural da proteína e dos receptores foi realizada e validada pelo programa Phyre2 (KELLEY *et al.*, 2015). Então a partir de sua estrutura foi possível realizar o docking proteico, por meio do programa PatchDock, o qual forneceu os sítios de interação entre a bhalternina e os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂, bem como os tipos de interação entre os aminoácidos (Figura 10A). A validação do docking foi feito pelo programa PDB Sum/Procheck, o qual gerou o gráfico de Ramachandran, que demonstra os ângulos de torção dos resíduos de aminoácidos onde se observa o quão favoráveis são as interações (Figura 10 B), bem como o fator G, que é um parâmetro de validação. Outro modo de validar o docking foi através do cálculo do RMSD, pelo programa Swiss PDBview, e do fator B, o qual determina o gasto energético da interação entre as moléculas, pelo programa ResQ. Os resultados mostraram que o complexo formado entre a bhalternina e o receptor P2Y₁₂ apresenta o melhor resultado de G-score (-0.20) e multiplicação de aveg(fatorB) e no(fator V) (-1,5491), o que sugere interações verdadeiras, com menor gasto energético (LIU, LI, LI, 2014).

Figura 10 – Docking proteico entre a bhalternina e os receptores P2Y₁ e P2Y₁₂. (A) Interação entre os aminoácidos da bhalternina (cadeia B) com os aminoácidos dos receptores P2Y₁ e P2Y₁₂ (cadeia A). (B) Gráfico de Ramachandran da interação entra a proteína e P2Y₁. (C) Gráfico de Ramachandran da interação entra a proteína e P2Y₁₂. Este gráfico mostra a relação entre os ângulos de interação psi e phi representando – os por áreas de regiões onde as interações ocorrem preferencialmente (vermelho), são permitidas de ocorrer (marrom escuro), as que raramente podem acontecer (amarelo) e por fim as desfavoráveis de ocorrer (bege claro). (D) Resumo dos resultados obtidos pela validação do docking.



D

Receptor	rmsd	G-score	aveg(nbfactor)	no(nbfactor)	aveg(nbfactor)*no(nbfactor)
P2Y ₁	1,088333	-0,21	22,11	19,9	4,3
P2Y ₁₂	1,116333	-0,20	-9,24	16,76	-1,5491

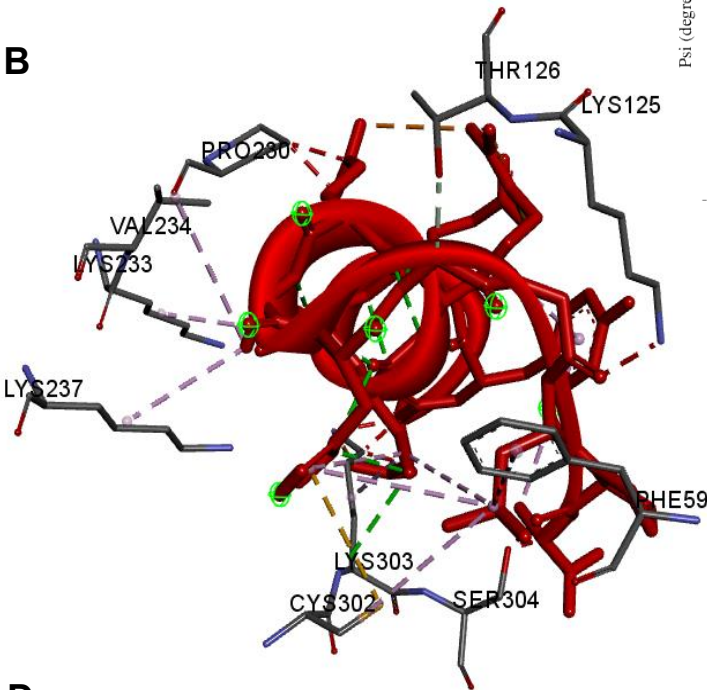
Após definir o P2Y₁₂ como o receptor que melhor interage com a bhalternina, as regiões interagentes fornecidas pelo programa PatchDock foram utilizadas para determinar os peptídeos que interagiriam com o receptor selecionado. Foram então definidos seis prováveis peptídeos, e a predição de afinidade realizada pelo pelos programas DSX e BindProfX, identificou que o peptídeo (Pep4) apresenta alta capacidade de interação com o receptor (Figura 11A). Tal conclusão se deu pelo fato do Pep4 ter mostrado baixo valor de DSX (-36) o que é representativo de menor custo energético, o que favorece a interação. Além disso, análises no programa BindProfX, o qual avalia as alterações de energia livre nas ligações entre proteínas induzidas por mutações, indicou que mutações de aminoácidos na sequência do Pep4 propicia alterações significativas na ligação ao receptor. Em seguida, a estrutura do peptídeo foi montada através do programa PEPITOPE e foi realizado o docking entre o peptídeo e o receptor. A validação da interação entre o Pep4 e o receptor P2Y₁₂ confirma a interação, através do gráfico Ramachandran, do valor do G-score (0,09) e multiplicação de aveg(fatorB) e no(fator B) (-0,1007809) (Figura 11 C e D).

Figura 11 – Docking entre os peptídeos e o receptor P2Y₁₂. (A) Afinidade de interação dos peptídeos devidados da interação da bhalternina com P2Y₁₂. (B) Interação dos resíduos de aminoácidos do pep4 (vermelho) com os resíduos do receptor P2Y₁₂ (cinza). (C) Gráfico de Ramachandran da interação entre o Pep 4 e P2Y₁₂, mostrando a relação entre os ângulos de interação psi e phi representando – os por áreas de regiões onde as interações ocorrem preferencialmente (vermelho), são permitidas de ocorrer (marrom escuro), as que raramente podem acontecer (amarelo) e por fim as desfavoráveis de ocorrer (bege claro). (D) Resumo dos resultados obtidos pela validação do docking entre o peptídeo e o receptor P2Y₁₂.

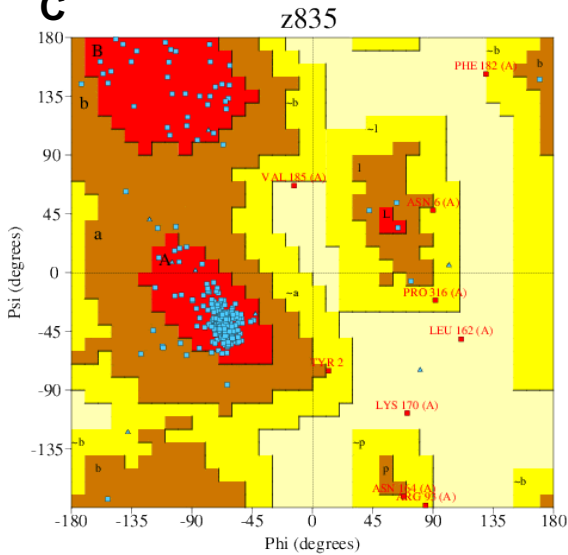
A

Peptídeo	BIND profx	DSX
Pep 1	0	0
Pep 2	0	-25
Pep 3	6,335	-20
Pep 4	16,877	-36
Pep 5	0,779	-22
Pep 6	7,389	-23

B



C

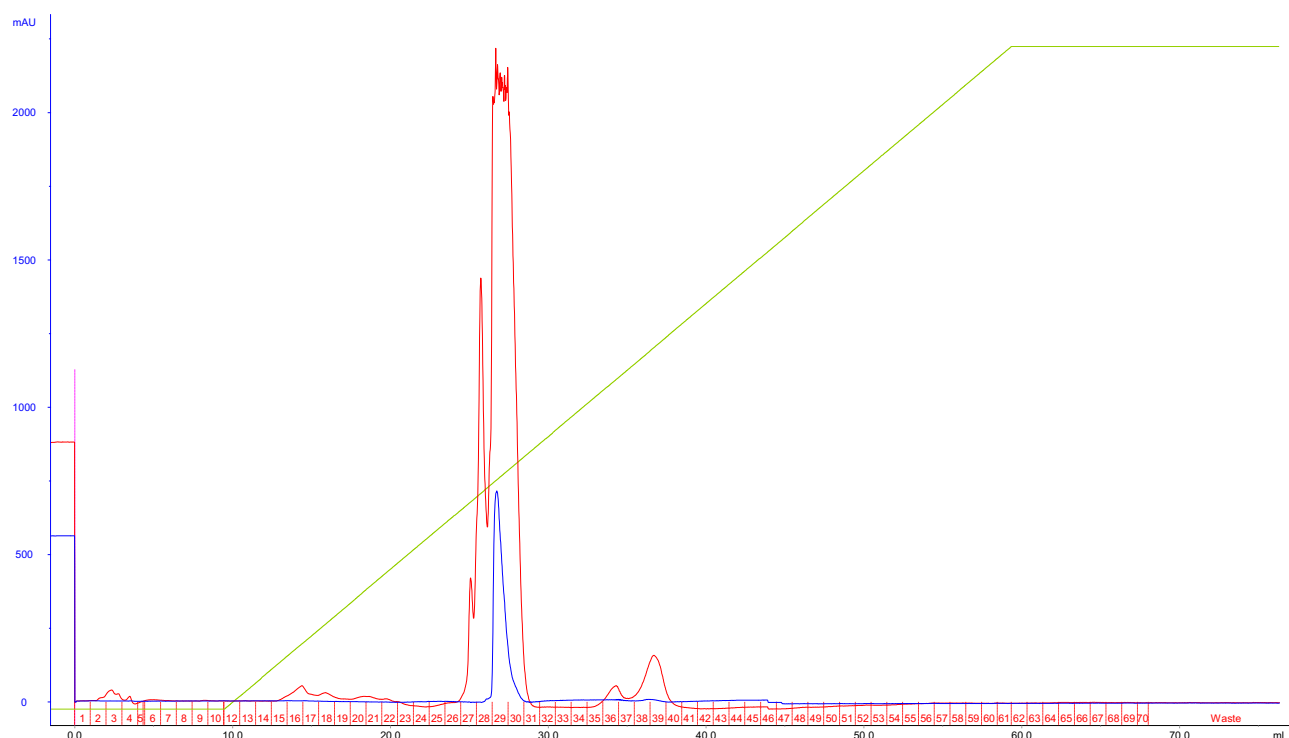


D

Peptídeo	rmsd	G-score	aveg(nbfactor)	no(nbfactor)	aveg(nbfactor)*no(nbfactor)
Pep 4	1,63	0,09	-1,744008163	5,77916431	-0,1007809

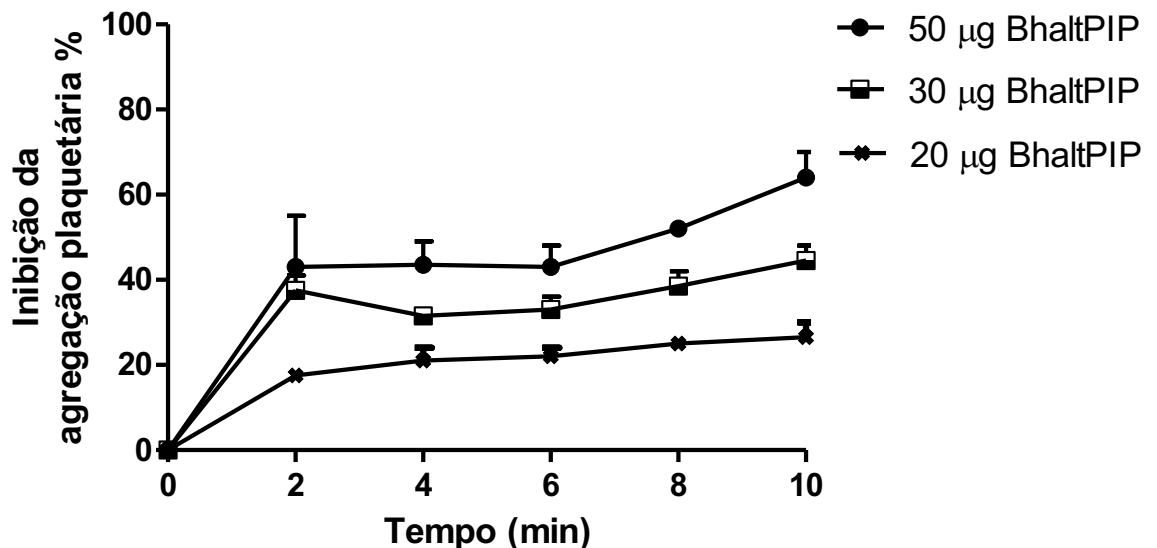
Tendo em vista a interação do Pep 4 com o receptor plaquetário, o mesmo foi nomeado de BhaltPIP (Peptídeo Inibidor de Plaquetas derivado da Bhalternina), e foi sintetizado através da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Dentre as técnicas de síntese de peptídeos, a síntese química tem destaque devido ao uso de aminoácidos artificiais e pseudo ligações peptídicas que permitem a produção em larga escala de pequenos e médios peptídeos, e o principal método que permite essa produção é a SPFS (MERRIFIELD, 1963; VLIEGHE *et al.*, 2010). Essa metodologia consiste no alongamento de uma cadeia peptídica ancorada a uma matriz sólida por adições sucessivas de aminoácidos que são ligados por ligações peptídicas entre o grupo carboxila do aminoácido receptor e o grupo amino do aminoácido previamente ligado à matriz (NILSSON; SOELLNER; RAINES, 2005). Após a síntese, o peptídeo passou por um processo de purificação em cromatografia de fase reversa (Figura 12).

Figura 12 - Purificação do peptídeo sintético em cromatografia de fase reversa na coluna Source 15 RPC ST previamente equilibrada com 0,065% de TFA e eluída com gradiente de concentração de 0-100% de 70% acetonitrila em 0.1% TFA. Leitura a 214 (vermelho) e 280 (azul) nanômetros.



Após o processo de purificação, a fração principal da fase reversa, correspondente ao BhaltPIP, foi submetido ao teste de inibição da agregação plaquetária. Os resultados obtidos mostraram que o BhaltPIP sintético foi capaz de inibir a agregação plaquetária de maneira dose dependente. Após 20 minutos de incubação, 50 μ g do BhaltPIP inibiram aproximadamente 60% da agregação plaquetária induzida por ADP, enquanto que 30 μ g inibiram aproximadamente 40% e 20 μ g inibiram apenas aproximadamente 20% da agregação (Figura 13).

Figura 13 - Efeito do BhaltPIP na agregação plaquetária. O BhaltPIP foi incubado com com plasma por 20 minutos e em seguida foi adicionado o ADP. Os resultados da inibição da agregação plaquetária foram expressos em porcentagem relativa à diminuição da agregação plaquetária comparada ao controle (apenas agonista) que representa 100% de agregação.



As plaquetas exercem papel central na hemostasia primária garantindo a integridade da parede do vaso sanguíneo. Após a ruptura do vaso, inicia-se uma série de mecanismos que tem como finalidade conter o sangramento, e vários agonistas participam do processo (MOSBAH *et al.*, 2019).

O ADP, armazenado e secretado nos grânulos densos, atua como promotor e amplificador da ativação plaquetária via dois receptores plaquetários, P2Y₁ e P2Y₁₂, e a ativação concomitante de ambos é essencial para uma agregação plaquetária normal (CATTANEO, 2005; CATTANEO, 2019; JIN; KUNAPULI, 1998). A ligação do ADP ao P2Y₁ induz aumento dos níveis de Ca²⁺ citosólico, alteração conformacional nas plaquetas, e rápida ativação da integrina α IIb β 3, promovendo a agregação plaquetária, porém os mecanismos de sinalização intracelular gerada por este receptor fazem com que a agregação seja transitória (STEFANINI; RODEN; BERGMEIER, 2009).

O P2Y₁₂ é um receptor transmembrana de sete segmentos acoplado à proteína Gi. A ligação do ADP inicia vários processos de sinalização intracelular que incluem inibição da enzima adenilato ciclase, ampliando a mobilização de Ca²⁺ e a ativação das plaquetas (HARDY *et al.*, 2004; VAN DER MEIJDEN *et al.*, 2005), e da 3-quinase fosfoinositol (PI 3-K), que ativa a integrina α IIb β 3 e sustenta a agregação plaquetária (DANGELMAIER *et al.*, 2001; DANIEL *et al.*, 1999; GRATACAP *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2002). A ligação do ADP a este receptor também amplifica a secreção do conteúdo dos grânulos densos e potencializa a agregação estimulada por outros agonistas (CATTANEO, 2019). Mesmo sendo necessária a ativação dos dois receptores, estudos em plaquetas com P2Y₁ bloqueados ou ausentes, mostram que altas concentrações de ADP podem ativar e promover lenta e estável agregação plaquetária, sem que haja prévia mudança na conformação das plaquetas (FABRE *et al.*, 1999; JARVIS *et al.*, 2000; KAUFFENSTEIN *et al.*, 2001). O P2Y₁₂ também tem papel crucial na estabilização da agregação induzida por outros agonistas, como TxA₂ e trombina, que também é mediada pela PI 3-K (CATTANEO, 2019; ECKLY *et al.*, 2001).

Através dos resultados deste trabalho, sugere-se que o BhaltPIP atua como antagonista do receptor P2Y₁₂, fazendo com que a ativação plaquetária iniciada pela ligação do ADP ao P2Y₁ não seja capaz de se sustentar havendo assim, a inibição da agregação plaquetária.

Foi realizada uma comparação entre as interações da bhalternina e do BhaltPIP com o receptor P2Y₁₂, através do programa Discovery Studio (Figura 14). Os resultados mostraram que não houveram mudanças quanto ao padrão de ligações de hidrogênio das moléculas testadas ao receptor (Figura 14A), porém houveram alterações quanto às interações hidrofóbicas. A interação do receptor com o BhaltPIP é menos hidrofóbica do que com a bhalternina (Figura 14B). As interações hidrofóbicas ocorrem em função da interação entre cadeias ou subunidades apolares das moléculas envolvidas. Elas são individualmente fracas, porém são firmes o suficiente para bloquear a ligação do agonista ao receptor (BARREIRO; FRAGA, 2015; GODFROID; BRAQUET, 1986). Devido ao fato da bhalternina apresentar em sua composição maior quantidade de aminoácidos aromáticos e apolares, o reconhecimento dela por parte do receptor e as ligações estabelecidas podem estar sendo favorecidas quando comparados ao reconhecimento do BhaltPIP. Como o peptídeo apresenta menor quantidade de aminoácidos aromáticos, há uma diminuição das interações hidrofóbicas, razão pela qual foi necessário um aumento na concentração de peptídeo para produzir o mesmo efeito da proteína nas plaquetas.

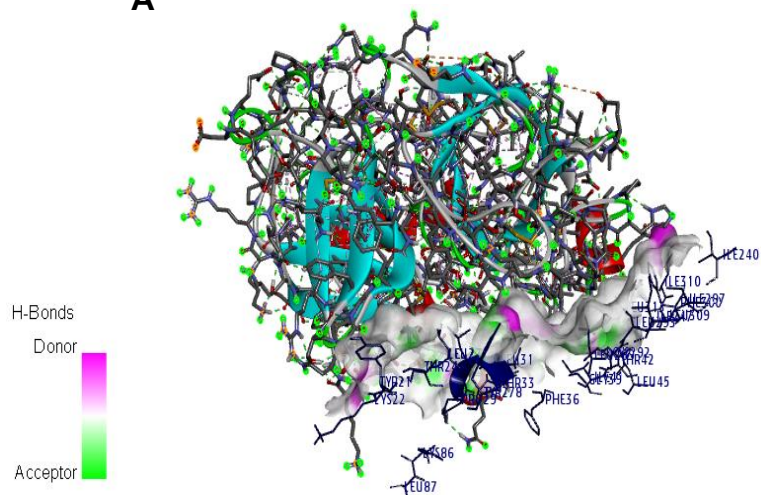
A hidrofobicidade da interação também está relacionada à estabilidade da ligação entre moléculas, uma vez que a menor hidrofobicidade resulta em uma menor barreira cinética entre a formação e o desacoplamento da ligação (SCHMIDTKE *et al*, 2011). O fato da ligação do BhaltPIP ao P2Y₁₂ ser menos hidrofóbica sugere que tal interação seja menos estável do que a ligação da bhalternina ao receptor. Condição esta que pode ser favorável à aplicação farmacológica do BhaltPIP, visto que a menor estabilidade da interação do peptídeo com o receptor faz com que a ação do peptídeo nas plaquetas seja reversível e de curto prazo, oferecendo menor risco de eventos hemorrágicos decorrentes de uma inibição da agregação plaquetária irreversível e duradoura.

quanto à hidrofobicidade e ponte de hidrogênio.

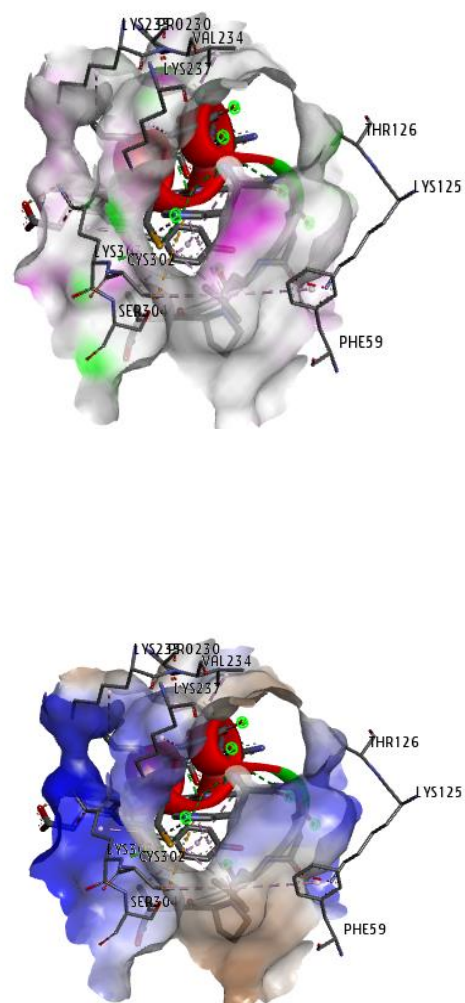
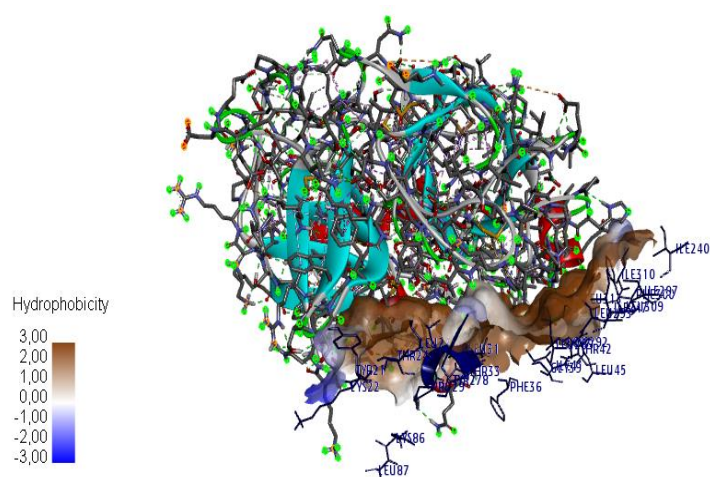
Interações P2Y₁₂ e Bhalternina

Interações P2Y₁₂ e BhaltPIP

A



B



Desequilíbrios nos mecanismos da agregação plaquetária provocam oclusão vascular que culminam no desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares. Complicações dessa patologia, como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar, e trombose venosa profunda, são a principal causa de mortalidade na atualidade (BENJAMIN *et al.*, 2019; MOSBAH *et al.*, 2019; RANG *et al.*, 2011).

A inibição da agregação plaquetária é considerada uma estratégia eficaz na prevenção e no tratamento de eventos cardiovasculares, sendo a inibição do receptor P2Y₁₂ uma importante via de atuação dos fármacos antiplaquetários, já que tal receptor está envolvido ativamente na amplificação da resposta plaquetária necessária para a formação do trombo (FALCÃO *et al.*, 2013). Além da inibição da agregação induzida pelo ADP, estudos demonstram que a inibição do P2Y₁₂ reduz fortemente a capacidade da produção de TxA₂ pelas plaquetas com consequente diminuição da agregação plaquetária induzida pela ligação destes ao receptor TP (WARNER; NYLANDER; WHATLING, 2011).

Alguns agentes antiplaquetários que atuam sobre os receptores de ADP já são utilizados. A ticlopidina, o clopidogrel, e o prasugrel fazem parte da classe de tienopiridínicos. O uso da ticlopidina é limitado em razão da grande incidência de efeitos colaterais, como a neutropenia e agranulocitose (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018). O clopidogrel se liga de maneira irreversível aos receptores P2Y₁₂, e apesar de demonstrar grande eficácia, apresenta algumas implicações, como a variabilidade individual, devido às diferenças no seu metabolismo, o risco aumentado de sangramentos, devido à inibição irreversível e a sua latência para atingir o pico de ação (CATTANEO, 2010). Após algumas doses desse medicamento, alguns pacientes apresentam resistência e se tornam hiporresponsivos, representando uma população com alto risco para doenças cardiovasculares mais graves (SNOEP *et al.*, 2007). O prasugrel é semelhante ao clopidogrel, se ligando irreversivelmente ao receptor P2Y₁₂, porém apresenta uma biodisponibilidade mais elevada o que resulta em uma ação mais rápida, maior inibição plaquetária e menor variabilidade individual (YEUNG, LI, HOLINSTAT, 2018). Em decorrência da maior taxa de sangramento, seu uso não é recomendado para pacientes com histórico de doenças trombóticas (WIVIOTT *et al.*, 2007). O cangrelor é um agente análogo ao ATP e o ticagrelor pertence à classe dos

ciclopentil-triazolopirimidinas. Eles interagem de forma reversível com o receptor P2Y₁₂ e inibem a ativação plaquetária mediada pelo ATP, porém possuem tempo de ação e de estabilização da função normal mais rápido quando comparado aos tienopiridínicos (YEUNG; LI; HOLINSTAT, 2018).

Apesar da utilização de inúmeros fármacos antiplaquetários, há ainda a ocorrência frequente de doenças trombóticas e suas complicações, representando uma importante questão de saúde pública. A eficácia dos antiplaquetários utilizados atualmente é limitado devido ao aumento do risco de sangramento e à resistência a estes fármacos. Sendo assim, é necessário o estudo de novos meios de avaliação das funções plaquetárias para um diagnóstico preciso e o desenvolvimento de formas de tratamento mais eficientes e que gerem menos efeitos colaterais (KOUPENOVA *et al.*, 2017; RENGASAMY *et al.*, 2019).

Os peptídeos derivados de peçonhas de serpentes surgem como uma alternativa para produção de fármacos antiplaquetários. Quando utilizados em proporções corretas ou após serem estruturalmente modificados, os peptídeos podem ser eficazes drogas terapêuticas ou carreadores de drogas (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006; KONG *et al.*, 2015; MUNAWAR *et al.*, 2018). Esses peptídeos apresentam alta afinidade e especificidade com seus ligantes, possuem meia vida curta e baixa toxicidade, embora apresentem alta potencialidade (SCOGNAMIGLIO *et al.*, 2013). Entretanto tais peptídeos apresentam algumas limitações para uso em larga escala, sendo a principal a dificuldade na obtenção devido à baixa quantidade presente na peçonha (MACHADO *et al.*, 2004). Uma alternativa então para uso desses compostos como fármacos é síntese química dos mesmos, a qual apresenta a possibilidade de automatização, alta velocidade e praticidade, além do alto rendimento e baixo custo de produção, quando comparadas à outras metodologias (GUZMÁN; BARBERIS; ILLANES, 2007; VLIEGHE *et al.*, 2010).

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que a bhalternina, uma serinoprotease isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*, apresenta ação tóxica sobre células tumorais de próstata, causando diminuição da viabilidade e inibição da migração dessas células, com pouco ou nenhum efeito tóxico em células normais. Além disso, a bhalternina também foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP. Através de ensaios de bioinformática, foi identificado que a bhalternina interage com as plaquetas através do receptor P2Y₁₂. Assim como nas plaquetas, em células tumorais também são encontrados receptores purinérgicos P2, os quais participam do processo de crescimento celular. Dado que nos permite sugerir que a interação da bhalternina com as células tumorais também deva ocorrer através de receptores desta classe.

A região peptídica da bhalternina associada à inibição da agregação plaquetária também foi identificada, o que permitiu a síntese química do Peptídeo Inibidor de Plaquetas derivado da Bhalternina - BhaltPIP. Este peptídeo sintético também impede a agregação plaquetária induzida pelo agonista ADP, devido à interação com o receptor plaquetário P2Y₁₂. O BhaltPIP está em processo de patenteamento para viabilizar a utilização desta molécula com base para a produção de fármacos para o tratamento de doenças trombóticas, bem como para a prevenção de complicações cirúrgicas relacionadas à hemostasia.

6. REFERÊNCIAS

- ALAMELU, J.; LIESNER, R. Modern management of severe platelet function disorders. *British Journal of Haematology*, v. 149, p. 813–823, 2010.
- ALBELDA, S.M. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis, *Lab. Invest.*, v. 68(1), p. 4–17, 1993.
- AMORIM, F. G., *et al.* New Insights on Moojase, a Thrombin-Like Serine Protease from *Bothrops moojeni* Snake Venom. *Toxins*, v.10, 500, 2018.
- ANDREWS R. K. *et al.* The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb Haemost*, 82, p.357-64, 1999.
- ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. *Thrombosis Research*, v. 114, p. 447-453, 2004.
- ARLINGHAUS, F. T; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms, *Toxicon*, v. 60, p. 512–519, 2012.
- BAJARNASON J. B., *et al.* Kallikrein-like enzyme from *Crotulus atrox* venom, *J. Biol. Chem*, 238: 12566 – 12573, 1983.
- BARBOSA, F. T.; CUNHA, R. M.; BARBOSA, L. T. Doença de von Willebrand e anestesia. *Rev. Bras. Anesthesiol*, v. 57, n. 3, p. 315-323, 2007.
- BARBOUCHE, R., *et al.* Anti-platelet activity of the peptides composing the lebetin 1 family, a new class of inhibitors of platelet aggregation. *Toxicon*, v. 36(12), p. 1939–194, 1998.
- BARBOUCHE, R., *et al.* Novel anti-platelet aggregation polypeptides from *Vipera lebetina* venom: isolation and characterization. *FEBS Lett*, v. 392(1), p. 6–10, 1996.
- BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. Aspectos gerais da ação dos fármacos. In: BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M. *Química Medicinal, as bases moleculares da ação dos fármacos*. 3ª edição. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2015.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. *Archives Biochemistry Biophysics*, v. 318, p. 247-250, 1995.

BELISARIO, M.A. *et al.* H₂O₂ activity on platelet adhesion to fibrinogen and protein tyrosine phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1495, p. 183–193, 2000.

BENJAMIN, E. B., *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics – 2019. Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, v.139, 2019.

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

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.

BLEDZKA, K., *et al.* Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. In: Michelson AD ed. *Platelets*, 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2013:233–248.

BRASIL. Manual de diagnóstico e tratamento da doença de von Willebrand/ Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008

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

BRASIL. Perfil das coagulopatias hereditárias no Brasil: 2015. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: Natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep*, v. 22, p. 162–195, 2005.

CALDERON, L. A., *et al.* Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. *BioMed Research International*. 2014.

CAPONE M. L., *et al.*, NSAIDs and car-diovascular disease: transducing human pharmacology results into clinical read-outs in the general opulation. *Pharmacol Rep*, v. 62, p. 530–535, 2010.

CASTRO, H. C., *et al.* Platelets: still a therapeutical target. *Bras Patol Med Lab*, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CASTRO, H.C.; RODRIGUES, C.R. Current status of snake venom thrombin-like enzymes. *Toxin Rev.* v. 25, p. 19, 2006.

CATELLA-LAWSON, F. *et al.* Cyclo-oxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med*, v. 345, p. 1809-17, 2001.

CATTANEO M. The P2 receptors and congenital platelet function defects. *Semin Thromb Hemost.*, v. 31, p. 168–73, 2005.

CATTANEO, M. New P2Y₁₂ inhibitors. *Circulation*, v. 121(1), p. 171-9, 2010.

CATTANEO, M. The Platelet P2 Receptors. *Platelets*, p. 259–277, 2019.

CESAR, P. H. S., *et al.* Snake Venom Disintegrins: An Overview of their Interaction with Integrins. *Curr Drug Targets.*, v.20(4), p. 465-477, 2019.

CHATTERJEE M, GEISLER T. Inflammatory Contribution of Platelets Revisited: New Players in the Arena of Inflammation. *Semin Thromb Hemost.* 42(3):205-14, 2016.

CHEN, M., *et al.* A novel direct factor Xa inhibitory peptide with anti-platelet aggregation activity from *Agkistrodon acutus* venom hydrolysates. *Scientific Reports*. 2015.

CHIU, C. C. *et al.* Goniiothalamine inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis, and reduced migration ability, *J. Agric. Food Chem*, v. 59 (8), p. 4288–4293, 2011.

CHWETZOFF, S., *et al.* Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid

sequence, and biological properties, *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 22, p. 13289–13297, 1989.

CIEMNY M. P., *et al.* Protein-peptide molecular docking with large-scale conformational changes: the p53-MDM2 interaction. *Sci Rep.*, v. 1;6, 2016.

CLEMETSON K. J., CLEMETSON J. M. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. *Semin Thromb Hemost*, 21, p. 130-6, 1995.

CLEMETSON, K. J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors, *Toxicon*, v. 56, p. 1236–1246, 2010.

CLEMETSON, K. J.; LU, Q.; CLEMETSON, J. M. Snake venom proteins affecting platelets and their applications to anti-thrombotic research. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, p. 2887-2892, 2007.

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

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas unidades federativas Lista de espécies. *Herpetologia Brasileira*, v. 7, p. 11-58, 2018.

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

COVIC, L., GRESSER, A. L., KULIOPULOS, A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*, v. 39, p. 5458-67, 2000.

DALE G. L., *et al.* Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, v.415, p. 175–179, 2002.

DANGELMAIER, C, *et al*, Potentiation of thromboxane A₂-induced platelet secretion by Gi signaling through the phosphoinositide-3 kinase pathway. *Thromb Haemost*, v. 85, p. 341–8, 2001.

DANIEL, J. L., *et al.*, Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost*, v. 82, p. 1322–6, 1999.

DAVÌ, G.; PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, v. 357, p. 2482-2494, 2007.

DI CERA, E., Serine Proteases. *IUBMB Life*, 61(5): p. 510-515, 2009.

DIAS, E. H. V., *et al.* In vitro tracking of phospholipase A₂ from snake venom conjugated with magic-sized quantum dots. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 122, p. 461–468, 2019.

DIAZ, B. L., ARM, J. P. Phospholipase A(2). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 69(2-3), p. 87-97, 2003.

DING, B, *et al.* Antiplatelet aggregation and antithrombosis efficiency of peptides in the snake venom of *Deinagkistrodon acutus*: Isolation, identification, and evaluation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

DONG, J. F, *et al.* Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. *Blood*, v. 97, p. 162–168, 2001.

DU, X. Y. CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, v. 40(6), p. 659-665, 2002.

ECHAHDI, H., *et al.* Von Willebrand's disease: case report and review of literature. *Pan African Medical Journal*, 2017.

ECKLY A., *et al.* Differential involvement of the P₂Y₁ and P₂Y₇ receptors in the morphological changes of platelet aggregation. *Thromb Haemost*, v. 85, p. 694–701.

ESTEVEZ, B., *et al.* Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood*, 127(5), 2015.

FABRE J. E., *et al.* Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y₁-deficient mice. *Nat Med*, v. 5, p. 1199–202, 1999.

FALCÃO, F. J. A., *et al.* P2Y₁₂ Platelet Receptors: Importance in Percutaneous Coronary Intervention. *Arq Bras Cardiol*, v.101(3), p. 277-282, 2013.

FÄLKER, K. Adrenoceptor α_{2A} signalling countervails the taming effects of synchronous cyclic nucleotide-elevation on thrombin-induced human platelet activation and aggregation. *Cellular Signalling*, v. 59, p. 96-10, 2019.

FERNANDEZ J. H., *et al.* Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochem Biophys Res Commun*, v.329(2), p. 457-64, 2005.

FERRAZ, F. B., FERNANDEZ, J. H. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. *Revista Científica da FMC*. v. 9, n 2, 2012.

FLAUMENHAFT, R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23, n.7, p. 1152-60, 2003.

FRY, B.G. The structural and functional diversification of the Toxicofera reptile venom system. *Toxicon*, 60, 434–448, 2012.

FUJIMURA, K., PHILLIPS, D. R. Calciumcation regulation of glycoprotein IIb-IIIa complex formation in platelet plasma membranes. *J Biol Chem*, v. 258(17), p.10247–10252, 1983.

GABRIEL, L. M., *et al.* Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 18, n. 1, p. 24–33, 2012.

GACHET, C. The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol ther*, v.108(2), p. 180-92, 2005.

GALE, A. Current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol.*, v. 39, n. 1, p. 273–280, 2011.

GEBRIM, L. C. S., *et al.* Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals*, v. 37, n. 4, p. 222–229, 2009.

GHOSH, K. *et al.* Co-existence of Bernard Soulier syndrome and factor XI deficiency in a family: a unified pathology? *Platelets*, v. 16, n. 2, p. 85-9, 2005.

GHOSHAL, K., BHATTACHARYYA, M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *Scientific World Journal*. 2014.

GIBBINS, J. M. Platelet adhesion signaling and the regulation of thrombus formation. *J Cells Sci*, v. 117, p. 3415-25, 2004.

GODFROID JJ, BRAQUET P. PAF-acether specific binding sites: 1. quantitative SAR of PAF-acether isosteres. *Trends Pharmacol Sci.* v. 7, p. 368-73, 1986.

GOGGS, R., POOLE, A. W. Platelet signaling: a primer. *J Vet Emerg Crit Care*, v. 22(1), p. 5-29, 2012.

GOODMAN, T., FERRO, A., SHARMA, P. Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *Br. J. Clin. Pharmacol*, v. 66, p. 222-232, 2008.

GRAINGER, J. D.; THACHIL, J.; WILL, A. M. How we treat the platelet glycoprotein defects; Glanzmann thrombasthenia and Bernard Soulier syndrome in children and adults. *British Journal of Haematology*, v. 182, p. 621–632, 2018.

GRATACAP, M. P, *et al.* FcγRIIA requires a Gidependent pathway for an efficient stimulation of phosphoinositide 3-kinase, calcium mobilization, and platelet aggregation. *Blood*, v. 96, p. 3439–46, 2000.

GREGG, D.; GLODSCHIMIDT-CLERMONT, P. Platelets and cardiovascular disease. *Circulation*, v. 188, p. 88-90, 2003.

GREMMEL, T.; FRELINGER, A. L.; MICHELSON, A. D. Platelet Physiology. *Seminars in Thrombosis & Hemostasis*;42(3):191-204, 2016.

GRIMALDO-GÓMEZ, F. A. Fisiología de la hemostasia. *Revista Mexicana de Anestesiología*, v. 40. pp S398-S400, 2017.

GUIMARÃES, D. O., *et al.* In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 97, p. 770–777, 2017.

GUNAY-AYGUN, M.; HUIZING, M.; GAHL, W. A. Molecular defects that affect platelet dense granules. *Sem Thromb Haemost*, v. 30, n. 5, p. 537-47, 2004.

GUO, C., *et al.* Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*, v. 60(3), p. 302-311, 2012.

GUPTA, G.P., MASSAGUE, J. Cancer metastasis: building a framework, *Cell*, v. 127(4), p. 679–695, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, v. 54, p. 958 - 975, 2009.

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

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

GUYTON, A.C. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.36, p. 475 – 486, 2011.

GUZMÁN, F., BARBERIS, S., ILLANES, A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.10, p. 279–314, 2007.

HAMAKO, J., *et al.* Purification and Characterization of Bitiscetin, a Novel von Willebrand Factor Modulator Protein from *Bitis arietans* Snake Venom, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 226, p. 273–279, 1996.

HANDIN, R. I. Inherited platelet disorders. *Hematology*, p. 396- 401, v. 2005.

HARDY A. R., *et al.* Reciprocal cross-talk between P2Y1 and P2Y12 receptors at the level of calcium signaling in human platelets. *Blood*, v.104, p. 1745–52, 2004.

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

HARTWIG, JH. Platelet structure. In: Michelson, A. D. *Platelets*. California: Academic Press, 2002.

HAYNES, S. E., *et al.* The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature neuroscience*, v. 9(12), 1512, 2006.

HECHLER, B; GACHET, C. P2 receptors and platelet function. *Purinergic Signalling*, v. 7, p. 293–303, 2011.

HSU, C.C.; WU, W.B.; HUANG, T.F. A snake venom metalloproteinase, kistomin, cleaves platelet glycoproteinVI and impairs platelet functions.J. *Thromb. Haemost*, v.6, p. 1578–158, 2008.

HUANG, J. *et al.* Platelet integrin $\alpha IIb\beta 3$: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *Journal of Hematology & Oncology*, p. 12-26, 2019.

HUANG, M. Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; KINI, R. M. Role of enzymatic activity in the antiplatelet effects of a phospholipase A2 from *Ophiophagus hannah* snake venom. *Life Sciences*, v. 61, p. 2211-2217, 1997.

HUANG, T. F., *et al.* Antiplatelet protease, kistomin, selectively cleaves human platelet glycoprotein Ib. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1158, p. 293–299, 1993.

ITALIANO, J. E.; HARTWIG, J. H. Megakaryocyte development and platelet formation. In: MICHELSON, A. D. Platelets. California: Academic Press, 2002.

IZIDORO, L. F. M., *et al.* Snake venom L-amino acid oxidases: Trends in pharmacology and biochemistry. *BioMed Res. Int*, 2014.

JAKUBOWSKI, P., *et al.* Identification of inhibitors of $\alpha 2\beta 1$ integrin, members of C-lectin type proteins, in *Echis sochureki* venom. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, v. 269, p. 34–42, 2013.

JANTZEN, H. M., *et al.* Impaired activation of murine platelets lacking $G\alpha(i2)$. *J Clin Invest*, v. 108, p. 477–83, 2001.

JARVIS, G. E, ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y(1) and P(2T) receptors. *Br J Pharmacol*, v.129, p. 275–82, 2000.

JIN, J., KUNAPULI, S. P. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci*, v.95, p. 8070–4, 1998.

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

KAHN, M. L., *et al.* Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*, v. 103, p. 879-87, 1999.

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

KANG, T.S. *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *Febs J*, 278(23). p. 4544-76, 2011.

KANNAN, M., AHMAD, F., SAXENA, R. Platelet activation markers in evaluation of thrombotic risk factors in various clinical settings *Blood Reviews*, 37:100583, 2019.

KASIRER-FRIEDE, A. *et al.* Signaling through GP Ib-IX-V activates $\alpha IIb\beta 3$ independently of other receptors. *Blood*, v. 103, n. 9, p. 3403-11, 2004.

KATZEN, F., CHANG, G., KUDLICKI, W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnology*, v. 23, no. 3, p. 150-156, 2005.

KAUFFENSTEIN G., *et al.* The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through weak activation of the α (IIb) β (3) integrin—a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett*, v. 505, p. 281–90, 2001.

KELLEY, L. A., *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.*, v. 10(6), p. 845-58, 2015.

KEREIAKES, D. J., *et al.* IIb's are not IIb's. *Am J Cardiol*, v. 85, p. 23C–31C, 2000.

KIM, S. *et al.* Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate Gi signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of Gi signaling. *Blood*, v. 99, p. 3629-36, 2002.

KING, G.F. Venoms as platform for human drug: Translating toxins into therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 11, 1469–1484, 2011.

KINI, M.R.; KOH, C.Y. Metalloproteinases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. *Toxins*, v. 8, 284, 2016.

KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination, *J. Thromb. Haemost.*, v.9, p. 195–208, 2011.

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

KINI, R.M., Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 34(4-5): p. 200-4, 2005.

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

KONG, Y., *et al.* Lx0702, a novel snake venom peptide derivative, inhibits thrombus formation via affecting the binding of fibrinogen with gpiib/iii_a. *J. Pharmacol. Sci.*, v. 127, p.462–466, 2015.

KONG, Y., *et al.* Purification and Characterization of a Novel Antiplatelet Peptide from *Deinagkistrodon acutus* Venom. *Toxins*, v.10, p. 332, 2018.

KOSOGLOU T, *et al.* Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the novel PAR-1 antagonist vorapaxar (formerly SCH 530348) in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 68, p. 249–258, 2012.

KOTTKE-MARCHANT, K.; CORCORAN G. Laboratory diagnosis of platelet disorder. *Arch Pathol Lab Med*, v. 126, n. 1, p. 133-46, 2002.

KOUPENOVA, M., *et al.* Thrombosis and platelets: an update. *European Heart Journal*, v. 38, p. 785–791, 2017.

KUMAR, V., *et al.* *Patologia Básica*, Elsevier Brasil, 9ª edição, 2013. p. 95.

KUO, Y, J., CHUNG, C. H., HUANG, T, F. From Discovery of Snake Venom Disintegrins to A Safer Therapeutic Antithrombotic Agent. *Toxins*, v. 11, p. 372, 2019.

LAING, G.D.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon*, v. 45, p. 987-996, 2005.

LAZAROVICI, P., MARCINKIEWICZ, C., LELKES, P. I. From Snake Venom's Disintegrins and C-Type Lectins to Anti-Platelet Drugs. *Toxins*, v. 11, p. 303, 2019.

LEITE, C. A., *et al.* Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in câncer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*, v 8, n°29, 2012.

LÉON, C., *et al.* Differential involvement of the P2Y₁ and P2Y₁₂ receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 23 (10), p.1941–1947, 2003.

LÉON, C., *et al.* Key role of the P2Y₁ receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y₁- knockout mice and mice treated with a P2Y₁ antagonist. *Circulation*, v. 103(5), p. 718–723, 2001.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 2, p. 790–802, 2003.

LI, L.; HUANG, J., LIN, Y. Snake Venoms in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Toxins*, v. 10, 346, 2018.

LI, N., *et al.* Effects of serotonin on platelet activation in whole blood. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, v. 8, p. 517–523, 1997.

LIN, T. M., *et al.* Impaired responsiveness of platelets to epinephrine due to α_2A adrenoreceptor deficiency in Male Chinese, *Platelets*, v. 27, p. 1–6, 2015.

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

LÖWENBERG, E. C.; MEIJERS, J. C. M.; LEVI, M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Netherlands Journal of Medicine*, v. 68, n. 6, p. 242–251, 2010.

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

MARKLAND Jr., F. S. Antitumor action of crotalase, a defibrinogenating snake venom enzyme,” *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, v. 12, n. 4, p. 284–290, 1986.

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

MARQUES, R. V. C. F., *et al.*, Atendimento odontológico em pacientes com Hemofilia e Doença de von Willebrand. *Arq. Odontol*, v. 46, n.3, p. 176-180, 2010.

MARRAKCHI, N., *et al.* Cerastotin, a serine protease from *Cerastes cerastes* venom, with platelet aggregating and agglutinating properties. *Eur. J. Biochem.* 247, 1997.

MATSUI T., FUJIMURA Y., TITANI K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimic. Biophysica Acta*, 1477, p. 146 – 156, 2000.

MCLANE, M. A., *et al.* Viper venom disintegrins and re-lated molecules. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 219 p. 109-19, 1998.

MENALDO, D. L. *et al.* Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biochimie*, v. 94, p. 2545-2558, 2012.

MENALDO, D.L., *et al.* Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. *Int. Immunopharmacol*, v.15, p. 764–771, 2013.

MERCADO, C. P., *et al.* A serotonin-induced N-glycan switch regulates platelet aggregation. *Sci. Rep*, v. 3, p. 2795, 2013.

MERRIFIELD, B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 85, p. 2149–2154, 1963.

MICHELSON, A. D. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*, v. 110, p. 489-93, 2004.

MOMIC, T., *et al.* Vixapatin (VP12), a C-Type Lectin-Protein from *Vipera xantina palestinae* Venom: Characterization as a Novel Anti-angiogenic Compound, *Toxins*, v. 4, p. 862–877, 2012.

MOSBAH, A., *et al.* Lebetin Peptides, A New Class of Potent Platelet Aggregation Inhibitors: Chemical Synthesis, Biological Activity and NMR Spectroscopic Study. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2019.

MOUNIER, C., *et al.* Platelet secretory phospholipase A2 fails to induce rabbit platelet activation and to release arachidonic acid in contrast with venom phospholipases A2. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1214, p. 88-96, 1994.

MUMAW, M.M. A Novel Approach to Antiplatelet Therapy: Targeting Protease Activated Receptor 4. Ph.D. Thesis, Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, 2016.

MUNAWAR, A. *et al.* Christian Betzel. Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. *Toxins*, 10, 474, 2018.

NAKAHATA N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol. Ther*, v. 118(1), p. 18-35, 2008.

NAUMANN, G.B., *et al.* Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, v. 1810, p. 683-694, 2011.

NAVDAEV, A. *et al.* Echicetin Coated Polystyrene Beads: A Novel Tool to Investigate GPIIb-Specific Platelet Activation and Aggregation. *PlosOne*, v. 9, 2014.

NIESWANDT, B., *et al.* Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO Journal*, 20, p. 2120-2130, 2001.

NIESWANDT, B.; AKTAS, B.; MOERS, A. Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *J Thromb Haemost*, v. 3, n. 8, p. 1725-36, 2005.

NILSSON, B L.; SOELLNER, M B; RAINES, R. T. Chemical synthesis of proteins. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, v. 34, p. 91-118, 2005.

NOWAK, A. A. O-linked glycosylation of von Willebrand factor modulates the interaction with platelet receptor glycoprotein Ib under static and shear stress conditions. *Blood*, 120: 214-22, 2012.

OFFERMANN S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res*, v. 99(12), p. 1293-304, 2006.

OLIVEIRA, I., *et al.* Platelets: Traditional and nontraditional roles in hemostasis, inflammation and câncer. *ABCS Health Sci*, v. 38(3), p. 153-161, 2013.

OPNEJA, A., KAPOOR, S., STAVROU, E. X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing, *Thrombosis Research*, v. 179, p. 56-63, 2019.

PATERSON, I.; ANDERSON, E.A. The renaissance of natural products as drug candidates. *Science*, v. 310, p. 451–453, 2005.

PEITSIDIS, P., *et al.* Bernard Soulier syndrome in pregnancy: a systematic review. *Haemophilia*, v. 16, p. 584–591, 2010.

PENTAPHARM. Defibrase® - Batroxobin. Disponível em <<https://www.pentapharm.com/markets-and-products/products/pharma/defibrase-batroxobin/>>. Acesso em 04 set, 2019.

PENTAPHARM. Reptilase® - Haemocoagulase. Disponível em <<https://www.pentapharm.com/markets-and-products/products/pharma/haemocoagulase/>>. Acesso em 04 set, 2019.

PERUTELLI, P., BIGLINO P., MORI P. von Willebrand Factor: Biological Functions and Molecular Defects. *Pediatric Hematology and Oncology*, 14, p. 499-152, 1997.

PRASHANTH, J.R., *et al.* Cone snail venomics: From novel biology to novel therapeutics. *Future Med. Chem.*, v.6, p. 1659–1675, 2014.

QUEIROZ, M. R., *et al.* The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon*, v.133, p. 33- 47, 2017.

QUEIROZ, M.R., *et al.* Rapid purification of a new P-I class metalloproteinase from Bothrops moojeni venom with antiplatelet activity. *Biomed. Res. Int.*, 2014.

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

READ, M.S., *et al.* Role of Botrocetin in Platelet Agglutination: Formation of an Activated Complex of Botrocetin and von Willebrand Factor. *Blood*, v. 15;74(3), p. 1031-5, 1989.

RENGASAMY, K, R. R., *et al.* Bioactive peptides and proteins as alternative antiplatelet drugs. *Med Res Rev.*, p. 1-19, 2019.

RIBEIRO, D. A. *et al.* Isolation of a new serine protease (uruprot) from *Bothrops alternatus* snake venom. *Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, v. .9, n.2, p.585, 2003.

RIBEIRO, D. A. Purificação, caracterização bioquímica e funcional de uma serinoprotease (Uuruprot) do veneno de *Bothrops alternatus* (Urutu). Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2000.

RODEGHIERO F, CASTAMAN G, DINI E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood*, v. 69(2), p. 454-9, 1987.

RODEGHIERO F, CASTAMAN G. Treatment of von Willebrand disease. *Semin Hematol*, v. 42, p. 29-35, 2005.

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*, v. 91, p. 490-501. 2009.

RUGGERI, Z. M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost*, v. 78, n. 1. p. 611-16, 1997.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J. Thromb. Haemost.* 1, 1335–1342, 2003.

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

SADLER J. E. A Revised Classification of von Willebrand Disease. *Thromb Haemost*, v. 71, p. 520-5, 1994.

SADLER, J. E. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 395–424, 1998.

SAJEVIC, T., LEONARDI, A., KRIZAJ, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*, 57, 2011.

SAKURAI Y, *et al.* Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon*, v. 39, p. 1827-33, 2001.

SÁNCHEZ, E. E., *et al.* Colombistatin: A disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*Bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion. *Arch Toxicol*, v. 83(3), p. 271- 9, 2009.

SANCHEZ, E. F., *et al.* Direct Fibrinolytic Snake Venom Metalloproteinases Affecting Hemostasis: Structural, Biochemical Features and Therapeutic Potential. *Toxins*, v. 9, 392, 2017.

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

SARANGI, S., *et al.* P2Y₁₂ receptor inhibition augments cytotoxic effects of cisplatin in breast câncer. *Med Oncol*, v. 30, p .567, 2013.

SARRAY, S. *et al.* Snake Venom Peptides: Promising Molecules with Anti-Tumor Effects, in: *Bioact. Food Pept. Heal. Dis.*, InTech, 2013.

SAVAGE, B., CATTANEO, M., RUGGERI, Z. M. Mechanisms of platelet aggregation. *Curr Opin Hematol*, v.8(5), p. 270–276, 2001.

SCHLONDORFF, J., BLOBEL, C P. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*, v.112, p. 3603-17, 1999.

SCHMIDTKE, P. *et al.* Shielded hydrogen bonds as structural determinants of binding kinetics: application in drug design. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 133, p. 18903–18910, 2011.

SCHMITMEIER, S., *et al.* Potent mimicry of fibronectin-induced intracellular signaling in glioma cells by the homodimeric snake venom disintegrin contortrostatin. *Neurosurgery*, v. 57, n. 1, p. 141–153, 2005.

SCOGNAMIGLIO, L., *et al.* Peptides to small molecules: an intriguing but intricate way to new drugs. *Current Medicinal Chemistry*, v.20(31), p. 3803-3817, 2013.

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinase. *Toxicon*, v. 62, p. 19-26, 2013.

SHIBUYA, M., *et al.* Antimetastatic effect of defibrinogenation with batroxobin depends on the natural killer activity of host in mice. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 116, n. 2, p. 168–172, 1990.

SHIN, D. H., *et al.* An Increase in Mean Platelet Volume/Platelet Count Ratio Is Associated with Vascular Access Failure in Hemodialysis Patients. *PLoS One*, v. 12(1), 2017.

SILVEIRA, L. B., *et al.* Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73, P. 35-43, 2013.

SMYTH, E. M. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. *Clin Lipidol*, v.5(2), p. 209-219, 2010.

SNOEP, J. D, *et al.* Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J.*, v.154(2), p.221-31, 2007.

SORIA, J., *et al.* Fibrinogen α C domain: Its importance in physiopathology. *Res Pract Thromb Haemost*, v. 3, p. 173–183, 2019.

SPALDING, A., *et al.* Mechanism of epinephrine-induced platelet aggregation. *Hypertension*, v. 31, p. 603–607, 1998.

SPRINGER, T. A., ZHU, J., XIAO, T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen γ C peptide by the platelet integrin α IIb β 3. *J Cell Biol*, v.182(4), p. 791–800, 2008.

STÁBELI, R. G.; *et al.* Plate-let aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg. Med. Chem.*, v.12(11), p. 2881-2886, 2004.

STABELI, R.G., *et al.* Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 41, p. 132-140, 2007.

STANISZEWSKA, I., *et al.* Effect of VP12 and viperistatin on inhibition of collagen-receptor-dependent melanoma metastasis., *Cancer Biol. Ther.*, v.8, p. 1507–16, 2009.

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

STEFANINI, L., RODEN, R. C., BERGMEIER, W. Ca_v1.2 is at the nexus of calcium-dependent platelet activation. *Blood*, v.114 (12), p. 2506–14, 2009.

STEVENS, R. F., MEYER, S. Fanconi and Glanzmann: the men and their works. *British journal of haematology*, v. 119, p. 901–904, 2002.

STOREY, R. F., *et al.* The central role of the P2Y₁ receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol*, v. 110(4), p. 925–934, 2000.

TAKAGI, J., *et al.* Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, v.110(5), p. 599-611, 2002.

TAKATSUKA, H., *et al.* Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol*, v. 1544, p. 267-277, 2001.

TAKEDA, S., TAKEYA, H., IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure,function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1824(1), p. 164–176, 2012.

TENG, C. M.; CHEN, Y. H.; OUYANG, C. Biphasic effect on platelet aggregation by phospholipase A₂ purified from *Vipera russellii* snake venom. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 772, p. 393-402, 1984.

VAN DER MEIJDEN PE, *et al.* Platelet P2Y₁₂ receptors enhancesignalling towards procoagulant activity and thrombin generation. A study with healthy subjects and patients at thrombotic risk. *Thromb Haemost*, v. 93, p, 1128–36, 2005.

VANNI, D. S. *et al.* Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 3, p. 181-189, 2007.

VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 28, p. 403-412, 2008.

VITT, L. J., CALDWELL, J. P. Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. Fourth Edition. 2014.

VLIEGHE, P., *et al.* Synthetic therapeutic peptides: Science and Market. *Drug Discovery Today*, v. 15, 2010.

VLOT A, J., *et al.* Kinetics of Factor VIII-von Willebrand Factor Association. *Blood*, 87(5), p. 1809-1816, 1996.

VORCHHEIMER, D.A., BECKER, R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin. Proc*, v. 81, p. 59-68, 2006.

WAGNER, C. L., *et al.* Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of binding to human platelets. *Blood*, v. 88(3), p. 907–914, 1996.

WAHEED, H., MOIN, S. F., CHOUDHARY, M.I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 24, p. 1874-1891, 2017.

WARE, J. Dysfunctional platelet membrane receptors: from humans to mice. *Thromb Haemost*, v. 92, n. 3, p. 478-85, 2004.

WARNER, T. D., NYLANDER, S., WHATLING, C. Anti-platelet therapy: cyclo-oxygenase inhibition and the use of aspirin with particular regard to dual anti-platelet therapy. *Br J Clin Pharmacol*, v. 72, p. 619–33, 2011.

WARRELL, D. A. Snake bite. *The Lancet*, v. 375, p. 77-88, 2010.

WATALA, C. Blood platelet reactivity and its pharmacological modulation in (people with) diabetes mellitus. *Curr Pharm Des*, v. 11, n. 18, p. 2331-65, 2005.

WEI, X.L., *et al.* Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. *Toxicon*, v. 50, p. 1126-1139, 2007.

WENCEL-DRAKE, J. D., *et al.* Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol*, v.124(2), p. 324–334, 1986.

WHITE J. G. Platelet structure. In: Michelson A. D ed. *Platelets*, 3rd ed. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2013, p.117–144.

WIJEYEWICKREMA, L.C.; GARDINER, E.E.; MOROI, M.; BERNDT, M.C.; ANDREWS, R.K. Snake venom metalloproteinases, crototharagin and alborhagin, induce ectodomain shedding of the platelet collagen receptor, glycoprotein VI. *Thromb. Haemost*, v. 98, p. 1285–1290, 2007.

WILLIAMS, J. A. Disintegrins: RGD-containing proteins which inhibit cell/matrix interactions (adhesion) and cell/cell inter-actions (aggregation) via the integrin receptors. *Pathol Biol.*, v. 40(8), p. 813–821, 1992.

WIVIOTT, S. D., *et al.*, Investigators. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.*, v.357(20), p. 2001-15, 2007.

WONG, P. C., *et al.* Blockade of protease-activated receptor-4(PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding. *Sci Transl Med.* v. 9(371), 2017.

WOODS, V. L. JR., WOLFF, L. E., KELLER, D. M. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem*, v. 261(32), p. 15242–15251, 1986.

YANG J, *et al.* Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J BIOL CHEM*, v. 277, p. 46035–42, 2002.

YEE, A.; KRETZ, C. A. von Willebrand Factor: Form for Function. *Semin Thromb Hemost*, 40:17–27, 2014.

YEUNG, J. LI, W., HOLINSTAT, M. Platelet signaling and disease: targeted therapy for thrombosis and other related diseases. *Pharmacological Reviews*, v. 70, p. 526–548, 2018.

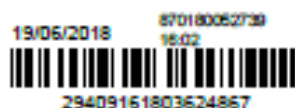
ZAHER, H. *et al.* Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes, Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines: A revised classification and descriptions of new taxa. *Papéis Avulsos de Zoologia*, v. 49 (11), p. 115-153, 2009.

ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily, *FEBS J.*, v. 272p. 6179–6217, 2005.

ZHANG, L., WU, W. T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Natural Product Research*, v. 22, n. 6, p. 554–563, 2008.

ZULIANI, J.P., *et al.* G. Snake venom L-amino acid oxidases: Some consideration about their functional characterization. *Protein Pept. Lett*, v. 16(8), p. 908-912, 2009.

ANEXO



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 012555 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25648387000118

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Av. João Naves de Ávila, 2121 - Campus Santa Mônica - Reitoria

Cidade: Uberlândia

Estado: MG

CEP: 38400-902

País: Brasil

Telefone: (34)3239 4977

Fax:

Email: propriedade@intelecto.ufu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 19/06/2018 às 16:02, Petição 870180052739