UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ANA KARINA DE OLIVEIRA

**Caracterização proteômica comparativa da
agregação plaquetária induzida pela trombina
e pela PA-BJ, uma serinoproteinase do
veneno da *Bothrops jararaca***

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/05/2015

ANA KARINA DE OLIVEIRA

**Caracterização proteômica comparativa da
agregação plaquetária induzida pela trombina e
pela PA-BJ, uma serinoproteinase do
veneno da *Bothrops jararaca***

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Dra. Solange Maria de Toledo Serrano

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Oliveira, Ana Karina de
O48ca Caracterização proteômica comparativa da agregação plaquetária
induzida pela trombina e pela PB-BJ, uma serinoproteinase do veneno
da *Bothrops jararaca* / Ana Karina de Oliveira. -- São Paulo,
2015.
206p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Serrano, Solange Maria de Toledo

1. Proteína : Bioquímica 2. Plaquetas sanguíneas I. T. II. Serrano,
Solange Maria de Toledo, orientador.

574.19245 CDD

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise proteômica dos efeitos da PA-BJ, uma serinoproteinase do veneno de *Bothrops jararaca*, sobre plaquetas humanas

Pesquisador: Solange Maria de Toledo Serrano

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 14583813.8.0000.0086

Instituição Proponente: Instituto Butantan

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 339.074

Data da Relatoria: 01/08/2013

Apresentação do Projeto:

Este estudo trata da PA-BJ que é uma serinoproteinase do veneno da *Bothrops jararaca* que induz agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas e em suspensões de plaquetas lavadas. O efeito da PA-BJ em plaquetas é mediado pelos receptores de trombina PAR1 e PAR4, que são receptores plaquetários acoplados à proteína G. A PA-BJ cliva in vitro o exodomínio recombinante do receptor PAR1 nas ligações Arg41-Ser42 e Arg46-Asn47, resultando na inativação do "tethered ligand". Ainda, a PA-BJ promove a liberação de cálcio em fibroblastos transfectados com o receptor PAR4 e tornam estas células insensíveis à ação da trombina. Sua sequência de aminoácidos foi determinada por técnicas de química de proteínas e apresenta um sítio de N-glicosilação e um de O-glicosilação. Já foram identificadas pelo menos oito isoformas de PA-BJ com diferenças de massa molecular e ponto isoelétrico e provavelmente diferenças entre seus resíduos de aminoácidos e diferentes graus de glicosilação.

Com o objetivo de entender melhor os eventos de sinalização causados pela clivagem do receptor PAR1 pela PA-BJ, pretende-se neste estudo utilizar algumas abordagens proteômicas e fosfoproteômicas para analisar comparativamente o proteoma de plaquetas ativadas pela PA-BJ e pela trombina após indução da agregação plaquetária in vitro. Serão coletados 10 ml de sangue

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 1º andar

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

E-mail: smscep@gmail.com

total, de seis voluntários saudáveis que não tenham feito o uso de medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios por pelo menos dez dias, que tenham idade entre 20 e 50 anos, e de ambos os sexos. Somente serão aceitos doadores que preencham estes requisitos. Não será necessário jejum para coleta de sangue. O sangue será coletado por profissional habilitado e serão usados materiais descartáveis e estéreis para este fim. Ao final da coleta será oferecido um lanche para os doadores. O sangue total será acondicionado em tubo apropriado contendo solução ACD (ácido cítrico 78 mM, citrato de sódio 117 mM e dextrose 282 mM) na proporção 1:7 v/v ACD/sangue total. Os ensaios de agregação plaquetária serão realizados com um pool de plaquetas de pelo menos 3 doadores. Não serão avaliadas amostras individualmente. Este estudo deverá resultar na geração de novos conhecimentos sobre a interação de serinoproteínases com seus substratos macromoleculares e a descrição de novas vias de sinalização celular em plaquetas.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral deste trabalho é aprofundar o estudo sobre a ativação de plaquetas pela PA-BJ e pela trombina, gerar novos conhecimentos sobre a interação de serinoproteínases com seus substratos macromoleculares e descrever novas vias de sinalização celular em plaquetas.

Objetivos Secundários:

- Avaliar comparativamente os efeitos da PA-BJ e da trombina sobre plaquetas analisando o proteoma de plaquetas por meio de eletroforese bidimensional e colorações específicas para detecção de fosfoproteínas e proteínas totais.
- Identificar proteínas plaquetárias contidas em spots diferenciais, por digestão in gel com tripsina e análise por técnicas de espectrometria de massas.
- Avaliar o extrato proteico plaquetário por técnicas de espectrometria de massas.
- Avaliar as proteínas secretadas (secretoma) após ativação plaquetária. Identificar proteínas fosforiladas em plaquetas pelo efeito da PA-BJ e da trombina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo descrevia na primeira versão que não havia risco ao voluntário, apesar da possibilidade de desconforto e pequena lesão da área de coleta. Contudo, já corrigiu este ponto do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao indicar Risco Mínimo e descrever a possibilidade de lesão. Fica evidente também que os riscos são menores que os benefícios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um trabalho de alta complexidade muito bem embasado cientificamente, e com metodologia muito bem desenhada. Fica evidente que a metodologia permitirá que todos os

objetivos sejam alcançados. A participação do voluntário está bem justificada e os riscos são mínimos e menores que os benefícios.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A folha de rosto está devidamente preenchida e assinada pelo pesquisador principal, responsável pela instituição proponente e pelo financiador (Instituto Butantã).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da primeira versão não estava redigido na forma de convite; linguagem era excessivamente técnica, impedindo a compreensão de voluntários que não possuísem correlação com a área de estudo; os riscos não estavam textualmente descritos; havia um excesso de itens de identificação do sujeito, sem justificativa para o uso destes dados. Na segunda versão do TCLE todos estes apontamentos foram sanados: está na forma de convite, a linguagem, apesar de técnica, permite a compreensão do que será realizado, os riscos estão explicitados; os dados do sujeitos não são solicitados, foram informados os contatos do Comitê de Ética da Secretaria Municipal da Saúde.

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Na primeira versão foram apontadas as seguintes pendências: 1. esclarecer o destino do material biológico após a finalização do estudo; 2. esclarecer se o estudo já foi iniciado. Se não, enviar cronograma atualizado; 3. quanto ao TCLE: a. redigir como convite, de forma clara, direta e objetiva e em linguagem adequada ao nível sociocultural do voluntário de pesquisa. b. justificar ou retirar dados de identificação do voluntário como nome, endereço, fone, RG. c. excluir ou esclarecer inclusão de campo para representante legal e testemunha. Pela descrição dos critérios de inclusão, o estudo não pretende incluir menores de idade ou pessoas não responsáveis. d. informar que o contato com o pesquisador é para dúvidas quanto ao estudo. e. informar forma de contato com o CEP/SMS para dúvidas e denúncias éticas. (smscep@gmail.com / fone 33972464.)

Na segunda versão todas as pendências foram sanadas, estando o projeto apto para aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Para início da coleta dos dados, o pesquisador deverá se apresentar na mesma instância que

autorizou a realização do estudo (Coordenadoria, Supervisão, SMS/Gab, etc).

O sujeito de pesquisa (ou seu representante) e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo, conforme Carta Circular no 003/2011 da CONEP/CNS.

Salientamos que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Lembramos que esta modificação necessitará de aprovação ética do CEP antes de ser implementada.

Ao pesquisador cabe manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP (Res. CNS 196/96 item IX. 2. e). De acordo com a Res. CNS 196, IX.2.c, o pesquisador deve apresentar a este CEP/SMS os relatórios semestrais. O relatório final deverá ser enviado através da Plataforma Brasil, ícone Notificação. Uma cópia digital (CD/DVD) do projeto finalizado deverá ser enviada à instância que autorizou a realização do estudo, via correio ou entregue pessoalmente, logo que o mesmo estiver concluído.

SAO PAULO, 23 de Julho de 2013

Assinador por:
SIMONE MONGELLI DE FANTINI
(Coordenador)

Endereço: Rua General Jardim, 36 - 1º andar
Bairro: CENTRO
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3397-2464

CEP: 01.223-010

E-mail: smscep@gmail.com

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

À Deus por iluminar meu caminho...

À minha amada mãe pelo amor e pela ternura em todos os momentos difíceis... suas palavras sempre são um bálsamo para minha alma inquieta...

Ao meu querido pai pela paciência e dedicação ao longo desses anos.

Aos meus amados irmãos Alessandra e Marcelo e meus cunhados José e Virgínia!

E ao meu mais novo amor Felipe, meu sobrinho amado... que só me traz alegrias!!!

À minha orientadora e amiga Dra Solange Serrano. Obrigada por contribuir fortemente na minha formação e amadurecimento científico. Mas principalmente pela amizade, pelas longas conversas e calorosas discussões científicas!

A minha querida amiga Milene Menezes. Foi um privilégio conviver e trabalhar com você ao longo desses anos! Uma das pessoas mais generosas que conheci, uma profissional exemplar! Obrigada pelas longas conversas, parcerias científicas e por ter me ensinado tudo que sei!

As minhas amigas de todas as horas... principalmente das boas!!! Eliana Marengo e Fernanda Bruni com vocês tudo foi mais fácil! Obrigada pelos conselhos, pela força, por nossas longas conversas e incríveis viagens!!!!

Aos amigos e colaboradores Dr. André Zelanis, Dra. Aline Lopes, Eduardo Shigueo, Dra. Amanda Asega, e Dr. Alexandre Tashima. Obrigada pelo apoio, pela ajuda nos experimentos e pelo convívio tão enriquecedor!

Aos meus amigos queridos Gabriela Dias, Luciana Nasciben, Débora Andrade, Ana Helena Pagotto, Edson Yamashiro, Elisa de Cortazar, Pollyanna Fernandes, Ismael Lima, Leo Iwai e Dyoni Matias. Obrigada pela amizade, pelas conversas que sempre terminavam em deliciosas risadas!! O convívio com cada um de vocês foi extremamente enriquecedor ao longo desses anos!!

Aos amigos Maria Inácia Estevão, Augusto Lima, Flavia Rezende, Marcos Hooijschuur, Alleta Schmidt-Hederich, Rachel Sz. e Desiree Freund que me acolheram com tanto carinho em Frankfurt!

Ao prof. Johannes A. Eble, pela oportunidade em trabalhar em seu laboratório e por ter me recebido com tanto carinho!

Ao Dr. Marcelo Santoro pela ajuda nos ensaios iniciais com plaquetas.

Não posso deixar de agradecer especialmente aos funcionários e amigos Maria José Silva, Leila Hashimoto, Isaias Franca, Aparecida Peixoto e Lídia Alves Silva! Foi um prazer trabalhar com vocês!!

Ao Dr. Sandro Roberto Marana, Dra. Letícia Labriola e Dra. Sayuri Miyamoto pelas sugestões apresentadas durante meu exame de qualificação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (processos 98/14307-9, 10/17328-0, e 13/07467-1).

Ao Prof. Hugo Armelin, coordenador do Center of Toxins, Immune-response and Cell Signaling-CEPID-FAPESP, pelo apoio para o desenvolvimento deste projeto.

Aos pesquisadores, pós-graduandos, estagiários e funcionários do LETA.

Ao longo desses dez anos de trabalho e aprendizado no Instituto Butantan eu tenho muito que agradecer! Obrigada a todos!!!

"É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem saber ver."

Gabriel García Márquez

RESUMO

Oliveira, AK. **Caracterização proteômica comparativa da agregação plaquetária induzida pela trombina e pela PA-BJ, uma serinoproteinase do veneno da *Bothrops jararaca***. 2015. 206 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Plaquetas são fragmentos celulares anucleados, derivados de megacariócitos, que estão envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos, como coagulação, inflamação, trombose, aterosclerose, e metástase e angiogênese tumorais. Para executar estas funções, plaquetas ativadas secretam uma fração solúvel de moléculas presentes em seus conteúdos granulares, que passam a interagir com outras moléculas e células adjacentes ao local da injúria, e com os próprios receptores plaquetários. No entanto, os mecanismos que regem a secreção em plaquetas ainda são pouco conhecidos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar comparativamente a agregação de plaquetas ativadas por dois diferentes agonistas enzimáticos: a trombina, um dos mais importantes agonistas plaquetários, e a PA-BJ, uma serinoproteinase do veneno da *Bothrops jararaca*, que assim como a trombina, ativa plaquetas através dos receptores PAR-1 e PAR-4. Neste estudo foram utilizadas abordagens de espectrometria de massas e de bioinformática para caracterizar alterações nos proteomas do sedimento de plaquetas não ativadas e ativadas, e também, para em paralelo analisar as frações proteicas e peptídicas presentes no sobrenadante (secretoma). Nas análises do sedimento de plaquetas ativadas tanto por PA-BJ quanto por trombina, foi verificada a menor abundância das proteínas PBP, PF4, proteína S, fibronectina, fator V e alfa-1 antitripsina, entre outras, e que também foram identificadas no sobrenadante (secretadas), e o aumento de abundância das proteínas ADAM-10, tromboxano A2 sintase, integrina α IIb, miosina-9 e fosforilase b, que estão diretamente envolvidas na ativação/agregação. Por outro lado, verificamos que na secreção plaquetária induzida por trombina ocorreu o aumento de abundância de proteínas envolvidas na regulação da formação do coágulo, como a proteína S, PAI1 e antitrombina III, sugerindo que nos eventos disparados pela trombina, exista uma regulação rigorosa de sua ação no local da injúria vascular. Já na secreção induzida por PA-BJ,

verificamos o aumento significativo das proteínas amiloide beta A4 e do fibrinogênio, envolvidas na ativação/agregação plaquetária, além da liberação e ativação de MMP1, indicando que esta metaloproteinase atue sinergicamente com a PA-BJ para a formação e estabilização do agregado plaquetário. Nas análises do secretoma de plaquetas não ativadas, identificamos pela primeira vez, a presença das proteínas catalase, anidrase carbônica, inibidor de elastase leucocitária e a glicoproteína rica em histidina, que estão envolvidas na inibição e regulação da ativação plaquetária. A análise da fração peptídica do sobrenadante plaquetário permitiu avaliar pela primeira vez o degradoma gerado no processo de agregação por PA-BJ e trombina. O conjunto de peptídeos resultante da ativação plaquetária pela PA-BJ é maior e mais complexo do que aquele gerado pela ação da trombina, sugerindo que as vias ativadas por ambas sejam diferenciais e sujeitas a diferentes controles de regulação da proteólise. Além disso, a degradação seletiva de algumas proteínas, e o conjunto de peptídeos gerados, poderiam ter um papel no controle da ativação e agregação plaquetárias. Em conjunto, nossos resultados demonstram que, embora a PA-BJ e a trombina induzam a agregação plaquetária mediada pelos receptores PAR-1 e PAR-4, estas enzimas induzem vias diferentes, alterando a secreção plaquetária para levar à agregação.

Palavras-chave: plaquetas, serinoproteinases, PA-BJ, trombina, espectrometria de massas, proteômica.

ABSTRACT

Oliveira, AK. **Comparative proteomic characterization of platelet aggregation induced by thrombin and PA-BJ, a serine proteinase from the venom of *Bothrops jararaca***. 2015. XX p. Ph.D. Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Platelets are anucleated cell fragments derived from megakaryocytes which are involved in many physiological and pathological processes, such as coagulation, inflammation, thrombosis, atherosclerosis, and tumor angiogenesis and metastasis. To perform these functions, activated platelets secrete a soluble fraction of molecules present in their granules, which then interact with other molecules and cells adjacent to the site of injury, and with platelet receptors. However, the mechanisms governing secretion in platelets are still poorly understood. Therefore, the objective of this study was to comparatively analyze the aggregation of platelets activated by two different enzyme agonists: thrombin, one of the most important platelet agonists, and PA-BJ, a serine proteinase from *Bothrops jararaca* venom, which, like thrombin, causes platelet aggregation mediated by the receptors PAR-1 and PAR-4. For this purpose, approaches of mass spectrometry and bioinformatics were used to characterize changes in the proteome of non-activated and activated platelets, and also to analyze proteins and peptides present in the supernatant of aggregated platelets (secretome). In the analysis of the sediment of platelets activated by PA-BJ and thrombin, various proteins, such as PBP, PF4, protein S, fibronectin, factor V, and alpha-1 antitrypsin, were detected in lower abundance while they were also identified as secreted, in the supernatant; likewise, proteins that are directly involved in the activation/aggregation, such as ADAM-10, thromboxane A2 synthase, integrin α IIb, myosin-9 and phosphorylase b were identified in higher abundance in platelets activated by PA-BJ and thrombin. Moreover, we found that in the thrombin-induced platelet secretion there was increased abundance of proteins involved in the regulation of blood clot formation, such as protein S, and antithrombin III PAI1, suggesting that in the events triggered by thrombin, there is strict regulation of its action at the site of vascular injury. In the analysis of the secretion induced by PA-BJ, we found a significant increase in amyloid beta A4 protein and fibrinogen, which are involved in the platelet activation/aggregation, in addition to the release and activation of MMP-1, indicating that this metalloproteinase acts synergistically with PA-BJ in the formation and stabilization of the platelet thrombus. In the analysis of the non-activated platelet secretome, we identified for the first time the presence of catalase, carbonic anhydrase, leukocyte elastase inhibitor and histidine-rich glycoprotein, which are involved in the inhibition and regulation of platelet activation. The analysis of the peptide fraction of the supernatant of activated platelets enabled

the characterization, for the first time, of the degradome generated in the process of aggregation by thrombin and PA-BJ. The resulting set of peptides generated upon platelet activation by PA-BJ is larger and more complex than that generated by the action of thrombin, suggesting that the pathways activated by both are differential and are subject to different controls of proteolysis. Furthermore, the selective degradation of some proteins, and the set of generated peptides could play a role in the control of platelet activation and aggregation. Taken together, our findings demonstrate that although both PA-BJ and thrombin induce platelet aggregation via PAR-1 and PAR-4, these enzymes activate different pathways to cause platelet secretion and aggregation.

Keywords: platelets, serine proteinases, PA-BJ, thrombin, mass spectrometry, proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas plaquetárias observadas em vênulas de rato.....	30
Figura 2. Ilustração esquemática das principais características estruturais das plaquetas.....	32
Figura 3. Estágios de alteração da forma da plaqueta.....	35
Figura 4. Modelo de adesão de plaquetas ao subendotélio vascular, seguido de ativação e agregação plaquetária.....	41
Figura 5. Ilustração esquemática de plaquetas e seus receptores e agonistas.....	43
Figura 6. Ativação de plaquetas induzida por colágeno.....	45
Figura 7. Esquema da ativação e sinalização induzidas pela clivagem de PAR-1 pela trombina.....	50
Figura 8. Modelo da estrutura tridimensional da PA-BJ, na representação <i>cartoon</i>	57
Figura 9. Ilustração dos métodos utilizados neste estudo para análise da atividade da PA-BJ e da trombina sobre plaquetas humanas.....	77
Figura 10. Perfil cromatográfico em coluna Mono S HR 5/5.....	91
Figura 11. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12% das frações obtidas da cromatografia na coluna Mono S HR 5/5.....	91
Figura 12 Perfil da recromatografia em coluna Mono S HR 5/5.....	93
Figura 13. Perfil eletroforético da PA-BJ isolada.....	93
Figura 14. Identificação da PA-BJ por espectrometria de massas.....	94
Figura 15. Curvas de agregação plaquetária em SPL.....	96
Figura 16. Esquema das estratégias analíticas utilizadas para a caracterização proteômica comparativa da agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina.....	99
Figura 17. Perfil eletroforético das proteínas do sedimento plaquetário.....	101
Figura 18. Proteínas identificadas com alterações significativas no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas.....	105

Figura 19. Algumas proteínas do sedimento plaquetário identificadas com alteração de abundância entre plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, ou não ativadas, após digestão tripsínica <i>in gel</i> e análise por LC-MS/MS.....	108
Figura 20. Reprodutibilidade dos experimentos de identificação de proteínas do sedimento plaquetário por digestão em solução com tripsina, fracionamento ortogonal e análise por LC-MS/MS.....	110
Figura 21. Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial no proteoma de plaquetas não ativadas ou ativadas por PA-BJ ou trombina, avaliado por digestão em solução com tripsina, fracionamento ortogonal e análise por LC-MS/MS	116
Figura 22. Perfil quantitativo com o destaque de algumas proteínas identificadas no proteoma de plaquetas não ativadas ou ativadas por PA-BJ ou trombina, avaliado por digestão em solução com tripsina, fracionamento ortogonal e análise por LC-MS/MS.....	117
Figura 23. Análise por <i>Western blot</i> das proteínas presentes no sedimento de plaquetas.....	122
Figura 24. Análise por <i>Western blot.</i> do receptor PAR-1 presente no sedimento de plaquetas.....	125
Figura 25. Algumas proteínas do sedimento plaquetário identificadas com alteração de abundância entre plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, ou não ativadas, após digestão tripsínica em solução, fracionamento ortogonal e análise por LC-MS/MS.....	127
Figura 26. Perfil eletroforético das proteínas do sobrenadante plaquetário.....	130
Figura 27. Reprodutibilidade dos experimentos de identificação de proteínas do sobrenadante de plaquetas por digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS.....	136
Figure 28. Proteínas identificadas com alterações significativas no proteoma do sobrenadante de plaquetas não ativadas.....	143
Figure 29. Proteínas identificadas com alterações de abundância estatisticamente significantes na fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas.....	145

Figura 30. Análise por <i>Western blot</i> das proteínas presentes na fração proteica do sobrenadante de plaquetas.....	148
Figura 31. Ensaio de inibição da agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina, com anti-MMP1.....	150
Figura 32. Análise por <i>Western blot</i> da presença da MMP1 em plaquetas.....	152
Figura 33. Análise da abundância do fibrinogênio na fração proteica do sobrenadante de plaquetas.....	153
Figura 34. Análise da abundância do fibrinogênio no proteoma do sedimento de plaquetas.....	154
Figura 35. Análise por <i>Western blot</i> da presença de fibrinogênio em plaquetas....	155
Figura 36. Algumas proteínas do sobrenadante plaquetário identificadas com alteração de abundância entre plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, ou não ativadas, após digestão tripsínica em solução, e análise por LC-MS/MS.....	159
Figura 37. Análise da atividade proteolítica em plaquetas.....	164
Figura 38. Sequência de aminoácidos das cadeias alfa e beta do fibrinogênio e dos fragmentos gerados pela sua degradação plaquetário no sobrenadante de plaquetas.....	168
Figura 39. Perfis de especificidade primária das proteinases que degradaram proteínas no sobrenadante de plaquetas não ativadas (A), ou ativadas com PA-BJ (B) ou trombina (C).....	174
Figura 40. Determinação da frequência de aminoácidos em sítios de clivagem verificados no peptidoma do sobrenadante de plaquetas ativadas utilizando a ferramenta IceLogo.....	175

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração enzimática e agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina.....	76
Tabela 2. Ensaio de indução da agregação plaquetária em SPL.....	92
Tabela 3. Proteínas com contagem espectral diferenciada, identificadas no proteoma do sedimento plaquetário pela análise das fatias de gel indicadas na Figura 16, por digestão <i>in gel</i> com tripsina e LC-MS/MS.....	103
Tabela 4. Identificação e quantificação das proteínas que apresentaram diferenças estatisticamente significantes no sedimento de plaquetas não ativadas ou ativadas por PA-BJ ou trombina, por digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS.....	112
Tabela 5. Identificação e quantificação das proteínas que apresentaram diferenças estatisticamente significantes na fração proteica do sobrenadante de plaquetas não ativadas ou ativadas por PA-BJ ou trombina, por digestão em solução com tripsina e LC-MS/MS.....	137
Tabela 6. Contagem de peptídeos e proteínas identificadas na fração peptídica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas.....	161
Tabela 7. Algumas proteínas identificadas como degradadas, pela análise da fração peptídica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas.....	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: acetonitrila

ADAM: disintegrina e metaloproteinase, (do inglês *A Disintegrin And Metalloproteinase*)

ADP: adenosina difosfato

ANOVA: análise de variância

APC: proteína C

ATP: adenosina trifosfato

BSA: soro albumina bovina

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

cDNA: DNA complementar

COFRADIC: do inglês *Combined Fractional Diagonal Chromatography*

cGMP: monofosfato cíclico de guanosina

CID – dissociação induzida por colisão, (do inglês *Collision Induced Dissociation*)

DAG: diacilglicerol

DDA – aquisição dependente de dados, (do inglês *Data Dependent Aquisition*)

DNA: ácido desoxirribonucléico

DTS/SR: sistema tubular denso/retículo sarcoplasmático

FDR – taxa de falso-positivo, (do inglês *False Discovery Rate*)

FPLC: do inglês *Fast Protein, Peptide and Polynucleotide Liquid Chromatography*

FTMS – espectrometria de massas com transformada de *Fourier*, (do inglês *Fourier Transform Mass Spectrometry*)

GDP: guanosina difosfato

GP: glicoproteína

GRKs: receptores de quinase acoplados à proteína G (do inglês *G protein-coupled Receptor Kinases*)

GTP: guanosina trifosfato

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid

HILIC: cromatografia líquida de interação hidrofílica, (do inglês *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*)

IEF: focalização isoeétrica, (do inglês *Isoelectric Focusing*)

IgG: imunoglobulina G

IP3: inositol-1,4,5-trifosfato

kDa: kilo Dalton

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LTQ: do inglês *Linear Trap Quadrupole*

m/z: razão massa/carga

MMPs – metaloproteinases de matriz, (do inglês *Matrix Metalloproteinases*)

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

MudPIT: do inglês *Multidimensional Protein Identification Technology*

NAPAP: do inglês *[Na-[(2-naphthylsulfonyl)-glycyl]-4-amidinophenylalanine piperidide]*

P2Y: receptores purinérgicos

PAR: receptor ativado por proteinase (do inglês *Protease-Activated Receptors*)

PBS: solução salina tamponada com fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PGE1: prostaglandina E1

PGH2: prostaglandina H2

pI: ponto isoelétrico

PI-3K: fosfoinosítideo 3 quinase

PICS: do inglês *Proteomic Identification of Protease Cleavage Sites*

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato;

PIs: fosfoinosítídeos

PLCy: fosfolipase Cy

PLC β : fosfolipase C β

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonila (do inglês *Phenylmethanesulfonyl Fluoride*)

PRP: plasma rico em plaquetas

Q-TOF – Quadrupolo –Tempo de Vão

SCX: cromatografia de troca catiônica, (do inglês *Strong Cation Exchange*)

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de SDS poliacrilamida (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

SPL: suspensão de plaquetas lavadas

SVSP: serinoproteinases de veneno de serpente, (do inglês *Snake Venom Serine Proteinases*)

TEMED: N, N, N', N', Tetrametil 1, 2 diaminometano

TFA: ácido trifluoroacético

TIC: cromatograma total de íons, (do inglês *Total Ion Current Chromatogram*)

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase (do inglês *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*)

TRAP: peptídeos ativadores do receptor de trombina (do inglês *Thrombin Receptor Activating Peptide*)

TRIS: Tris (hidroximetil)-aminometano

TxA2: tromboxano A2

vWF: fator de von Willebrand

SÍMBOLOS DOS AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Ácido Aspártico
E	Glu	Ácido Glutâmico
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina
W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1 Plaquetas: uma breve história.....	29
1.2 Plaquetas: morfologia e fisiologia.....	32
1.2.1 Citoesqueleto.....	33
1.2.2 Membrana plasmática.....	35
1.2.3 Organelas.....	37
1.3 Plaquetas: ativação e agregação.....	39
1.4 Trombina.....	47
1.5 Serinoproteinases do veneno de serpentes.....	51
1.6 PA-BJ.....	55
1.7 Análise proteômica de plaquetas.....	59
2. OBJETIVOS.....	64
2.1 Objetivos específicos.....	64
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.1 Quantificação de proteínas.....	65
3.2 Eletroforese de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida.....	65
3.3 Coloração de proteínas.....	66
3.4 Digestão tripsínica <i>in gel</i>	67
3.5 Digestão tripsínica em solução.....	69
3.6 Dessalinização com Sep-Pak Light tC18 (Waters).....	69
3.7 Preparo de colunas capilares C18 e C18/SCX/C18.....	70
3.8 Isolamento da PA-BJ.....	71
3.8.1 Precipitação das proteínas do veneno <i>B. jararaca</i>	71
3.8.2 Cromatografia em coluna HiPrep QXL 16/10	72
3.8.3 Cromatografia em coluna Mono S HR 5/5.....	72
3.8.4 Recromatografia em coluna Mono S HR 5/5.....	73

3.9	Obtenção de plaquetas humana.....	74
3.10	Ensaio de agregação plaquetária.....	75
3.11	Análise proteômica de plaquetas.....	76
3.12.	Análise do sedimento plaquetário (proteoma).....	78
3.12.1	Análise do sedimento plaquetário por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação de proteínas por LC-MS/MS	
3.12.2	Análise do sedimento plaquetário por digestão tripsínica em solução, cromatografia ortogonal e LC-MS/MS.....	78
3.13	Análise do sobrenadante plaquetário (secretoma).....	80
3.13.1	Análise da fração proteica do sobrenadante plaquetário por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação de proteínas por LC-MS/MS.....	81
3.13.2	Análise das frações proteica e peptídica por LC-MS/MS.....	82
3.14	Busca em banco de dados usando o programa Mascot.....	83
3.14.1	Processamento dos espéctros de massas (extensão *<i>pkf</i>).....	83
3.14.2	Processamento dos espéctros de massas (extensão *<i>mgf</i>).....	84
3.15	Busca em banco de dados usando o programa MaxQuant.....	85
3.16	Análise da especificidade proteolítica observada na fração peptídica do sobrenadante plaquetário.....	87
3.17	Ensaio de inibição da agregação plaquetária.....	88
3.18	<i>Western blot</i>.....	88
3.19	Zimografia de gelatina.....	89
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
4.1	Isolamento e Identificação da PA-BJ.....	90
4.2	Ensaio de agregação plaquetária em SPL.....	95
4.3	Delineamento experimental utilizado na caracterização proteômica comparativa da agregação plaquetária induzida pela trombina e pela PA-BJ.....	98
4.4	Análise do proteoma do sedimento plaquetário.....	99
4.4.1	Análise do proteoma do sedimento plaquetário por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação de proteínas por LC-MS/MS.....	100

4.4.2	Análise do sedimento plaquetário por digestão tripsínica em solução, cromatografia ortogonal e LC-MS/MS.....	108
4.5	Análise do sobrenadante plaquetário (secretoma).....	128
4.5.1	Análise da fração proteica do sobrenadante de plaquetas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação por espectrometria de massas.....	128
4.5.2	Análise da fração proteica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas.....	135
4.5.3	Análise da fração peptídica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas.....	160
5.	CONCLUSÕES.....	176
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	180
7.	ANEXOS.....	202
7.1	Tabelas Suplementares.....	202
7.2	Súmula curricular.....	203

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plaquetas: uma breve história

Foi pela primeira vez em 1842, que o médico sanitarista Alfred Donné, durante uma sessão sobre estudos microscópicos do sangue na “*Académie des Sciences*”, em Paris, declarou que existia no sangue glóbulos vermelhos, brancos e pequenos glóbulos, as globulinas (Donné, 1842; Osler, 1886). Era uma das primeiras evidências da existência das plaquetas no sangue. Mais tarde em seu livro “*Cours de Microscopie*” ele ampliaria sua descrição sobre estes elementos morfológicamente distintos, mas erroneamente assinalaria a origem como linfática (Donné, 1945; Tocantins, 1948).

À mesma época da declaração de Donné, Gustav Zimmermann descreveu pequenos corpúsculos que ele chamou de “*Elementarbläschen*” (vesícula elementar) (Zimmermann, 1846; 1860). Ele acreditava que estes corpúsculos eram precursores das células vermelhas com notável tendência a se aglomerar. Zimmermann foi um dos primeiros a utilizar anticoagulante em seus estudos citológicos e do sangue (Rollett, 1870; Tocantins, 1948). Em 1865, Schultze também observou pequenos elementos no sangue, que considerou como fragmentos de destruição de glóbulos brancos, chamando-os de proteoplasma (Schultze, 1865; Tocantins, 1948). Ele também observou que esses elementos tinham tendência em se agregar, principalmente na presença de fibras, o que o fez concluir que esta formação granular estaria envolvida nos processos iniciais da coagulação (Schultze, 1865).

Em 1874, William Osler também deu sua importante contribuição para a caracterização destes pequenos corpúsculos sanguíneos. Ele observou que as massas glomerulares observadas por Schutze resultavam da aglutinação de

pequenos corpúsculos que ocorreriam como unidades únicas na circulação, de cor pálida e circular, e que se agrupavam em processos de extravasamento sanguíneo (Osler, 1874). Os estudos de Osler foram realizados em vênulas de ratos recém-sacrificados, evitando artefatos ou subprodutos de uma mudança no sangue extravasado. Este tipo de ensaio permitiu verificar o momento em que as plaquetas começam alterar sua forma. As ilustrações feitas por Osler descrevem as distintas formas plaquetárias observadas por ele em seu trabalho de 1874 (Figura 1).

Figura 1. Formas plaquetárias observadas em vênulas de rato. A ilustração 5 (a-k), representa as distintas formas plaquetárias observadas em vênulas de ratos sacrificados após 3 horas. A ilustrações 6 e 7 representam, respectivamente, as formas observadas após 4 e 5 horas. A ilustração 8 representa os corpúsculos entre células vermelhas do sangue em vênulas de ratos recém sacrificados. A ilustração 9 evidencia alterações na forma das plaquetas após 3 horas de observação, com adição de soro e aumento da temperatura.

FONTE: Osler, 1874.

Mas foi em 1882 que o professor e médico patologista Giulio Bizzozero confirmou a existência de plaquetas como um componente do sangue, derivado de elementos morfológicos pré-existentes (Bizzozero, 1882). Bizzozero foi um dos primeiros a observar plaquetas circulantes em animais vivos. Em seu trabalho,

demonstrou que a parte branca dos trombos consistia quase que exclusivamente de plaquetas e não de leucócitos, como se acreditava à época, indicando o importante papel das plaquetas em processos trombóticos (Bizzozero, 1882). Ele observou que as plaquetas se acumulavam gradativamente em um ponto da parede do vaso injuriado ou da circulação obstruída. Segundo ele, as plaquetas tinham forma discoide, não apresentavam núcleo, mas possuíam membrana e uma matriz na qual haviam grânulos dispersos; e, em processos de injúria, alteravam sua aparência e se tornavam extremamente “pegajosas”, adesivas. Bizzozero publicou seu trabalho em diversos idiomas e chamou estes componentes de “*piastrine*” na Itália, de “*petit plaques*” e “*plaquettes*” na França, e “*Blutplättchen*” na Alemanha. Na língua inglesa o termo foi traduzido como “*blood-plaque*” e depois “*platelets*” (plaquetas), já no século XX.

Ironicamente, 12 anos antes de suas descobertas sobre plaquetas, Bizzozero, ao estudar células da medula óssea, foi o primeiro a identificar os megacariócitos sem saber que estes eram os precursores das plaquetas. Essa descoberta foi feita por James Homer Wright (1906), ao observar semelhanças na forma e na cor violeta dos grânulos contidos em plaquetas e em megacariócitos, utilizando um método de coloração por ele desenvolvido, a coloração de Wright. Ele evidenciou que as plaquetas surgem a partir de extensões de megacariócitos, os pseudópodes. Embora ainda exista pouco consenso, até os dias de hoje, sobre os mecanismos envolvidos na biogénese de plaquetas, a teoria clássica de Wright ainda é a mais aceita (Patel et al., 2005).

Desde as descrições de Alfred Donné até os dias de hoje, muito se avançou no conhecimento sobre as plaquetas, incluindo a caracterização de diversos receptores e agonistas, de mecanismos moleculares envolvidos na transdução de

sinais, e acima de tudo, o desenvolvimento de tratamentos antiplaquetários visando a prevenção primária e secundária de distúrbios ateroscleróticos.

1.2 Plaquetas: morfologia e fisiologia

Aproximadamente um trilhão de plaquetas circulam em um homem adulto, com um tempo médio de vida de 7 a 10 dias (Hartley, 2007). Plaquetas são fragmentos celulares de megacariócitos, de formato discoide, anucleados, com 1 a 3 μm de diâmetro, que retêm em seu citoplasma organelas como mitocôndrias, grânulos densos e grânulos alfa, além de estruturas como lisossomos, grânulos de glicogênio e regiões residuais de complexo de Golgi (Figura 2) (Smyth et al., 2010).

Figura 2. Ilustração esquemática das principais características estruturais das plaquetas.
FONTE: Adaptado de Smyth et al., 2010.

1.2.1 Citoesqueleto

A forma discoide das plaquetas é mantida por uma estrutura bem definida e altamente especializada, o citoesqueleto. Este sistema de escoras e travas moleculares preserva a forma e a integridade das plaquetas à medida que estas encontram forças elevadas de cisalhamento na circulação sanguínea (*high shear stress*). Os principais elementos estruturais do citoesqueleto são a proteína espectrina, associada à membrana, os microtúbulos e o citoesqueleto de actina (Smyth et al., 2010). A rede de filamentos de espectrina-actina faz interações com a filamina A (proteína de ligação à actina), um dímero não covalente de duas cadeias polipeptídicas idênticas com massa molecular de 280 kDa. A filamina fixa o complexo GPIb/IX/V aos filamentos de actina, contribuindo para a manutenção do formato discoide das plaquetas e para o alinhamento dos receptores na superfície plaquetária (Fox, 1993; Kiema et al., 2006; Smyth et al., 2010). A filamina também se liga aos domínios citoplasmáticos de subunidades da integrina $\beta 3$ mantendo o receptor em um estado de baixa afinidade.

Outras proteínas também compõem o citoesqueleto de espectrina-actina, como a talina, vinculina, proteínas relacionadas à distrofina, e várias isoenzimas da proteína quinase C (Fox, 1993; Fox et al., 1999). A talina, uma proteína constituinte do complexo de adesão focal que liga proteínas de membrana com proteínas do citoesqueleto, está associada às proteínas vinculina e actina. A talina também está envolvida na ativação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ por ligação do domínio FERM, presente em sua região N-terminal, com o domínio citoplasmático de $\beta 3$. A proteína kindlin-3 se liga ao domínio citoplasmático de $\beta 3$ facilitando a ligação da talina e convertendo o receptor para um estado de alta afinidade (Ma et al., 2008; Yates et al., 2012). A fosforilação da talina e sua clivagem pela calpaína são processos determinantes

para a ativação da integrina $\beta 3$ (Yan et al., 2001). A calpaína é uma cisteíno proteinase que é ativada quando ocorre aumento de cálcio na plaqueta (Fox et al., 1999).

Os microtúbulos são os maiores filamentos do citoesqueleto com 25 nm e 14 nm de diâmetro externo e interno, respectivamente, podendo chegar até vários micrometros de comprimento. Localizam-se no entorno das plaquetas, logo abaixo da membrana plasmática de forma circular (Figura 2). São formados por dímeros de $\alpha\beta$ tubulina que se polimerizam formando protofilamentos, e que por sua vez se combinam em estruturas em forma de tubo. Essas estruturas tem um importante papel na biossíntese de plaquetas e na manutenção do formato discoide das mesmas. (Sanabria et al., 2006; Smyth et al., 2010).

A actina é a proteína plaquetária mais abundante, com 2 milhões de moléculas expressas por plaqueta (Nachmias e Yoshida, 1988). Cerca de 40 % das subunidades de actina estão polimerizadas para formar de 2000 a 5000 filamentos lineares em plaquetas em repouso, enquanto que o restante é armazenado no citoplasma em complexo com a timosina- $\beta 4$ na proporção 1:1. Esta actina é convertida em filamentos durante a ativação plaquetária, os quais cruzam o interior da plaqueta, interligando vários pontos em uma rede citoplasmática rígida de proteínas, incluindo filamina, GPIb/IX e α -actinina, resultando no espreadimento das plaquetas. A primeira etapa deste processo ocorre com a interação agonista/receptor que ativa a fosfolipase $C\beta$, a qual hidrolisa fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2), ligado à membrana, em inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). Em seguida IP3 liga-se aos receptores do sistema tubular denso/retículo sarcoplasmático (DTS/SR), gerando um aumento da concentração de cálcio citosólico de 0,5 μM para 10 μM , e assim ativando a gelsolina, a qual fragmenta os

filamentos de actina aumentando o volume plaquetário (Hartwig et al., 1999). A segunda etapa deste processo é caracterizada pela formação de filopódios e lamelipódios, no qual o número de filamentos de actina é duplicado ao incorporar a actina do estoque actina-timosina $\beta 4$ (Figura 3). Este evento é mediado pela ativação do complexo de proteínas que se ligam a actina Arp 2/3, de fosfoinosítídeos ($PI_{3,4}P_2$, $PI_{4,5}P_2$ e $PI_{3,4,5}P_3$) e da profilina (Hartwig et al., 1999; Falet et al., 2002).

Figura 3. Estágios de alteração da forma da plaqueta. Em repouso as plaquetas mantêm sua forma discoide. Após ativação, devido ao aumento de cálcio intracelular, as plaquetas assumem uma forma mais arredondada. No último estágio, emitem filopódios e lamelipódios e apresentam forma espiculada, mediada por fosfoinosítídeos (PIs).

FONTE: Hartwig et al., 1999.

1.2.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática plaquetária tem estrutura trilaminar e é composta de uma bicamada de fosfolípidios em que o colesterol, glicolípidios e glicoproteínas estão incorporados. Devido à carga negativa da superfície, propiciada pela presença de resíduos de ácido siálico ligados a proteínas e lípidios, as plaquetas

movimentam-se num campo eléctrico no qual a repulsão eletrostática entre elas e com outras células do sangue previne a adesão e a agregação de plaquetas em repouso (Smyth et al., 2010).

Os fosfolípidios carregados negativamente, especialmente a fosfatidilserina (PS), são quase que exclusivamente encontrados no folheto interno da membrana. Estes fosfolípidos são capazes de acelerar várias etapas da coagulação, assim, seu deslocamento para a superfície externa da membrana só acontece nas etapas de ativação plaquetária, disparando as reações de coagulação que acontecem na superfície celular (Sims et al., 1989). As jangadas lipídicas (*rafts* lipídicos), também presentes na membrana plaquetária, são microdomínios lipídicos ricos em colesterol e esfingolipídios que estão envolvidos na sinalização intracelular e transporte de moléculas. O canal de entrada de cálcio hTRPC1 é associado as jangadas lipídicas, e após a ativação plaquetária, também contribui para a entrada de cálcio nas plaquetas (Brownlow et al., 2004). Outras proteínas como CD36, CD63, CD9, α IIb β 3, o transportador de glicose GLUT-3, GPVI, GPIb/IX/V, entre outras, estão presentes nos *rafts* lipídicos (Bodin et al., 2003).

Ainda na membrana, encontramos o sistema canalicular aberto que é composto por invaginações da membrana que se estendem ao longo das plaquetas (Figura 3). Estes canais permitem o acesso de proteínas ao meio externo através da fusão de grânulos à membrana plasmática ou a qualquer região do sistema canalicular aberto (White e Escolar, 1991). A fusão dos grânulos à membrana plasmática é regulada por um conjunto de proteínas integrais de membrana, chamado SNARE (do inglês *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein Receptor*). A fusão é realizada através da ligação de um SNARE do grânulo ou vesícula (v-SNARE), com um complexo heterotrimérico de proteínas na

membrana alvo (t-SNARE) (Weber et al., 1998; Sudhof e Rothman, 2009). Em plaquetas encontram-se quatro v-SNAREs: as VAMPs 2, 3, 7 e 8 (do inglês *Vesicle-Associated Membrane Protein*), sendo que VAMP-3 e VAMP-8 são importantes para a secreção de plaquetas, além de membros de duas famílias de t-SNAREs, as sintaxinas 2, 4, 7 e 11, e SNAP 23, 25 e 29 (do inglês *Soluble N-Ethylmaleimide Sensitive Factor Attachment Protein*) (Lemons et al., 2000; Flaumenhaft, 2003). Os SNAREs são regulados por segundos mensageiros como DAG e cálcio, e também pela família de proteínas Munc (do inglês *Mammalian Uncoordinated*), incluindo Munc18 (a, b, e c) e Munc13-4 (Houng et al., 2003; Shirakawa et al., 2004).

1.2.3 Organelas

Grânulos densos são organelas muito pequenas, medindo de 20 a 30 nm de diâmetro, e estão presentes em um número de 3-9 por plaqueta. Contêm moléculas muito pequenas como adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e íons como cálcio, fosfato e magnésio. Durante a ativação plaquetária, a membrana dos grânulos densos se funde a membrana plasmática e o conteúdo dos grânulos é liberado no ambiente extracelular. Os constituintes dos grânulos densos contribuem para recrutamento de outras plaquetas e na hemostasia (McNicol e Israels, 1999). A serotonina, por exemplo, tem importante papel na vasoconstrição local, e na coagulação (Lesurtel et al., 2006). O ADP está envolvido principalmente na ativação plaquetária, sendo responsável pela maior parte dos efeitos de feedback positivos na agregação plaquetária (Kunapuli, 1998; Smyth et al., 2010).

Grânulos alfa são os mais abundantes, com cerca de 80 unidades por plaqueta; são maiores que os grânulos densos (200 a 500 nm) e secretam uma variedade de proteínas envolvidas no recrutamento e ativação de outras plaquetas,

proteínas adesivas, fatores de coagulação, inibidores de proteinase, quimiocinas e proteínas de regulação da angiogênese (Harrison e Cramer, 1993; King e Reed, 2002). Muitas destas proteínas são sintetizadas especificamente pelos megacariócitos (como fator de von Willebrand e trombospondina-1), enquanto outras como albumina, fibrinogênio e fator V, são captadas do plasma (Louache et al., 1991; Camire et al. 1998). Análises proteômicas de proteínas secretadas após ativação plaquetária identificaram mais de 300 proteínas, a maioria originada de grânulos alfa (Coppinger et al., 2004; McRedmond et al., 2004; Maynard et al., 2007).

Os lisossomos, encontrados em número reduzido nas plaquetas, possuem tamanho entre 180-250 nm de diâmetro e são compostos por proteinases como catepsinas, elastase e collagenases, além de glicosidases e heparinases (Holmsen, 1993; Ciferri et al., 2000). A liberação do conteúdo de lisossomos é mais lenta do que de grânulos alfa e densos, necessitando de agonistas mais potentes para induzir a secreção (Ciferri et al., 2000). As proteínas presentes nas membranas lisossomais, como as glicoproteínas associadas à membrana do lisossomo (LAMP-1, LAMP-2 e LAMP-3), quando identificadas na membrana plaquetária indicam que ocorreu ativação plaquetária intensa (Nieuwenhuis et al., 1987). Embora o papel funcional dos lisossomos seja pouco conhecido, há indícios de que contribua com a regulação da formação de trombo e a remodelação da matriz extracelular (Castellot et al., 1982; Ciferri et al., 2000).

Mitocôndrias são encontradas em número de 4-7 por plaqueta, e estão envolvidas no metabolismo de energia oxidativa (Holmsen, 1993). A perda do potencial de membrana mitocondrial está associada à maior susceptibilidade de plaquetas à agregação (Remenyi et al., 2005).

Ribossomos estão presentes em número relativamente baixo em plaquetas, como um resquício do aparelho de Golgi derivado dos megacariócitos. Embora o número de transcritos funcionais seja baixo, muitos trabalhos de transcriptômica tem descrito um aumento da síntese proteica durante a ativação plaquetária (Gnatenko et al., 2003; McRedmond et al., 2004; Weyrich et al., 2009). Proteínas como TIMP2 e IL-1 β , por exemplo, são sintetizadas durante a ativação plaquetária (Lindermann et al., 2001; Schwertz et al., 2006; Cecchetti et al., 2011).

1.3 Plaquetas: ativação e agregação

Em condições fisiológicas, as plaquetas circulam preferencialmente na periferia do vaso, sem aderir ao endotélio ou agregarem entre si. Em situações de injúria vascular, seja mecânica ou fisiológica, a matriz subendotelial é exposta e uma série coordenada de eventos é iniciada na tentativa de conter a perda de sangue e manter o equilíbrio homeostático. A adesão das plaquetas à matriz extracelular é a etapa inicial da hemostasia primária, começando pelo rolamento, seguido de adesão e espreadimento sobre a matriz de colágeno, e formando uma monocamada de plaquetas ativadas sobre a lesão (Brass, 2003; Davi e Patrono 2007; Varga-Szabo et al., 2008). A adesão plaquetária é mediada pela interação do complexo GPIb/IX/V com o domínio A1 do fator de von Willebrand (vWF), e da glicoproteína GPVI e a integrina $\alpha 2\beta 1$ com o colágeno (Figuras 4 e 6) (Cruz et al., 2005; Varga-Szabo et al., 2008). A interação entre vWF e GPIb/IX/V é necessária na etapa inicial da adesão e em condições de intenso cisalhamento (*high shear*) observados em artérias, arteríolas e artérias estenosadas (Savage et al., 1996).

O vWF é uma proteína multimérica, sintetizado pelas células endoteliais e megacariócitos; e é encontrado em corpos de Weibel-Palade de células endoteliais,

grânulos alfa de plaquetas, na forma solúvel no plasma, e também na matriz subendotelial (Ruggeri, 2007). Em condições normais, o vWF solúvel não interage com GPIb/IX/V, entretanto, quando imobilizado ao colágeno no local da injúria vascular, torna-se uma proteína extremamente adesiva. Além disso, durante a injúria vascular, o recém-secretado vWF de células endoteliais, também chamado de ULVWF (do inglês *Ultra Large vWF*), é maior e mais adesivo que o vWF presente no plasma, que já sofreu hidrólise pela metaloproteinase ADAMTS-13 (Sporn et al., 1986; Soejima et al., 2001; Dong, 2005). As moléculas protrombóticas de ULVWF aderem à superfície de células endoteliais e formam grandes estruturas semelhantes a cordas, facilitando a adesão plaquetária, enquanto que o vWF plasmático é menor e menos reativo (Moake et al., 1986; Dong, 2005).

A ativação plaquetária e o recrutamento de novas plaquetas no local da injúria são estimulados pelos produtos da secreção plaquetária e também pelos fatores protrombóticos locais, resultando na formação de trombo hemostático. A ativação plaquetária pode ser disparada por várias vias incluindo, o colágeno, ADP, tromboxano A₂, epinefrina, serotonina, trombina, entre outros. A Figura 5 ilustra os principais agonistas e seus receptores em plaquetas.

Os diferentes agonistas podem ser secretados, sintetizados ou formados no local da injúria vascular. Podem ser classificados como agonistas fortes ou fracos dependendo da secreção induzida, se a ativação é completa, ou se é iniciada sem aumentar a agregação plaquetária. Além disso, baixas doses de agonistas fortes podem se comportar como agonistas fracos (Coller, 1991; Smyth et al., 2010). Assim, os diferentes fenômenos observados durante a ativação plaquetária são resultado da capacidade intrínseca de cada agonista, da sua concentração no local da injúria e também dos efeitos sinérgicos da combinação de mais de um agonista.

Figura 4. Modelo de adesão de plaquetas ao subendotélio vascular, seguido de ativação e agregação plaquetária. Durante o evento de injúria vascular o contato inicial entre a matriz extracelular e as plaquetas é mediado pela interação entre a glicoproteína GPIIb e o vWF. Em seguida as plaquetas aderem ao colágeno através dos receptores GPVI e $\alpha2\beta1$, iniciando a ativação, a transição das integrinas para um estado de alta afinidade e a secreção de ativadores autócrinos como ADP, ATP e TxA2. A alteração conformacional de $\alphaIIb\beta3$ habilita a ligação de fibrinogênio, iniciando a agregação plaquetária. A trombina, gerada via ativação da cascata da coagulação, ativa os receptores PAR-1 e PAR-4. A secreção de ADP, ATP, e TxA2 amplifica a ativação de integrinas em plaquetas aderentes e induz a ativação de plaquetas adicionais.

PAR-1 e PAR-4, receptor ativado por proteinase 1 e 4; Gi, Gq e Gz, subunidades da proteína G; AC, adenilato ciclase; TxA2 tromboxano A2; TP α , receptor de tromboxano α ; $\alpha2A$, receptor adrenérgico; P2Y1, P2Y12 e P2X1, receptores purinérgicos.

FONTE: <http://www.diapensia.se>

Os agonistas plaquetários ligam-se a receptores de duas categorias: receptores acoplados à proteína G e receptores que podem iniciar a fosforilação em proteínas alvo. Em ambos os casos, uma sequência de eventos de sinalização leva ao aumento de cálcio intracelular, alteração da forma da plaqueta, secreção de grânulos e ativação da integrina $\alphaIIb\beta3$, culminando na agregação de plaquetas (Figura 4).

O aumento no cálcio intracelular em plaquetas ocorre a partir da liberação de estoques intracelulares e do influxo de cálcio através da membrana plasmática (Varga-Szabo et al., 2008). Receptores acoplados à proteína G são ativados quando a subunidade $G\alpha$ troca GDP por GTP e se dissocia do complexo β/γ . Esses receptores ativados por ADP, tromboxano A2 (TxA2) e trombina, ativam a fosfolipase $C\beta$ (PLC β), enquanto que receptores como GPVI preferencialmente ativam a fosfolipase $C\gamma$ (PLC γ). A ativação de PLC β ou PLC γ resulta na hidrólise de fosfoinosítídeos gerando dois importantes produtos: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). DAG medeia o influxo de cálcio enquanto IP3 libera cálcio das reservas intracelulares (Varga-Szabo et al., 2008). Além disso, o influxo de cálcio pode ser induzido diretamente por certos agonistas, tais como ATP, que se ligam ao receptor purinérgico P2X1, um canal iônico ativado por ligante (Murugappan et al., 2004).

O aumento da concentração de cálcio resulta em alterações estruturais nas plaquetas. Estruturalmente é alterada a forma, de discoide para espiculada, devido à ativação de enzimas e proteínas envolvidas na reorganização do citoesqueleto (Fox, 2001). Os grânulos plaquetários são centralizados e os seus conteúdos são liberados no lúmen do sistema canalicular aberto e daí secretados para o ambiente extracelular. O aumento de cálcio ativa a fosfolipase A2 que libera ácido araquidônico a partir de fosfolipídios da membrana. O ácido araquidônico é convertido em um produto intermediário, a prostaglandina H2 (PGH2), pela enzima ciclooxigenase 1 (COX-1). PGH2 é, por sua vez, metabolizada pela enzima tromboxano sintase gerando tromboxano A2 (TxA2), um potente ativador plaquetário, (Gryglewski, 2008; Nakahata, 2008).

A formação de DAG e a presença de cálcio também participam da ativação da proteína quinase C (PKC). PKC induz a secreção de ADP pelos grânulos densos, fato que potencializa a ação de outros agonistas (Murphy e Westwick, 1992).

Figura 5. Ilustração esquemática de plaquetas e seus receptores e agonistas. Agonistas solúveis estimulam os receptores de plaquetas que levam à sinalização intracelular mediada pelas proteínas indicadas. A sinalização mediada por receptores acoplados à proteína G envolve as proteínas correspondentes e ativam a fosfolipase Cβ (PLCβ). A ativação de plaquetas via receptores GPVI e CLEC-2 ativam a fosfolipase Cγ2 (PLCγ2). A ativação de PLCβ e PLCγ2 resulta na hidrólise de fosfoinosítídeos gerando DAG e IP3.

PAR-1 e PAR-4, receptor ativado por proteínase 1 e 4; G_{12/13}, G_i, G_q e G_z, subunidades da proteína G; CLEC-2, receptor de lectina tipo C; TF, fator tecidual; TxA₂, tromboxano A₂; TP, receptor de TxA₂; α_{2A}, receptor adrenérgico; P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁, receptores purinérgicos; LAT, proteína ligadora para ativação células T; PI3K, AC, adenilato ciclase; fosfoinosítideo-3-quinase; PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PIP₃, fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato; IP₃, inositol-1,4,5-trisfosfato; DAG, diacilglicerol; Src, Syk, Fyn, Lyn, SFK, proteínas tirosina quinases.

FONTE: Stegner e Nieswandt, 2011.

O ADP interage com a família de receptores purinérgicos P2Y (P2Y1 e P2Y12) que são acoplados à proteínas G. O receptor P2Y1 é acoplado à subunidade Gq da proteína G, que mobiliza o cálcio intracelular mediando a alteração da forma das plaquetas e a agregação. O receptor P2Y12 está acoplado à subunidade Gi, responsável pela inibição da adenilato ciclase, inibindo a produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (Murugappan e Kunapuli, 2006). O cAMP é um potente inibidor da ativação plaquetária e por isso, o receptor P2Y12 é alvo de agentes antitrombóticos, tais como ticlopidina, clopidogrel e prasugrel (Price, 2009). A importância do ADP não se limita só à sua capacidade de induzir a agregação plaquetária independente de outros agonistas, já que também contribui significativamente com o aumento da agregação plaquetária induzida por outros agonistas.

Diferentemente da sinalização disparada por agonistas solúveis, a sinalização intracelular em resposta à ativação por colágeno é mediada por pelo menos três receptores: GPVI, GPIb, e $\alpha 2\beta 1$ (Nuytens et al., 2011; Abrams e Brass, 2013). GPVI pertence à superfamília das imunoglobulinas e sua capacidade de gerar sinais depende essencialmente da sua associação constitutiva com uma segunda molécula, o receptor Fc cadeia- γ (FcR γ) (Poole et al., 1997; Clemetson et al., 1999). A ligação do colágeno a GPVI induz a fosforilação de FcR γ no resíduo de tirosina presente no *motif* ITAM (do inglês *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) por proteínas quinases da família Src (Poole et al., 1997; Ezumi et al., 1998). ITAM fosforilado permite a ligação e ativação de Syk (do inglês *Spleen Tyrosine Kinase*) que por sua vez, fosforila um complexo de proteínas sinalizadoras como LAT (do inglês *Linker for T-cell Activation*) e SLP76 (do inglês *Src homology 2- containing Leukocyte Protein 76*), recrutando Btk (do inglês *Bruton's tyrosine kinase*), e

consequentemente ativando PI3-quinase que induz a fosforilação e ativação da fosfolipase C γ (PLC γ) (Gibbins et al., 1998; Kim et al., 2013). A ativação de PLC γ gera os segundos mensageiros IP₃ e DAG. IP₃ aumenta as concentrações de cálcio citoplasmático através da abertura dos canais de cálcio do sistema tubular denso (Varga-Szabo et al., 2008). DAG e cálcio ativam a proteína quinase C (PKC), regulando os eventos de fosforilação de serina/treonina necessários para a ativação plaquetária. Esses eventos de fosforilação ativam a integrina α IIb β 3, habilitando sua ligação ao fibrinogênio. A Figura 6 resume as etapas da ativação plaquetária induzida por colágeno.

Figura 6. Ativação de plaquetas induzida por colágeno. As plaquetas ativadas utilizam diferentes complexos moleculares para sustentar a ativação induzida por colágeno, incluindo a ligação a GPIIb/IIIa mediada por vWF e a interação do complexo colágeno, GPIV, FcR γ e α 2 β 1. A ativação de GPIV resulta na fosforilação de resíduos de tirosina no domínio citoplasmático de FcR γ , seguido da ligação e ativação da proteína tirosina quinase Syk. A subsequente ativação de PLC γ resulta na hidrólise de fosfoinosítídeos gerando DAG e IP₃, secreção de ADP e TxA₂.

PLA₂, Fosfolipase A₂; COX-1, cicloxigenase 1; PG, prostaglandina; LAT, proteína ligadora para ativação células T; PKC, proteína quinase C; PIP₂, fosfatidilinositol-4, 5-bisfosfato; TxA₂, tromboxano A₂; PIP₂, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; IP₃, inositol-1,4,5-trisfosfato; DAG, diacilglicerol; Syk, Btk, SLP76, SFKs, proteínas tirosina quinases.

FONTE: Abrams e Brass, 2013.

A integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, também chamada de glicoproteína GPIIb/IIIa, receptor de fibrinogênio ou CD41/CD61, é a principal molécula de adesão envolvida na agregação plaquetária. Esta integrina está presente em grande número em plaquetas em repouso, com cerca de 80.000 a 100.000 cópias na superfície plaquetária e de 20.000 a 40.000 cópias na membrana dos grânulos alfa e densos, sendo que, durante a ativação plaquetária as integrinas presentes nos grânulos são transportadas para a membrana plasmática, aumentando sua disponibilidade durante a agregação (Plow e Ginsberg, 1989; Wagner et al., 1996; Niiya et al., 1987).

Na agregação plaquetária o principal ligante de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ é o fibrinogênio que possui a sequência RGD, que medeia a ligação à integrina. O fibrinogênio possui duas sequências RGD localizadas nas posições 95-97 e 572-574 da cadeia alfa, que interage com a subunidade β_3 , e também, a sequência peptídica HHLGGAKQAGDV na região C-terminal da cadeia gama, que faz a ligação com as plaquetas através da subunidade αIIb (Farrell et al., 1992; Hantgan et al., 2001). A ativação de uma ou mais isoenzimas de PKC induzem a alteração na conformação de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ tornando o receptor com alta afinidade pelo fibrinogênio (Plow e Ginsberg, 1989).

Além do fibrinogênio, outras proteínas que também possuem a sequência RGD podem se ligar a $\alpha\text{IIb}\beta_3$ durante a ativação plaquetária, entre elas fibronectina, vWF, trombospondina, vitronectina e protrombina (Plow et al., 1985; Byzova e Plow, 1997). A ligação de todas essas proteínas pode ser inibida pela presença do peptídeo sintético RGDS, indicando um requisito comum para a interação entre a sequência RGD na proteína e o sítio de ligação RGD em $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Haverstick et al., 1985).

Outra importante molécula de adesão é a P-selectina (CD62P), que está presente na superfície de plaquetas ativadas. A P-selectina interage com o receptor PSGL-1 na superfície de leucócitos e de monócitos, induzindo o rolamento de leucócitos e a ativação do fator tecidual, aumentando assim a eficiência de produção de trombina e consequentemente de fibrina (Yeo et al., 1994; Goel e Diamond, 2001).

1.4 Trombina

A trombina é a principal proteinase efetora da cascata de coagulação e é um dos mais potentes ativadores plaquetários. A trombina é uma serinoproteinase produzida a partir da protrombina, um zimogênio inativo que circula no plasma. Durante a injúria vascular, uma série de reações de conversão de zimogênios ocorre quando fatores da coagulação circulantes entram em contato com o fator tecidual. O fator tecidual (fator III ou tromboplastina) é uma proteína integral de membrana que funciona como um cofator obrigatório na ativação do fator X pelo fator VIIa. O fator Xa em conjunto com o fator Va converte a protrombina em trombina em uma reação dependente de cálcio (Ofuso et al., 1996). A conversão de zimogênios atua tanto na amplificação da produção de trombina quanto na regulação da sua produção, assim, sua concentração é limitada para atuar perto do local onde é produzida. A trombina tem curta duração na circulação e, no contexto fisiológico, suas ações tendem a cessar a sua produção (Esmon et al., 1999; Coughlin, 2000).

A proteína C (APC), uma serinoproteinase dependente de vitamina K, é um dos principais inibidores da atividade da trombina. APC é ativada ao se ligar à trombina e à trombomodulina, que está presente na superfície de células endoteliais. A forma ativa da proteína C, juntamente com a proteína S, outra serinoproteinase

dependente de vitamina K, degrada os fatores Va e VIIIa, inibindo a formação de trombina (Lu et al., 1996). Outro potente inibidor da trombina é a antitrombina-III, uma serpina que inibe igualmente os fatores IXa, Xa e XIa, em um processo que é acelerado pela presença da heparina (Olson e Bjork, 1992).

Em um dos estágios finais da coagulação, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina, que se polimeriza para formar a matriz fibrosa do coágulo sanguíneo. A trombina cliva o fibrinogênio entre as ligações Arg16 e Gly17 na cadeia alfa e entre as ligações Arg14 e Gly15 na cadeia beta, gerando os fibrinopeptídeos A e B (Scheraga e Laskowski, 1957).

Outro importante papel da trombina é a ativação das plaquetas em um processo mediado pelos receptores PAR-1 e PAR-4. A trombina induz a alteração da forma das plaquetas, a secreção de ativadores autócrinos como ADP, serotonina e tromboxano A2, assim como quimiocinas, fatores de crescimento, entre outras moléculas envolvidas na formação e regulação do trombo plaquetário.

Os receptores do tipo PAR (do inglês *Protease Activated Receptor*) são uma família de receptores acoplados a proteína-G que possuem um elegante mecanismo de ativação dependente de proteinase, no qual um novo N-terminal é revelado (*tethered ligand*), ativando o receptor que passa a disparar uma série de sinais intracelulares (Vu et al., 1991). A família PAR é formada por quatro membros: PAR-1, PAR-3 e PAR-4 que podem ser ativados pela trombina, mas também por plasmina, catepsina G, MMP1, entre outras proteinases, e PAR-2, que pode ser ativado por tripsina, triptase, fator VIIa e Xa, mas não por trombina (Vu et al., 1991; Coughlin, 2000; O'Brien et al., 2001; Alberelli e Candia, 2014). Estes receptores também são ativados por peptídeos sintéticos que contêm a sequência do *tethered ligand*, presente nos respectivos receptores humanos: SFLLRN (PAR-1), SLIGKV

(PAR-2), TFRGAP (PAR-3), GYPGQV (PAR-4). Esses peptídeos são conhecidos como peptídeos ativadores do receptor de trombina, ou TRAP (do inglês *Thrombin Receptor Activating Peptide*), e mimetizam os efeitos gerados pela clivagem do receptor PAR (Gerszten et al., 1994; Kuiopulos et al., 1999). Além da membrana plaquetária, esta família de receptores também está presente na membrana de células endoteliais, fibroblastos, monócitos, células do músculo liso, e algumas linhagens de célula tumorais (Déry et al., 1998).

A trombina se liga ao exodomínio de PAR-1 na região N-terminal e hidrolisa as ligações Arg41-Ser42, gerando uma nova sequência N-terminal, que é capaz de disparar uma série de reações intracelulares de sinalização (Vu et al., 1991). O receptor PAR-1 é acoplado às subunidades $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ e $G\beta\gamma$ (Figura 7) da proteína G. A subunidade $G\alpha_{12/13}$ se liga a RhoGEFs (GEF, do inglês *Guanine-nucleotide Exchange Factors*) que ativa proteínas G menores, como Rho. $G\alpha_q$ ativa a fosfolipase $C\beta$ desencadeando a hidrólise de fosfoinosítídeos, resultando na formação de DAG e IP₃, na mobilização de cálcio e na ativação de PKC e MAP quinase (*Mitogen-Activated Protein*), entre outras proteínas que medeiam respostas celulares, que vão desde a secreção de grânulos, ativação de integrina e agregação em plaquetas (Offermanns et al., 1997). $G\beta\gamma$ ativa PI-3-quinase (PI-3K) e receptores de quinase acoplados à proteína G. PI-3K modifica o folheto interno da membrana plasmática facilitando uma série de reações de sinalização (Leevers et al., 1999). Por fim, a subunidade $G\alpha_i$ inibe a adenilato ciclase inibindo a formação de cAMP (Murugappan e Kunapuli, 2006).

Figura 7. Esquema da ativação e sinalização induzidas pela clivagem de PAR-1 pela trombina. A trombina hidrolisa o exodomínio de PAR-1 gerando uma nova sequência N-terminal ativando o receptor. Uma vez ativado, PAR-1 sofre alterações conformacionais facilitando o acoplamento à proteína G. A subunidade G α 12/13 se liga a RhoGEFs que ativa proteínas G menores, como Rho e induz alterações na morfologia plaquetária e também ativa o fator de transcrição SER (*Serum response factor*). G α q ativa a fosfolipase C β desencadeando a hidrólise de fosfoinosítídeos, gerando DAG e IP₃, aumentando a mobilização de cálcio e ativando PKC e MAP quinase entre outras proteínas que medeiam respostas celulares, que vão desde a secreção de grânulos, ativação de integrina, agregação em plaquetas e respostas transcricionais em células endoteliais e mesenquimais. G α i/z inibe a adenilato ciclase inibindo a formação de cAMP. Por fim, a subunidade G β γ ativa PI-3-quinase (PI-3K), receptores de quinase acoplados à proteína G (GRKs) e canais de K⁺, que modificam o folheto interno da membrana plasmática facilitando as interações moleculares.
FONTE: Adaptado de Coughlin, 2000; Angiolillo et al., 2010.

Embora os receptores PAR-1 e PAR-4 estejam presentes na membrana plaquetária, somente PAR-1 é ativado em baixas concentrações de trombina, enquanto que a ativação de PAR-4 depende de concentrações mais altas (Kahn et al., 1999). Esta diferença de ativação entre os dois receptores pode ser explicada pela ligação da trombina ao domínio tipo hirudina, presente no exodomínio de PAR-1. Este domínio interage com exossítio I da trombina, favorecendo a ação da enzima em baixas concentrações (Gandhi et al., 2008, 2010).

Além da geração de fibrina e da indução da agregação plaquetária, a trombina está envolvida em várias outras atividades biológicas, como a formação do coágulo, ativando proteínas pró-coagulantes como os fatores V, VIII, XII e APC; na resposta inflamatória (Esmon, 2004); na metástase e angiogênese tumoral (Ruf e Mueller, 2006; Snyder e Kessler, 2008); e na ativação de células endoteliais, que também alteram sua forma, aumentado a permeabilidade vascular, e assim facilitando a diapedese de leucócitos e migração de citocinas (Lum e Malik, 1994).

1.5 Serinoproteinases do veneno de serpentes

As toxinas de venenos de serpentes, especialmente metaloproteinases e serinoproteinases, compartilham características estruturais e funcionais semelhantes aos seus homólogos de mamíferos, que atuam no sistema hemostático provocando vários efeitos patológicos observados no processo de envenenamento (Serrano, 2013). As serinoproteinases do veneno de serpentes, SVSPs (do inglês *Snake Venom Serine proteinases*), formam uma grande família de enzimas proteolíticas que interferem especificamente nos mecanismos hemostáticos, com uma notável resistência à inibição por serpinas (Serrano e Maroun, 2005; Parry et al., 1998).

AS SVSPs são classificadas no clan PA, subclan PA(S), família S1 da quimotripsina (Barrett e Rawlings, 1995). Assim como a tripsina, essas enzimas clivam especificamente ligações peptídicas contendo Arg ou Lys na posição P1, mas a especificidade pelo substrato também é fortemente influenciada pelos resíduos de aminoácidos adjacentes à ligação a ser clivada (Serrano e Maroun, 2005). Além disso, essas enzimas apresentam “*fold*” semelhante à serinoproteinases do tipo tripsina, com o sítio ativo localizado na fenda da junção dos dois barris beta (Parry et al., 1998). O mecanismo catalítico das SVSPs é definido pela presença da tríade

catalítica composta pelos resíduos Ser195, His57 e Asp102 que formam o sítio ativo (Bode et al., 1989). O mecanismo catalítico envolve principalmente um resíduo de serina reativo (Ser195), que desempenha um papel chave na formação do complexo transitório acil-enzima, que é estabilizado pela presença dos resíduos His57 e Asp102 (Barrett e Rawlings, 1995).

Em contraste com a tripsina, que apresenta atividade proteolítica sobre vários substratos, as enzimas de venenos de serpentes são caracterizadas pela alta especificidade, e em muitos aspectos são funcionalmente similares às enzimas endógenas do sistema hemostático humano, interferindo na manutenção e regulação da cascata de coagulação sanguínea, ativando proteínas envolvidas na coagulação, fibrinólise, no sistema calicreína-cinina, e na agregação plaquetária (Serrano e Maroun, 2005).

Por essa razão algumas enzimas de venenos têm sido utilizadas como reagentes em ensaios de diagnóstico ou como ferramentas na caracterização de deficiências hemostáticas, enquanto outras têm o potencial de se tornarem agentes terapêuticos e são utilizadas em triagens clínicas de terapias trombolíticas intravenosas, em casos de acidente vascular cerebral, e como selantes biológicos (Stocker, 1988; Hutton e Warrel, 1993; Lefebvre et al., 2001; Bernstein e Hemphill, 2001; Sherman, 2002; Madhavan et al., 2002; Serrano e Maroun, 2005; Fox e Serrano, 2007).

Dessa forma, as serinoproteinases de venenos de serpente se apresentam como ótimas ferramentas para estudos das relações entre estrutura e função da trombina, e podem ser utilizadas como base para o desenvolvimento de agentes antitrombóticos que poderiam distinguir entre as atividades pró-agregante, pró-coagulante e anticoagulante, desempenhadas pela trombina. De fato, em contraste

com a trombina que é uma enzima multifuncional (Bode et al., 1992; Stubbs e Bode, 1993), as enzimas de venenos de serpentes são classificadas como tipo-trombina e apresentam geralmente apenas uma das atividades exercida pela trombina. Elas atuam especificamente pela clivagem do fibrinogênio (Stocker, 1978; Nishida et al., 1994), ou ativando o fator V (Tokunaga et al., 1988), como ativadores da proteína C (Stocker et al., 1987), ou como ativadores plaquetários específicos (Niewiarowski et al., 1979; Serrano et al., 1995).

Atualmente existem algumas toxinas e drogas cuja estrutura foi baseada em toxinas, em uso ou em desenvolvimento para os ensaios clínicos em vários países. Entre elas destacam-se o ativador de proteína C, Protac®, uma serinoproteinase isolada do veneno de *Agkistrodon contortrix*, mas também encontrada no veneno de subespécies de *Agkistrodon bilineatus* (Stocker et al., 1987; Nakagaki et al., 1990). Esta proteinase age sobre a proteína C sem a necessidade de associação com a trombomodulina, como ocorre com a trombina (Stocker et al., 1987). Atualmente Protac® é utilizado como reagente em ensaios de dosagem da proteína C no plasma.

A batroxobina é uma serinoproteinase que apresenta efeito anticoagulante, já que hidrolisa a cadeia alfa do fibrinogênio entre as ligações Arg16-Gly17 liberando o fibrinopeptídeo A e assim induz a formação de uma rede de fibrina mais frouxa (Stocker e Barlow, 1976), e que consome fibrinogênio, em um processo que resulta na diminuição da coagulação. A batroxobina, isolada do veneno da serpente *B. atrox*, induz a formação de fibrina por um período de tempo prolongado, sem sofrer inibição pela heparina, e por isso é utilizada como reagente em ensaios para determinar a concentração de fibrinogênio no plasma e para testar o tempo de retração do coágulo (Reptilase® Clot retraction Test) (Funk et al., 1971). A

preparação de batroxobina derivada do veneno de *B. moojeni* é usada como um agente desfibrinante (Defibrase®), induzindo a fibrinólise plasmática ao ativar o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) a partir do endotélio, e reduzindo assim a viscosidade do sangue e a coagulabilidade (Latallo e Lopaciuk, 1973).

Algumas serinoproteinases já foram isoladas do veneno da *B. jararaca* e caracterizadas como toxinas que afetam principalmente componentes do sistema hemostático (Serrano et al., 2014). Entre elas destacam-se a KN-BJ1 e a KN-BJ2, que, por proteólise limitada, liberam bradicinina do cininogênio bovino de baixo peso molecular e convertem o fibrinogênio em fibrina, através da liberação do fibrinopeptídeo A (Serrano et al. 1998). A TL-BJ, que é encontrada no veneno em pelo menos três proteoformas, é capaz de coagular o fibrinogênio sem apresentar atividade proteolítica sobre o plasminogênio, cininogênio e plaquetas (Serrano et al., 2000). É uma serinoproteinase capaz de clivar a cadeia alfa do fibrinogênio, liberando o fibrinopeptídeo A, sem afetar a cadeia beta (Serrano et al., 2000). A bothrombina atua sobre o fibrinogênio de maneira semelhante à TL-BJ, e ainda ativa o fator VIII da coagulação sanguínea, porém com potência inferior à trombina. Ainda, esta enzima é capaz de induzir agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP), e em suspensão de plaquetas lavadas (SPL) na presença de fibrinogênio exógeno (Nishida et al., 1994).

A Bothrops proteinase A (BPA), a primeira serinoproteinase isolada do veneno de *B. jararaca* e descrita em 1958, apresenta massa molecular de cerca de 68 kDa dos quais 62 % corresponde a cadeias de carboidratos presentes em sua estrutura (Henriques et al., 1958; Murayama et al., 2003). A BPA degrada o fibrinogênio *in vitro* e em *in vivo*, sendo que *in vivo* a BPA previne a formação de trombo causado por estase da veia cava ou pela injúria da veia jugular em ratos, retardando o tempo

de recalcificação do plasma e diminuindo a concentração de fibrinogênio plasmático (Paes Leme et al., 2008).

Além destas, o veneno da *B. jararaca* contém a PA-BJ, uma serinoproteinase com notável atividade sobre plaquetas e que é alvo deste estudo, e será descrita abaixo.

1.6 PA-BJ

A PA-BJ é uma serinoproteinase que induz 95% de agregação plaquetária em PRP e 40% de agregação em SPL nas concentrações de 10 nM e 100 nM, respectivamente, sem induzir a coagulação do plasma (Serrano et al., 1995). O efeito da PA-BJ em plaquetas é mediado pelos receptores de trombina PAR-1 e PAR-4, que são receptores acoplados à proteína G. A PA-BJ cliva *in vitro* o exodomínio recombinante do receptor PAR-1 nas ligações Arg41-Ser42 e Arg46-Asn47, resultando na inativação do *tethered ligand* (Santos et al., 2000). A agregação plaquetária induzida pela PA-BJ é inibida pela heparina e por um anticorpo monoclonal anti-PAR-1 que reconhece a sequência NATLDPRSFLLR que contém o sítio de clivagem pela trombina. A hirudina e a trombomodulina, inibidores clássicos da trombina, não inibem a atividade catalítica da PA-BJ sobre plaquetas. No entanto, o anticorpo WEDE-15, que reconhece o *motif* KYEPFWEEDEEKNES, importante para a ligação da trombina em PAR-1, inibe fracamente a ativação plaquetária induzida por PA-BJ (Santos et al., 2000). Ainda, a PA-BJ promove a liberação de cálcio em fibroblastos de camundongos nocaute para PAR-1 e transfectados com o gene de PAR-4, indicando que PA-BJ também pode ativar o receptor PAR-4 de forma semelhante à trombina (Santos et al., 2000).

A PA-BJ catalisa a hidrólise de alguns substratos peptídicos acoplados a p-nitroanilida contendo Arg e Lys na posição P1, e entre estes, os mais suscetíveis à hidrólise são D-Phe-Pip-Arg-pNA e Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, utilizados para a determinação da atividade amidolítica da trombina. Tanto a agregação plaquetária quanto a atividade amidolítica da PA-BJ são abolidas pelo PMSF (*phenylmethanesulfonyl fluoride*) e pelo inibidor de trombina NAPAP [*Na-[(2-naphthylsulfonyl)-glycyl]-4-amidinophenylalanine piperidide*], um derivado de benzamidina (Serrano et al., 1995).

A sequência de aminoácidos completa da PA-BJ foi determinada por degradação de Edman, a qual revelou 232 resíduos de aminoácidos contendo um sítio para *N*-glicosilação e outro para *O*-glicosilação nos resíduos Asn20 e Ser23, respectivamente (Figura 8) (Serrano et al., 1995). A massa molecular de 25,218 kDa, calculada a partir da sequência de aminoácidos da PA-BJ, é menor do que o valor de 30 kDa, estimado por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, provavelmente devido à presença de porções de carboidratos em sua estrutura (Serrano et al., 1995). Em um modelo da estrutura tridimensional da PA-BJ, obtido por homologia estrutural utilizando como modelo a estrutura cristalográfica da TSV-PA, uma serinoproteinase ativadora de plasminogênio do veneno de *Trimeresurus stejnegeri*, Yamashiro et al. (2014), foi observado que os resíduos da tríade catalítica da PA-BJ estão localizados entre a junção de dois barris beta, enquanto que os dois sítios de glicosilação estão próximos da fenda catalítica (Figura 8), o que poderia contribuir para a sua resistência à inibição por serpinas (Yamashiro et al., 2014).

Figura 8. Modelo da estrutura tridimensional da PA-BJ, na representação *cartoon*. Os sítios de *N*- e *O*-glicosilação, nas posições Asn20 e Ser23, respectivamente, estão representados como esferas vermelhas. O sítio catalítico está representado em laranja entre os barris beta.
FONTE: Yamashiro et al., 2014.

Recentemente foram identificadas oito proteoformas da PA-BJ no veneno da *B. jararaca*, com pequenas variações de ponto isoelétrico e de massa molecular, resultantes de diferentes níveis de glicosilação (Yamashiro et al., 2014). Usando a tecnologia de sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing*) foram identificados três cDNAs que codificam a PA-BJ (BJARSVSP14, BJARSVSP16 e BJARSVSP22), com 83 % de homologia de sequência, apresentando substituições de 20, 40 e 12 resíduos de aminoácidos, respectivamente, sem com isso afetar significativamente os seus pontos isoelétricos e massas moleculares teóricas (Yamashiro et al., 2014). Esses transcritos conservam o sítio putativo para *N*-glicosilação em Asn20 e apresentam um novo sítio na região C-terminal da enzima, e embora a Ser23 seja conservada, esse resíduo não é putativo para *O*-glicosilações nos novos transcritos (Yamashiro et al., 2014). As oito proteoformas isoladas do

veneno são funcionalmente similares, já que induzem agregação plaquetária em SPL (70-90%) na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$, mas a desglicosilação afeta parcialmente sua capacidade de hidrolisar *in vitro* o exodomínio recombinante de PAR-1, sugerindo um importante papel dessas cadeias na manutenção da estrutura e atividade catalítica da enzima (Yamashiro et al., 2014).

Para compreender a base molecular da atividade da PA-BJ sobre plaquetas Maroun e Serrano (2004) geraram um modelo molecular, construído por homologia estrutural, da interação da PA-BJ com os fragmentos R38-R41 e R51-R64 do exodomínio de PAR-1. A interação entre a PA-BJ e PAR-1 foi analisada por sobreposição de sequências de PAR-1 com o sítio ativo e com o exosítio I da PA-BJ. A análise mostrou que a sequência R38-R41 de PAR-1 se liga no sítio ativo da PA-BJ, enquanto a sequência R51-R64, um domínio de ligação de hirudina no exodomínio de PAR-1, se liga ao exosítio I da PA-BJ (Maroun e Serrano, 2004). A modelagem molecular também mostrou que a PA-BJ apresenta na realidade dois exosítios putativos (I e II) que são semelhantes aos respectivos exosítios da trombina, mas que, no entanto, contém uma proporção menor de resíduos básicos, fato que poderia estar associado à menor diversidade funcional da PA-BJ em comparação com a trombina (Maroun e Serrano, 2004).

Embora as SVSPs apresentem em torno de 65 % de identidade em suas estruturas primárias, essas enzimas possuem distintas especificidades por substratos macromoleculares. Em trabalho recente, no qual foi realizada a análise da especificidade primária da BPA e da PA-BJ utilizando como substrato uma biblioteca de peptídeos derivados da digestão de células monocíticas (THP-1) com a endoproteínase Glu-C, demonstrou-se que, embora essas enzimas tenham preferência por Arg na posição P1 e Pro na posição P2, os resíduos adjacentes ao

ponto de clivagem são distintos (Zelanis et al., 2015). A PA-BJ mostrou clara preferência por Leu e Phe nas posições P4' e P2', respectivamente, concordando com os estudos de modelagem molecular da PA-BJ com o exodomínio de PAR-1 (Maroun e Serrano, 2004; Zelanis et al., 2015).

1.7 Análise proteômica de plaquetas

As plaquetas retêm em seu citoplasma uma pequena quantidade de mRNA derivado de megacariócitos e algumas estruturas como retículo plasmático rugoso e ribossomos, que permitem a sua transcrição (Kieffer et al., 1987; Weyrich et al., 1998). As plaquetas apresentam maior síntese proteica durante sua ativação do que em seu estado quiescente, apresentando uma correlação de 69 % entre as proteínas identificadas no secretoma e no citoplasma, com o mRNAs detectados no transcriptoma (McRedmond et al. 2004). Embora exista uma boa correlação entre transcritos funcionais e proteínas expressas, as técnicas de transcriptômica são insuficientes para descrever a composição total de proteínas plaquetárias.

A ausência de núcleo celular e a presença de proteínas oriundas do megacariócito e do plasma, além da dificuldade em se obter preparações livres de, contaminação com células nucleadas, são limitações importantes que dificultam a análise global do conteúdo plaquetário usando técnicas transcriptômicas.

Assim, nos últimos anos, a proteômica tem se estabelecido como uma ferramenta importante na elucidação de características biológicas e funcionais das plaquetas, fornecendo dados importantes sobre a localização, interações e modificações pós-traducionais disparadas durante a ativação plaquetária. Avanços importantes podem ser vistos em diversos trabalhos sobre a composição das proteínas plaquetárias humanas, analisando plaquetas em repouso e ativadas

(Marcus et al., 2000; O'Neill et al., 2002; García et al., 2004a; Martens et al., 2005; Qureshi et al., 2009; Májek et al., 2010; Burkhart et al., 2012), proteínas pertencentes à membrana plasmática (Moebius et al., 2005; Maguire et al., 2005; Senis et al., 2007; Tucker et al., 2009), proteínas secretadas após ativação com diferentes agonistas (McRemond et al., 2004; Coppinger et al., 2004 e 2007; Piersma et al., 2009; Wijten et al., 2013; van Holten et al., 2014; Vélez et al., 2015), proteínas presentes em micropartículas plaquetárias (García et al., 2005; Capriotti et al., 2013; Aatonen et al., 2014; Milioli et al., 2015) e nos grânulos alfa e densos (Hernandez-Ruiz et al., 2007; Maynard et al., 2007 e 2010), o fosfoproteoma de plaquetas em repouso e ativadas (Maguire et al., 2002; Marcus et al., 2003; García et al., 2004b; Zahedi et al., 2008), e mais recentemente, proteínas que compõe o proteassoma de plaquetas (Klockenbusch et al., 2014).

Assim, a primeira análise do proteoma de plaquetas foi publicada no ano de 2000, no qual o grupo da Dra. Katrin Marcus identificou 186 proteínas, analisando a fração citosólica de plaquetas em repouso (Marcus et al., 2000). Ao longo dos últimos quinze anos muitas técnicas de fracionamento, tanto proteico quanto peptídico, aliados a diferentes métodos de análise por espectrometria de massas, foram empregados na tentativa de cobrir o maior número de proteínas identificadas e assim melhor caracterizar o proteoma de plaquetas. Utilizando principalmente análise por eletroforese bidimensional seguido de digestão *in gel* e análise por espectrometria de massas O'Neill et al. (2002) e Gacia et al. (2004a) identificaram 123 e 311 proteínas, respectivamente. Martens et al. (2005), utilizando a técnica COFRADIC™, a qual é constituída de duas etapas cromatográficas idênticas, com um passo de modificação enzimática entre as duas separações, identificaram 641 proteínas. Utilizando a combinação de três estratégias distintas, (fracionamento por

eletroforese unidimensional, enriquecimento de proteínas de membrana e de fosfopeptídeos) Qureshi et al. (2009) identificaram 1500 proteínas. Mas foi somente em 2012 que Burkhart et al., utilizando uma combinação de diferentes estratégias de fracionamento, (COFRADIC, SCX, IEF, HILIC e enriquecimento de fosfopeptídeos com dióxido de titânio), identificaram cerca de 4.000 proteínas plaquetárias, das quais 3.700 tiveram o número de cópias estimado. A maioria destes trabalhos teve o objetivo de descrever o proteoma de plaquetas e identificar novas proteínas. O trabalho de Májek et al. (2010) é um dos primeiros em que se comparou o proteoma de plaquetas em repouso com plaquetas ativadas por diferentes agonistas (trombina, colágeno e ácido araquidônico), e neste foram identificados 144 spots diferenciais entre as amostras, por eletroforese bidimensional.

O estudo do secretoma é uma das mais importantes análises do subproteomas de plaquetas, já que possibilita a identificação de moléculas que em condições fisiológicas não se encontrariam no leito vascular, e que podem estar envolvidas em processos trombogênicos, tornando-se potenciais alvos farmacológicos. Nos últimos anos, muitos grupos se dedicaram ao estudo das proteínas secretadas após indução com diferentes agonistas. Um dos primeiros trabalhos, publicado em 2004, identificou 300 proteínas secretadas após estímulo com trombina (Coppinger et al., 2004). Em 2007 os mesmos autores comparam o secretoma plaquetário induzido por ADP, colágeno e TRAP e verificaram que estes secretomas eram bem diferentes entre si, apresentando diferenças de abundância de algumas proteínas como trombospondina e PF4; além disso, foi verificado que o tratamento prévio com aspirina diminuía drasticamente a secreção induzida por ADP e colágeno, mas não por TRAP, indicando um importante papel de tromboxano A₂ nestas ativações (Coppinger et al., 2007).

Wijten et al. (2013) identificaram 124 proteínas secretadas após estímulo com trombina e colágeno, e verificaram a presença de proteínas como tenascina X, filamina C e folistatina, identificadas pela primeira vez no secretoma de plaquetas. Ao analisar comparativamente os secretomas induzidos por agonistas de PAR-1 e PAR-4, van Holten et al. (2014), não identificaram alterações significativas entre eles, em oposição aos resultados obtidos por Italiano et al. (2008) que utilizaram microscopia eletrônica e de imunofluorescência para evidenciar que proteínas pro- e anti-angiogênicas (VEGF e endostatina) são separadas em subpopulações distintas nos grânulos alfa e são secretadas diferencialmente, dependendo se o receptor ativado for PAR-1 ou PAR-4 (Italiano et al., 2008). Recentemente Vélez et al. (2015), ao analisarem comparativamente os secretomas induzidos por trombina e colágeno, identificaram a proteína S em maior abundância no secretoma induzido por trombina, constatando que esses agonistas induzem secreção diferencial em plaquetas.

Embora exista uma extensa literatura sobre função plaquetária, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos que regem a secreção, tanto de proteínas como de pequenas moléculas, e também, de vesículas extracelulares (micropartículas e exossomos) durante processos fisiológicos e patológicos. O conhecimento mais acurado sobre o proteoma e o secretoma de plaquetas, em diferentes condições de ativação, poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos que regem este sistema e também, no desenvolvimento de novos alvos para terapias antiplaquetárias.

Já foi demonstrado que a PA-BJ induz agregação plaquetária em PRP e em SPL, sem causar a coagulação do plasma. Da mesma forma que a trombina, a ativação plaquetária pela PA-BJ é mediada pela clivagem dos receptores PAR-1 e

PAR-4, porém essas proteinases parecem divergir em seus mecanismos de ativação. Neste sentido, o estudo proteômico comparativo da agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina abre caminho para novos conhecimentos sobre os mecanismos de ativação para a formação do trombo plaquetário.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi analisar comparativamente a agregação de plaquetas humanas induzida por PA-BJ e trombina, utilizando abordagens proteômicas. Foram propostos os seguintes objetivos específicos:

2.1 Objetivos específicos

- 1) Analisar comparativamente o proteoma do sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, por espectrometria de massas.
- 2) Analisar comparativamente o proteoma e o peptidoma do sobrenadante de plaquetas ativas por PA-BJ e trombina, por espectrometria de massas.
- 3) Validar os resultados por análise estatística dos dados de espectrometria de massas e *Western blot*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Quantificação de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando o corante azul de Coomassie G-250 (Sigma), e a albumina bovina (Sigma) como proteína padrão na construção de uma curva de referência de concentração proteica. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (*Gene Quant* – GE Healthcare) no comprimento de onda de 595 nm e a concentração foi expressa em mg/mL.

A concentração de proteínas também foi estimada em espectrofotômetro, (*Gene Quant* – GE Healthcare) no comprimento de onda de 280 nm, pela absorção da luz ultravioleta dos aminoácidos aromáticos presentes nas proteínas.

3.2 Eletroforese de proteínas em gel de SDS-poliacrilamida

O preparo do gel de poliacrilamida, contendo SDS (dodecil sulfato de sódio), foi realizado segundo Laemmli (1970). Foram empregadas placas de vidro de 10 x 10,5 cm (GE Healthcare) e 16 x 20 cm (Life Technologies™), lavadas em água corrente e limpas com etanol 70%. As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando-se cubas verticais (Electrophoresis System Hoefer™miniVE) ou (Gibco BRL Vertical Gel Electrophoresis Apparatus – Life Technologies™) e uma fonte elétrica (Electrophoresis Power Supply EPS 601, GE Healthcare).

O gel de SDS-poliacrilamida a 12% continha tampão Tris-HCl 0,38 M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida 12%, bisacrilamida 0,3%, TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil etileno-diamino) 0,1% e persulfato de amônio 0,06%. O gel a 8% continha acrilamida 8%, bisacrilamida 0,2% e os demais reagentes mencionados acima. O gel de SDS-

poliacrilamida com gradiente de 6% a 18% foi preparado com o auxílio de bomba peristáltica (*Pump P1* – Pharmacia-Biotech) e continha acrilamida de 6% a 18% e bisacrilamida de 0,13% a 0,4% além dos outros reagentes mencionados acima.

Após a polimerização do gel de corrida ou gel de separação, um gel superior, de empacotamento ou de empilhamento da amostra, foi preparado com acrilamida 4% e bisacrilamida 0,1%, tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, acrescido dos demais reagentes já citados.

As amostras de proteínas aplicadas foram submetidas à desnaturação e redução de pontes de dissulfeto em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo 2-mercaptoetanol 2% e SDS 2%, aquecidas a 95 °C durante 5 min. Usou-se como tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, contendo glicina 0,18 M, pH 8,3 e SDS 1%. As corridas foram desenvolvidas a temperatura ambiente a 150V, 80mA e 100w por 2 horas (10 cm x 10,5 cm) ou a 50V, 20mA e 100w por 8 horas (16 cm x 20 cm).

3.3 Coloração de proteínas

A coloração das bandas proteicas foi realizada de acordo com Neuhoff et al. (1988) utilizando solução de azul de Coomassie coloidal G-250 (Pierce Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye - Thermo Fisher Scientific), contendo 0,08% do corante em metanol 25%, ácido fosfórico 1,6% e sulfato de amônio 8%. O gel de SDS-poliacrilamida foi submerso nesta solução por 10 horas e descorado em seguida com água MilliQ®.

Outro método utilizado foi a coloração com nitrato de prata (Mortz et al., 2001). Ao termino da corrida eletroforética o gel foi colocado na solução de fixação (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,05%) por 18 horas. Em seguida, este foi lavado três vezes com etanol 35% por 20 min e incubado em solução de

tiosulfato de sódio 0,02% por 2 min. Após esse período, o gel foi lavado três vezes com água MilliQ® por 5 min e incubado em solução 0,2% de nitrato de prata contendo formaldeído 0,076% por 20 min. Após duas lavagens com água MilliQ® por 1 min o gel foi colocado em solução de carbonato de sódio 6%, formaldeído 0,05%, e tiosulfato de sódio 0,0004% até obter-se a coloração desejada das bandas de proteínas. Utilizou-se uma solução de metanol 50% e ácido acético 12% para interromper a reação.

3.4 Digestão tripsínica *in gel*

A digestão de proteínas *in gel* foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Hanna et al. (2000) com algumas modificações. Foram submetidos à digestão *in gel*: a banda proteica resultante do isolamento da PA-BJ; as fatias do gel de SDS-poliacrilamida após a separação eletroforética das proteínas do sedimento plaquetário e aquelas correspondentes a bandas diferenciais na análise da fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas. Inicialmente os fragmentos de gel recortados foram incubados em 500 µL de solução de metanol 50% e ácido acético 5% em água MilliQ® por duas horas. Esta etapa foi repetida por duas vezes. Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados pela incubação por 10 min (2 vezes de 5 min) em 200 µL de acetonitrila (ACN) 100%. A solução de ACN foi removida e o restante foi evaporado em sistema de concentração a vácuo do tipo *speed vac* (CHRIST, modelo RVC2-18). Após esta etapa, os fragmentos de gel foram incubados por 30 min em 30 µL de solução redutora (ditiotreitól 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM) para redução das pontes dissulfeto. Em seguida esta solução foi removida e foram adicionados 30 µL de solução alquilante (iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM) por 30 min. Após

remoção da solução alquilante os fragmentos de gel foram submetidos à incubação por 10 min em 100 μ L de solução de bicarbonato de amônio 100 mM e em seguida desidratados com 200 μ L de ACN 100% por 10 min. Esta última etapa foi repetida por mais uma vez e ao final a solução de ACN foi removida e o restante evaporado em *speed vac*. Aos fragmentos de gel foram adicionados 3 μ L de uma solução de tripsina (50 ng/ μ L em bicarbonato de amônio 50 mM) seguido da adição de uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM, em um volume suficiente para cobrir os fragmentos de gel, e incubados a 37°C por 18 horas.

Para a extração dos peptídeos do gel foram utilizadas duas soluções: ácido fórmico 5% (solução 1) e ácido fórmico 5% e ACN 50% (solução 2). Todas as etapas foram realizadas a temperatura ambiente.

Aos fragmentos de gel foram adicionados 30 μ L da solução 1 por 10 min. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi transferida para um novo tubo e aos fragmentos de gel foram adicionados 12 μ L da solução 2 por 10 min. A solução foi transferida para o tubo que continha os peptídeos extraídos com a solução 1. Este último passo foi repetido mais duas vezes e, então, a solução contendo os peptídeos extraídos foi concentrada em *speed vac* e os peptídeos resultantes foram ressuspensos em 5 μ L de ácido trifluoroacético 0,1% (TFA 0,1%) e submetidos a dessalinização utilizando ponteiros preenchidas com resina C-18 (sistema ZipTipTM, Millipore), de acordo com instruções do fabricante. Os peptídeos obtidos após dessalinização foram secos em *speed vac*, ressuspensos em 20 μ L de ácido fórmico 0,1% e analisados por espectrometria de massas.

3.5 Digestão tripsínica em solução

A digestão tripsínica em solução foi realizada segundo o protocolo descrito por (Rappsilber et al., 2003) com algumas modificações. Às amostras submetidas à digestão em solução foram adicionados ureia 8 M seguido da redução de pontes dissulfeto com solução de ditioneitol (preparado em HEPES 50 mM pH 7.5) para uma concentração final de 5 mM. Esta mistura foi incubada por 45 min. Após este período as cisteínas foram alquiladas adicionando uma solução de iodoacetamida (preparado em HEPES 50 mM pH 7.5) para uma concentração final de 15 mM, por 30 min no escuro a temperatura ambiente. Ao final desta etapa, o excesso de iodoacetamida foi consumido pela adição de ditioneitol para uma concentração final de 15 mM por 30 min a temperatura ambiente.

O volume da reação foi aumentado em 5 vezes com HEPES 50 mM pH 7.5 para reduzir a concentração da ureia para 1,6 M. O pH foi mensurado entre 7,0 - 8,0 e foi adicionada tripsina (preparada em HCl 1 mM; Proteomics Grade, Sigma) na proporção enzima:substrato de 1:100. A solução foi incubada por 18 horas a 37 °C. Após este período a reação foi interrompida por acidificação com a adição de TFA até a concentração final de 1% e seca em *speed vac*.

3.6 Dessalinização com Sep-Pak Light tC18 (Waters)

As amostras peptídicas foram ressolubilizadas individualmente em 400 µL em solução de TFA 0,1% e aplicadas em colunas de extração em fase sólida Sep-Pak Light tC18 seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante, previamente condicionada com 2 mL de metanol 100%, seguido de 2 mL de TFA 0,1% para equilibrar a resina. A amostra, previamente acidificada ou ressuspensa em 400 µL de TFA 0,1%, foi injetada lentamente na coluna; em seguida lavou-se a coluna com

8 mL de TFA 0,1%. A amostra foi eluída com 2 mL de ACN 50% preparado em TFA 0,1% e seca em *speed vac*.

3.7 Preparo de colunas capilares C18 e C18/SCX/C18

Para a produção das colunas analíticas (75 µm de diâmetro interno, d.i.; LC-MS/MS), capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, USA), foram preenchidos com 5 mm da mistura de lithasil 25-silicato de lítio (PQ Corporation)/formamida (Sigma)/silicato de amônio tetrametila (Sigma), seguido de aquecimento com ferro de solda para formação do *frit* (disco poroso).

Para a pré-coluna (100 µm d.i.; LC-MS/MS) e para a coluna trifásica - C18/SCX/C18 (250 µm d.i.), os *frits* foram feitos com o preenchimento de 5 mm da mistura de Kasil 1624 silicato de potássio (PQ Corporation) e formamida, seguido de aquecimento a 80 °C. O *frit* formado serviu como filtro e uma barreira para retenção da resina. Em seguida a coluna analítica (10 cm) e a pré-coluna (5 cm) foram preenchidas com resina Jupiter® C-18 (Phenomenex) com tamanho de partícula de 5 µm e 10 µm, respectivamente. A coluna trifásica foi preenchida na sequência C18/SCX/C18 com resina Jupiter® C-18 5 µm/SCX Luna 5 µm (Phenomenex)/Jupiter® C-18 5 µm, com 2,5 cm de cada resina. O empacotamento das colunas foi realizado utilizando uma bomba de nitrogênio com pressão de 700 psi. A coluna analítica foi cortada com o laser puller (P-2000, Sutter Instrument Co.) para formar uma ponta emissora (*emitter*) com abertura de aproximadamente 5 µm.

Uma amostra contendo 50 fmol de soro albumina bovina digerida com tripsina (MassPrep™, Waters), foi analisada por LC-MS/MS em sistema nanoProxion/LTQ Orbitrap Velos (Thermo) como controle de qualidade da coluna analítica. Durante 35 min foram monitorados o tempo de retenção do íon duplamente carregado da BSA,

de razão m/z igual a 874, bem como a sua intensidade relativa. Valores de intensidade maiores ou iguais a 10^5 no cromatograma de íons (TIC), e tempos de retenção dentro do intervalo de 18 e 19 min no cromatograma, indicaram boa qualidade das colunas preparadas, sendo este parâmetro também utilizado como controle da qualidade de cada coluna entre as corridas analíticas.

3.8 Isolamento da PA-BJ

Para o isolamento da PA-BJ foi utilizada a metodologia descrita por Serrano et al. (1995) com algumas modificações.

3.8.1 Precipitação das proteínas do veneno *B. jararaca*

O veneno de *B. jararaca* foi coletado de serpentes mantidas no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

Uma amostra contendo 500 mg de veneno liofilizado foi cuidadosamente dissolvida em 50 mL de NaCl 0,15 M. Foram acrescentados lentamente a esta solução 8,92 g de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ triturado, para atingir a concentração final de 30% (178,3 g/L). A mistura ficou sob agitação durante 30 min a temperatura ambiente e o precipitado proteico formado foi separado por centrifugação a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C; ao sobrenadante (54 mL) foi acrescentado sulfato de amônio (10,66 g) para atingir a concentração de 60% (197,4 g/L). Para a última etapa de saturação foram acrescentados 12,6 g de sulfato de amônio para precipitar as proteínas entre 60 e 90% (221,15 g/L). Após cada etapa de saturação o precipitado formado foi separado por centrifugação, dissolvido em água MilliQ® e dialisado por 24 horas em água MilliQ® e por 48 horas em tampão Tris-HCl 20mM pH 7,5 contendo CaCl_2 1 mM, a 4 °C, com trocas a cada 12 horas.

3.8.2 Cromatografia em coluna HiPrep QXL 16/10

Após diálise e quantificação de proteínas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 280 nm, 300 mg da fração proteica do veneno de *B. jararaca* precipitada entre 30% e 60% com sulfato de amônio, foram aplicados na coluna de troca aniônica HiPrep QXL 16/10 (GE Healthcare) previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5 contendo CaCl_2 1 mM. A cromatografia foi desenvolvida em sistema FPLC (Äkta Purifier, GE Healthcare), a temperatura ambiente, com fluxo de 2,0 mL/min. Como a PA-BJ é uma proteína de pI superior a 9,0, esta etapa cromatográfica auxiliou apenas na separação da fração de proteínas com pI acima de 7,5 (na qual está contida a PA-BJ) das outras proteínas do veneno (a qual foi utilizada para purificação de outras toxinas de caráter ácido). A fração de proteínas básicas foi coletada, liofilizada e submetida à diálise contra tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 por 12 horas a 4 °C.

3.8.3 Cromatografia em coluna Mono S HR 5/5

Após diálise e quantificação de proteínas, 55 mg da fração de proteínas básicas, foram aplicadas na coluna de troca catiônica Mono S HR 5/5 previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4. A cromatografia foi desenvolvida em sistema FPLC (Äkta Purifier, GEHealthcare) a temperatura ambiente, com fluxo de 1,0 mL/min. A eluição proteica foi realizada com o tampão inicial (5 mL) seguido de um gradiente linear de NaCl de 0 a 1 M no tampão inicial (volume total de 25 mL), coletando frações de 0,50 mL. Foram realizadas 6 cromatografias consecutivas. As frações proteicas eluídas foram avaliadas quanto ao seu perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida 12% e atividade de indução de agregação plaquetária em SPL.

3.8.4 Recromatografia em coluna Mono S HR 5/5

As frações eluídas entre 0,3 M e 0,4 M de NaCl da cromatografia em Mono S HR 5/5, que apresentaram perfil eletroforético com bandas proteicas com massa molecular entre 28 kDa e 30 kDa e capacidade de indução de agregação plaquetária acima de 70% na concentração de 2,5 µg/mL, foram reunidas em *pool*, o qual foi submetido à diálise por 18 horas em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4, quantificação de proteínas, e recromatografia em coluna Mono S HR 5/5, previamente equilibrada no mesmo tampão. A cromatografia foi desenvolvida em sistema FPLC (Äkta Purifier, GEHealthcare) a temperatura ambiente, com fluxo de 1,0 mL/min e a eluição proteica foi realizada com o tampão inicial (2 mL) seguido de um gradiente linear de NaCl de 0 a 0,7 M no tampão inicial (volume total de 25 mL), coletando frações de 0,50 mL. Foram realizadas 5 cromatografias consecutivas, com 9 mg de proteínas por corrida, que resultaram em perfis de eluição semelhantes. As frações proteicas eluídas foram avaliadas quanto ao seu perfil eletroforético em gel de SDS-poliacrilamida 12% e atividade de indução de agregação plaquetária em SPL.

As frações que apresentaram perfil eletroforético semelhante foram reunidas em *pool*, o qual foi liofilizado e posteriormente dialisado contra tampão Hepes 20 mM pH 7,5, para remoção do excesso de sal. A banda proteica resultante, apresentando cerca de 30 kDa em gel de SDS-poliacrilamida 12%, foi recortada, submetida à digestão com tripsina, e os fragmentos gerados foram submetidos à análise por LC-MS/MS em sistema nanoAcquity/Q-ToF (Waters) para identificação (como descrito no item 3.13.1).

3.9 Obtenção de plaquetas humana

O uso de plaquetas humanas foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, conforme CAAE 14583813.8.0000.0086. O sangue humano foi coletado de voluntários que afirmaram não terem feito o uso de medicamentos analgésicos, anti-inflamatórias e anticoagulantes nos 10 dias anteriores à coleta.

Para os ensaios realizados com SPL, 20 mL de sangue humano foram coletados em tubo apropriado contendo solução ACD (ácido cítrico 78 mM, citrato de sódio 117 mM e dextrose 282 mM, preparado em água MilliQ®), na proporção ACD-sangue 1:7 (v/v). A centrifugação foi realizada em duas etapas de 10 min a 900 rpm a 37 °C, para obtenção de PRP livre de contaminantes leucocitários e de hemácias. Alíquotas de PRP foram distribuídas em tubos de 2 mL com adição de prostaglandina E1 (PGE₁) (Sigma) na concentração final de 0,2 µg/mL, e centrifugadas por 1 min a 12.000 rpm. O sedimento plaquetário formado foi ressuspensionado em solução de Tyrode (NaCl 134 mM, KCl 2,9 mM, Na₂HPO₄ 3 mM, HEPES [ácido 4-(2-hidroxietilpiperazina-1-etanosulfônico)] 20 mM, glicose anidra 5 mM, MgCl₂ 1 mM e PGE₁ 0,1 µg/mL) com pH ajustado para 6,2, e centrifugado por 1 min a 12.000 rpm (Antunes et al. 2010). Esta etapa foi repetida por duas vezes. Na última etapa, o sedimento plaquetário foi ressuspensionado cuidadosamente em solução de Tyrode com pH ajustado para 7,4, contendo 2,5 mM de CaCl₂, sem PGE₁, e mantido a 37 °C.

A contagem de plaquetas foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, onde uma alíquota de SPL foi diluída em solução Unopette (oxalato de amônio 0,08 M, timerosal 0,2 mM, 0,664 mL de PBS 10x (NaH₂PO₄H₂O 0,73 M, Na₂HPO₄ 0,131 M e NaCl 0,77 M) preparada em 100 mL de água MilliQ®) na

proporção plaquetas-Unopette 1:200 (v/v). A contagem de plaquetas foi realizada em 2 quadrantes externos perpendiculares na câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico (Eclipse TS100, Nikon) com objetiva ajustada para o aumento de 40x. Para determinação da concentração plaquetária foi realizado o seguinte cálculo:

$$\text{nº de plaquetas} = \frac{(\text{soma das plaquetas contadas}) \times 200 (\text{fator de diluição}) \times 10 (\text{nº de plaquetas em } 1 \mu\text{L})}{2 (\text{nº de campos contados})}$$

O volume da SPL foi ajustado para atingir concentração de $500 \times 10^9/\text{L}$.

3.10 Ensaio de agregação plaquetária

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados utilizando 400 μL de SPL ($500 \times 10^9/\text{L}$) sob agitação de 1200 rpm, a temperatura constante de 37 °C. A agregação foi monitorada durante 8 min após adição do agonista, em agregômetro Chrono-log modelo 490, com quatro canais (Chrono-log, Havertown, PA). Os resultados foram expressos em porcentagem de agregação através de medidas ópticas de turbidez, utilizando a solução de Tyrode como branco, nos ensaios com SPL.

Para otimização da concentração enzimática que induz agregação plaquetária acima de 80% em SLP, foram realizados ensaios com concentrações crescentes das enzimas PA-BJ e trombina (GE Healthcare) como descrito na Tabela 1.

Por fim, os ensaios subsequentes de agregação plaquetária, foram realizados com PA-BJ 100 nM ou trombina 2 nM ou PBS (controle). A agregação plaquetária foi monitorada por 8 min, sob agitação de 1200 rpm, a temperatura constante de 37 °C.

Tabela 1. Concentração enzimática e agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina.

PA-BJ – 30.000 Da		Trombina – 37.000 Da	
Molaridade (nM)	Agregação (%) [*]	Molaridade (nM)	Agregação (%) [*]
200	87±5,7	5	90±3,1
100	85±2,0	2	91±2,1
50	72±4,0	1	73±2,1

Ensaios realizados em SPL..

* Média de 3 replicatas técnicas ± desvio padrão.

3.11 Análise proteômica de plaquetas

Diferentes estratégias foram adotadas para avaliar o efeito da atividade da PA-BJ e da trombina sobre plaquetas e um resumo dos métodos utilizados está esquematizado na Figura 9.

Figura 9. Ilustração dos métodos utilizados neste estudo para análise da atividade da PA-BJ e da trombina sobre plaquetas humanas.

Após a incubação da SPL com PBS (controle), ou PA-BJ (100 nM) ou trombina (2 nM), por 8 min, sob agitação de 1200 rpm, a 37°C, a suspensão de plaquetas foi imediatamente removida das cubetas e centrifugada por 10 min a 5.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi removido e congelado a -20 °C, para as análises que serão descritas a seguir, e o sedimento plaquetário foi ressuspensionado

em solução de uréia 8 M com adição de ditioneitol 1 mM, coquetel de inibidores (*Halt Proteinase and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Thermo Fisher Scientific), conforme instruções do fabricante, e incubado no gelo por 15 min. Para completar a lise celular, a suspensão foi sonicada utilizando uma sonda ultrassônica (UD-201, Tomy), durante 30 s a 16 W. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min a 5.000 rpm, a 4 °C, para a remoção de debris celulares e o sobrenadante foi submetido à quantificação de proteínas utilizando o método de Bradford (1976).

3.12. Análise do sedimento plaquetário (proteoma)

3.12.1 Análise do sedimento plaquetário por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação de proteínas por LC-MS/MS

Proteínas oriundas do sedimento plaquetário (150 µg) foram submetidas à desnaturação e redução de pontes de dissulfeto, e analisadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (gradiente de 6-18%) em géis de 16 x 20 cm, por 8 horas a 50 V, 20 mA e 100 W (Laemmli, 1970).

As bandas proteicas foram coradas com Coomassie coloidal G-250 e a área do gel correspondente a cada amostra foi recortada em 28 fatias de 5 mm. Em seguida as fatias de gel foram submetidas à digestão proteica *in gel* com tripsina, dessalinizado utilizando sistema ZipTip™ (Millipore), de acordo com instruções do fabricante, e ressolubilizados em 20 µL de ácido fórmico 0,1% para análise por LC-MS/MS em sistema nanoEksigent/LTQ XL (Thermo). Uma alíquota de 5 µL da solução peptídica foi aplicada numa pré-coluna de C-18 com 180 µm (d.i.) e 20 mm de comprimento (partícula de 5 µm, Waters) com fluxo de 15 µL/min. Em seguida a mistura de peptídeos foi submetida à cromatografia líquida, utilizando coluna

analítica C-18 de 100 μm x 100 mm (partícula de 1,7 μm , Waters), sob fluxo de 500 nL/min durante o gradiente de 3 a 80% de ACN (solvente B) em ácido fórmico 0,1%, (Solvente A) em 40 min (3 a 8% de B em 5 min; 8-40% B em 25 min; 40-50% de B em 5 min e 50-80% de B em 5 min).

A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 1,8 kV e 200 °C, respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA), no qual uma varredura de massas na região de m/z de 300 a 2000 foi realizada, seguida por dissociação induzida por colisão (CID) dos 10 íons mais intensos. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 60 segundos (para se diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de m/z).

3.12.2 Análise do sedimento plaquetário por digestão tripsínica em solução, cromatografia ortogonal e LC-MS/MS

Para minimizar as diferenças de concentração entre as proteínas plaquetárias, empregamos a tecnologia MudPIT (do inglês *Multidimensional Protein Identification Technology*) (Giddings, 1984; Washburn et al., 2001), a qual faz uso de combinações de separações cromatográficas, para, com maior precisão, aumentar a capacidade identificação de proteínas menos abundantes.

Em nosso estudo, o fracionamento dos peptídeos foi realizado *off-line*, isto é, sem acoplamento direto da coluna ao espectrômetro de massas, com algumas modificações (Peng et al., 2003; Magdeldin et al., 2014). Após a digestão das proteínas (70 μg) do sedimento plaquetário (controle, PA-BJ e trombina) com tripsina (item 3.5) e dessalinização utilizando Sep-Pak Light tC18 (item 3.6), os peptídeos obtidos foram ressolubilizados em ácido fórmico 0,1% e carregados por

pressurização na coluna trifásica C18/SCX/C18. Neste arranjo multidimensional os peptídeos foram fracionados em sistema de μ HPLC Accela (Thermo) sob fluxo de 2 μ L/min, inicialmente com ACN 50% em ácido fórmico 0,1%, seguido da aplicação de diferentes concentrações de acetato de amônio (0, 0,020 mM, 0,050 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM e 1 M). Cada fração eluída da SCX foi deslocada para a fase de C18 seguinte, para a remoção do excesso de sal e eluição com ACN 50% em ácido fórmico 0,1%, em tubos de 1,5 mL. As frações coletadas foram secas em *speed vac* e ressolubilizados em 20 μ L de ácido fórmico para análise por LC-MS/MS em sistema nanoProxion/LTQ Orbitrap Velos (Thermo). Uma alíquota de 18 μ L da solução peptídica foi aplicada numa pré-coluna de 5 cm e 100 μ m (d.i.), com fluxo de 2 μ L/min. A cromatografia líquida foi desenvolvida sob fluxo de 200 nL/min em uma coluna analítica de 10 cm (item 3.7) com um gradiente de 5 a 35% de ACN em ácido fórmico 0,1%, durante 90 min. A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 2,2 kV e 250 °C, respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA), no qual uma varredura de massas na região de m/z de 300 a 1650 foi realizada com resolução de 60.000 no modo FTMS, seguida por dissociação induzida por colisão (CID) no *Ion Trap*, dos 15 íons mais intensos. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 60 segundos (para se diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de m/z), com uma janela de isolamento do íon precursor de ± 1.5 Da.

3.13 Análise do sobrenadante plaquetário (secretoma)

3.13.1 Análise da fração proteica do sobrenadante plaquetário por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação de proteínas por LC-MS/MS

Para análise das proteínas presentes no sobrenadante plaquetário, 100 μ L do sobrenadante de plaquetas ativadas (PA-BJ ou trombina) ou não ativadas (controle), foram concentrados em *speed vac*, para um volume final de 25 μ L. As proteínas foram submetidas à desnaturação e redução de pontes de dissulfeto, e analisadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (12%) em géis de 10 x 10,5 cm, por 2 horas a 150 V, 40 mA e 100 W (Laemmli, 1970).

As bandas proteicas foram coradas com nitrato de prata e as bandas diferenciais observadas foram recortadas e submetidas à digestão *in gel* por tripsina (item 3.4). Os peptídeos obtidos foram dessalinizados utilizando sistema ZipTip™ e ressolubilizados em 15 μ L de ácido fórmico 0,1%, e analisados por LC-MS/MS em sistema nanoAcquity/Q-ToF (Waters). 4,5 μ L da solução de peptídeos foram aplicados numa pré-coluna 180 μ m (d.i.) x 20 mm (5 μ m, Waters) com fluxo de 5 μ L/min, ajustado diretamente no programa do cromatógrafo nanoAcquity (Waters). Em seguida a mistura de peptídeos foi submetida à cromatografia líquida de fluxo nanométrico, utilizando uma coluna de C-18 de 100 μ m x 100 mm (1,7 μ m, Waters), sob fluxo de 700 nL/min com gradiente de 0 a 80% de ACN (solvente B) em ácido fórmico 0,1%, (Solvente A) durante 20 min (3% de B em 1 min; 60% de B em 14 min; 80% de B em 2 min e 30 s; 80% de B em 1 min e de 80-3% de B em 1 min e 30 s). Como calibrante do espectrômetro foi utilizada a infusão constante de uma solução de ácido fosfórico 0,1% e ACN 25% em água MilliQ®, sob fluxo de 700 nL/min.

A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 3.1 kV e 100 °C, respectivamente. O espectrômetro foi operado no modo *Data Dependent Aquisition* (DDA), utilizando uma varredura de massas na região de m/z de 200 a 2000, seguida da dissociação induzida por colisão (CID) dos 6 íons mais

intensos. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 90 s (para diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de m/z).

3.13.2 Análise das frações proteica e peptídica por LC-MS/MS

As proteínas presentes no sobrenadante de plaquetas ativadas (PA-BJ ou trombina) e não ativadas (controle) foram submetidas a quantificação e um volume de 2 mL foi sob submetido à precipitação de proteínas pela adição de uma mistura de acetona e metanol gelada (8:1:1 acetona/metanol/amostra,v/v/v). Após incubação por 4 horas a -80 °C, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 14.000 rpm a 4°C. O sedimento resultante foi ressuspendido em 100 µL de ureia 8 M e submetido a digestão tripsínica em solução (item 3.5), dessalinização (item 3.6), concentração em *speed vac* e ressolubilização com 15 µL de ácido fórmico 0,1%, previamente à análise por LC-MS/MS em sistema nanoProxion/LTQ Orbitrap Velos (Thermo). Este ensaio foi realizado em triplicata.

O sobrenadante resultante da precipitação proteica com acetona, correspondente a fração peptídica, foi concentrado em *speed vac*, dessalinizado (item 3.6), novamente concentrado em *speed vac* e ressolubilizado com 12 µL de ácido fórmico 0,1%, e analisado por LC-MS/MS em sistema nanoProxion/LTQ Orbitrap Velos (Thermo).

Para identificação das proteínas e dos peptídeos, uma alíquota de 10 µL de cada amostra descrita acima, foi aplicada em pré-coluna de 5 cm e 100 µm (d.i.) (item 3.7), com fluxo de 2 µL/min. A cromatografia líquida foi desenvolvida com fluxo de 200 nL/min, com gradiente de 5 a 30% de ACN em ácido fórmico 0,1%, em 180 min (fração proteica digerida com tripsina) e 90 min (fração peptídica). A voltagem e a temperatura da fonte de ionização foram ajustadas para 2,2 kV e 250 °C,

respectivamente, e o espectrômetro foi operado no modo *Data Dependent Acquisition* (DDA) no qual uma varredura de massas na região de m/z de 300 a 2000 foi realizada com resolução de 30.000 no modo FTMS, seguida por dissociação induzida por colisão (CID) dos 10 íons mais intensos. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 60 s (para diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de m/z), com uma janela de isolamento do íon precursor de ± 1.5 Da.

3.14 Busca em banco de dados usando o programa Mascot

3.14.1 Processamento dos espectros de massas (extensão *.pkl)

Os dados brutos (*Raw files*), referentes às análises de MS/MS utilizando o espectrômetro Q/ToF, foram processados utilizando o programa ProteinLynx™ versão 2.3 (Waters). Os arquivos resultantes (extensão *.pkl) foram gerados utilizando os seguintes parâmetros: deisotopização e centróide dos picos; a acurácia na determinação das massas foi baseada na utilização do íon de massa 784,823 como *lock mass* (proveniente do canal de MS do ácido fosfórico, utilizado como calibrante), com duas varreduras (*scans*) e uma tolerância de massa de 0,1 Da. Os arquivos com extensão *.pkl foram utilizados para buscas em banco de dados, utilizando o programa Mascot (versão 2.3, Matrix Science).

Para as buscas da análise da digestão tripsínica *in gel* da banda proteica resultante do isolamento da PA-BJ, foi utilizado o banco não-redundante do *National Center for Biotechnology Information* (*nrNCBI Databank* – www.ncbi.nlm.nih.gov), com restrição à taxonomia Serpentes, que contava com 25.210 sequências (junho/2011).

Para as buscas das análises da digestão *in gel* das bandas proteicas do sobrenadante plaquetário, utilizamos o banco NCBI nr restrito à taxonomia *Homo sapiens*, que contava com 240.907 sequências (dezembro/2011).

Como parâmetros de busca foram consideradas, como modificação fixa a carbamidometilação de resíduos de cisteínas (+57,000 Da), e como modificação variável a oxidação de resíduos de metionina (+15,9949 Da). A tolerância de massa para íons precursores foi definida como sendo igual a $\pm 1,2$ Da, e para os íons-filho $\pm 0,6$ Da.

3.14.2 Processamento dos espectros de massas (extensão *.mgf)

Os dados brutos (*Raw files*) referentes às análises de MS/MS nos espectrômetros de massas LTQ-XL e LTQ Orbitrap Velos foram processados utilizando ferramentas disponíveis no *Trans Proteomics Pipeline* (ProteoWizard versão 2.1, disponível em <http://proteowizard.sourceforge.net/>). Foram gerados arquivos com extensão *.mgf (*Mascot Generic Format*) utilizados para buscas com o programa Mascot (versão 2.4.1, Matrix Science).

Para as buscas das análises da digestão *in gel* das bandas proteicas do sedimento plaquetário foi utilizado o banco de proteínas do *Universal Protein Resource Knowledgebase* (*UniProtKB/Swiss-Prot database* – disponível em <http://www.uniprot.org/>), com restrição à taxonomia *Homo sapiens*, que contava com 20.238 sequências revisadas (junho/2012). Como parâmetros de busca, consideramos duas clivagens perdidas pela tripsina; resíduos de cisteína carbamidometilados (+57,000 Da) como modificação fixa; e , resíduos de metionina oxidados (+15,9949 Da), deamidação da asparagina e da glutamina (+0,9840 Da) e acetilação do N-terminal (+42,0105 Da), como modificações variáveis.

Para as buscas das análises da fração peptídica do sobrenadante plaquetário, utilizamos o banco de dados de proteínas do UniProtKB/Swiss-Prot restrito à taxonomia *Homo sapiens* com 20.256 sequências revisadas (maio/2014). A busca em banco de dados foi realizada sem especificidade enzimática e foram definidos como modificações variáveis: a oxidação de resíduos de metionina (+15,9949 Da), a deamidação da asparagina e da glutamina (+0,9840 Da), e a acetilação do N-terminal de qualquer peptídeo (+42,0105 Da).

A tolerância de massa para íons precursores foi ajustada para $\pm 1,2$ Da, e $\pm 0,6$ para os íons-filho gerados no LTQ-XL, e para ± 10 ppm e 0,5 Da para íons precursores e íons filhos, respectivamente, gerados no LTQ Orbitrap Velos.

Os resultados das buscas foram submetidos ainda a uma segunda análise, utilizando o programa Scaffold 4.0.7 (Proteome Software Inc., Searle, 2010), considerando pelo menos um peptídeo único para identificação de cada proteína, com probabilidade >99% para identificação de peptídeos e proteínas. Utilizando o algoritmo Mascot, foram considerados os peptídeos cujos scores para os íons de carga +2, +3 e +4 apresentaram valores maiores ou iguais a 25, 30 e 35, respectivamente.

3.15 Busca em banco de dados usando o programa MaxQuant

Para a identificação de proteínas do sobrenadante e sedimento plaquetários (digeridas com tripsina), os dados brutos (*Raw files*), referentes às análises de MS/MS utilizando o espectrômetro LTQ Orbitrap Velos, foram analisados utilizando o programa MaxQuant (Cox e Mann, 2008), que faz uso do algoritmo Andromeda como ferramenta de busca (Cox et al., 2011). Foi utilizado o banco de dados de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot restrito à taxonomia *Homo sapiens*, que continha

20.256 sequências revisadas (maio/2014). Como parâmetros para busca, foram considerados: taxa de falsos positivos de 0,01% para proteínas e para peptídeos, duas clivagens perdidas pela tripsina e sem restrições de clivagem na ocorrência de prolina na posição P1'. Foi definida como modificação fixa a carbamidometilação de resíduos de cisteínas (+57,000 Da), e como modificações variáveis a oxidação de resíduos de metionina (+15,9949 Da), a deamidação da asparagina e da glutamina (+0,9840 Da), e acetilação do N-terminal de qualquer peptídeo (+42,0105 Da). A tolerância de massa para íons precursores foi ajustada para 10 ppm, e para 0,5 Da para os íons-filhos (MS/MS) .

Os dados obtidos da análise da fração proteica do sobrenadante plaquetário foram ainda submetidos à validação utilizando o programa Scaffold 4.0.7 (Proteome Software Inc.; Searle, 2010), considerando pelo menos um peptídeo único para identificação de cada proteína, com probabilidade >95% para identificação de peptídeos e proteínas. Para a análise quantitativa das proteínas identificadas, foram adotados os dados normalizados da contagem espectral dos íons. Os dados estatisticamente significantes foram obtidos utilizando o teste de variância ANOVA ($p < 0,05$), considerando como valor mínimo pelo menos uma diferença de 3 contagens espectrais entre as amostras.

Para a validação dos dados obtidos da análise da fração proteica do sedimento plaquetário foi utilizado o programa Perseus (versão 1.5.1.6), disponível na plataforma MaxQuant (Cox, et al., 2014). Inicialmente as médias dos valores das intensidades dos íons foram logaritmizadas e distribuídas em uma curva de Gauss. Em seguida essas médias e seus valores de desvio padrão ajustados foram utilizados para os cálculos quantitativos. A significância estatística das diferenças de intensidade foi calcula aplicando-se o teste de variância ANOVA ($p < 0,05$),

considerando como valor mínimo pelo menos uma diferença de 3 contagens espectrais entre as amostras.

3.16 Análise da especificidade proteolítica observada na fração peptídica do sobrenadante plaquetário

Os peptídeos identificados na fração peptídica do sobrenadante de plaquetas ativadas (PA-BJ ou trombina) e não ativadas (controle) foram usados para o mapeamento das sequências de aminoácidos adjacentes aos sítios de clivagem, que indicam o tipo de especificidade hidrolítica das proteinases envolvidas na agregação plaquetária. Para o mapeamento da especificidade hidrolítica das proteinases envolvidas na agregação plaquetária, foram analisadas as sequências de aminoácidos dos peptídeos identificados no sobrenadante, correspondentes às posições P1'-P6' (Schechter e Berger, 1967), em cada amostra da fração peptídica (plaquetas controle, e ativadas por PA-BJ ou trombina). As sequências de aminoácidos complementares (P1-P6) adjacentes aos sítios de clivagem dos respectivos peptídeos foram obtidas utilizando-se a ferramenta WebPICS, disponível *online* na página <http://clipserve.clip.ubc.ca/pics> (Schilling et al., 2011), que também gerou a representação gráfica (*heat map*) Dessas análises. Os conjuntos de sítios de clivagem significativamente representados em cada peptidoma foram comparados par a par (controle x PA-BJ; controle x trombina; PA-BJ x trombina) utilizando a ferramenta IceLogo (Colaert, et al., 2009), que possibilita a visualização dos resíduos de aminoácidos diferenciais e mais frequentes em cada posição, e em cada peptidoma.

3.17 Ensaio de inibição da agregação plaquetária

Para os ensaios de inibição da agregação plaquetária, uma amostra de 500 μL de SPL ($500 \times 10^9/\text{L}$) foi incubada com 1 μg do anticorpo anti-MMP1 (ab38929, Abcam) por 2 min a 37 °C, sob agitação constante de 1.200 rpm. Após este período, foi adicionada trombina (2 nM) ou PA-BJ (100 nM) e a agregação plaquetária foi monitorada por 14 min em agregômetro. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.18 Western blot

Os ensaios de *Western blot*, foram realizados de acordo com o método descrito por Burnette (1981). 200 μL do sobrenadante plaquetário ou 20 μg de proteínas do sedimento plaquetário previamente lisado, foram submetidos à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, e transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™ - GE Healthcare), utilizando o sistema ECL Semi-Dry Transfer Unit (GE Healthcare), por 2 horas com 0.8mA/cm². Em seguida a membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% por 14 horas a 4 °C. Após lavagem com TBS-T 0,05% (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, contendo NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%), a membrana foi incubada por 4 horas com os anticorpos primários: anti-vitronectina 1:1000, anti-trombospondina-1 1:500, anti-filamina-A 1:5000, anti-PAR-1 1:1000, anti-fibronectina 1:1000, anti-MMP1 1:5000 e anti-MMP2 1:1000 (Abcam); anti-plasminogênio 1:500 (R&D); anti-fibrinogênio 1:1000 (Biodesign), anti-vWF 1:500 (Sigma), em TBS-T 0,05%. Em seguida a membrana foi lavada três vezes com TBS-T 0,05% por 10 min e incubada com o anticorpo secundário: anti-IgG de camundongo, ou anti-IgG de coelho, ou anti-IgG de cabra, conjugados com fosfatase alcalina 1:5000 (Abcam) por 1 hora, a temperatura ambiente. Após este período a membrana foi lavada três vezes com TBS-T 0,05%. A

reação foi revelada pela adição do substrato para fosfatase alcalina NBT/BCIP (5-*Bromo-4-chloro-3-Indolyl-phosphate/Nitroblue Tetrazolium*) (Sigma). A reação foi interrompida pela remoção da solução NBT/BCIP e lavagem rigorosa da membrana com H₂O MilliQ®.

3.19 Zimografia de gelatina

A presença de gelatinases no secretoma de plaquetas foi avaliada utilizando a técnica de zimografia descrita por Heussen e Dowdle (1980), na qual 1 mg/mL de gelatina bovina (Sigma) é copolimerizado com acrilamida 12% e bisacrilamida 0,3%, para formar o gel acrilamida/gelatina. Um volume de 300 µL do sobrenadante de plaquetas não ativadas e ativadas por PA-BJ ou trombina foram concentradas em speed vac e avaliados em condições não desnaturantes e não redutoras. A eletroforese foi desenvolvida em temperatura ambiente, a 150 V. Ao final da corrida o gel foi lavado por 60 min em solução tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo Triton X-100 2,5%), para a remoção do SDS. Em seguida, três lavagens de 10 min com água destilada foram realizadas e o gel foi incubado em tampão de ativação (Tris-HCl 50mM pH 8,0 com CaCl₂ 10 mM, NaCl 200 mM e Igepal 0,02%) por 18 h a 37°C. O gel foi corado com azul de Coomassie G-250 (Sigma) e a avaliação da atividade proteolítica foi evidenciada com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação da PA-BJ

A PA-BJ foi isolada do veneno de *B. jararaca* como descrito por Serrano et al. (1995), com algumas modificações. Para este isolamento da PA-BJ foram realizadas quatro etapas de fracionamento (saturação do veneno com sulfato de amônio entre 30-60%; cromatografia em coluna de troca aniônica HiPrep QXL 16/10; e duas cromatografias em coluna de troca catiônica Mono S HR 5/5).

A fração de proteínas precipitadas pela saturação do veneno de *B. jararaca* com sulfato de amônio entre 30 e 60% foi submetida a fracionamento em coluna de troca aniônica (HiPrep QXL), onde a fração de proteínas básicas foi eluída com o tampão inicial da cromatografia, enquanto que a fração de proteínas ácidas ($pI < 7,4$) foi eluída com a adição de um gradiente de NaCl, e continha toxinas estudadas em outros projetos de nosso grupo (não mostrado). A fração básica foi dividida em seis alíquotas, as quais foram submetidas separadamente à cromatografia em coluna de troca catiônica (Mono S), de onde as proteínas foram eluídas por um gradiente de NaCl de 0 – 1 M (Figura 10). As frações coletadas foram avaliadas quanto ao perfil eletroforético e a capacidade de indução de agregação plaquetária (Figura 11 e Tabela 2). As frações eluídas pelo gradiente de NaCl entre 0,3 M e 0,8 M, que apresentaram massa molecular de cerca de 30 kDa, foram capazes de induzir agregação plaquetária (70-90%), com 1 µg, em SPL, como mostrado na Tabela 2.

Figura 10. Perfil cromatográfico em coluna Mono S HR 5/5. Foram aplicados 55 mg da fração de proteínas não retidas na coluna HiPrep QXL . Frações de 0,5 mL foram coletadas sob o fluxo de 1 mL/min. As frações indicadas (21-25) foram recromatografadas na coluna Mono S HR 5/5.

Figura 11. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 12% das frações obtidas da cromatografia na coluna Mono S HR 5/5. Foram aplicados 2 μ g de cada fração. O retângulo destaca as frações submetidas à recromatografia. Os valores à esquerda indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. Coloração por prata.

Tabela 2. Ensaio de indução da agregação plaquetária em SPL.

Fração*	Agregação	Fração*	Agregação	Fração*	Agregação
21	69%	26	76%	34	79%
22	84%	27	80%	37	73%
23	82%	28	90%	38	72%
24	90%	32	74%	39	80%
25	84%	33	70%	44	60%

*Frações obtidas na cromatografia em coluna Mono S HR 5/5 (1 µg).

Entre as frações que induziram agregação plaquetária, optamos por recromatografar aquelas eluídas com NaCl 0,3-0,4M (Figuras 10 e 11, frações 21-25), pois apresentaram perfil eletroforético mais homogêneo, com bandas proteicas de cerca de 30 kDa, e presença de poucos contaminantes (Figura 11). Estas frações foram reunidas, submetidas à diálise e à recromatografia na coluna Mono S, resultando na eluição de três picos de proteínas com pequenas diferenças de pI (entre 0,3 M e 0,4 M de NaCl) (Figura 12). O perfil eletroforético destas frações mostrou que continham uma banda de 30 kDa, que correspondem a proteoformas da PA-BJ (Figura 13A), as quais foram reunidas e submetidas à quantificação de proteínas, que resultou em 2,6 mg. A análise do perfil eletroforético desta preparação mostrou que a diferença de massa molecular observada entre a amostra submetida à redução de pontes de dissulfeto (30 kDa) ou não (25 kDa), se deve ao fato de que a presença destas pontes influencia a mobilidade proteica (Figura 13B).

Para identificação por espectrometria de massas, esta banda proteica foi submetida à digestão tripsínica *in gel* e os fragmentos gerados foram analisados por LC-MS/MS em sistema nanoAcquity/Q-ToF (Waters). Foram identificados 6 peptídeos (MKLGVHSIK, LGVHSIK, FICPNR, KDDVLDKDIMLIR, ETYPDVPHCAK e

INILDHAVCR), encontrados na estrutura primária da PA-BJ (UniProt P81824) (Figura 14).

Figura 12 Perfil da recromatografia em coluna Mono S HR 5/5. Frações de 0,5 mL foram coletadas sob o fluxo de 1 mL/min. A barra indica as frações que continham PA-BJ.

Figura 13. Perfil eletroforético da PA-BJ isolada. (A) Perfil eletroforético das frações obtidas após recromatografia em coluna Mono S. Foram aplicados 1 µg de cada fração. Os valores à esquerda indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. (B) Eletroforese do *pool* das frações 19-26 (2 ug) em gel de SDS poliacrilamida 12%, com redução das pontes dissulfeto (1) e sem redução (2). M (marcadores de massa molecular). Coloração por prata.

			*	*					
1	VVGGRPCKIN	VHRSVLVLLYN	SSSLC	SGTL	INQEWVLTAA	H	CDSKNFK	MK	
51	LGVHSIK	IRN	KNERTRHPKE	K	FICPNRKKD	DVLDK	D	IMLI	RLNRPVSNSE
101	HIAPLSLPSS	PPSVGSVCYV	MGWGKISSTK	E	TYPDVPHCA	K	INILDH	AVC	
151	RAAYTWWPAT	STTLCAGILQ	GGKDTCEGD	S	GGPLICNGLQ	G	IVSGGGN	PC	
201	GQPRKPALYT	KVFDYLPWIE	SIIAGTTTAT	CP					

Figura 14. Identificação da PA-BJ por espectrometria de massas. Peptídeos obtidos pela digestão tripsínica *in gel* da banda proteica de 30 kDa (figura 13B) seguido de análise em espectrômetro de massas Q-ToF (Waters). Em vermelho estão marcados os 6 peptídeos identificados (*Mascot Score* 650). Em azul, os aminoácidos pertencentes à tríade catalítica nas posições His41, Asp86 e Ser180. Os asteriscos representam os sítios de N- e O- glicosilação (UniProt P81824).

Recentemente Yamashiro et al. (2014) isolaram oito proteoformas da PA-BJ do veneno da *B. jararaca* utilizando uma estratégia experimental mais simples, composta por apenas três etapas cromatográficas. Estas proteoformas apresentaram massas moleculares distintas, variando de 30 a 38 kDa, nas análises por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, e de 25 a 30 kDa, nas análises por espectrometria de massas (LC-MS). As diferentes massas moleculares apresentadas pelas diferentes formas desta enzima presentes no veneno, são provavelmente resultantes de diferentes estruturas de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica. No entanto, os diferentes níveis de glicosilação das proteoformas parecem não desempenhar um papel na sua capacidade de induzir a agregação plaquetária (Yamashiro et al., 2014). Assim como a PA-BJ, outras SVSPs do veneno da *B. jararaca*, apresentam diferentes proteoformas, KN-BJ1 2 KN-BJ2 e TL-BJ1, TL-BJ2 e TL-BJ13, que diferem em seus pontos isoelétricos e massas moleculares, mas exibem atividades similares de liberação de cinina do cininogênio e de coagulação do fibrinogênio, respectivamente (Serrano et al., 1998, 2000).

As proteoformas de PA-BJ, isoladas neste estudo, também apresentaram atividade de indução de agregação plaquetária semelhante, e por esta razão a

mistura das frações obtidas pela recromatografia na coluna Mono S (Figuras 12 e 13) foi utilizada para os ensaios de padronização da concentração de PA-BJ para a análise proteômica (Tabela 1).

4.2. Ensaios de agregação plaquetária em SPL

Para determinara concentração enzimática capaz de induzir agregação plaquetária acima de 80% em SPL, foram realizados ensaios de agregação com diferentes concentrações de PA-BJ (50-200 nM) e trombina (1-5 nM) (Tabela 1). Os ensaios mostraram que as concentrações de 100 nM, para PA-BJ, e 2 nM, para trombina, geravam curvas reprodutíveis de agregação de cerca de 80-90% das plaquetas.

A Figura 15 mostra curvas de agregação de plaquetas em SPL ($500 \times 10^9/L$) induzidas por PA-BJ (100 nM) e trombina (2 nM). Perfis de agregação semelhantes a estes foram descritos para PA-BJ (Serrano et al. 1995) e também para a trombocetina, uma serinoproteinase do veneno de *B. atrox* (Niewiarowski et al. 1979). Kahn et al. (1999) e Covic et al (2000), demonstraram que tanto a ativação plaquetária, quanto a liberação de Ca^{2+} intracelular mediada pela clivagem dos receptores PAR-1 (em humanos) e PAR-3 (em camundongos), ocorre com concentrações da ordem de 1 nM de trombina, enquanto que sobre o PAR-4 a trombina só induza a ativação em concentração superior a 10 nM.

Figura 15. Curvas de agregação plaquetária em SPL. Ensaios realizados em triplicatas.

A agregação plaquetária induzida pela PA-BJ envolve a clivagem do receptor PAR-1 entre os resíduos Arg41 e Ser42, como ocorre com a trombina, porém a clivagem de outra ligação (Arg46-Asn47) pela PA-BJ poderia resultar na inativação do receptor, apesar destas duas clivagens pela PA-BJ gerarem um peptídeo mais curto (SFLLR) também capaz de induzir a agregação plaquetária em altas concentrações (Kuliopulos et al., 1999, Santos et al., 2000). Dessa forma, o fato de

que uma concentração 50 vezes mais alta de PA-BJ do que de trombina seja necessária para a agregação >80% das plaquetas se deve ao mecanismo pelo qual a PA-BJ ativa o receptor PAR-1.

Santos et al. (2000) já haviam sugerido que a degradação do “*tethered ligand*” pela PA-BJ estaria relacionada com sua atividade menos potente sobre as plaquetas, em relação à trombina. De fato, a relação entre baixa concentração enzimática e baixa resposta plaquetária, não se restringe somente à PA-BJ, como um agonista. Trombina, em baixas concentrações induz baixa resposta plaquetária e também dessensibiliza PAR-1 à sua ação (Ishii et al., 1993). Considerando o fato de que a ativação de PAR-1 ocorre por um mecanismo enzimático irreversível, como poderia esta sinalização ser interrompida e como a concentração enzimática modula a ativação do receptor? Agonistas clássicos desencadeiam respostas celulares ao se ligarem aos seus receptores específicos. A trombina e a PA-BJ são proteinases, e por isso, mesmo em baixas concentrações, podem clivar e ativar PAR-1 continuamente. No entanto, cada molécula de receptor ativado desencadeia a produção de algumas moléculas do segundo mensageiro IP3. Este segundo mensageiro tem uma meia vida curta e é rapidamente eliminado, assim o nível de segundo mensageiro alcançado é proporcional à velocidade com que os receptores são clivados e ativados, e consequentemente, a taxa de segundo mensageiro também é proporcional à concentração enzimática (Ishii et al., 1993; Coughlin, 2000). Assim, a baixa concentração de segundo mensageiro gerada, mesmo com a contínua clivagem do receptor, induz o desligamento do receptor. Desta forma, PAR-1 torna-se refratário à ação da trombina, mas não à ação do peptídeo TRAP, sugerindo que possa existir outro mecanismo de reativação do receptor quando este não está mais sensível ao à ação do “*tethered ligand*” (Ishii et al., 1993).

Uma outra característica que diferencia o modo de ação da PA-BJ sobre plaquetas, em relação à trombina, e que pode estar relacionada com a diferença de concentração necessária para ativação plaquetária por essas enzimas, é a afinidade da trombina por uma região do exodomínio de PAR-1 que se assemelha à sequência C-terminal da hirudina, e que facilita sua atividade proteolítica sobre este receptor (Matthews et al., 1994; Coughlin, 1998). A ativação plaquetária pela PA-BJ, por outro lado, parece não depender do reconhecimento desse domínio em PAR-1, já que a agregação plaquetária induzida pela PA-BJ é fracamente inibida pelo anticorpo monoclonal WEDE-15, que reconhece o domínio de ligação de hirudina em PAR-1 (Santos et al., 2000). Além disso, a PA-BJ não é inibida por trombomodulina e hirudina, importantes inibidores da trombina (Santos et al., 2000). O exossítio de ligação desses inibidores em trombina é levemente diferente das regiões correspondentes na PA-BJ, sugerindo que a PA-BJ não é capaz de se ligar a hirudina, trombomodulina, e liga-se com baixa afinidade ao domínio tipo hirudina de PAR-1 (Santos et al., 2000; Maroun e Serrano, 2004).

4.3 Delineamento experimental utilizado na caracterização proteômica comparativa da agregação plaquetária induzida pela trombina e pela PA-BJ

Ao longo deste estudo utilizamos diferentes abordagens experimentais no intuito de caracterizar os efeitos da ativação de plaquetas humanas por PA-BJ, comparando aos efeitos desencadeados pela trombina. Assim, a Figura 16 ilustra de forma geral as estratégias experimentais adotadas neste trabalho.

Figura 16. Esquema das estratégias analíticas utilizadas para a caracterização proteômica comparativa da agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina.

4.4 Análise do proteoma do sedimento plaquetário

Nas últimas duas décadas, novas metodologias “*high throughput*” (em larga escala) foram desenvolvidas por diversos grupos de proteômica em todo o mundo, as quais também contribuíram na caracterização do proteoma de plaquetas. Estudos realizados por autores como Burkhart et al. (2012) e Zeiler et al. (2014) forneceram descrições abrangentes do conteúdo proteico de plaquetas em repouso. Burkhart et al. (2012) utilizando uma combinação de diferentes estratégias de fracionamento de peptídeos tripsínicos (COFRADIC, SCX, IEF, HILIC e enriquecimento de fosopeptídeos), identificaram em torno de 4.000 proteínas em plaquetas humanas,

enquanto que Zeiler et al. (2014) identificaram 4.400 proteínas em plaquetas de camundongos, porém sem realizar fracionamento prévio da amostra. Embora a identificação de proteínas plaquetárias por abordagens proteômicas tenha aumentado nos últimos anos, os pesquisadores ainda tem o grande desafio de estabelecer claramente o papel destas proteínas no metabolismo de plaquetas, tanto em processos fisiológicos, como na formação do trombo hemostático, quanto em processos patológicos, como na aterosclerose e na metástase tumoral. Desde então, a proteômica vem contribuindo no entendimento da biologia de plaquetas; com vários estudos caracterizando os subproteomas de plaquetas (grânulos plaquetários, proteínas de membrana, fosfoproteoma, secretoma), e nas alterações do proteoma de plaquetas ativadas.

Assim, este estudo teve início coma a análise qualitativa das proteínas presentes no sedimento de plaquetas em repouso (controle), e ativadas por PA-BJ ou trombina, utilizando a análise por eletroforeses em gel de SDS-poliacrilamida, seguida de digestão tripsínica e identificação de proteínas por espectrometria de massas. Paralelamente, o proteoma do sedimento plaquetário foi avaliado quantitativamente por digestão tripsínica em solução, seguida de descomplexação das amostras, utilizando cromatografia ortogonal e análise por espectrometria de massas de alta resolução.

4.4.1 Análise do proteoma do sedimento plaquetário por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação de proteínas por LC-MS/MS

As proteínas presentes no sedimento de plaquetas não ativadas e ativadas por PA-BJ ou trombina foram inicialmente analisadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Nesta análise não foram observadas alterações significativas no

perfil eletroforético entre as amostras, a não ser por algumas bandas proteicas com diferentes intensidades, na região de massa molecular entre 50 kDa e 14 kDa (Figura 17). Em seguida, no intuito de obter uma análise comparativa mais abrangente do sedimento de plaquetas, a área do gel, correspondente a cada amostra, foi cortada em 28 fatias e submetida à digestão *in gel* com tripsina. Os fragmentos tripsínicos gerados foram analisados por espectrometria de massas em sistema nanoEksigent/LTQ XL, para identificação de proteínas.

Figura 17. Perfil eletroforético das proteínas do sedimento plaquetário. Eletroforese em gel de SDS–poliacrilamida com gradiente de 6% a 18%. **(A)** Foram analisados 150 µg de proteínas do sedimento de plaquetas não ativadas (controle) e ativadas com PA-BJ ou trombina. As setas menores indicam as bandas proteicas com diferenças de intensidades **(B)** Representação da divisão do gel em fatias previamente à digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS. Os valores à esquerda indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. Coloração com Coomassie Coloidal G-250.

Foram identificadas 845 proteínas na amostra controle, 825 na amostra de plaquetas tratadas com PA-BJ e 786 naquela tratada com trombina, sendo que mais de 85% das proteínas identificadas estavam presentes em todas as amostras (Tabela Suplementar 1). Uma parcela importante das proteínas que foram identificadas apenas em uma única amostra são proteínas de baixa abundância no proteoma de plaquetas, fato que talvez tenha dificultado a identificação destas em todas as amostras. Um outro fator que pode limitar a identificação de proteínas em uma mistura fracionada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida é a baixa solubilidade de proteínas hidrofóbicas e a dificuldade de separação de proteínas de massa molecular muito alta ou baixa (Beranova-Giorgianni., 2003; Chandramouli e Qian, 2009). Qureshi et al. (2009), ao analisar o proteoma de plaquetas em repouso, utilizando eletroforese unidimensional como método de fracionamento, seguido de análise por espectrometria de massas em um instrumento do tipo ion trap (similar ao usado em nossa análise), identificaram 957 proteínas pela análise de 6 replicatas biológicas, com uma sobreposição de identificação de mais de 95% entre as amostras, um resultado muito próximo ao obtido neste estudo.

Algumas proteínas que estão envolvidas em processos metabólicos foram identificadas exclusivamente em cada amostra, entre elas a NADH desidrogenase e proteína dedos de zinco 185, identificadas no sedimento de plaquetas ativadas por trombina, e fosfoenolpiruvato carboxiquinase mitocondrial e gama-glutamilciclotransferase, identificadas em plaquetas ativadas por PA-BJ; proteínas como as envolvidas na formação do trombo e que são secretadas durante a ativação plaquetária, tais como PAI1 e proteína S, foram identificadas apenas no proteoma de plaquetas não ativadas (Vélez et al., 2015), explicando o fato de não terem sido identificadas no proteoma de plaquetas ativadas (Tabela 3 e Tabela Suplementar 1).

Tabela 3. Proteínas com contagem espectral diferenciada, identificadas no proteoma do sedimento plaquetário pela análise das fatias de gel indicadas na Figura 16, por digestão *in gel* com tripsina e LC-MS/MS.

	Acesso UniProt	Proteína identificada	Controle		PA-BJ		Trombina	
			NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE
1	ADA10_HUMAN	ADAM-10	1	2	2	3	3	4
2	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	2	2				
3	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	21	52	16	46	13	16
5	CNN2_HUMAN	Calponin-2	10	20	8	9	2	3
6	FA5_HUMAN	Coagulation factor V	7	8	3	3	2	2
7	F13A_HUMAN	Coagulation factor XIII A chain	25	65	20	60	24	94
8	COF1_HUMAN	Cofilin-1	15	48	16	49	7	12
9	FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	27	103	12	41	23	75
10	FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	28	73	15	27	23	55
11	FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	17	41	12	25	18	51
12	ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	17	46	16	30	10	13
13	ENOG_HUMAN	Gamma-enolase	4	16	6	19		
14	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	16	70	13	51	11	54
15	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	5	7			2	2
16	ITA2B_HUMAN	Integrin alpha-IIb	28	61	34	109	32	110
17	LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding	11	14	3	3	2	3
18	MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	10	20	10	33	6	13
19	ML12B_HUMAN	Myosin regulatory light chain 12B	9	20	6	13	5	9
20	MYH9_HUMAN	Myosin-9	111	367	111	401	123	489
21	NID1_HUMAN	Nidogen-1	7	7	1	1	1	1
22	PDL1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1	21	33	20	33	12	17
23	PPIB_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	9	11	7	10	3	4
24	PAI1_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1	3	3				
25	CXCL7_HUMAN	Platelet basic protein	12	47	6	10	2	2
26	PLF4_HUMAN	Platelet factor 4	8	28	5	7	2	5
27	GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	7	14	3	8	1	5
28	ALBU_HUMAN	Serum albumin	24	34	6	12	11	12
29	SPRC_HUMAN	SPARC	6	8			1	1
30	TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1	41	192	31	108	37	142
31	THAS_HUMAN	Thromboxane-A synthase	9	10	12	15	12	15
32	TGFB1_HUMAN	Transforming growth factor beta-1	4	4	2	2	3	3
33	VASP_HUMAN	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	10	24	13	28	7	9
34	PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S	3	3				
35	VWF_HUMAN	von Willebrand factor	11	17	6	6	9	14

Análise por LC-MS/MS em sistema nanoEksigent/LTQ XL. Os resultados foram processados utilizando o programa Mascot (com tolerância de massa de ± 1.2 e $\pm 0,6$ Da para íons precursores e filhos, respectivamente) e posteriormente pelo programa Scaffold™. Foi considerando pelo menos um peptídeo único para identificação da proteína, com probabilidade >99% para identificação de peptídeos e proteínas.

NPU, número de peptídeos únicos; CTE, contagem total de espectros.

Das proteínas identificadas tanto no proteoma de plaquetas não ativadas quanto ativadas, algumas apresentam alterações importantes na contagem de espectros, indicando que houve alteração no proteoma das plaquetas após ativação. As proteínas com alterações mais significativas estão descritas na Tabela 3 e na

Figura 18, e todas as proteínas identificadas pela análise por digestão *in gel* com tripsina e LC-MS/MS estão descritas na Tabela Suplementar 1. Entre estas proteínas identificadas, destacam-se algumas encontradas em menor abundância no proteoma de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina e que são secretadas durante a ativação plaquetária, tais como o fator V e a proteína S, envolvidas na coagulação; fator plaquetário 4 (PF4) e proteína básica de plaqueta (PBP), que são citocinas quimiotáticas pertencentes à família CXC (Brandt et al. 1999); nidogênio-1, envolvido em interações com a matriz extracelular; SPARC que está envolvida na proliferação celular (Brekken e Sage, 2001); soro albumina, que regula a pressão osmótica do sangue, além de ser o maior transportador de proteínas no plasma; e os inibidores alfa-1 anti-tripsina e inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) (Tabela 3 e Figura 18) (Coppinger et al., 2004, 2007; Piersma et al., 2009; van Holten et al., 2014).

Outra importante proteína encontrada em menor abundância em plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, em relação a plaquetas não ativadas, foi o inibidor da dissociação de Rab-GDP (do inglês, *Rab GDP dissociation inhibitor beta*), que regula a troca de GDP/GTP na maioria das proteínas Rab, impedindo a dissociação de GDP e mantendo as plaquetas em seu estado inativado (Tabela 3) (Shock et al., 1997).

Também foi identificada em menor abundância nas plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, a proteína de ligação à forma latente do TGF β (Tabela 3 e Figura 18). A plaqueta é uma importante fonte de TGF β que é secretado durante sua ativação, e que está envolvido no reparo tecidual, promovendo inflamação e angiogênese, enquanto a proteína de ligação a TGF β está envolvida na ativação de sua forma latente (Mustoe et al., 1987; Chen e Wahl, 1999; Blakytyn et al., 2004).

Estas proteínas são secretadas em forma de complexo e a ativação de TGF β parece ocorrer após a sua secreção durante a ativação induzida por trombina (Blakytyn et al., 2004).

Figura 18. Proteínas identificadas com alterações significativas no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas. A identificação foi realizada após digestão em solução *in gel* com tripsina e análise por LC-MS/MS. Para esta análise foram utilizados os valores da contagem total de espectros referentes à identificação de proteínas presentes no sedimento de plaquetas não ativadas (controle), e ativadas por PA-BJ ou trombina. Dados normalizados com o auxílio do programa ScaffoldTM. Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism 6.

As proteínas tromboxano-A sintase, a integrina αIIb e a miosina-9, foram identificadas em maior abundância no proteoma de plaquetas ativadas, tanto por PA-BJ quanto por trombina (Tabela 3 e Figura 18). A enzima tromboxano-A sintase, que é responsável pela formação de tromboxano A₂ (TxA₂), o qual potencializa a ativação plaquetária, após sua secreção (Gryglewski, 2008; Nakahata, 2008), também foi identificada em maior abundância nos proteomas de plaquetas ativadas por trombina e PA-BJ, sugerindo que ambas as enzimas ativam essa via durante a agregação de plaquetas. A subunidade αIIb , que juntamente com a subunidade $\beta 3$, forma a integrina principalmente responsável pela agregação plaquetária, foi identificada com aumento de quase 50% em sua contagem espectral em ambos os proteomas de plaquetas ativadas. Gnatenko et al. (2003) evidenciaram um número expressivo de transcritos de αIIb em plaquetas, em análise por microarranjos de DNA e SAGE (do inglês *Serial Analysis of Gene Expression*), confirmando que esta proteína passa por aumento de expressão durante a ativação plaquetária. No entanto, contrariamente ao que seria esperado, neste estudo não foi detectado o aumento da expressão da subunidade $\beta 3$ desta integrina (Tabela Suplementar 1). A miosina-9, também identificada em maior abundância, está envolvida na remodelação do citoesqueleto ao interagir com actina nos processos de contração e espraiamento plaquetário (Johnson et al., 2007), sugerindo que, assim como a trombina, a PA-BJ também induza seu aumento no processo de ativação plaquetária.

Ainda nas análises do proteoma do sedimento plaquetário, as proteínas vWF e trombospondina-1 também foram identificadas em menor abundância em ambos os proteomas de plaquetas ativadas (por PA-BJ ou trombina), no entanto esta diminuição foi mais evidente nas plaquetas ativadas por PA-BJ (Tabela 3 e Figura 18). Outra importante alteração no proteoma de plaquetas ativadas foi a acentuada

diminuição do fibrinogênio (cadeias alfa, beta e gama) no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas com PA-BJ (Tabela 3 e Figura 18). O fibrinogênio é uma das proteínas mais importantes na agregação plaquetária, mediando a ligação entre plaquetas através de $\alpha\text{IIb}\beta_3$ e é matéria prima primordial na formação da fibrina (Scheraga e Laskowski, 1957; Plow e Ginsberg, 1989). Alterações na abundância do fibrinogênio foram verificadas em todos os métodos de análise do proteoma do sedimento e do sobrenadante de plaquetas e serão discutidas em conjunto mais adiante.

Por outro lado, no proteoma de plaquetas ativadas por trombina foi identificada a diminuição de abundância de proteínas envolvidas no metabolismo energético, tais como alfa enolase, gama enolase e a frutose bifosfato enolase (Esposito et al., 2004), assim como da proteína contendo os domínios PDZ e LIM, que está envolvida em interações proteína/proteína no citoesqueleto (Bauer et al., 2000). A diminuição de abundância destas proteínas ainda não havia sido relatada, bem como sua participação no processo de agregação plaquetária. Da mesma forma, a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP, do inglês *Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*), que está envolvida na inibição da agregação plaquetária mediada por cAMP e cGMP, teve sua abundância significativamente diminuída em plaquetas ativadas por trombina, indicando um mecanismo de modulação da agregação distinto entre trombina e PA-BJ (Tabela 3) (Aszódi et al., 1999). Assim, é interessante notar que, embora o sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ ou por trombina compartilhem muitas semelhanças, algumas diferenças importantes são observadas entre as diferentes ativações (Figura 19).

Figura 19. Algumas proteínas do sedimento plaquetário identificadas com alteração de abundância entre plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, ou não ativadas, após digestão tripsínica *in gel* e análise por LC-MS/MS.

4.4.2 Análise do sedimento plaquetário por digestão tripsínica em solução, cromatografia ortogonal e LC-MS/MS

Neste estudo, a análise analisamos comparativa do proteoma de plaquetas não ativadas (controle) e de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, foi também realizada com as amostras do lisado plaquetário por digestão de proteínas em solução com tripsina, seguida de fracionamento ortogonal dos peptídeos em coluna

capilar constituída das resinas C18/SCX/C18 e análise por LC-MS/MS em sistema nanoProxion/LTQ Orbitrap Velos.

Quanto mais complexo o proteoma a ser analisado, maior a necessidade de fracionamento para diminuir as grandes diferenças de concentração entre as proteínas de um determinado fluido, tecido ou célula, o chamado *dynamic range* das proteínas (Washburn et al., 2001). Nos últimos anos uma variedade de combinações de separações ortogonais, como cromatografias de troca iônica e de fase reversa, têm sido utilizada para melhorar a separação de misturas complexas de peptídeos (Giddings, 1984; Link et al., 1999; Magdeldin et al., 2014). Em nosso estudo optamos por construir uma coluna trifásica na configuração fase reversa/troca catiônica/fase reversa – C18/SCX/C18, que foi utilizada no modo *off-line*, isto é, sem acoplamento direto ao espectrômetro de massas. Este fracionamento dos peptídeos tripsínicos aprimorou a descomplexação das amostras, diminuindo assim o *dynamic range* das proteínas e facilitando sua identificação.

Para avaliar e visualizar a qualidade das análises de identificação de proteínas nas amostras do sedimento plaquetário, os valores de abundância das diferentes proteínas identificadas em cada réplica biológica foram correlacionados. Ao aplicarmos o coeficiente de correlação de Pearson (r) que mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas obtivemos o valor de $r > 0,85$, que indicou o alto grau de correlação entre as amostras, e a reprodutibilidade das etapas de obtenção, processamento e análise das amostras por LC-MS/MS (figura 20).

Figura 20. Reprodutibilidade dos experimentos de identificação de proteínas do sedimento plaquetário por digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS. Gráfico de dispersão da abundância das proteínas identificadas em plaquetas não ativadas (controle - CTL) ou ativadas por PA-BJ ou trombina (Tromb.). O gráfico foi construído utilizando o programa Perseus (plataforma MaxQuant).

Um dos maiores desafios em análise proteômica quantitativa, sem o uso de marcadores, e associada ao pré-fracionamento de peptídeos, é a padronização do processamento das amostras para minimizar as diferenças que podem ocorrer entre as frações a serem comparadas. O uso do programa MaxQuant, possibilitou a correção destas diferenças. O algoritmo deste programa agrega todos os sinais dos íons de um dado peptídeo, que estão dispersos em várias corridas de LC-MS/MS e

considera os fatores de normalização de cada fração, possibilitando a análise da variação global no proteoma em estudo (Cox et al., 2014).

Assim, em nossas análises do sedimento plaquetário foi possível identificar 1580 proteínas quantificáveis entre as amostras controle (plaquetas não ativadas), e ativadas com PA-BJ ou trombina, utilizando a abordagem de digestão tripsínica em solução, cromatografia ortogonal e LC-MS/MS e considerando a média ponderada da intensidade dos íons que identificaram cada proteína (Cox e Mann, 2008) (Tabela Suplementar 2)

Das 1578 proteínas identificadas e quantificadas, 87 apresentaram diferença de abundância entre as três amostras (controle, PA-BJ e trombina), em análises realizadas em duas réplicas biológicas independentes. A significância estatística dessas diferenças foi calculada aplicando-se o teste ANOVA ($p < 0,05$) sobre o Log2 da intensidade dos íons normalizados. Na Tabela 4 estão mostradas as proteínas identificadas com diferenças de abundância entre plaquetas ativadas (PA-BJ ou trombina) em relação às plaquetas não ativadas (controle), e algumas destas diferenças estão ilustradas nas Figuras 21 e 22. A relação de todas as proteínas identificadas no proteoma de plaquetas, por esta abordagem, está descrita na Tabela Suplementar 2, na qual estão descritas todas as informações de intensidade de cada proteína e suas medidas estatísticas.

Tabela 4. Identificação e quantificação das proteínas que apresentaram diferenças estatisticamente significantes no sedimento de plaquetas não ativadas ou ativadas por PA-BJ ou trombina, por digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS.

	Acesso UniProt	Proteína identificada	ANOVA p value	Controle		PA-BJ		Trombina	
				#1	#2	#1	#2	#1	#2
1	Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	0,0144	26,117	26,129	25,659	25,434	25,589	25,609
2	P07741	Adenine phosphoribosyltransferase	0,0455	26,419	26,603	26,149	25,763	25,752	25,737
3	Q9HDC9-2	Adipocyte plasma membrane-associated protein	0,0163	28,644	28,345	27,711	28,096	27,203	27,093
4	P49588	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,0025	24,748	24,974	25,724	25,759	25,980	25,987
5	Q8NFV4	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 11	0,0047	21,785	21,735	23,989	23,635	23,461	23,880
6	P01009-2	Alpha-1-antitrypsin	0,0358	28,402	27,209	24,126	24,785	24,614	22,991
7	P05067-11	Amyloid beta A4 protein	0,0099	29,410	28,984	26,804	27,099	26,600	27,226
8	Q06481-4	Amyloid-like protein 2	0,0296	27,135	29,076	21,709	21,561	27,764	25,343
9	P63010	AP-2 complex subunit beta	0,0354	26,756	26,720	26,881	27,090	26,566	26,535
10	O00203-3	AP-3 complex subunit beta-1	0,0281	24,687	24,987	24,170	24,020	24,262	24,346
11	P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	0,0229	20,340	20,347	22,595	22,065	21,642	22,359
12	O75947	ATP synthase subunit d, mitochondrial	0,0478	24,879	24,882	24,883	25,021	25,145	25,279
13	P56134-4	ATP synthase subunit f, mitochondrial	0,0171	22,261	21,623	19,788	19,226	19,929	20,358
14	P36542-2	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0,0067	23,382	23,920	25,731	25,971	25,178	25,367
15	Q9Y6E2	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	0,0189	20,184	20,191	21,657	21,438	22,272	21,590
16	P27824	Calnexin	0,0215	29,721	29,926	30,052	29,917	29,358	29,417
17	P07339	Cathepsin D	0,0123	23,809	23,747	23,520	23,216	22,452	22,715
18	Q02224-3	Centromere-associated protein E	0,0331	24,332	22,739	25,491	25,246	22,074	21,442
19	O76074	cGMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase	0,0012	30,161	30,156	30,411	30,382	30,054	30,094
20	P09496-2	Clathrin light chain A	0,0156	26,754	26,551	28,322	27,842	27,361	27,375
21	O75534-2	Cold shock domain-containing protein E1	0,0171	24,143	23,614	20,817	21,914	25,450	24,701
22	P01024	Complement C3	0,0409	26,821	26,408	22,010	24,078	21,989	22,974
23	Q9P1F3	Costars family protein ABRACL	0,0379	24,287	25,297	20,777	22,318	24,566	24,764
24	P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	0,0440	29,197	29,162	29,542	29,613	28,931	29,205
25	Q9H7D0	Dedicator of cytokinesis protein 5	0,0115	21,760	20,884	24,007	24,498	24,500	24,023
26	Q12882	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]	0,0290	24,460	24,395	24,805	24,613	24,914	25,075
27	P53634	Dipeptidyl peptidase 1	0,0225	20,585	19,959	20,291	20,415	21,691	22,110
28	O14672	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10	0,0234	32,056	31,846	32,709	32,916	32,984	33,441
29	P26641	Elongation factor 1-gamma	0,0443	28,976	28,775	29,452	29,307	29,248	29,412
30	Q9Y6C2	EMILIN-1	0,0140	30,617	30,519	31,084	31,136	31,144	31,373

	Acesso UniProt	Proteína identificada	ANOVA p value	Controle		PA-BJ		Trombina	
				#1	#2	#1	#2	#1	#2
31	Q96AP7	Endothelial cell-selective adhesion molecule	0,0174	27,052	27,122	26,674	27,001	27,684	27,803
32	A0FGR8-2	Extended synaptotagmin-2	0,0387	27,182	27,184	26,957	27,285	27,855	28,282
33	P02671-2	Fibrinogen alpha chain	0,0107	35,632	35,684	34,731	35,046	35,849	35,959
34	P02675	Fibrinogen beta chain	0,0035	33,828	33,490	32,186	32,228	33,476	33,452
35	P02751-12	Fibronectin	0,0197	29,234	29,655	28,038	27,566	27,884	28,196
36	P09382	Galectin-1	0,0300	23,501	22,981	24,443	24,854	24,195	24,172
37	Q9BSJ2	Gamma-tubulin complex component 2	0,0215	21,603	22,090	20,594	20,647	20,800	20,993
38	P00390-2	Glutathione reductase, mitochondrial	0,0473	28,351	28,232	28,940	29,490	29,147	29,132
39	P69905	Hemoglobin subunit alpha	0,0332	29,965	30,140	30,441	29,971	31,002	31,241
40	Q92902-2	Hermansky-Pudlak syndrome 1 protein	0,0404	23,579	22,308	25,322	24,848	25,666	25,287
41	P04196	Histidine-rich glycoprotein	0,0238	26,421	26,234	24,256	23,330	25,040	24,507
42	P01857	Ig gamma-1 chain C region	0,0017	26,457	26,473	21,140	22,060	21,822	21,630
43	P13598	Intercellular adhesion molecule 2	0,0383	27,604	27,623	27,621	28,254	26,668	26,766
44	P01042-3	Kininogen-1	0,0022	24,791	25,195	23,981	23,339	20,818	20,984
45	Q9Y608-4	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	0,0060	30,853	30,968	31,086	31,094	31,385	31,351
46	P09960	Leukotriene A-4 hydrolase	0,0145	24,697	24,760	24,961	24,956	23,819	24,171
47	O60488-2	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4	0,0176	26,012	25,671	24,919	24,924	25,529	25,437
48	Q5SQ64	Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f	0,0395	29,897	29,498	30,511	30,241	29,491	29,449
49	P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	0,0035	26,347	26,348	27,221	27,048	26,927	26,974
50	Q9Y4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	0,0205	27,197	27,348	26,884	27,030	27,467	27,519
51	P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9	0,0094	29,970	29,856	29,931	30,071	30,481	30,454
52	Q9C011	Myotubularin-related protein 12	0,0484	29,813	29,523	30,677	31,378	30,647	30,905
53	P00387-2	NADH-cytochrome b5 reductase 3	0,0375	29,714	29,587	29,123	29,137	29,238	28,952
54	Q13564-3	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	0,0389	22,645	23,044	21,147	21,739	22,078	22,021
55	Q02818	Nucleobindin-1	0,0099	20,801	21,901	24,316	24,718	24,701	24,934
56	Q9BZF1-3	Oxysterol-binding protein-related protein 8	0,0213	27,576	27,747	26,637	26,745	27,190	27,542
57	Q96HC4	PDZ and LIM domain protein 5	0,0092	29,991	29,904	29,837	29,973	30,549	30,434
58	Q00722-3	Phospholipase C-beta-2	0,0137	24,984	24,830	24,193	24,095	24,346	24,542
59	P46019	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, liver isoform	0,0145	22,590	20,753	27,408	27,384	28,028	30,084
60	P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	0,0235	24,161	24,592	19,836	21,268	21,193	20,117
61	P02775	Platelet basic protein	0,0006	36,056	35,921	32,537	32,719	32,206	32,636
62	P07602	Proactivator polypeptide	0,0423	29,731	29,057	29,789	29,983	27,585	25,976

	Acesso UniProt	Proteína identificada	ANOVA p value	Controle		PA-BJ		Trombina	
				#1	#2	#1	#2	#1	#2
63	P35232	Prohibitin	0,0485	25,665	25,180	26,920	26,884	25,346	26,067
64	O15258	Protein RER1	0,0380	21,711	22,336	23,002	23,279	23,302	23,653
65	P55735	Protein SEC13 homolog	0,0143	22,697	22,731	22,020	22,284	22,964	22,874
66	O95825-2	Quinone oxidoreductase-like protein 1	0,0069	21,894	19,963	27,531	28,647	28,253	29,000
67	P61026	Ras-related protein Rab-10	0,0419	27,777	27,762	28,596	29,100	28,328	28,600
68	Q9P2E9-3	Ribosome-binding protein 1	0,0251	22,170	22,326	22,172	22,337	21,747	21,812
69	P10124	Serglycin	0,0254	27,824	27,355	24,985	24,626	25,114	26,205
70	Q9H2K8	Serine/threonine-protein kinase TAO3	0,0300	30,064	30,214	30,391	30,626	31,133	30,852
71	O15084-2	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory ankyrin repeat	0,0039	22,884	22,472	26,782	26,574	26,302	27,249
72	Q5H9R7-4	Serine/threonine-protein phosphatase 6 regulatory subunit 3	0,0020	24,093	24,136	24,456	24,430	24,068	24,118
73	P36873	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic sub.	0,0451	23,017	22,770	22,027	21,078	21,189	21,113
74	P02768	Serum albumin	0,0003	33,604	33,472	29,868	30,243	29,477	29,627
75	Q9BWM7	Sideroflexin-3	0,0105	24,088	23,974	24,845	24,614	23,829	23,951
76	P30626-3	Sorcin	0,0358	25,885	25,624	25,219	25,064	25,016	25,206
77	P09486	SPARC	0,0498	29,456	29,969	25,159	26,696	25,286	27,024
78	P04179-4	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	0,0404	31,315	31,447	31,792	31,214	32,663	32,394
79	Q9Y6I9	Testis-expressed sequence 264 protein	0,0193	24,421	24,902	25,747	26,050	25,981	25,907
80	P62328	Thymosin beta-4	0,0267	34,230	34,182	34,473	34,591	34,971	35,392
81	P43307	Translocon-associated protein subunit alpha	0,0069	20,499	20,767	22,355	22,418	22,429	21,978
82	Q7Z7H5-3	Transmembrane emp24 domain-containing protein 4	0,0177	23,758	23,975	22,676	22,968	22,340	22,731
83	Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	0,0459	26,421	26,138	25,929	25,827	27,321	26,757
84	O15327	Type II inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase	0,0340	24,086	23,905	23,331	22,959	21,951	22,658
85	P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N	0,0437	26,785	26,903	27,218	27,328	27,478	27,234
86	P46459	Vesicle-fusing ATPase	0,0427	25,137	25,069	25,477	25,138	23,900	24,439
87	P07225	Vitamin K-dependent protein S	0,0010	28,869	28,921	26,312	25,906	26,811	26,801
88	Q7Z2W4	Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	0,0369	25,262	25,687	26,079	26,141	26,733	26,395

Os resultados de LC-MS/MS foram processados utilizando o programa MaxQuant, considerando tolerância de massa de ± 10 ppm para íons precursores e 0,5 Da para íons filhos. Posteriormente os resultados foram analisados utilizando o programa Perseus (plataforma MaxQuant). Foram identificadas 1578 proteínas com 0,01% de taxa de falsos positivos (FDR - False Discovery Rate), das quais 87 proteínas apresentaram diferenças estatisticamente significantes nas amostras do controle (plaquetas não ativadas), PA-BJ e trombina (plaquetas ativadas). # Valores normalizados do log2 da intensidade dos íons. Os dados estatisticamente significantes foram obtidos utilizando o teste de variância ANOVA ($p < 0,05$).

Para comparar os perfis de abundância entre as proteínas identificadas nas amostras de plaquetas controle e naquelas ativadas (PA-BJ ou trombina), utilizamos a análise de cluster hierárquico, na qual as intensidades das proteínas são agrupadas fazendo uso da distância euclidiana, que mede a distância métrica entre dois pontos. A Figura 21 ilustra o cluster hierárquico das principais proteínas que mostraram diferenças de abundância entre as amostras. Nesta análise observamos dois principais ramos do dendrograma agrupados com base nos diferentes níveis de abundância entre cada replica biológica. De forma interessante, é notável o agrupamento entre as replicas biológicas de cada tratamento e, sobretudo, entre as amostras de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, que apresentam maior correlação entre si em comparação com a amostra controle, sugerindo que os efeitos desencadeados em plaquetas por ambas as enzimas apresentam muitas semelhanças.

A Figura 22 complementa estas análises ao ilustrar o perfil quantitativo de cada proteína dentro de cada replica biológica. Nesta figura observamos, igualmente entre os proteomas de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, a diminuição da abundância de algumas proteínas relacionadas ao processo de coagulação, como a proteínas S, fibronectina e PAI1, e proteínas envolvidas em processos inflamatórios como PBP e IgG-1; também são observadas proteínas que tiveram aumento de abundância como ADAM10, emilina-1 e fosforilase b (Tabela 4). No entanto, diferenças importantes são assinaladas entre os proteomas de plaquetas ativadas, dentre as quais é notável a diminuição acentuada da abundância das cadeias alfa e beta do fibrinogênio no proteoma de plaquetas ativadas por PA-BJ. Por outro lado, a diminuição da abundância das proteínas catepsina-D e cininogênio-1 foi mais pronunciadas no proteoma de plaquetas ativadas por trombina.

Figura 21. Cluster hierárquico não supervisionado de proteínas identificadas com abundância diferencial no proteoma de plaquetas não ativadas ou ativadas por PA-BJ ou trombina, avaliado por digestão em solução com tripsina, fracionamento ortogonal e análise por LC-MS/MS. Proteínas apresentando alterações de abundância estatisticamente significantes (ANOVA $p < 0,05$), com intensidades normalizadas e agrupadas utilizando a distância euclidiana. Os clusters destas proteínas estão representados no *heat map* em vermelho, pelas proteínas mais abundantes, e em verde por aquelas menos abundantes. As proteínas identificadas estão indicadas na árvore horizontal; as réplicas biológicas estão indicadas nas árvores verticais. C1 e C2: (plaquetas não ativadas); P1 e P2 (plaquetas ativadas por PA-BJ); T1 e T2 (plaquetas ativadas por trombina). O cluster foi construído utilizando o programa Perseus (plataforma MaxQuant).

Entre as proteínas identificadas com abundância diferencial entre as amostras, e que apresentaram aumento em plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, identificamos algumas envolvidas em processos do metabolismo celular, tais como aspartato aminotransferase, envolvida na gliconeogênese, ATP sintase subunidade gama, que forma ATP a partir de ADP, DOCK5 (do inglês *Dedicator Of CytoKinesis protein 5*), que pertence à família das proteínas trocadoras de guanina (*GEF*, da sigla em inglês, *Guanine nucleotide Exchange Factor*) e que são responsáveis pela ativação de pequenas GTPases como Rho e Rac, envolvidas na remodelação do citoesqueleto (Aslan e McCarty, 2013), timosina beta 4, que inibe a polimerização da actina, clatrina, envolvida na formação do revestimento de vesículas (Pearse, 1976), e fosforilase b subunidade alfa, que é uma quinase responsável pela fosforilação de certos substratos, como troponina-I (Stull et al., 1972), porém pouco se sabe sobre função em plaquetas (Tabela 4 e Tabela Suplementar 2).

Embora as plaquetas não contenham núcleo, o aumento de expressão/abundância de proteínas pode estar relacionado com o aumento da transcrição de mRNAs durante a ativação plaquetária (Gnatenko et al., 2003; McRedmond et al., 2004; Weyrich et al., 2008). Ao correlacionar dados de proteômica e transcriptômica McRedmond et al. (2004), observaram que 69% das proteínas descritas no secretoma de plaquetas tem seu mRNA correspondente também detectado em plaquetas e sugeriram que os transcritos presentes em plaquetas refletem o perfil de expressão de proteínas. Outras evidências de que ocorre expressão de proteínas durante a agregação plaquetária foram reportadas por Pabla et al. (1999), que demonstraram que a transcrição da proteína Bcl-3 (na sigla em inglês de *B-Cell Lymphoma 3 protein*) é regulada pela ligação do

fibrinogênio à integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ durante a agregação plaquetária. Esses autores observaram ainda que a interação entre colágeno e a integrina $\alpha 2\beta 1$ também pode disparar a transcrição de Bcl-3 (Pabla et al., 1999). Ainda, Gnatenko et al. (2003), utilizando técnicas de microarranjos de DNA identificaram 2147 transcritos em plaquetas, dos quais 22% estavam envolvidos com o metabolismo celular e na sinalização intracelular, enquanto 32% deste total ainda não tinha uma função definida em plaquetas. Assim, podemos sugerir que a ativação plaquetária, tanto por PA-BJ quanto por trombina, induz a transcrição de proteínas durante os processos de ativação, secreção e agregação, e por isso, algumas são identificadas em maior abundância no proteoma de plaquetas ativadas (Tabela 4 e Tabela Suplementar 2).

Ainda foram identificadas em maior abundância no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, a proteína 11 contendo o domínio alfa-beta-hidrolase, emilina-1, e ADAM-10 (Tabela 4 e Figuras 21 e 22). A proteína 11 contendo o domínio alfa-beta-hidrolase, é uma enzima relacionada a síndrome de Williams-Beuren, na qual 26 genes contíguos são deletados, inclusive o gene que a codifica, causando principalmente defeitos cardíacos (Merla et al., 2002). Embora esta enzima já tenha sido descrita no proteoma de plaquetas (Burkhart et al., 2012), ainda pouco se sabe sobre sua função, e o fato de que esta proteína tenha sua expressão aumentada em plaquetas ativadas pode indicar sua participação no processo de agregação. Já a proteína emilina-1, presente principalmente na matriz extracelular, está envolvida na ligação de células musculares às fibras elásticas e na manutenção de células vasculares (Zanetti et al., 2004); na hemostasia, sua deficiência está relacionada ao aumento da retração do coágulo sanguíneo (Huang et al., 2015).

A ADAM-10, outra proteína identificada em maior abundância em plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina (Tabela 4 e Figuras 21 e 22), é uma metaloproteinase de membrana, que assim como a ADAM-17, é expressa em plaquetas e tem a função de controlar os níveis de GPVI e GPIb α , respectivamente, controlando processos trombóticos em plaquetas (Bergmeier et al., 2003; Gardiner et al., 2007). Embora a clivagem de GPVI seja dependente do tempo de interação com seus agonistas, como colágeno, convulxina, trombina e anticorpo anti-GPVI (Gardiner et al., 2007), em nossa análise não foi detectada a diminuição de GPVI e nem a presença de peptídeos gerados pela sua clivagem nas análises da fração peptídica do sobrenadante plaquetário (Tabela Suplementar 1 e 2). Ainda assim, o aumento da expressão de ADAM-10 parece estar envolvido nos processos de ativação plaquetária, e o seu aumento foi também observado na ativação plaquetária mediada por PA-BJ.

Entre as proteínas identificadas em menor abundância no proteoma de plaquetas ativadas (por PA-BJ ou trombina) em comparação com plaquetas não ativadas, muitas são secretadas durante o processo de ativação. A maioria dessas proteínas já foi descrita por outros autores que analisaram o secretoma de plaquetas (Coppinger et al., 2004; Wijten et al., 2013; van Holten et al., 2014; Vélez et al., 2015), e também serão descritas adiante em nossa análise do sobrenadante de plaquetas ativadas.

Também em menor abundância no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, foi identificada a proteína S (Tabela 4 e Figuras 21 e 22), uma proteína anticoagulante que atua como cofator na ativação da proteína C e consequente inativação dos fatores V e VII (Walker et al., 1980, 1987); ainda, nesta análise foram identificadas outras proteínas com atividade de inibição, tais

com, o inibidor de ativação do plasminogênio 1 – PAI1, e alfa-1-antitripsina que tem atividade sobre elastase, plasmina e trombina (Tabela 4 e Figuras 21 e 22).

A proteína amiloide beta 4, que está envolvida no desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer, também foi identificada em menor abundância no proteoma de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina (Tabela 4 e Figura 21). As plaquetas são a principal fonte de amiloide beta 4 plasmática, contribuindo com 90% de sua concentração (Li et al., 1994), sendo que o fragmento peptídico A β 40, responsável pela formação de placas neuronais, também é encontrado no citoplasma de plaquetas e é secretado na ativação plaquetária induzida por colágeno, trombina e ácido araquidônico (Skovronsky et al., 2001). Tanto a proteína íntegra quanto o peptídeo A β 40 são capazes de induzir ou potencializar a ativação plaquetária, causando a secreção de grânulos e agregação (Shen et al., 2008; Sonkar et al., 2014). Assim, a menor abundância verificada tanto em plaquetas ativadas por trombina quanto por PA-BJ, pode estar relacionada com a secreção desta proteína, que possivelmente também contribui para potencializar a agregação plaquetária induzida por estas proteinases.

Ainda em menor abundância em plaquetas ativadas, identificamos a proteína do complemento C3 e a proteína básica de plaqueta, que estão envolvidos em processos inflamatórios, e a fibronectina, uma proteína adesiva envolvida na formação do agregado plaquetário fazendo a ligação plaqueta-plaqueta através da integrina α IIb β 3 (Tabela 4 e Figuras 21 e 22). A diminuição de abundância da fibronectina também foi identificada por *Western blot*, no qual foi verificada a diminuição da intensidade de sua banda correspondente em ambos os sedimentos de plaquetas ativadas por trombina ou PA-BJ (Figura 23).

Embora as proteínas vWF e trombospondina-1 tenham sido identificadas em menor abundância, principalmente no sedimento de plaquetas ativadas por PABJ, nas análises após digestão *in gel* e LC-MS/MS, estas alterações não foram estatisticamente significantes nas análises utilizando a abordagem de digestão em solução, fracionamento ortogonal e LC-MS/MS. No entanto, nas análises por *Western blot* podemos observar a diminuição de intensidade das bandas correspondentes a estas proteínas em ambos os sedimentos de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina (Figura 23), sugerindo que tanto a PA-BJ quanto a trombina possam induzir igualmente a secreção destas proteínas após ativação plaquetária.

Figura 23. Análise por *Western blot* das proteínas presentes no sedimento de plaquetas. Foram analisados 20 µg de proteínas do sedimento de plaquetas não ativadas (controle) e ativadas (PA-BJ ou trombina). A filamina foi utilizada como controle de concentração proteica. As setas indicam as bandas proteicas reconhecidas pelos anticorpos. Valores à esquerda indicam as mobilidades dos marcadores de massa molecular (kDa).

A catepsina-D, umas das proteínas identificadas com menor abundância no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas por trombina, mas não por PA-BJ (Tabela 4 e Figuras 21 e 22), é uma aspartil proteinase lisossomal, que é ativa em pH ácido, e que também pode ser encontrada em vesículas extracelulares, endossomos e fagossomos (Leto et al., 1992; Hu et al., 2008). Sua função em plaquetas ainda é pouco conhecida, no entanto parece estar envolvida em processos de degradação de proteínas envolvidas no crescimento celular. Nesse sentido, foi demonstrado que a trombina induz o aumento do mRNA que codifica a catepsina-D assim como o aumento de sua secreção no plasma, contribuindo para o fenótipo maligno principalmente do câncer de mama (Johnson et al., 1993), induzindo migração celular, metástase e angiogênese (Hu et al., 2008). Recentemente van Holten et al. (2014) demonstraram que tanto a ativação de plaquetas mediada por PAR-1 quanto por PAR-4, pode induzir a secreção de catepsina-D, sugerindo que a diminuição de abundância desta proteinase, observada no sedimento de plaquetas ativadas por trombina, pode estar relacionada com sua secreção após ativação.

O cininogênio, também identificado em menor abundância somente no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas por trombina, tem um importante papel no início da coagulação sanguínea juntamente com o fator XII na ativação da tromboplastina plasmática (Saito, 1977). Além disso, a calicreína, ativada pelo fator XII, cliva o cininogênio liberando os peptídeos bradicinina ou kalidina, conhecidos como cininas vasoativas (Rocha e Silva, 1962), que tem ação sobre o tônus vascular. Em plaquetas, o cininogênio inibe a agregação induzida por trombina, mas não por outro agonista, de forma dose-dependente, inibindo a ligação de trombina a plaquetas e inibindo a clivagem da agreguina, um proteoglicano envolvido na

ativação do receptor de, a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Puri et al., 1991). Assim, a diminuição da abundância de cininogênio no sedimento de plaquetas ativadas por trombina pode estar relacionada com sua secreção e possível papel na modulação da agregação plaquetária (Tabela 4 e Figuras 21 e 22).

Da mesma forma que na análise do sedimento plaquetário por digestão *in gel* com tripsina e LC-MS/MS (Tabela 3), o fibrinogênio foi identificado em menor abundância em plaquetas ativadas por PA-BJ em comparação com a trombina, no experimento de digestão em solução com tripsina e LC-MS/MS (Tabela 4 e Figuras 21 e 22), sugerindo que ocorre secreção diferencial entre as ativações por PA-BJ e trombina.

Em nossas análises de plaquetas por espectrometria de massas não identificamos o receptor PAR-1, mas ao investigarmos a presença dessa proteína por *Western blot*, verificamos a diminuição significativa da banda de proteína reconhecida pelo anticorpo, no sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ, e a sua total ausência naquelas ativadas por trombina (figura 24). Este é um evento esperado, já que após 60 segundos de ativação este receptor é endocitado e degradado nos lisossomos, como controle sua atividade (Hoxie et al., 1993; Ishii et al., 1993). Igualmente ao que ocorre com outros receptores acoplados a proteína G, a ativação de PAR-1 é rapidamente interrompida e o receptor é internalizado por um mecanismo depende de fosforilação (Ishii et al., 1993; Coughlin, 2000). No entanto, diferente do que ocorre em fibroblastos e células endoteliais, a capacidade de resposta a trombina é mantida pelo fornecimento de um novo receptor para a superfície da célula, a partir de um conjunto intracelular pré-formado, garantindo a capacidade de resposta ao agonista. Em plaquetas o receptor PAR-1 uma vez ativado, é internalizado e encaminhado aos lisossomos para degradação.

Neste sentido, uma hipótese importante a ser considerada é que a clivagem do receptor PAR-1 pela PA-BJ, em duas distintas ligações, possa gerar uma parcela de receptores ativados pelo novo N-terminal revelado (*tethered ligand*), e outra pelo peptídeo gerado (SFLLR), pela clivagem do receptor entre as ligações Arg41-Ser42 e Arg46-Asn47 (Santos et al., 2000). Assim, a ativação defasada ou por vias diferentes, justificaria a presença de algumas moléculas remanescentes do receptor, como identificado no proteoma de plaquetas, após 8 min de ativação (Figura 24).

Figura 24. Análise por *Western blot*. do receptor PAR-1 presente no sedimento de plaquetas. Foram analisados 20 µg de proteínas do sedimento de plaquetas não ativadas (controle) e ativadas (PA-BJ ou trombina). A seta indica a banda proteica reconhecida pelo anticorpo anti-PAR-1. Valores à esquerda indicam as mobilidades dos marcadores de massa molecular (kDa).

Májek et al. (2010) ao compararem o proteoma de plaquetas em repouso ou ativadas por diferentes agonistas (trombina, colágeno e ácido araquidônico), identificaram 144 spots diferenciais entre as amostras, utilizando eletroforese bidimensional. Neste trabalho os autores também observaram que a proteína

ETHE1, envolvida no metabolismo de mitocôndrias, e CDV3, uma proteína citoplasmática ainda sem função definida, apresentaram *spots* de maior intensidade em plaquetas ativadas por ácido araquidônico em relação aos outros agonistas (Májek et al., 2010). Ainda estes autores evidenciaram que as proteínas F-actina, a proteína de ligação ao nucleotídeo guanina, e o oncogene FGFR1, foram identificadas com alterações de volume de spot entre todos os agonistas estudados (Májek et al., 2010), indicando que estas diferenças estão relacionadas aos diferentes tipos de indutores da ativação plaquetária e seus diferentes receptores. Por outro lado, Gárcia et al. (2004) ao estimular plaquetas com TRAP, identificou pela primeira vez a presença da proteína tirosina quinase Dok-2 em maior abundância em relação a plaquetas em repouso. A proteína Dok-2 já tinha sido relacionada à ativação plaquetária induzida por colágeno, convulxina e trombina, demonstrando que diferentes agonistas também podem compartilhar vias de sinalização semelhantes.

Embora alguns trabalhos já tenham evidenciado os diferentes efeitos desencadeados quando se ativa PAR-1 ou PAR-4 em plaquetas (Ma et al., 2005; Italiano et al., 2008), nosso trabalho evidencia pela primeira vez diferenças entre a ativação plaquetária induzida por diferentes agonistas de caráter enzimático. Assim, embora o proteoma de plaquetas ativadas por PA-BJ ou por trombina compartilhem muitas semelhanças, as poucas diferenças observadas são bastante intrigantes e sugerem que essas enzimas, ainda que induzam a ativação plaquetária por meio dos receptores PAR-1 e PAR-4, podem utilizar vias diferentes para chegar à agregação plaquetária.

Utilizando a abordagem de digestão em solução, fracionamento ortogonal e análise por LC-MS/MS foi possível aumentar a cobertura de identificação das proteínas e confirmar algumas alterações de abundância já evidenciadas nas

análises de digestão *in gel* e LC-MS/MS (Figura 19). A Figura 25 ilustra as principais diferenças de abundância identificadas entre o sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina em relação ao controle (plaquetas não ativadas). Entre elas destacamos a diminuição de abundância de proteínas em plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, como PBP, PAI1, proteína S e SPARC; e proteínas com diminuição de abundância exclusivamente em plaquetas ativadas pela PA-BJ, como o fibrinogênio, ou ativadas por trombina, como catepsina-D e cininogênio (Figura 25).

Figura 25. Algumas proteínas do sedimento plaquetário identificadas com alteração de abundância entre plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, ou não ativadas, após digestão tripsínica em solução, fracionamento ortogonal e análise por LC-MS/MS.

4.5 Análise do sobrenadante plaquetário (secretoma)

Nas análises do sobrenadante plaquetário (secretoma) de plaquetas ativadas por PA-BJ ou por trombina, empregamos três diferentes abordagens para caracterizar o conteúdo liberado pelas plaquetas ativadas: 1) análise do perfil eletroforético das proteínas secretadas e identificação das bandas diferenciais por digestão tripsínica *in gel*, seguida da análise por espectrometria de massas no sistema nanoAcquity/Q-TOF Ultima; 2) identificação e quantificação das proteínas secretadas, por digestão tripsínica em solução, seguida da análise por espectrometria de massas no sistema nanoProXion/LTQ Orbitrap Velos ; 3) identificação da fração peptídica do sobrenadante por LC-MS/MS, no intuito de caracterizar a degradação proteica desencadeada durante a ativação plaquetária. Para analisar o conteúdo de proteínas e peptídeos presentes no secretoma plaquetário, para estas análises foi utilizado um volume igual do sobrenadante plaquetário da amostra controle e daquelas ativadas com PA-BJ ou trombina, no sentido de se avaliar comparativamente as mudanças no secretoma plaquetário.

4.5.1 Análise da fração proteica do sobrenadante de plaquetas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e identificação por espectrometria de massas

Para a análise comparativa da fração proteica do sobrenadante de plaquetas não ativadas, ou ativadas por PA-BJ ou trombina, foi realizada eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, onde as amostras, contendo 100 µL do sobrenadante de 500×10^9 plaquetas/L, foram analisadas em triplicata. O perfil eletroforético das proteínas revelou diferenças significativas de intensidade de coloração de algumas bandas proteicas entre as amostras, e algumas destas diferenças estão indicadas na Figura 26. Além das diferenças de coloração também foi observada a presença

de novas bandas proteicas com cerca de 40, 28, 12 e 10 kDa nas amostras de plaquetas ativadas. As bandas diferenciais foram submetidas à digestão tripsínica *in gel* e os fragmentos gerados foram identificados por LC-MS/MS. Tanto o perfil eletroforético quanto os resultados das análises por espectrometria de massas, apresentaram reprodutibilidade entre as réplicas biológicas. As proteínas identificadas nas bandas diferenciais estão indicadas na Figura 26 e na Tabela Suplementar 3.

Figura 26. Perfil eletroforético das proteínas do sobrenadante plaquetário. Eletroforese em gel de SDS–poliacrilamida (12%). Foram analisados 100 µL do sobrenadante de plaquetas não ativadas (controle) e ativadas com PA-BJ ou trombina. As bandas indicadas em vermelho foram recortadas nas três amostras e separadamente submetidas à digestão com tripsina e análise por LC-MS/MS. Os valores à esquerda indicam a mobilidade dos marcadores de massa molecular. As setas indicam as proteínas identificadas nas respectivas bandas. Coloração por prata.

Após ativação, as plaquetas liberam uma fração do conteúdo de seus grânulos alfa e densos, dos lisossomos, além de micropartículas e exossomos, no microambiente extracelular. A secreção plaquetária é modulada pela sinalização desencadeada pelo estímulo inicial, seguida do aumento de cálcio intracelular que promove rearranjos no citoesqueleto necessários para a alteração da forma das plaquetas e da fusão de grânulos a membrana plasmática através do sistema canalicular aberto (White e Escolar, 1991).

A maior parte do conteúdo plaquetário é formado por proteínas que foram sintetizadas ainda nos megacariócitos e são carregadas nos grânulos durante o processo de biossíntese plaquetária (Heijnen et al., 1998). Outras proteínas como o fibrinogênio e o fator V da coagulação são captados do plasma (Louache et al., 1991; Camire et al. 1998), e há ainda outras que são sintetizadas a partir de mRNAs presentes em seu citoplasma, tais como a citocina IL-1 β , o regulador transcricional Bcl-3 e o TIMP2, um inibidor de MMP (Weyrich et al., 1998; Lindemann et al., 2001; Cecchetti et al., 2011).

Entre as proteínas identificadas no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, a trombospondina-1, o fator XIII da coagulação, e o fibrinogênio, estão envolvidas na formação do trombo plaquetário, e já foram extensivamente descritas como presentes no secretoma de plaquetas ativadas, em outros estudos (Coppinger et al., 2004; Maynard et al., 2007; Piersma et al., 2009; Wijten et al., 2013; van Holten et al., 2014).

A trombospondina-1 é uma glicoproteína de 450 kDa, formada por 3 cadeias polipeptídicas idênticas, que é encontrada quase exclusivamente em plaquetas, e que corresponde a 20% do total das proteínas secretadas por plaquetas ativadas (Adams e Lawler, 2004). Dardik e Lahav, (1987) demonstraram *in vitro* que a

trombospondina-1 é clivada pela trombina, gerando um fragmento de 35 kDa, da porção N-terminal e que contém o domínio de ligação à heparina, e outro fragmento maior, de 160 kDa, está envolvido na estabilização do agregado plaquetário Rabhi-Sabile et al. (1996). Neste estudo, a trombospondina-1 foi identificada em bandas proteicas de ~160 kDa e ~30 kDa, no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina e, uma banda adicional de ~35 kDa somente no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ (Figura 26). Os peptídeos identificados em ambas as bandas proteicas de ~35 kDa e ~30 kDa são da região N-terminal da trombospondina-1 (Figura 26 e Tabela Suplementar 3), sugerindo que esta proteína foi processada em ambos os secretomas gerados por PA-BJ e trombina, sendo que na ativação induzida por PA-BJ ocorre um processamento diferencial desta proteína, resultando na banda de 35 kDa.

As proteínas, fator plaquetário 4 (PF4) e proteína básica de plaqueta (PBP), são citocinas quimiotáticas que pertencem a subfamília CXC. O PF4, uma quimiocina encontrada predominantemente em plaquetas, diferente da PBP não tem um papel claro em processos inflamatórios, no entanto, tem um importante papel na ao inibir a angiogênese e também modulando a formação do trombo (Kowalska et al., 2010). Neste estudo o PF4 foi identificado no secretoma de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, assim como sua diminuição de abundância foi evidenciada em ambos proteomas do sedimento de plaquetas ativadas (Tabela 3 e Figuras 18, 19 e 26). Já a PBP é sucessivamente clivada em diferentes regiões, formando três fragmentos C-terminais biologicamente ativos: CTAP-III (do inglês *Connective Tissue-Activating Peptide III*), NAP-2 (do inglês *Neutrophil-Activating Protein-2*) e β -tromboglobulina (β -TG) (Malkowski et al. 1995; Brandt et al. 2000). β -TG é um fragmento menor identificado somente em plaquetas estimuladas, que está

envolvido em processos pro- inflamatórios e na quimiotaxia de fibroblastos (Senior et al., 1983; Brandt et al. 2000). A PBP foi identificada em duas bandas de massas moleculares distintas, 10 kDa e 8 kDa, indicando que esta proteína foi processada em ambas as ativações plaquetárias (PA-BJ ou trombina) (Figura 26 e Tabela Suplementar 3). Também foi identificada em menor abundância no sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina (Tabela 3 e 4 e Figuras 19 e 25).

A SPARC (do inglês *Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), também conhecida como osteonectina e BM-40, é uma glicoproteína associada a matriz extracelular que é expressada em uma variedade de tecidos durante a embriogênese e o reparo tecidual (Lane e Sage, 1994). Em plaquetas é encontrada em grânulos alfa e em menor abundância na superfície plaquetária, que é secretada durante a ativação por trombina ou colágeno (Kelm e Mann, 1990). Esta proteína se liga às proteínas da matriz extracelular, tais como colágeno e vitronectina modulando a interação célula/célula e célula/matriz (Brekken e Sage, 2001). Também regula a proliferação celular ao se ligar ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), ao fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2), e ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Brekken e Sage, 2001). SPARC foi identificada no secretoma de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, e, em concordância, foi também identificada em menor abundância nos é respectivos sedimentos plaquetários (Tabelas 3 e 4, Figuras 18, 19, 25 e 26).

A soro albumina, proteína mais abundante no plasma, além da função de controle da pressão osmótica do sangue e também está envolvida no transporte de muitas proteínas não solúveis no plasma. Assim, a secreção de albumina durante a ativação plaquetária, por PA-BJ e trombina, poderia estar relacionada ao carreamento de proteína(s) plaquetárias pouco solúveis. Além disso, outras funções

biológicas para a soro albumina em plaquetas foram sugeridas, entre elas a inibição da agregação plaquetária induzida por trombina (Jørgensen e Stoffersen, 1980; Folsom et al., 2010).

Devido à baixa concentração proteica no sobrenadante plaquetário, mesmo após a ativação/secreção (~30 µg em plaquetas não ativadas; ~80 µg em plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina), a análise do proteoma por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e LC-MS/MS é relativamente limitada, mas é bastante informativa sobre as alterações ocorridas durante a ativação. O perfil eletroforético das proteínas secretadas apresentou claramente o aumento da concentração proteica após ativação por ambas as enzimas, fato que também foi evidenciado na determinação da concentração proteica. Embora não tenha sido possível avaliar diferenças de abundância entre as proteínas secretadas, foi possível constatar processamentos proteolíticos, como observado para trombospondina-1 e PBP, que ocorrem após a secreção plaquetária. É interessante notar que tanto o perfil eletroforético quanto os processamentos proteolíticos também são observados na secreção plaquetária induzida pela PA-BJ, sugerindo que esta compartilhe com a trombina alguns eventos durante a ativação plaquetária.

4.5.2 Análise da fração proteica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas

A segunda abordagem que utilizamos para o estudo do secretoma de plaquetas é conhecida como *Shotgun Proteomics*, na qual uma mistura complexa de proteínas é digerida com tripsina (*bottom-up proteomics*) e analisada por uma combinação de cromatografia líquida de alta eficiência seguida de análise por espectrometria de massas em tandem (MS/MS). Nesta análise, realizada em triplicata, foram identificadas 458 proteínas com diferença de abundância, entre a amostra controle (plaquetas não ativadas) e ativadas por PA-BJ ou por trombina (Tabela Suplementar 4). Entre estas proteínas encontram-se várias que são oriundas dos grânulos plaquetários, e também proteínas de secretadas em vesículas extracelulares (García et al., 2005; Capriotti et al., 2013; Aatonen et al., 2014; Milioli et al., 2015).

Ao correlacionamos os valores de abundância das diferentes proteínas identificadas, aplicando o coeficiente de correlação de Pearson (r), observamos uma maior correlação ($r > 0,92$) entre as amostras do secretoma de plaquetas ativadas (PA-BJ ou trombina), do que entre estas amostras e o controle ($r = 0,6 - 0,75$), indicando que, embora essas amostras se correlacionem, existem diferenças entre o secretoma de plaquetas não ativadas e ativadas (Figura 27).

Das 458 proteínas identificadas, 163 apresentaram diferença de abundância entre as três amostras (controle, PA-BJ e trombina). A significância estatística dessas diferenças foi calculada aplicando-se o teste ANOVA ($p < 0,05$) sobre a contagem normalizada do total de espectros, considerando como valor mínimo pelo menos uma diferença de 3 contagens espectrais entre as amostras. Na Tabela 5 é

Figure 1 is a 7x7 matrix of scatter plots showing the relationship between different data sets. The rows and columns are labeled CTL1, CTL2, CTL3, PA-BJ1, PA-BJ2, PA-BJ3, and Tromb.1. Each plot shows a positive linear correlation with a regression coefficient value displayed in the top left corner. The diagonal elements are all 1.0. The off-diagonal elements show varying degrees of correlation, with CTL1 having the highest correlations (0.974 to 0.954) and Tromb.1 having the lowest (0.709 to 0.922).

Figura 27. Reprodutibilidade dos experimentos de identificação de proteínas do sobrenadante de plaquetas por digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS. Gráfico de da abundância das proteínas identificadas em plaquetas não ativadas (controle - CTL) ou ativadas por PA-BJ ou trombina (Tromb.). O gráfico foi construído utilizando o programa Perseus (plataforma MaxQuant).

Tabela 5. Identificação e quantificação das proteínas que apresentaram diferenças estatisticamente significantes na fração proteica do sobrenadante de plaquetas não ativadas ou ativadas por PA-BJ ou trombina, por digestão em solução com tripsina e LC-MS/MS.

	Acesso UniProt	Proteína identificada	ANOVA p-value	Controle						PA-BJ						Trombina					
				NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE
1	P62258	14-3-3 protein epsilon	< 0,00010	9	24	6	25	5	19	3	13	3	14	3	14	3	15	3	15	3	14
2	P31946-2	14-3-3 protein beta/alpha	0,00086	6	20	6	23	5	21	2	8	3	13	2	7	4	13	1	6	2	8
3	Q04917	14-3-3 protein eta	0,0045	5	13	4	17	5	17	1	6	2	12	2	9	2	8	2	8	2	7
4	P61981	14-3-3 protein gamma	0,0013	5	19	3	23	3	16	3	10	2	12	2	10	4	16	2	10	3	11
5	P27348	14-3-3 protein theta	0,014	3	12	3	17	2	14	1	6	4	13	1	7	1	7	2	8	2	8
6	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	< 0,00010	12	48	12	56	14	48	9	33	10	36	9	27	8	25	4	20	6	22
7	P52209	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	0,00013	6	10	6	12	6	13	0	0	1	2	0	0	1	1	1	2	0	0
8	P11021	78 kDa glucose-regulated protein	0,0042	8	18	7	15	5	13	3	4	2	4	2	3	6	12	2	4	1	3
9	P68032	Actin, alpha cardiac muscle 1	< 0,00010	2	121	2	119	1	114	2	73	2	78	1	71	1	67	1	47	1	41
10	P60709	Actin, cytoplasmic 1	0,00015	22	638	19	779	22	707	16	402	17	478	16	439	15	521	14	468	10	496
11	P61160-2	Actin-related protein 2	0,006	6	10	6	11	3	5	0	0	1	1	0	0	1	2	1	2	2	3
12	O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2	< 0,00010	4	7	3	7	5	7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
13	O15145	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	0,011	3	8	3	9	2	4	0	0	0	0	0	0	2	3	1	1	0	0
14	P59998-3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	0,005	3	7	4	7	2	4	0	0	2	3	0	0	1	2	1	2	1	2
15	O15511-2	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5	0,013	3	5	3	8	2	4	1	2	1	2	1	1	1	2	0	0	0	0
16	P61158	Actin-related protein 3	0,00014	11	21	11	18	10	18	4	6	4	7	2	4	5	10	5	8	3	7
17	P00568	Adenylate kinase isoenzyme 1	< 0,00010	3	5	3	6	3	5	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	3
18	Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	0,0055	13	72	14	82	13	50	8	37	9	50	5	33	7	37	8	42	6	34
19	P01009	Alpha-1-antitrypsin	0,021	6	13	8	17	10	21	9	29	9	36	9	30	9	33	8	27	7	30
20	P04217	Alpha-1B-glycoprotein	0,00049	1	1	1	1	1	2	4	9	3	7	4	9	5	8	3	6	3	7
21	P12814-3	Alpha-actinin-1	< 0,00010	44	157	41	169	45	157	24	71	24	81	25	67	29	95	25	71	21	65
22	O43707	Alpha-actinin-4	0,0058	8	70	8	86	3	65	0	0	1	36	1	34	1	44	0	0	0	0
23	P06733	Alpha-enolase	0,0011	12	40	16	64	13	44	9	24	9	26	10	26	8	26	8	21	7	18
24	P05067-11	Amyloid beta A4 protein	0,003	1	1	1	1	0	0	11	33	8	28	8	29	9	28	7	15	4	10
25	P01008	Antithrombin-III	0,017	0	0	0	0	2	3	1	2	2	3	2	3	3	5	4	6	2	4
26	P02749	Beta-2-glycoprotein 1	0,018	2	2	0	0	4	5	4	6	6	12	6	10	3	10	3	10	4	10
27	P61769	Beta-2-microglobulin	0,02	2	6	2	6	3	8	2	5	2	6	2	6	2	4	1	4	1	2
28	Q9HBI1-2	Beta-parvin	0,029	7	19	7	17	8	19	3	4	6	16	3	5	5	11	5	12	4	13
29	Q05682-2	Caldesmon	0,00081	11	20	5	13	9	17	2	3	2	3	2	2	2	4	2	4	1	2
30	P62158	Calmodulin	0,00068	6	13	5	11	4	9	1	2	2	5	1	2	2	4	1	2	2	5
31	Q99439	Calponin-2	0,0045	3	5	3	8	3	5	2	2	1	1	0	0	2	3	2	3	2	4
32	P00918	Carbonic anhydrase 2	0,0039	5	11	7	19	5	11	1	2	1	3	1	2	1	4	2	8	1	2
33	P07339	Cathepsin D	0,0027	1	1	0	0	0	0	4	7	5	9	4	7	4	7	4	9	4	9
34	P00450	Ceruloplasmin	0,0052	0	0	2	2	2	2	6	12	7	14	5	10	7	12	9	18	6	12
35	O00299	Chloride intracellular channel protein 1	< 0,00010	11	31	10	34	9	21	3	6	3	7	3	7	4	6	2	4	2	4
36	Q14019	Coactosin-like protein	0,00065	3	9	4	12	4	9	1	4	2	4	0	0	2	3	2	6	1	3
37	P12259	Coagulation factor V	0,0056	5	9	3	4	6	9	15	37	13	27	11	24	12	32	15	37	10	27
38	P00488	Coagulation factor XIII A chain	0,00048	19	58	20	77	21	70	12	35	11	42	14	34	12	42	11	35	9	31
39	P23528	Cofilin-1	0,0012	8	43	9	52	9	42	7	29	9	33	8	25	8	33	4	18	5	23
40	P01024	Complement C3	0,00062	4	6	4	6	5	7	15	31	16	34	20	40	12	30	17	40	10	28

	Acesso UniProt	Proteína identificada	ANOVA p-value	Controle						PA-BJ						Trombina					
				NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE
41	P31146	Coronin-1A	< 0,00010	9	17	10	22	9	18	4	8	4	6	3	5	4	8	2	4	3	6
42	Q9ULV4-2	Coronin-1C	0,00038	6	9	7	10	5	6	2	3	0	0	0	0	1	2	2	2	1	1
43	P46109	Crk-like protein	0,0046	3	5	2	4	2	4	0	0	1	2	0	0	1	2	1	2	1	1
44	P21291	Cysteine and glycine-rich protein 1	0,045	3	6	4	5	5	10	1	1	1	1	0	0	1	2	1	2	0	0
45	P30044-2	Cytoplasmic+peroxisomal of Peroxiredoxin-5	0,00061	5	11	5	8	6	10	0	0	0	0	0	0	1	2	1	2	2	3
46	P81605-2	Dermcidin	0,00032	2	4	2	4	2	4	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
47	O00429-2	Dynamin-1-like protein	0,0024	4	6	6	11	4	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	Q9H4M9	EH domain-containing protein 1	0,00053	1	6	1	6	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	P52907	F-actin-capping protein subunit alpha-1	0,012	2	7	2	6	4	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	P47755	F-actin-capping protein subunit alpha-2	< 0,00010	4	7	4	7	3	7	1	2	2	3	2	3	1	2	2	3	2	3
51	P47756-2	F-actin-capping protein subunit beta	0,001	5	11	6	9	5	8	2	4	2	4	2	5	1	3	1	4	2	5
52	Q86UX7-2	Fermitin family homolog 3	0,00014	21	51	21	61	20	50	4	12	10	28	9	20	10	26	12	30	10	28
53	P02671	Fibrinogen alpha chain	0,019	26	123	27	104	28	149	30	234	22	180	33	236	17	131	12	83	10	114
54	P02675	Fibrinogen beta chain	0,0073	27	185	23	137	27	202	34	777	24	598	33	930	25	419	22	253	26	593
55	P02679-2	Fibrinogen gamma chain	0,0036	21	85	20	80	23	106	27	488	23	422	26	691	19	311	17	141	13	332
56	P02751-10	Fibronectin	< 0,00010	1	1	4	6	5	6	18	43	20	44	22	51	20	47	23	53	17	40
57	P21333-2	Filamin-A	0,0062	102	406	103	472	87	251	54	197	57	212	52	163	58	214	53	207	37	164
58	Q13642-1	Four and a half LIM domains protein 1	0,00091	5	8	4	8	7	9	1	2	2	4	2	4	2	4	3	5	1	2
59	P04075-2	Fructose-bisphosphate aldolase A	0,00026	10	35	10	37	11	28	4	10	5	14	4	6	6	14	7	17	3	9
60	Q3ZCW2	Galectin-related protein	0,0016	3	5	5	8	2	6	1	1	1	2	1	2	2	4	2	4	2	4
61	P06396	Gelsolin	0,008	18	63	19	68	18	65	16	55	15	55	16	61	15	69	12	63	14	75
62	P07093-2	Glia-derived nexin	0,006	1	1	1	2	1	2	6	20	6	12	9	26	4	12	4	11	5	14
63	P06744-2	Glucose-6-phosphate isomerase	0,00018	6	10	5	10	6	11	1	1	3	4	2	2	3	6	2	4	2	4
64	P78417	Glutathione S-transferase omega-1	0,00038	6	11	6	13	6	13	4	7	3	5	3	6	3	7	3	7	3	7
65	P09211	Glutathione S-transferase P	0,00028	8	19	5	19	6	14	2	5	2	6	1	2	4	11	3	8	2	6
66	P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	0,00096	5	9	8	17	6	12	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
67	P08107	Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	0,0024	8	16	11	21	6	10	0	0	3	6	1	3	2	5	2	5	1	4
68	P17066	Heat shock 70 kDa protein 6	< 0,00010	1	12	1	15	1	11	1	4	1	6	1	5	1	5	0	0	0	0
69	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	< 0,00010	15	40	14	43	15	37	8	11	7	11	7	10	9	16	9	17	8	12
70	P04792	Heat shock protein beta-1	0,008	3	5	3	10	5	7	1	1	1	2	1	1	2	4	0	0	2	4
71	P69905	Hemoglobin subunit alpha	< 0,00010	7	21	6	22	7	18	3	6	3	8	4	8	4	10	4	9	2	6
72	P68871	Hemoglobin subunit beta	0,0011	9	34	9	36	9	31	7	18	7	21	7	23	7	19	8	27	7	20
73	Q9Y251-2	Heparanase	0,0043	2	3	2	4	1	2	5	9	4	6	6	9	6	8	5	10	5	9
74	P04196	Histidine-rich glycoprotein	0,025	8	26	7	21	12	32	4	16	3	10	3	7	6	15	5	17	2	6
75	P01857	Ig gamma-1 chain C region	0,0046	8	28	8	27	9	29	8	44	8	41	8	58	7	54	10	63	8	54
76	P01859	Ig gamma-2 chain C region	0,019	2	9	3	18	3	16	3	17	4	20	5	33	5	33	5	50	5	37
77	P01860	Ig gamma-3 chain C region	0,0045	2	17	3	17	3	18	1	16	1	14	1	21	2	27	3	28	1	24
78	P0CG05	Ig lambda-2 chain C regions	0,021	4	15	4	16	5	16	5	31	4	24	5	44	3	32	3	34	3	42
79	P01871-2	Ig mu chain C region	0,0042	13	35	9	26	10	25	6	8	6	10	2	5	6	13	6	16	1	2
80	P08514	Integrin alpha-IIb	0,0019	18	39	18	45	12	21	2	5	4	8	3	6	5	11	4	9	2	6
81	Q13418	Integrin-linked protein kinase	0,0022	10	20	12	26	6	14	3	6	4	10	4	6	4	9	4	9	4	9
82	Q14624-2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	0,012	0	0	0	0	0	0	2	4	3	6	4	5	2	3	1	2	2	3
83	P13598	Intercellular adhesion molecule 2	0,012	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	3	1	5	1	6	1	4

	Acesso UniProt	Proteína identificada	ANOVA p-value	Controle						PA-BJ						Trombina					
				NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE
84	P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	< 0,00010	6	12	6	11	5	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	Q14766	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1	0,0085	8	15	10	23	12	23	25	79	21	60	23	66	22	62	19	49	11	31
86	P30740	Leukocyte elastase inhibitor	0,00075	9	16	10	17	12	20	2	4	3	4	2	4	3	5	5	9	3	4
87	P48059-2	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain pr	0,0098	4	9	6	15	6	14	2	7	3	6	2	6	3	9	3	6	3	5
88	P00338-3	L-lactate dehydrogenase A chain	0,00023	8	21	8	28	7	17	3	6	5	8	3	7	5	10	3	8	3	8
89	P40925-2	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	0,016	2	3	3	4	2	3	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
90	P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	0,00031	3	5	4	6	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91	P26038	Moesin	0,00026	16	36	12	32	12	26	3	6	5	11	5	12	3	8	5	13	4	10
92	Q13201	Multimerin-1	0,00028	18	42	15	40	15	31	23	199	22	231	22	244	25	186	22	245	17	249
93	O14950	Myosin regulatory light chain 12B	0,00094	2	19	2	17	2	17	2	9	2	8	2	8	2	14	2	10	2	8
94	P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9	0,0011	8	20	8	19	8	19	3	7	3	6	3	6	6	13	6	10	2	4
95	P35579	Myosin-9	0,0078	51	110	52	138	28	61	9	17	21	44	16	28	26	56	14	37	20	46
96	P58546	Myotrophin	0,0018	4	8	3	8	4	7	1	2	1	2	2	3	2	6	1	2	2	6
97	P14543	Nidogen-1	0,00071	6	10	4	9	8	13	10	28	11	35	13	36	11	31	13	35	9	28
98	Q14112-2	Nidogen-2	0,022	0	0	0	0	1	1	4	6	4	7	6	13	4	8	4	8	4	10
99	P22392-2	Nucleoside diphosphate kinase B	0,00025	5	9	4	9	3	6	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0
100	O00151	PDZ and LIM domain protein 1	0,0032	10	22	11	26	15	34	5	11	5	11	3	12	3	9	3	8	3	7
101	P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	0,0027	7	15	4	13	5	13	3	8	3	8	3	8	3	8	3	8	4	11
102	P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	0,036	8	20	7	19	8	19	6	14	5	14	7	17	6	19	6	20	5	13
103	Q06830	Peroxiredoxin-1	0,043	4	7	3	5	6	11	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	0	0
104	P30041	Peroxiredoxin-6	0,00044	8	18	9	22	6	15	4	9	4	8	3	8	3	7	3	8	4	11
105	P36871	Phosphoglucomutase-1	0,0052	4	9	8	15	4	9	0	0	3	4	2	3	1	1	3	7	1	2
106	P00558	Phosphoglycerate kinase 1	< 0,00010	11	30	15	43	13	32	6	12	6	12	7	13	6	11	7	15	5	10
107	P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	0,00095	2	3	0	0	5	9	8	20	8	23	9	22	9	23	8	28	7	24
108	P02775	Platelet basic protein	< 0,00010	9	177	8	245	8	295	8	833	8	912	10	970	7	890	6	892	5	888
109	P02776	Platelet factor 4	< 0,00010	3	32	2	32	2	24	4	208	3	214	3	216	3	197	4	206	4	187
110	P10720	Platelet factor 4 variant	< 0,00010	4	26	5	27	4	19	5	194	4	197	6	207	6	169	4	191	6	175
111	P07359	Platelet glycoprotein Ib alpha chain	0,0041	7	15	8	17	9	15	5	14	4	10	6	15	4	9	5	11	3	9
112	P40197	Platelet glycoprotein V	0,016	14	48	13	57	15	51	12	68	11	121	13	127	12	166	10	194	10	112
113	P08567	Pleckstrin	< 0,00010	9	36	10	37	10	29	5	12	6	17	5	13	6	15	5	11	3	11
114	Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	0,0072	1	366	1	374	1	377	1	266	1	346	1	308	1	323	1	316	1	306
115	P07602	Prosaposin	0,0013	1	2	1	3	2	3	4	10	3	10	5	13	4	10	5	12	2	8
116	P07237	Protein disulfide-isomerase	0,032	5	8	2	4	4	6	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
117	P30101	Protein disulfide-isomerase A3	< 0,00010	14	33	16	33	14	31	4	6	5	8	5	8	5	8	7	14	4	8
118	Q15084-2	Protein disulfide-isomerase A6	0,0074	7	13	5	12	3	6	2	4	2	4	2	4	2	4	1	2	1	2
119	Q99497	Protein DJ-1	< 0,00010	6	18	6	20	6	14	1	1	2	4	1	2	3	5	2	5	2	4
120	P12931-2	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	< 0,00010	5	10	5	14	5	9	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
121	P00491	Purine nucleoside phosphorylase	0,0002	12	33	12	41	13	34	5	11	7	17	5	14	6	18	9	22	5	13
122	P14618	Pyruvate kinase PKM	< 0,00010	24	80	22	80	24	75	11	23	11	40	11	25	13	41	11	32	9	41
123	P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	< 0,00010	13	24	11	23	12	22	2	6	4	10	3	8	4	14	4	12	5	14
124	P50395	Rab GDP dissociation inhibitor beta	0,00016	4	20	4	20	3	17	1	8	1	12	1	9	1	14	2	13	1	12
125	Q15404	Ras suppressor protein 1	0,0013	11	32	10	23	11	30	5	10	3	8	3	6	7	14	5	10	5	11
126	Q15907	Ras-related protein Rab-11B	0,014	6	11	4	8	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0

	Acesso UniProt	Proteína identificada	ANOVA p-value	Controle						PA-BJ						Trombina					
				NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE	NPU	CTE
127	P61224	Ras-related protein Rap-1b	0,00075	6	16	8	21	6	16	1	2	2	6	1	2	4	9	4	11	1	4
128	P52565	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	< 0,00010	2	4	2	5	2	4	1	1	1	1	0	0	2	3	2	2	2	3
129	P10124	Serglycin	0,011	3	6	3	5	2	6	2	4	2	5	2	6	3	9	3	9	2	7
130	P02768	Serum albumin	0,0017	38	188	38	206	44	232	40	449	41	494	42	592	34	482	30	618	23	549
131	O95810	Serum deprivation-response protein	0,0011	5	13	5	10	5	8	1	2	2	4	1	1	2	3	1	1	1	2
132	O75368	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	0,019	2	4	4	6	4	7	1	1	1	2	0	0	1	2	0	0	0	0
133	Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3	< 0,00010	4	13	5	14	4	13	2	3	3	6	3	4	3	4	3	4	1	2
134	Q9HAT2-2	Sialate	0,00074	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	2	5	3	6	2	6	2	6
135	P00441	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	0,00013	3	6	3	7	4	7	0	0	0	0	0	0	2	4	0	0	1	2
136	P04179-4	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	0,00032	2	4	2	4	2	4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
137	Q9Y490	Talin-1	0,00021	95	347	92	370	84	265	50	157	59	199	54	164	54	190	53	190	49	171
138	P10599-2	Thioredoxin	0,0037	3	6	2	5	2	4	1	2	1	2	1	2	1	3	1	2	1	2
139	P07996	Thrombospondin-1	0,011	45	379	44	242	34	129	46	1109	39	834	40	885	42	1128	34	578	27	924
140	P19971-2	Thymidine phosphorylase	0,0099	3	5	3	7	3	6	1	2	2	4	2	3	2	5	2	6	2	4
141	P37837	Transaldolase	0,0016	3	4	4	6	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142	P01137	Transforming growth factor beta-1	0,00088	3	3	1	1	1	4	9	29	8	22	9	33	8	25	7	29	6	19
143	P37802	Transgelin-2	0,00087	13	67	11	60	13	63	8	35	9	41	8	39	9	42	10	44	9	47
144	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	0,012	5	11	8	16	2	6	1	1	1	2	0	0	2	5	2	4	0	0
145	P29401-2	Transketolase	0,0013	2	5	3	7	4	7	1	2	1	3	1	2	1	2	1	2	1	2
146	Q86YW5-2	Trem-like transcript 1 protein	0,0023	1	2	1	2	1	2	2	6	2	6	2	7	2	7	3	10	3	9
147	P60174-1	Triosephosphate isomerase	0,00011	11	31	11	37	12	35	8	17	9	20	8	16	7	16	7	18	6	16
148	P09493-3	Tropomyosin alpha-1 chain	0,0078	3	14	1	7	2	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149	P09493-5	Tropomyosin alpha-1 chain	< 0,00010	1	8	1	8	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0
150	P06753-2	Tropomyosin alpha-3 chain	0,01	5	19	3	19	5	22	3	8	3	7	2	4	4	20	4	11	1	7
151	P67936	Tropomyosin alpha-4 chain	0,0021	9	23	9	29	7	25	2	4	3	8	1	1	7	19	3	5	2	5
152	P07951-2	Tropomyosin beta chain	< 0,00010	2	14	3	19	2	17	0	0	0	3	0	0	0	0	1	4	0	0
153	A6NHL2-2	Tubulin alpha chain-like 3	< 0,00010	1	5	1	5	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
154	P68366	Tubulin alpha-4A chain	0,0048	16	63	14	73	15	61	7	25	9	51	7	32	8	48	10	56	10	48
155	Q9NY65	Tubulin alpha-8 chain	0,019	3	39	4	54	4	39	1	12	1	37	1	20	1	26	1	30	1	30
156	P07437	Tubulin beta chain	0,0048	13	45	13	60	14	55	8	29	9	39	7	28	10	42	12	40	7	31
157	Q9H4B7	Tubulin beta-1 chain	0,0028	17	52	17	65	20	53	11	28	14	45	11	35	13	50	12	39	11	38
158	P68371	Tubulin beta-4B chain	0,0045	2	41	3	52	3	48	3	28	3	36	2	26	3	39	3	36	2	29
159	P68036-2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	0,037	2	4	4	7	2	4	2	3	2	3	2	3	2	5	2	4	2	4
160	P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	0,00033	8	14	6	15	9	16	3	5	4	8	3	5	2	6	2	6	3	7
161	P18206-2	Vinculin	< 0,00010	41	113	49	149	43	116	20	44	24	58	24	54	21	58	23	59	20	56
162	P02774-3	Vitamin D-binding protein	< 0,00010	1	8	1	8	1	8	4	17	4	18	6	22	7	22	5	20	4	19
163	P07225	Vitamin K-dependent protein S	0,0064	2	4	1	2	3	7	5	10	8	15	11	23	8	22	6	19	8	18
164	O75083	WD repeat-containing protein 1	0,00018	13	26	15	29	18	35	1	1	1	1	0	0	4	5	2	3	1	1
165	Q15942	Zyxin	< 0,00010	11	30	10	31	12	31	3	10	3	8	3	10	4	13	3	12	3	10

Os resultados de LC-MS/MS foram processados utilizando o programa MaxQuant (com tolerância de massa de ± 10 ppm para íons precursores e 0,5 Da para íons filhos) e foram submetidos ainda à análise utilizando o programa Scaffold™. Foram identificadas 458 proteínas com 0,01% de taxa de falsos positivos (FDR), das quais 163 proteínas apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as amostras do controle (plaquetas não ativadas), PA-BJ e trombina (plaquetas ativadas). ANOVA ($p < 0,05$). NPU, número de peptídeos únicos; CTE, contagem total de espectros.

Das proteínas identificadas exclusivamente no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ, destacam-se o fator H do complemento e a quimiocina 5 contendo o motif C-X-C, que estão envolvidas em processos inflamatórios, fetuína-A, que promove endocitose e a legumaina, uma asparaginil proteinase lisossomal. Da mesma forma, as proteínas inibidor inter-alfa de tripsina, alfa-2 macroglobulina e sindecan-4, foram identificados também com baixa contagem espectral e apenas identificadas em uma replicação biológica no sobrenadante de plaquetas ativadas por trombina. No entanto essas proteínas foram identificadas com contagem espectral muito baixa, e portanto, esses achados não foram considerados estatisticamente significantes (Tabela Suplementar 4).

Diversas proteínas identificadas exclusivamente no sobrenadante de plaquetas não ativadas podem estar associadas à possível ativação plaquetária durante o processo de preparo da amostra e de incubação sob agitação constante de 1200 rpm, por 8 min, já que alterações fisiológicas no microambiente plaquetário podem causar sua ativação. A tensão imposta ao vaso sanguíneo durante a coleta de sangue, e também as etapas de centrifugação no processo de obtenção de plaquetas lavadas, podem ainda contribuir para este fenômeno (Zellner and Oehler, 2011; Parguina et al., 2012). Além disso, a presença de vesículas extracelulares no sobrenadante de plaquetas não ativadas, que podem ser fisiologicamente liberadas (Flaumenhaft et al., 2009; Østergaard et al., 2012; Parguina et al., 2012), e de algumas proteínas envolvidas na inibição da ativação plaquetária, também compõem o secretoma de plaquetas não ativadas.

Entre as proteínas que foram identificadas em maior abundância no sobrenadante de plaquetas não ativadas, destaca-se o fator XIII da coagulação, uma transaminase com duas cadeias catalíticas A e duas cadeias B (que tem a função de

carrear proteínas), apresentando meia-vida de 20 min, e que é ativado pela trombina em uma reação dependente de cálcio (Tabela 5) (Robinson et al., 2000). Embora o fator XIII tenha um importante papel na estabilidade do coágulo, através da formação de ligações cruzadas entre as cadeias da fibrina, neste estudo, ele foi identificado em menor abundância no secretoma de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina. Pouco se sabe sobre a regulação desta enzima, para a qual até hoje não foram descritos inibidores, e o provável é que sua regulação ocorra através da degradação proteica (Robinson, et al., 2000; Muszbek et al., 2011), corroborando com nossos resultados que mostraram sua menor abundância em plaquetas ativadas (Tabela 5).

Neste estudo, identificamos pela primeira vez, em maior abundância no secretoma de plaquetas não ativadas (controle), proteínas envolvidas na inibição e regulação da ativação plaquetária, entre elas a catalase, uma enzima que inibe a agregação plaquetária induzida por peróxido de oxigênio (Vavaev et al., 2012), o inibidor de elastase leucocitária, que inibe a deposição de fibrina e que inibe tanto a elastase leucocitária quanta a catepsina-G que podem induzir a agregação plaquetária (Renesto e Chignard, 1993; Goel e Diamond, 2001), a anidrase carbônica que regula o pH do meio e inibe a agregação plaquetária mediada por trombina (Siffert et al., 1984) e a glicoproteína rica em histidina que se liga ao fator XIIIa aumentando o tempo de coagulação (MacQuarrie et al., 2011) (Figura 28 e Tabela 5). A presença destes reguladores da agregação plaquetária no sobrenadante de plaquetas não ativadas sugere que possa existir um mecanismo fisiológico de regulação do microambiente plaquetário, inibindo a sua ativação inespecífica.

Figure 28. Proteínas identificadas com alterações significativas no proteoma do sobrenadante de plaquetas não ativadas. A identificação das proteínas foi realizada após digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS. Para esta análise foi utilizada a média dos valores da contagem total de espectros da identificação de proteínas presentes no sobrenadante de plaquetas não ativadas (controle), e ativadas por PA-BJ ou trombina. Dados normalizados utilizando o programa Scaffold™. As barras de erro representam o erro padrão da media de três réplicas biológicas (ANOVA $p < 0,05$). Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism 6.

Células em geral estão constantemente expostas a forças físicas e a estímulos mecânicos associados ao seu ambiente local. Os processos celulares que respondem a estímulos físicos ou mecânicos, traduzindo estes estímulos em sinais bioquímicos e gerando uma resposta fisiológica são descritos como mecanotransdução (Chatterjee e Fisher, 2014). Assim, este processo permite que as células possam reagir ou se adaptar a alterações de seu ambiente físico. Jalali et al. (2001) mostraram que a tensão de cisalhamento (*shear stress*), ativa integrinas

específicas em células endoteliais que passam a fazer novas ligações entre integrinas e proteínas específicas da matriz extracelular, retransmitindo os sinais induzidos pela tensão de cisalhamento para o meio intracelular e ativando vias intracelulares de transdução de sinais em resposta ao estímulo. Neste sentido, é possível que as plaquetas também respondam as alterações do seu meio, mesmo sem a adição de agonistas.

Ao contrario do observado na fração proteica do sobrenadante de plaquetas não ativadas, identificamos um conjunto de proteínas secretadas em maior abundância na fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, e que estão envolvidas na promoção e regulação da agregação. Neste conjunto, estão inclusas as proteínas trombospondina-1, fibrinogênio, fator V da coagulação, fibronectina, amiloide beta A4, antitrombina III, PAI1, soro albumina, multimerina-1, e proteína S (Weisel, 2005; García, 2006; Smyth, et al., 2010) (Tabela 5 e Figura 29). Ainda, identificamos proteínas envolvidas em processos inflamatórios como a proteína básica de plaqueta (PBP), fator 4 plaquetário (PF4) e a proteína do complemento C3. Estas proteínas foram descritas em trabalhos que avaliaram o secretoma de plaquetas após ativação com trombina e com o TRAP (Coppinger et al., 2004; Priesma et al., 2009), reiterando o importante papel de plaquetas durante processos inflamatórios como a aterosclerose e de injúria vascular, e sugerindo que a PA-BJ possa gerar resposta pró-inflamatória ao ativar plaquetas.

Figure 29. Proteínas identificadas com alterações de abundância estatisticamente significantes na fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas. A identificação das proteínas foi realizada após digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS. Para esta análise foi utilizada a média dos valores da contagem total de espectros da identificação de proteínas presentes no sobrenadante de plaquetas não ativadas (controle), e ativadas por PA-BJ ou trombina. Dados normalizados utilizando o programa Scaffold™. As barras de erro representam o erro padrão da media de três réplicas biológicas (ANOVA $p < 0,05$). Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism 6.

O fator V da coagulação, também identificado com aumento de abundância em ambos os secretomas de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, é encontrado nos grânulos alfa plaquetários associadas à proteína multimerina (Mann e Kalafatis, 2003), e sua secreção durante a ativação plaquetária é responsável pelo aumento local da sua concentração nos processo de injúria vascular. O fator V juntamente com o fator Xa formam o complexo protrombinase que é responsável pela conversão

de protrombina em trombina (Ofosu et al., 1996), no entanto a ligação da multimerina ao fator V limita a geração de trombina *in vivo* (Jeimy et al., 2008). Desta forma nossos resultados sugerem que, da mesma forma que a trombina, a PA-BJ induz a secreção do fator V e da multimerina, e provavelmente, estas proteínas estão envolvidas na regulação no processo de formação do trombo controlando a geração da trombina durante a ativação plaquetária.

Ainda entre as proteínas identificadas com aumento de abundância na fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina encontra-se a catepsina-D, cujo papel na formação do trombo plaquetário ainda não é conhecido, porém sua notável atividade proteolítica sugere que esta possa participar ativamente na degradação de proteínas secretadas no evento da agregação (Tabela 5 e Figura 29). A heparanase, uma endoglicosidase responsável pela hidrólise de heparan sulfato, também foi liberada por plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina (Tabela 5 e Figura 29), e sua presença no secretoma pode estar relacionada ao papel que esta enzima exerce na interação de plaquetas com a matriz extracelular endotelial, que está associada à degradação de heparan sulfato (Vlodavsky et al., 1992; Pikas et al., 1998; Baker et al., 2012).

Além de enzimas, inibidores de proteinases, como inibidor inter-alfa de tripsina e alfa-1 anti-tripsina (Tabela 5 e Figura 29), também foram encontrados no secretoma de plaquetas ativadas (PA-BJ e trombina) os quais devem participar na regulação dos eventos procoagulantes envolvidos na geração do trombo plaquetário.

Notadamente foi detectada no secretoma plaquetário induzido por trombina a maior abundância de inibidores como anti-trombina III e PAI1 (Figura 29), do que em plaquetas ativadas por PA-BJ. A trombina tem vida curta na circulação, e num contexto fisiológico, suas ações tendem a cessar sua produção (Esmon, et al.,

1999). Além das plaquetas, a trombina interage com outros parceiros moleculares e também está envolvida em uma série de eventos fisiológicos e patológicos (Coughlin, 2000). Sua ação enzimática e os sinais moleculares por ela disparados devem ser finamente regulados. Dessa forma, a presença de inibidores de proteinases no secretoma induzido pela trombina, parece fazer parte do controle fino de sua atuação no processo de formação do trombo plaquetário.

O aumento em abundância de algumas proteínas detectadas na fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas (Figura 29 e a Tabela 5) foi também verificado por ensaios de *Western blot*, que mostraram o aumento de intensidade das bandas proteicas, em comparação com o sobrenadante de plaquetas não ativadas (Figura 30). Entre elas destaca-se a fibronectina, uma glicoproteína adesiva envolvida na formação e estabilização do coágulo através das ligações com o fator XIII e o fibrinogênio/fibrina (Ramanathan e Karuri, 2014). É interessante notar que no secretoma induzido por trombina, diferente daquele induzido pela PA-BJ, a fibronectina foi detectada com diferentes massas moleculares, indicando que pode ter sido degradada (Figura 30).

Outra proteína que apresentou produtos de degradação após sua secreção foi a trombospondina, que nas análises por *Western blot* apresentou bandas proteicas de ~450 kDa (molécula íntegra) e os produtos de degradação de ~160 kDa e ~30 kDa, em ambos os secretomas de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina (Figura 30), corroborando com os resultados anteriores das análises do sobrenadante plaquetário por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida e LC-MS/MS (Figura 27). Além disso, a trombospondina foi identificada em maior abundância no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, sugerindo que ambas

induzem a secreção e o processamento proteolítico desta proteína (Figura 29 e Tabela 5)

Figura 30. Análise por *Western blot* das proteínas presentes na fração proteica do sobrenadante de plaquetas. Foram analisadas as proteínas presentes em 200 μ L do sobrenadante de plaquetas não ativadas (controle) e ativadas (PA-BJ ou trombina). As setas indicam as bandas proteicas reconhecidas pelos anticorpos. A trombospondina foi analisada em géis contendo poliacrilamida 8% (esquerda) e 12% (direita) e em condições não redutoras. Valores à esquerda das imagens indicam as mobilidades dos marcadores de massa molecular (kDa).

Embora não seja estatisticamente significativa, devido ao limite estatístico determinado, proteínas como vWF, vitronectina, cininogênio, protrombina,

plasminogênio, TIMP1, e as proteínas do complemento C4A, C5 e os fatores de complemento B e H, também foram identificadas com aumento da contagem espectral em relação ao controle, sendo que as proteínas plasminogênio, vWF e vitronectina mostraram o aumento de intensidade das bandas proteicas nas análises por *Western blot* (Figura 30). O plasminogênio, proteína precursora da plasmina, foi identificado apresentando a banda proteica de 90 kDa, além de duas bandas adicionais de ~52 kDa (mais intensa) e 38 kDa, que correspondem às massas moleculares da plasmina e da angiostatina, respectivamente, sugerindo que pode ter ocorrido a ativação da plasmina durante a agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina. Enquanto o plasminogênio está envolvido na regulação da formação do coágulo, através da atividade proteolítica da plasmina sobre a fibrina, o vWF e a vitronectina, que são proteínas adesivas, estão envolvidas na agregação plaqueta-plaqueta e plaqueta-endotélio, contribuindo na formação e retração do coágulo (Gil-Bazo et al., 2003; Wu et al., 2004), e sua secreção de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina indica que participem nos eventos de formação do trombo plaquetário.

É interessante notar que, embora o secretoma de plaquetas ativadas por PA-BJ ou por trombina compartilhem muitas semelhanças, existem algumas diferenças importantes e que corroboram com os resultados da análise do proteoma do sedimento de plaquetas. A primeira diferença importante observada foi o aumento da contagem espectral de MMP1 no secretoma induzido por PA-BJ que, embora estatisticamente não seja significativa, foi o primeiro indício para investigarmos o papel desta metaloproteinase na ativação induzida por PA-BJ.

A MMP1 é um importante mediador na ativação plaquetária mediada por colágeno (Trivedi et al., 2009); neste sentido, avaliamos a inibição de MMP1 durante a ativação plaquetária, utilizando SPL incubadas previamente com anticorpo anti-

MMP1. Após 2 min do início do processo de ativação/agregação plaquetária com PA-BJ e trombina, observamos uma desagregação constante do agregado plaquetário induzido por PA-BJ, fato que não foi observado na agregação induzida por trombina (Figura 31).

Figura 31. Ensaio de inibição da agregação plaquetária induzida por PA-BJ e trombina, com anti-MMP1. Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados em 400 μ L de SPL (500×10^9 /L) incubadas com 1 μ g de anti-MMP1 por 2 min e em seguida ativadas com PA-BJ (100 nM) ou trombina (2 nM). Os ensaios foram monitorados por 13 min. As curvas foram construídas utilizando programa GraphPad Prism 6. Ensaio realizado em triplicata.

As plaquetas expressam em sua superfície uma variedade de metaloproteinases, entre elas MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 e MMP14 (Chesney et al., 1974; Galt et al., 2002). Tanto a MMP1 quanto a MMP2 são capazes de induzir agregação plaquetária, porém seus alvos moleculares e os mecanismos de ativação ainda são pouco conhecidos (Galt et al., 2002; Sawicki et al., 1997). Triverdi et al., (2009) verificaram que durante a ativação plaquetária mediada por colágeno ocorre a liberação e ativação de MMP1 no sobrenadante plaquetário. A ativação de MMP1 passaria a reger o processo de ativação e agregação plaquetária através da clivagem do receptor PAR-1, em um sítio diferente daquele clivado pela trombina, gerando um N-terminal mais longo e mais ativo (Trivedi et al., 2009). Neste trabalho, os autores demonstraram que a inibição de MMP1 reduz 35-50% a agregação plaquetária induzida por colágeno (Trivedi et al., 2009). A desagregação não é um evento incomum em plaquetas; já foi observado *in vivo* que a prostaciclina (PGI₂) não só inibe a agregação plaquetária como também é capaz de desagregar plaquetas agregadas induzidas por ADP (Rao et al., 1980; Martin et al., 1980). Assim, a desagregação observada após inibição da atividade de MMP1, em plaquetas ativadas por PA-BJ sugere uma importante participação de MMP1 na estabilização do agregado plaquetário induzido por PA-BJ (Figura 31).

Paralelamente, investigamos por *Western blot* a presença de MMP-1 tanto no sedimento e no sobrenadante de plaquetas e, verificamos que a pro-MMP1 (zimogênio de ~57 kDa) é identificada somente no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas por trombina, não sendo detectada no proteoma do sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ, indicando a liberação da metaloproteinase no sobrenadante (Figura 32). Já, a forma ativa da MMP1 (~52 kDa) foi detectada em

ambos os secretomas de plaquetas ativadas (PA-BJ e trombina), sendo que no secretoma induzido pela PA-BJ a MMP1 é identificada com maior intensidade.

Figura 32. Análise por Western blot da presença da MMP1 em plaquetas. Proteínas presentes no sedimento plaquetário (20 µg) ou no sobrenadante de plaquetas (200 µL) foram reveladas utilizando anticorpo anti-MMP1. Controle (plaquetas não ativadas) e PA-BJ e trombina (plaquetas ativadas).

A participação de MMP1 na agregação plaquetária induzida pela PA-BJ, revelada neste estudo, sugere que, apesar de a PA-BJ compartilhar com a trombina, a capacidade de clivar o receptor PAR-1 no evento da agregação plaquetária, a liberação e processamento da MMP1 na ativação plaquetária induzida pela PA-BJ, é um mecanismo que a difere da atividade da trombina sobre plaquetas, e que pode ter um efeito sinérgico na sustentação do agregado plaquetário gerado pela PA-BJ.

O fibrinogênio, uma glicoproteína que tem papel fundamental na hemostasia e também na agregação plaquetária, ao se ligar com alta afinidade à integrina $\alpha IIb\beta 3$, foi identificado com alterações de abundância tanto nas análises do sedimento

quanto do sobrenadante de plaquetas ativadas. Nas análises do sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina observamos a diminuição significativa do fibrinogênio, tanto por digestão *in gel* com tripsina e LC-MS/MS, quanto por digestão tripsínica em solução, seguida de fracionamento ortogonal e LC-MS/MS (Tabelas 3 e 4 e Figuras 21, 22, e 33). Porém, a diminuição de abundância do fibrinogênio nas plaquetas ativadas por PA-BJ foi mais acentuada do que em plaquetas ativadas por trombina. Na Figura 33, que mostra a comparação da identificação do fibrinogênio no sedimento plaquetário por digestão *in gel* com tripsina e análise por LC-MS/MS, pode-se observar que a contagem espectral das cadeias alfa e beta no sedimento de plaquetas tratadas por trombina é duas vezes maior do que no sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ, sugerindo que a PA-BJ tenha induzido a secreção mais acentuada do fibrinogênio do que a trombina durante o processo de agregação plaquetária.

Figura 33. Análise da abundância do fibrinogênio no proteoma do sedimento de plaquetas. A identificação foi realizada após digestão em solução *in gel* com tripsina e análise por LC-MS/MS. Para esta análise foram utilizados os valores da contagem total de espectros referentes à identificação do fibrinogênio no proteoma do sedimento de plaquetas não ativadas (controle), e ativadas por PA-BJ ou trombina. Dados normalizados com o auxílio do programa Scaffold™. Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism 6.

Em concordância, nas análises do sobrenadante plaquetário por digestão com tripsina em solução e LC-MS/MS, foi identificado o aumento significativo de abundância do fibrinogênio na fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ, em relação ao sobrenadante de plaquetas controle ou ativadas por trombina (Tabela 5 e Figura 34). Na Figura 34, onde são comparadas as contagens espectrais referentes ao fibrinogênio, pode-se observar que a contagem espectral das cadeias alfa, beta e gama no sobrenadante de plaquetas tratadas por PA-BJ é duas vezes maior do que no sobrenadante de plaquetas ativadas por trombina, dessa forma reiterando que a PA-BJ induz a secreção mais acentuada do fibrinogênio do que a trombina durante o processo de agregação plaquetária.

Figura 34. Análise da abundância do fibrinogênio na fração proteica do sobrenadante de plaquetas. A identificação foi realizada após digestão em solução com tripsina e análise por LC-MS/MS. Para esta análise foi utilizada a média dos valores da contagem total de espéctros da identificação do fibrinogênio no proteoma do sobrenadante de plaquetas não ativadas (controle), e ativadas por PA-BJ ou trombina. Dados normalizados utilizando o programa Scaffold™. As barras de erro representam o erro padrão da media de três réplicas biológicas (ANOVA $p < 0,05$). Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism 6.

As alterações identificadas para o fibrinogênio nas análises por espectrometria de massas, também foram observadas nas análises por *Western blot* (Figura 35), na qual as bandas proteicas referentes às cadeias do fibrinogênio também foram detectadas em menor intensidade nas análises do sedimento

plaquetário ativado por PA-BJ, e com maior intensidade nas análises do sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ. Embora alterações de abundância do fibrinogênio também tenham sido observadas nas análises do sedimento e do sobrenadante de plaquetas ativadas por trombina (Figura 35), estas alterações foram mais pronunciadas na ativação induzida por PA-BJ.

Figura 35. Análise por Western blot da presença de fibrinogênio em plaquetas. Proteínas presentes no sedimento plaquetário (20 µg) ou no sobrenadante de plaquetas (200 µL) foram reveladas utilizando anticorpo anti-fibrinogênio. Como controle utilizamos 15 µg de fibrinogênio humano (Sigma) e 15 µg de fibrina preparada com a mesma trombina utilizado nos ensaios de ativação plaquetária na proporção 1:1000 enzima:substrato. Plaquetas não ativadas (Controle), e plaquetas ativadas (PA-BJ ou trombina).

Recentemente Vélez et al., (2015) excluíram de suas análises por eletroforese bidimensional, os *spots* de fibrinogênio presentes em suas análises do secretoma de plaquetas ativadas por trombina ou colágeno, por concluírem que a trombina teria coagulado o fibrinogênio e, a fibrina formada teria se agregado ao sedimento

plaquetário, diminuindo assim, o fibrinogênio livre no sobrenadante plaquetário induzido por trombina, o que poderia gerar um erro de interpretação das análises quantitativas do fibrinogênio, nas comparações entre os dois agonistas. Em nossos resultados, no entanto, não observamos, um perfil eletroforético, que indicasse a formação da fibrina nos conteúdos do sedimento e do sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina (Figura 35), sugerindo que as alterações de abundância do fibrinogênio observadas, tanto no sedimento quanto sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, não são decorrentes de formação de fibrina, e sim um resultado dos mecanismos de ativação e agregação disparados pela ação dessas enzimas.

Em conjunto, estes resultados sugerem que a PA-BJ induz uma maior secreção de fibrinogênio, em comparação à secreção induzida por trombina, sendo este evento observado tanto pela diminuição da concentração do fibrinogênio no sedimento quanto pelo seu aumento no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ, aumentando assim, a disponibilidade local do fibrinogênio nos eventos de agregação plaquetária. Neste sentido, o aumento da secreção de fibrinogênio induzido pela PA-BJ poderia estar também relacionado ao mecanismo de ativação desta proteinase, que paralelamente induz a liberação e ativação de MMP1, para promover a estabilização do agregado plaquetário.

É interessante notar que a complexidade do secretoma de plaquetas ativadas é caracterizada por uma diversidade de moléculas reguladoras da coagulação, como proteinases, inibidores de proteinases, e produtos de degradação de proteínas. Pouco se sabe sobre os mecanismos que orquestram os eventos de proteólise que ocorrem durante a agregação plaquetária. O fato é que as mínimas alterações nas

relações entre estas moléculaspodem levar a complicações patológicas vasculares (Leslie, 2010).

Os mecanismos que regulam a secreção plaquetária, ou seja, quais proteínas e em quais concentrações estas são liberadas, ainda são pouco conhecidos e os estudos realizados até agora mostram resultados até controversos em alguns casos. No entanto, muitos grupos vêm demonstrando que existe secreção diferencial em plaquetas diretamente relacionada com a natureza do agonista e sua concentração.

Alguns estudos demonstraram que em plaquetas, existem diferentes subgrupos de grânulos alfa contendo moléculas pró-angiogênicas ou anti-angiogênicas, e a preferência pela secreção de uma ou outra molécula é determinada pela ativação dos receptores PAR-1 ou PAR-4, respectivamente (Ma et al., 2005; Italiano et al., 2008; Chatterjee et al., 2011). Em oposição a estes, outros estudos demonstraram que não existem subgrupos de grânulos alfa com conteúdos diferentes e que a secreção diferencial de moléculas deve ser regida por outros mecanismos (van Nispen tot Pannerden et al., 2010; Kamykowski et al., 2011). Sehgal e Storrie (2007) sugeriram que tanto o fibrinogênio quanto o fator de vWF são diferencialmente armazenados nos grânulos alfa por endocitose ou após síntese proteica no megacariócito e que este diferente armazenamento poderiaexplicar a secreção diferencial destas moléculas. Entretanto, van Holten et al., (2014), não encontraram evidências de que ocorra secreção diferencial de moléculas após ativação de PAR-1 ou PAR-4, enquanto que Vélez et al., (2015), demonstraram que a proteína S é encontrada em maior abundância no secretoma de plaquetas ativadas por trombina do que porcolágeno.

Jonnalagadda et al. (2012) ao compararem a cinética de secreção induzida pelos agonistas trombina, convulxina, e os peptídeos TRAP específicos para PAR-1

e PAR-4, observaram que o conteúdo secretado e a velocidade da secreção eram dependentes dos diferentes estímulos testados. Assim, agonistas fortes como a trombina e a convulxina, secretaram mais rapidamente o conteúdo de seus grânulos, enquanto os TRAPs induziram a secreção mais lentamente, sendo que a secreção do conteúdo granular mediada por PAR-4 foi ainda parcial (Jonnalagadda et al., 2012).

A Figura 36 destaca as principais diferenças de abundância identificadas entre a fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina em relação ao controle (plaquetas não ativadas). Assim, demonstramos que embora a PA-BJ e a trombina ativem plaquetas por meio dos receptores PAR-1 e PAR-4, resultando em agregação, existem diferenças importantes no conteúdo secretado, que sugerem que estas enzimas induzam a agregação por mecanismos diferentes. A trombina induziu o aumento da secreção de proteínas envolvidas na regulação da formação do coágulo, como a proteína S, PAI1 e antitrombina III, reforçando a hipótese de que uma fina regulação é necessária nos eventos disparados pela trombina para conter sua ação no local da injúria vascular. Por outro lado, na secreção induzida por PA-BJ, observou-se o aumento da abundância de proteínas como a proteína amiloide beta-4, MMP1 e fibrinogênio, o que parece indicar que a secreção induzida pela PA-BJ tem um conteúdo que favorece a formação e estabilidade do agregado plaquetário.

Figura 36. Algumas proteínas do sobrenadante plaquetário identificadas com alteração de abundância entre plaquetas ativadas por PA-BJ ou trombina, ou não ativadas, após digestão tripsínica em solução e análise por LC-MS/MS.

4.5.3 Análise da fração peptídica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas

A ativação, secreção e agregação plaquetárias, por diversos agonistas, são eventos que ocorrem fisiologicamente e patologicamente, e que tem sido estudados por vários grupos, utilizando diversos tipos de abordagem, com o objetivo de compreender a interação dos agonistas com seus receptores, e as reações desencadeadas e que levam à mudança de forma, secreção, culminando na agregação. No entanto, até agora, apesar de a atividade de algumas proteinases plaquetárias ter sido caracterizada como importante na regulação da formação do trombo plaquetário, não é completamente conhecida a degradação de proteínas durante a ativação e agregação, gerando o conjunto de peptídeos que são produtos de proteólise, caracterizado como o degradoma. Considerando que os peptídeos presentes no secretoma gerado por plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, e ausentes em plaquetas não ativadas, são provavelmente produtos oriundos da clivagem de proteínas por essas proteinases, ou por proteinases lisossomais, a identificação destes peptídeos por espectrometria de massas (peptidoma) indica os substratos degradados em plaquetas ativadas e agregadas. Ainda, o conhecimento sobre o peptidoma pode trazer pistas sobre a participação dos produtos de degradação na modulação da formação do trombo plaquetário.

Nas análises da fração peptídica do secretoma de plaquetas foi verificada a intensa degradação de proteínas tanto no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ como por trombina, no entanto a degradação ocorrida após ativação pela PA-BJ foi mais pronunciada (Tabela 6 e 7 e Tabela Suplementar 5). Nestas análises identificamos 192 peptídeos únicos na fração peptídica do sobrenadante de

plaquetas não ativadas, sugerindo uma moderada degradação proteica nos estágios de preparo da suspensão de plaquetas lavadas e também durante a incubação com PBS sob agitação constante de 1.200 rpm (Tabela 6). No entanto, após a ativação plaquetária o número de peptídeos únicos identificados aumentou para 374 e 265 nas frações peptídicas do sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, respectivamente, fato que foi acompanhado pelo aumento significativo na contagem espectral desses peptídeos (Tabela 6). A identificação dos peptídeos mostrou que estes se originaram de 64 proteínas, nas amostras de plaquetas não ativadas, enquanto que nas amostras de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina, os peptídeos identificados correspondiam a 84 e 80 proteínas, respectivamente, fato que indicou o aumento do repertório de proteínas degradadas durante a agregação plaquetária (Tabela Suplementar 5).

Tabela 6. Contagem de peptídeos e proteínas identificadas na fração peptídica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas.

	Peptídeos únicos*	Espéctros totais*	Proteínas identificadas*
Controle	192	275	64
PA-BJ	374	721	84
Trombina	265	583	80

* Soma de valores obtidos em três réplicas biológicas.

A Tabela 7 mostra as proteínas das quais se derivaram o maior número de peptídeos identificados no sobrenadante plaquetário. Embora tenha sido observada degradação proteica nas amostras de controle, a intensidade dessa degradação aumentou com a ativação plaquetária, como verificado pelo aumento do número de proteínas e de peptídeos nas amostras de plaquetas ativadas, e de forma mais pronunciada nas plaquetas tratadas com PA-BJ.

Tabela 7. Algumas proteínas identificadas como degradadas, pela análise da fração peptídica do sobrenadante de plaquetas por espectrometria de massas.

Acesso UniProt	Proteína identificada	Número de peptídeos únicos/Contagem total de espéctros								
		Controle			PA-BJ			Trombina		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1 A4_HUMAN	Amyloid beta A4 protein				2/2	1/1	3/3	3/3	3/3	2/2
2 CALD1_HUMAN	Caldesmon		1/1			2/2	2/2	2/2	2/2	1/1
3 CPNS1_HUMAN	Calpain small subunit 1			1/1	2/2	4/6		6/8	6/7	
4 FA5_HUMAN	Coagulation factor V				2/2	1/1	1/1	1/1		
5 COF1_HUMAN	Cofilin-1				2/2	1/2		2/2		
6 CSRP1_HUMAN	Cysteine and glycine-rich protein 1				3/4	3/3	3/4			
7 URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3	1/1	2/2	2/2	3/3	6/7	4/4	5/6	4/5	4/6
8 FHOD1_HUMAN	FH1/FH2 domain-containing protein 1					3/3	3/3		3/3	1/1
9 FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	1/1	6/6	4/4	34/50	41/99	23/77	15/28	13/62	12/43
10 FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	1/1	1/1		4/6	7/12	9/14	6/10	8/19	8/17
11 INF2_HUMAN	Inverted formin-2					2/2	2/3	1/2	2/2	3/3
12 LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1				1/1	2/2	2/2	1/1	2/2	1/1
13 MMRN1_HUMAN	Multimerin-1	2/2	3/3	6/6	11/11	11/11	10/11	15/16	14/15	17/18
14 MYH9_HUMAN	Myosin-9		4/4	4/4	3/3	13/13	10/12	5/5	9/13	8/8
15 PDLI1_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 1	1/1	12/13	4/4	19/19	21/22	14/15	21/22	20/20	16/16
16 SRGN_HUMAN	Serglycin		2/2		4/4	14/14	10/11	1/1	3/3	2/2
17 SRC8_HUMAN	Src substrate cortactin	1/1	3/3	2/2	4/4	6/6	4/4	3/3	7/7	5/5
18 TLN1_HUMAN	Talin-1	8/11	13/18	14/20	14/21	31/39	16/27	17/28	28/40	14/22
19 TSP1_HUMAN	Thrombospondin-1				1/1	2/3	1/1	1/1		
20 TAGL2_HUMAN	Transgelin-2	1/1	2/2		14/14	5/5	5/5	2/2	3/3	4/5

Os resultados foram processados utilizando o programa Mascot (com tolerância de massa de ± 10 ppm para íons precursores e 0,5 Da para íons filhos) e posteriormente analisados utilizando o programa Scaffold™. Foram considerados apenas peptídeos com probabilidade de identificação > 99%. Resultados das análises de três réplicas biológicas.

A degradação de proteínas plaquetárias pode ser o resultado da secreção e ativação de proteinases contidas nos grânulos alfa, lisossomos e também na membrana plasmática plaquetária, e de fato, no secretoma de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina foram identificadas diversas proteinases, entre as quais destacam-se MMP1, protrombina/trombina, plasminogênio/plasmina, e catepsina-D (Tabela 5 e Tabela Suplementar 4) que podem ter ativamente participado na geração do degradoma plaquetário. Além disso, a degradação observada nas plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina pode ter ocorrido pela atividade enzimática direta destas proteinases, que poderiam escapar da ação de inibidores de serinoproteinases que estão presentes no sobrenadante plaquetário (Tabela Suplementar 4).

Considerando a presença de proteinases no sobrenadante plaquetário e o fato de que estas se encontravam ativas, como visto pela degradação de diversas proteínas, realizamos o ensaio de zimografia de gelatina para avaliar o perfil proteolítico do sobrenadante. Neste ensaio foi observada a presença de proteinases ativas na região de aproximadamente 110 kDa, 92 kDa, e 68 kDa, as quais correspondem as massas moleculares de pro-MMP9, MMP9 e MMP2, respectivamente, sendo que a banda ativa de ~68 kDa só foi verificada no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e trombina. Por *Western blot* comprovamos a presença de MMP2 ativa no secretoma de plaquetas enquanto que sua forma de zimogênio, pro-MMP2, com massa aproximada de 72 kDa, foi visualizada apenas no sedimento plaquetário (Figura 37), indicando que esta proteinase foi secretada e ativada durante a agregação plaquetária. Sawicki, et al., (1997) demonstraram que tanto o colágeno quanto a trombina são capazes de induzir a secreção de MMP2, e que embora esta proteinase seja incapaz de agregar

plaquetas intactas, ela atua sinergicamente amplificando a agregação induzida pelo colágeno. Além disso, altas concentrações de MMP2 (acima de 100 ng/mL) inibem a agregação plaquetária. Esses altos valores de concentração de MMP2 são encontrados no plasma de pacientes com doenças vasculares (Sawicki, et al., 1997). Em trabalho recente, Prudova et al., (2014) identificaram mais de 2000 produtos proteolíticos estáveis em concentrado de plaquetas armazenado por 9 dias, sendo as metaloproteinases foram identificadas como responsáveis primárias por esta proteólise. Desta forma, os produtos de degradação identificados em nosso trabalho também podem ter sido gerados por metaloproteinases presentes no sobrenadante plaquetário.

Figura 37. Análise da atividade proteolítica em plaquetas. (A) proteínas presentes em 300 μ L de sobrenadante de plaquetas não ativadas (controle) e ativadas (PA-BJ ou trombina) foram submetidas a zimografia, em condições não redutoras, utilizando gel de SDS poliacrilamida 12% copolimerizado com 1 mg / mL de gelatina. O gel foi corado com azul de Coomassie R-250. As setas indicam a digestão da gelatina detectada como zonas mais claras. (B) e (C) Análise por *Western blot* da presença da MMP2 no sedimento e sobrenadante de plaquetas, respectivamente. Proteínas presentes no sedimento (20 μ g) ou no sobrenadante de plaquetas (200 μ L) foram detectadas utilizando anticorpo anti-MMP2.

Interessantemente, identificamos no secretoma de plaquetas ativadas tanto por PA-BJ como por trombina, peptídeos oriundos do fragmento peptídico ativo da proteína amiloide beta 4 ($A\beta 40$), e que está envolvido no desenvolvimento e progressão da doença de Alzheimer e também na indução da agregação plaquetária (Shen et al., 2008; Sonkar et al., 2014), sugerindo que este peptídeo sofre outras clivagens após secreção, possivelmente como um mecanismo de regulação de sua atividade sobre plaquetas (Tabela 7).

Entre os peptídeos identificados no sobrenadante de plaquetas ativadas tanto por PA-BJ como por trombina, encontram-se diversos oriundos de proteínas envolvidas na manutenção e reorganização do citoesqueleto, tais como miosina-9, talina-1, transgelina-2, cofilina-1 e a proteína-1 que contém os domínios FH1/FH2 (FHOD1) (Tabela 7). No entanto, a presença de peptídeos resultantes da degradação de proteínas de citoesqueleto no sobrenadante não seria esperada. Por outro lado, sabe-se que plaquetas circulantes, em processo de senescência ou ativadas, liberam microvesículas que estão envolvidas em doenças metabólicas, neurodegeneração, inflamação, autoimunidade e câncer, além de desempenhar um papel fundamental em trombose e na formação de placas ateroscleróticas (Burnier et al., 2009; Suades et al., 2012). Dessa forma, considerando que neste estudo, para a análise das proteínas e peptídeos do secretoma, não foram removidas as microvesículas por centrifugação diferencial, é provável que estas proteínas associadas ao citoesqueleto eram provenientes de microvesículas liberadas no processo de ativação/agregação. O fato de que algumas dessas proteínas tenham sido degradadas indica que houve comprometimento da integridade do citoesqueleto plaquetário como resultado da ativação por PA-BJ e trombina.

Peptídeos oriundos do fator V da coagulação e da multimerina também foram identificados em maior abundância no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e por trombina (Tabela 7 e Tabela Suplementar 5), indicando que embora estas proteínas tenham sido identificados em maior abundância no sobrenadante de plaquetas ativadas, estas também foram parcialmente degradadas, possivelmente como controle da geração de trombina.

Nas análises da fração proteica do sobrenadante de plaquetas ativadas pela PA-BJ, chamou a atenção a contagem espectral de peptídeos da cadeia alfa do fibrinogênio (180-236), que foi bem inferior àquela das cadeias beta (600-900) e gama (420-690) (Tabela 5). Este achado foi corroborado com a análise da fração peptídica do sobrenadante plaquetário, que mostrou a presença significativa de peptídeos oriundos da cadeia alfa do fibrinogênio, e confirmou sua degradação em ambos os secretomas gerados por PA-BJ e trombina (Tabela 7, sendo a degradação mais acentuada no peptidoma induzido por PA-BJ).

A Figura 38 mostra a sequência de aminoácidos das cadeias alfa e beta do fibrinogênio, e a posição dos peptídeos identificados como produto de hidrólise na fração peptídica de plaquetas, evidenciando a extensa hidrólise desta proteína que ocorre durante a ativação plaquetária pela PA-BJ. É interessante notar que entre os peptídeos identificados no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ encontram-se os fibrinopeptídeos A e B, que embora tenham sido liberados, não houve a conversão do fibrinogênio em fibrina, já que as cadeias alfa e beta foram clivadas em várias outras ligações peptídicas, gerando diversos fragmentos e inviabilizando a formação da fibrina. Ainda, observou-se que os peptídeos identificados, oriundos da região correspondente aos fibrinopeptídeos, e gerados tanto nas plaquetas ativadas por PA-BJ quanto por trombina, apresentaram

sequências truncadas no lado N-terminal, indicando que possivelmente tenham sido também substratos para uma aminopeptidase plaquetária.

1 20 35 *** 130
MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADSGEGDFLAEGGGVVRGPRVVERHQSACKDSDWPFCSDEDWNYKCPSGCRMGLIDEVNDQFTNRINKLKNSLFQYQKNNKDSHSLTTNIMEILRGDFSSANNRDNTYNRV
ADSGEGDFLAEGGGV (3)
DSGEGDFLAEGGGV (2)
SGEGDFLAEGGGV (2)
ADSGEGDFLAEGGGV (1)
ADSGEGDFLAEGGGV (53)
DSGEGDFLAEGGGV (18)
SGEGDFLAEGGGV (14)
GEGDFLAEGGGV (13)
EGDFLAEGGGV (5)
GDFLAEGGGV (3)
DFLAEGGGV (4)
ADSGEGDFLAEGGGV (2)
ADSGEGDFLAEGGGV (85)
DSGEGDFLAEGGGV (14)
SGEGDFLAEGGGV (15)
GEGDFLAEGGGV (10)
EGDFLAEGGGV (3)
GDFLAEGGGV (2)
DFLAEGGGV (4)
131 260
SEDLRSRIEVLKRKQVIEKVQHIQLLQKNVRAQLVDMKRLEVDIDIKIRSCRGSCSRALAREVDLKDYEDQQKQLEQVIAKDLLPSRDRQHPLIKMKFVPDLVPGNFKSQLQKVPPEWKALTDMPQMRME
261 390
LERPGGNEITRGGSTSYGTGSETESPRNPSSAGSWNSGSSGPGSTGNRNPSSSGTGGTATWKPSSSGPGSTGSWNSGSSSGTSTGNQNPSPRPGSTGTWNPSSSERGSAGHWTSESSVSGSTGQWHS
SYGTGSETESPRNPSS (1)
SPRNPSSAGSWNSG (2) NPGSSGTGGTATWKP (1)
SYGTGSETESPRNPSS (1)
SETESPRNPSSAGSWNSG (1)
SPRNPSSAGSWNSG (2) WNSGSSGTSTGNQNPSPRPGSTGT (1)
SPRNPSSAGSWNSGSSGPGSTGNRNP (1) WNSGSSGTSTGNQNPSPRPGSTGT (2)
SWNSGSSGPGSTGNRNP (1) WNSGSSGTSTGNQNPSPRPG (1)
SWNSGSSGPGSTGNRNP (1) SSVSGSTGQWHS PGSPRPGSTGTWNP (1) WHS
391 512
GSFRPDSPGSGNARPNPDWGTFFEEVSGNVSPGTRREYHTEKLVTSKGDKELRGTGKEKVTSGSTTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVTKEVVTSSEGDSDCPEAMDGLTSLSGIGTLDGFRHR--
GS (1) DLGTLSGIGTLDGFRH (1)
GSFRPDSPGSGN (1) SGIGTLDGF (1)
ARPNNPDWGTFFEEVSGNVSPGTR (1) GTLSGIGTLDGF (1)
ARPNNPDWGTFFEEVSGNVSP (1) DLGTLSGIGTLDGF (1)
TEKLVTSKGDKELRGTG (1) DLGTLSGIGTLDGFR (1)
TEKLVTSKGDKELR (2) DLGTLSGIGTLDGFRH (3)

Fibrinogênio – cadeia alfa

513	***	640
HPDEAAFFDTASTGKTFFPGFFSPMLGEFVSETESRGSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPSRGKSSSYSKQFTSSTSYNRGDSTFESKSYKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPVRDCDDVLQTHP		
FDTASTGKTFFPG (2)	YSKQFTSSTSY (1)	
FDTASTGKTFFPG (5)	SSYSKQFTSSTSY (1)	
DTASTGKTFFPG (1)	YSKQFTSSTSY (3)	
HPDEAAFFDTASTGKTFFPG (3)	SGIFTNTKESSSHHPGIA (1)	YSKQFTSSTSY (1)
HPDEAAFFDTASTGKTFFPG (2)	SGIFTNTKESSSHHP (1)	YSKQFTSSTSY (1)
HPDEAAFFDTASTGKT (2)		YNRGDSTFESKSY (2)
HPDEAAFFDTASTGKT (3)		SSYSKQFTSSTSY (2)
DEAAFFDTASTGKTFFPGFFSPM (1)		SSYSKQFTSSTSY (1)
FFDTASTGKTFFPGFFSPM (2)		SSYSKQFTSSTSY (1)
FDTASTGKTFFPGFFSPMLGE (1)		SSYSKQFTSSTSY (1)
FDTASTGKTFFPGFFSPM (1)		YSKQFTSSTSY (1)
FDTASTGKTFFPGFFSP (1)		YSKQFTSSTSY (1)
FDTASTGKTFFPG (5)		YSKQFTSSTSY (1)
FDTASTGKTFFPG (1)		YSKQFTSSTSY (1)
DTASTGKTFFPGFFSPM (6)		TSSTSYNRGDSTFESKSY (1)
DTASTGKTFFPGFFSP (1)		STSYNRGDSTFESKSY (1)
DTASTGKTFFPGFFS (2)		SYNRGDSTFESKSY (1)
DTASTGKTFFPG (1)		
ASTGKTFFPGFFSPM (2)		
TFPGFFSPMLGEFVSETESRGSE (1)		
FFSPMLGEFVSETESRGSE (1)		
FSPMLGEFVSETESRGSE (1)		
FSPMLGEFVSETESR (1)		
MLGEFVSETESRGSE (1)		
LGEFVSETESRGSESGIFTNT (1)		
LGEFVSETESRGSESGIF (2)		
LGEFVSETESRGSE (1)		
GEFVSETESRGSESGIFTNT (1)		
GEFVSETESRGSE (1)		
FVSETESRGSESGIFTNT (3)		
FVSETESRGSESGIFT (1)		
FVSETESRGSESGIF (1)		
FVSETESRGSESG (1)		
FVSETESRGSES (1)		
FVSETESRGSE (1)		
641		860
SGTQSGIFNI-----		

Fibrinogênio – cadeia beta

1	31	44	130
MKRMVSWSFHKLKTMKHL L L L L L L C V F L V K S G V N D N E E G F F S A R G H R P L D K K R E E A P S L R P A P P P I S G G G Y R A R P A K A A A T Q K K V E R K A P D A G G C L H A D P D L G V L C P T G C Q L Q E A L L Q Q E R P I R N S V D E L			
	VNDNEEGFFSAR	(1)	LRPAPPISGGG (1)
	GVNDNEEGFFSAR	(3)	EAPSLRPAPPISGGGY (3)
	VNDNEEGFFSAR	(19)	EAPSLRPAPPISGGG (2)
	VNDNEEGFFSA	(1)	LRPAPPISGGGY (2)
	NDNEEGFFSAR	(6)	LRPAPPISGGGYR (1)
	DNEEGFFSAR	(4)	
	NEEGFFSAR	(4)	
	GVNDNEEGFFSAR	(2)	EAPSLRPAPPISGGGY (2)
	VNDNEEGFFSAR	(13)	LRPAPPISGGGYR (1)
	NDNEEGFFSAR	(4)	LRPAPPISGGGY (2)
	NEEGFFSAR	(2)	LRPAPPISGGG (3)
	NEEGFFSAR	(4)	RPAPPISGGG (3)

Figura 38. Sequência de aminoácidos das cadeias alfa e beta do fibrinogênio e dos fragmentos gerados pela sua degradação no sobrenadante de plaquetas. As sequências sublinhadas nas cadeias alfa e beta correspondem aos fibrinopeptídeos A e B, respectivamente. Os asteriscos indicam os resíduos da tríade Arg-Gly-Asp. Os produtos de hidrólise do fibrinogênio foram identificados na fração peptídica do sobrenadante de plaquetas não ativadas (vermelho), e ativadas por PA-BJ (azul) ou por trombina (verde). O número da contagem total de espéctros para cada peptídeo está entre parênteses.

Fragmentos gerados pela proteólise do fibrinogênio já foram descritos em muitos trabalhos, e a uma diversidade de funções biológicas já foram atribuídas a eles (Jennewein et al., 2011). Os fibrinopeptídeos A e B têm ação pró-inflamatória como quimioatraente de neutrófilos, monócitos e macrófagos (Richardson, et al., 1976); os D-dímeros, formados pela clivagem da fibrina pela plasmina, são usados na clínica como marcadores de fibrinólise disseminada e além disso são capazes de induzir a secreção de IL-1 β , IL-6 e PAI1 por monócitos do sangue periférico (Robson, et al., 1994); o fragmento E (também conhecido como domínio E), formado pela junção de fragmentos das cadeias α , β e γ , tem atividade angiogênica quando derivado da fibrina e inibe a angiogênese quando derivado do fibrinogênio (Thompson, et al., 1992; Bootle-Wilbraham et al., 2000); o fragmento derivado da cadeia β , B β 15-42 tem ação protetiva do miocárdio na reperfusão pós-isquêmica (Petzelbauer, et al., 2005); outro fragmento importante derivado da cadeia α , denominado alfastatina, exibe ação antiangiogênica na microvasculatura (Staton, et al., 2004). No entanto durante o processo de fibrinólise muitos fragmentos são gerados e ainda pouco se sabe sobre seu papel biológico.

Assim, a degradação do fibrinogênio durante o processo de ativação/agregação plaquetária poderia contribuir para os eventos de formação e regulação do trombo plaquetário ao gerar fragmentos biologicamente ativos. No caso da ativação pela PA-BJ, considerando que o fibrinogênio em sua forma íntegra foi detectado em maior abundância no sobrenadante, porém juntamente com diversos peptídeos oriundos de sua degradação, pode-se supor que estes peptídeos tenham estimulado sua secreção para garantir a disponibilidade desta proteína, que interage com a integrina α IIb β 3, fazendo a ligação entre as plaquetas.

Embora pouco se saiba sobre como as plaquetas detectam e respondem aos aspectos mecânicos do seu microambiente, como a presença e rigidez do substrato (fibrina/fibrinogênio), em trabalho recente, Qiu et al., (2014) demonstraram que as plaquetas são sensíveis à rigidez do substrato adjacente, e respondem a ele aumentando sua adesão e espraiamento, e conseqüentemente amplificam sua ativação ao aumentar a secreção de grânulos, a ativação medida pela integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e atividade pró-coagulante do meio. As plaquetas têm o potencial para controlar o microambiente vascular através das inúmeras moléculas que secretam durante os eventos de ativação e agregação (Brass, 2010). Neste sentido, podemos sugerir que as alterações do conteúdo secretado, durante a ativação plaquetária, também são influenciadas pela composição do microambiente.

Os peptídeos identificados na fração peptídica do sobrenadante de plaquetas foram usados não apenas para a verificação das proteínas que foram hidrolisadas no processo de agregação plaquetária, como também para a realização do mapeamento de sequências de aminoácidos adjacentes aos sítios de clivagem, que são preferenciais da(s) proteinase(s) (especificidade primária). Para tanto, foram utilizadas as sequências de aminoácidos dos peptídeos, correspondentes às posições P1'-P6' (Schechter e Berger, 1967), identificados nas amostras de plaquetas ativadas com PA-BJ e trombina e oriundos das proteínas consideradas como substrato (Tabela Suplementar 5); as sequências de aminoácidos complementares (P6-P1) adjacentes aos sítios de clivagem dos respectivos peptídeos foram obtidas utilizando-se uma ferramenta disponível *online* na página <http://clipserve.clip.ubc.ca/pics> (Schilling e Overall, 2008; Schilling et al., 2011), que também gerou a representação gráfica (*heat map*) da sequência consenso de clivagem pela(s) proteinase(s).

Na Figura 39 pode-se observar a ocorrência relativa dos aminoácidos nas posições P6-P6', e a ocorrência em relação à abundância natural dos aminoácidos, que indicam a preferência de aminoácidos apresentada pelas proteinases para estas posições em cada peptidoma. Analisando a ocorrência relativa dos aminoácidos observa-se maior ocorrência do resíduo de metionina na posição P1 (16,1%, 14,8% e 16%) e do resíduo de alanina na posição P1' (18,8%, 13% e 20,9%), nos peptídeos identificados na fração peptídica do sobrenadante de plaquetas não ativadas, e ativadas por PA-BJ ou trombina, respectivamente. Esses resultados não indicam a atividade no sobrenadante de alguma proteinase específica. A presença relativamente abundante de metionina na posição P1, não indica a atividade de nenhuma proteinase plaquetária conhecida. Por outro lado, conhece-se a serinoproteinase granzyme M (ou Met-ase), liberada por linfócitos ativados, que cliva ligações peptídicas após resíduos de metionina, mas esta ainda não foi descrita em plaquetas.

Ao analisarmos comparativamente as sequências obtidas utilizando o programa IceLogo (Colaert, et al., 2009), observamos que as preferências de sítio de clivagem observadas na fração peptídica do secretoma induzido por PA-BJ tem características semelhantes às preferências de clivagem da própria PA-BJ (Figura 40C), que foram determinadas em um estudo recente (Zelanis, et al., 2015). Entre as preferências determinadas, identificamos a preferência pelos resíduos de arginina na posição P1, de prolina na posição P2 e de fenilalanina na posição P2', como descrito para PA-BJ (Zelanis, et al., 2015). Estes resultados sugerem a possível participação da PA-BJ na clivagem de proteínas presentes no sobrenadante de plaquetas.

A 112 sítios de clivagem

B 271 sítios de clivagem

C 187 sítios de clivagem

Figura 39. Perfis de especificidade primária das proteinases que degradaram proteínas no sobrenadante de plaquetas não ativadas (A), ou ativadas com PA-BJ (B) ou trombina (C). *Heat map* da porcentagem de ocorrência de aminoácidos nas posições P6-P6' (direita); *heat map* da ocorrência de aminoácidos nas posições P6-P6' em relação à sua abundância natural (esquerda). A linha branca representa o ponto de clivagem pelas proteinases.

Figura 40. Determinação da frequência de aminoácidos em sítios de clivagem verificados no peptidoma do sobrenadante de plaquetas ativadas utilizando a ferramenta IceLogo. Os IceLogos representam os resíduos de P6 a P6' do conjunto total de sítios de clivagem para cada peptidoma e comparados entre si. Estão indicados os aminoácidos significativamente representados no peptidoma do sobrenadante de plaquetas ativadas com PA-BJ (acima do eixo x) ou trombina (abaixo do eixo x).

Em conjunto, as análises da fração peptídica do secretoma de plaquetas ativadas mostraram que o peptidoma é complexo e gerado por proteinases com diferentes especificidades, e que de alguma forma escapam do controle exercido por inibidores de proteinases também presentes no secretoma. A comparação dos peptidomas identificados no sobrenadante de plaquetas ativadas com a PA-BJ e com a trombina, mostrou que a ativação pela PA-BJ leva à geração de um conjunto de peptídeos maior e mais complexo, possivelmente porque a própria PA-BJ participe da degradação de proteínas presentes no sobrenadante. Além disso, a menor complexidade do peptidoma do sobrenadante de plaquetas ativadas por trombina poderia ser explicada pela presença de inibidores de proteinases, identificados em maior abundância em relação ao sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ, e que poderiam participar na regulação da proteólise.

5.0 CONCLUSÕES

Neste estudo foram utilizadas abordagens proteômicas para analisar o sedimento e o secretoma de plaquetas ativadas pelas serinoproteinases PA-BJ e trombina, e é mostrado pela primeira vez que embora a ativação de plaquetas por essas enzimas seja mediada pelos receptores PAR-1 e PAR-4, existem diferenças nas vias de ativação, que são refletidas em diferenças no sedimento e no secretoma de plaquetas agregadas:

1. Na secreção induzida por PA-BJ, foi verificado o aumento da abundância de proteínas como a proteína amiloide beta A4, MMP1 e fibrinogênio, o que indica que a secreção induzida pela PA-BJ tem um conteúdo que favorece a formação e estabilidade do agregado plaquetário.
2. Na secreção induzida por trombina foi verificado o aumento de abundância de proteínas envolvidas na regulação da formação do coágulo, como a proteína S, PAI1 e antitrombina III, reforçando a hipótese de que uma fina regulação é necessária nos eventos disparados pela trombina, regulando assim sua ação no local da injúria vascular.
3. A ativação mediada por PA-BJ e trombina induz igualmente a secreção de proteínas envolvidas em eventos de agregação plaquetária, na formação do coágulo e em processos inflamatórios, entre as quais estão fibronectina, trombospondina, heparanase, fator V da coagulação, multimerina, catepsina-D, albumina, alfa-1 anti-tripsina, inibidor inter alfa de tripsina, PBP, PF4 e a proteína do complemento C3, sugerindo que embora a ativação disparada por estas enzimas difira em alguns mecanismos elas também compartilham vias em comum.

4. No secretoma de plaquetas não ativadas, identificamos pela primeira vez, a presença de proteínas envolvidas na inibição e regulação da ativação plaquetária, tais como catalase, anidrase carbônica, inibidor de elastase leucocitária e a glicoproteína rica em histidina, sugerindo que possa existir um mecanismo fisiológico de regulação do microambiente plaquetário, inibindo a sua ativação inespecífica.
5. A análise da fração peptídica do secretoma induzido por PA-BJ e trombina mostrou também pela primeira vez que ocorre degradação proteica como resultado da ativação e secreção plaquetárias, sugerindo que possa existir um mecanismo de regulação da ativação/agregação plaquetária no qual a degradação de algumas proteínas geraria peptídeos biologicamente ativos que participariam nestes eventos.
6. A comparação dos peptidomas identificados no sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ e por trombina mostrou que a ativação pela PA-BJ leva à geração de um conjunto de peptídeos maior e mais complexo, possivelmente porque a própria PA-BJ escape à ação de inibidores e participe da degradação de proteínas presentes no sobrenadante. Além disso, a menor complexidade do peptidoma do sobrenadante de plaquetas ativadas por trombina poderia ser explicada pela presença de inibidores de proteinases, identificados em maior abundância, em relação ao sobrenadante de plaquetas ativadas por PA-BJ, e que poderiam participar na regulação da proteólise.
7. Algumas semelhanças foram verificadas no sedimento de plaquetas ativadas por PA-BJ e por trombina, entre elas o aumento de abundância de proteínas, tais como ADAM-10, tromboxano A2 sintase, integrina α IIb, miosina-9 e fosforilase b, que estão envolvidas nos eventos de ativação e agregação plaquetária.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que embora a PA-BJ e a trombina ativem plaquetas por meio dos receptores PAR-1 e PAR-4, estas enzimas utilizam vias diferentes para chegar à agregação plaquetária, fato evidenciado pela secreção e degradação proteica diferenciais, induzidas por ambas.

Assim, investigações futuras sobre as proteínas e peptídeos identificados na secreção diferencial de plaquetas neste estudo poderão ampliar o conhecimento sobre as vias disparadas em consequência da ativação plaquetária por diferentes serinoproteinases, contribuindo para a descoberta de novos alvos para terapias antiplaquetárias.

6.0 REFERÊNCIAS

- AATONEN, M.T.; OHMAN, T.; NYMAN, T.A.; LAITINEN, S.; GRÖNHOLM, M.; SILJANDER, P.R. Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014.
- ABRAMS, C.S.; BRASS, L.F. Platelet Signal Transduction In: MARDER, V.J.; AIRD, W.C.; BENNETT, J.S.; SCHULMAN, S.; WHITE II, G.S. **Hemostasis and Thrombosis - Basic Principles and Clinical Practice**, 8 ed. Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer, 2013. Cap. 33, p. 449-461.
- ADAMS, J.C.; LAWLER, J. The thrombospondins. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 6, p. 961-968, 2004.
- ALBERELLI, M.A.; DE CANDIA, E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology. **Vascul Pharmacol**, v. 62, n. 2, p. 72-81, 2014.
- ANGIOLILLO, D.J.; CAPODANNO, D.; GOTO, S. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis. **Eur Heart J**, v. 31, n. 1, p. 17-28, 2010.
- ANTUNES, T.C.; YAMASHITA, K.M.; BARBARO, K.C.; SAIKI, M.; SANTORO, M.L. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 1443-1458, 2010.
- ASLAN, J.E.; MCCARTY, O.J. Rho GTPases in platelet function. **J Thromb Haemost**, v. 11, n. 1, p. 35-46, 2013.
- ASZÓDI, A.; PFEIFER, A.; AHMAD, M.; GLAUNER, M.; ZHOU, X.H.; NY, L.; ANDERSSON, K.E.; KEHREL, B.; OFFERMANN, S.; FÄSSLER, R. The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. **EMBO J**, v. 18, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BAKER, A.B.; GIBSON, W.J.; KOLACHALAMA, V.B.; GOLOMB, M.; INDOLFI, L.; SPRUELL, C.; ZCHARIA, E.; VLODAVSKY, I.; EDELMAN, E.R. Heparanase regulates thrombosis in vascular injury and stent-induced flow disturbance. **J Am Coll Cardiol**, v. 59, n. 17, p. 1551-1560, 2012.
- BARRETT, A.J.; RAWLINGS, N.D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys**, v. 318, p. 247-250, 1995.
- BAUER, K.; KRATZER, M.; OTTE, M.; DE QUINTANA, K.L.; HAGMANN, J.; ARNOLD, G.J.; ECKERSKORN, C.; LOTTSPEICH, F.; SIESS, W. Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4236-4245, 2000.
- BERANOVA-GIORGIANNI, S. Proteome analysis by two dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 273-281, 2003.
- BERGMEIER, W.; BURGER, P.C.; PIFFATH, C.L.; HOFFMEISTER, K.M.; HARTWIG, J.H.; NIESWANDT, B.; WAGNER, D.D. Metalloproteinase inhibitors

improve the recovery and hemostatic function of in vitro-aged or -injured mouse platelets. **Blood**, v. 102, p. 4229–4235, 2003.

BERNSTEIN, R.A.; HEMPHILL, J.C. Critical care of acute ischemic stroke. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 1, p. 587-592, 2001.

BIZZOZERO, G. Ueber einen neuen Formbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und Blut gerinnung. **Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med**, 1882, v. 90, p. 261-332 (translated into English by Beck EA. On a new blood particle and its role in thrombosis and blood coagulation. Bern, Switzerland, Hans Huber, 1982).

BLAKYTNY, R.; LUDLOW, A.; MARTIN, G.E.; IRELAND, G.; LUND, L.R.; FERGUSON, M.W.; BRUNNER, G. Latent TGF-beta1 activation by platelets. **J Cell Physiol**, v. 199, p. 67-76, 2004.

BODE, W.; MAYR, I.; BAUMANN, U.; HUBER, R.; STONE, S.R.; HOFSTEENGE, J. The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. **EMBO J**, v. 8, p. 3467-3475, 1989.

BODE, W.; TURK, D.; KARSHIKOV, A. The refined 1.9 Å x-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone inhibited human alpha thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active site geometry, and structure-function relationships. **Protein Sci**, v. 1, p. 426-471, 1992.

BODIN, S.; TRONCHERE, H.; PAYRASTRE, B. Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1610, p. 247-257, 2003.

BOOTLE-WILBRAHAM, C.A.; TAZZYMANN, S.; MARSHALL, J.M.; LEWIS, C.E. Fibrinogen E-fragment inhibits the migration and tubule formation of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. **Cancer Res**, v. 60, p. 4719-4724, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDT, E.; PETERSEN, F.; LUDWIG, A.; EHLERT, J.E.; BOCK, L.; FLAD, H.D. The b-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 471-478, 2000.

BRASS, L.F. Thrombin and platelet activation. **Chest**, v. 124, p. 18S-25S, 2003.

BRASS, L. Understanding and evaluating platelet function. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2010, p. 387-396, 2010.

BREKKEN, R.A.; SAGE, E.H. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. **Matrix Biol**, v. 19, n. 8, p. 816-827, 2001.

BROWNLOW, S.L.; HARPER, A.G.; HARPER, M.T.; SAGE, S.O. A role for hTRPC1 and lipid raft domains in store-mediated calcium entry in human platelets. **Cell Calcium**, v. 35, p. 107-113, 2004.

- BURKHART, J.M.; VAUDEL, M.; GAMBARYAN, S.; RADAU, S.; WALTER, U.; MARTENS, L.; GEIGER, J.; SICKMANN, A.; ZAHEDI, R.P. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. **Blood**, v. 120, p. e73–e82, 2012.
- BURNETTE, W. N. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal. Biochem.**, v. 112, p. 195-203, 1981.
- BURNIER. L.; FONTANA, P.; KWAK, B.R.; ANGELILLO-SCHERRER, A. Cell derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. **Thromb Haemost**, v. 101, p. 439-451, 2009.
- BYZOVA, T.V.; PLOW, E.F: Networking in the hemostatic system. Integrin α IIb β 3 binds prothrombin and influences its activation. **J Biol Chem**, v. 272, n. 43, p. 27183-27188, 1997.
- CAMIRE, R.M.; POLLAK, E.S.; KAUSHANSKY, K.; TRACY, P.B. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3035-3041, 1998.
- CAPRIOTTI, A.L.; CARUSO, G.; CAVALIERE, C.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Proteomic characterization of human platelet-derived microparticles. **Anal Chim Acta**, v. 776, p. 57-63, 2013.
- CASTELLOT, J.J., Jr.; FAVREAU, L.V.; KARNOVSKY, M.J.; ROSENBERG, R.D. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by endothelial cell-derived heparin. Possible role of a platelet endoglycosidase. **J Biol Chem**, v. 257, n. 19, p. 11256-11260, 1982.
- CECCHETTI, L.; TOLLEY, N.D.; MICHETTI, N.; BURY, L.; WEYRICH, A.S.; GRESELE, P. Megakaryocytes differentially sort mRNAs for matrix metalloproteinases and their inhibitors into platelets: a mechanism for regulating synthetic events. **Blood**, v. 118, n. 7, p. 1903-1911, 2011.
- CHANDRAMOULI, K.; QIAN, P.Y. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. **Hum Genomics Proteomics**, pii: 239204, 2009.
- CHATTERJEE, M.; HUANG, Z.; ZHANG, W.; JIANG, L.; HULTENBY, K.; ZHU, L.; HU, H.; NILSSON, G.P.; LI, N. Distinct platelet packaging, release, and surface expression of proangiogenic and antiangiogenic factors on different platelet stimuli. **Blood**, v. 117, p. 3907-3911, 2011.
- CHATTERJEE, S.; FISHER, A.B. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow. **Antioxid Redox Signal**, v. 20, n. 6, p. 899–913, 2014.
- CHEN, W.; WAHL, S.M. Manipulation of TGF- β to control autoimmune and chronic inflammatory diseases. **Microbes Infect**, v. 1, p. 1367–1380, 1999.

- CHESNEY, C.M.; HARPER, E.; COLMAN, R.W. Human platelet collagenase. **J Clin Invest**, v. 53, p. 1647–1654, 1974.
- CIFERRI, S.; EMILIANI, C.; GUGLIELMINI, G.; ORLACCHIO, A.; NENCI, G.G.; GRESELE, P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. **Thromb Haemost**, v. 83, p. 157-164, 2000.
- CLEMETSON, J.M.; POLGAR, J.; MAGNENAT, E.; WELLS, T.N.; CLEMETSON, K.J. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcαR and the natural killer receptors. **J Biol Chem**, v. 274, n. 41, p. 29019-29024, 1999.
- COLAERT, N.; HELSENS, K.; MARTENS, L.; VANDEKERCKHOVE, J.; GEVAERT, K. Improved visualization of protein consensus sequences by iceLogo. **Nat Methods**, v. 6, n. 11, p. 786-787, 2009.
- COLLER, B.S. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: FOZZARD, H.A.; JENNINGS, R.B.; KATZ, A.M.; MORGAN, H.E.; HABER, E. **The Heart and Cardiovascular System**, 2 ed. Raven Press, New York, 1991, p 219.
- COPPINGER, J.A.; CAGNEY, G.; TOOMEY, S.; KISLINGER, T.; BELTON, O.; MCREDMOND, J.P.; CAHILL, D.J.; EMILI, A.; FITZGERALD, D.J.; MAGUIRE, P.B. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. **Blood**, v. 103, p. 2096-2104, 2004.
- COPPINGER, J.A.; O’CONNOR, R.; WYNNE, K.; FLANAGAN, M.; SULLIVAN, M.; MAGUIRE, P.B.; FITZGERALD, D.J.; CAGNEY, G. Moderation of the platelet releasate response by aspirin. **Blood**, v. 109, p. 4786-4792, 2007.
- COUGHLIN, S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 258-264, 2000.
- COVIC, L.; GRESSER, A.L.; KULIOPULOS, A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. **Biochemistry**, v. 39, n. 18, p. 5458-5467, 2000.
- COX, J.; HEIN, M.Y.; LUBER, C.A.; PARON, I.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 9, p. 2513-2526, 2014.
- COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol**, v. 26, p. 1367-72, 2008.
- COX, J.; NEUHAUSER, N.; MICHALSKI, A.; SCHELTEMA, R.A.; OLSEN, J.V.; MANN, M. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J Proteome Res**, v. 10, p. 1794-805, 2011.
- CRUZ, M.A.; CHEN, J.; WHITELOCK, J.L.; MORALES, L.D.; LOPEZ, J.A. The platelet glycoprotein Ib-von Willebrand factor interaction activates the collagen receptor alpha2beta1 to bind collagen: activation-dependent conformational change of the alpha2-I domain. **Blood**, v. 105, p. 1986-1991, 2005.

- DARDIK, R.; LAHAV, J. The structure of endothelial cell thrombospondin. Characterization of the heparin-binding domains. **Eur J Biochem**, v. 168, n. 2, p. 347-355, 1987.
- DAVI, G.; PATRONO, C. Platelet activation and atherothrombosis. **N Engl J Med**, v. 357, p. 2482–2494, 2007.
- DÉRY, O.; CORVERA, C.U.; STEINHOFF, M.; BUNNETT, N.W. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. **Am J Physiol**, v. 274, p. C1429-1452, 1998.
- DONG, J.F. Cleavage of ultra-large von Willebrand factor by ADAMTS-13 under flow conditions. **J Thromb Haemost**, v. 3, p. 1710-1716, 2005.
- DONNÉ, A. Cours de microscopie complémentaire des études médicales: anatomie microscopique et physiologie des fluides de l'économie. Paris : **J B Baillière**, 1845.
- DONNÉ, A. De l'origine des globules du sang, de leur mode de formation et de leur fin. **CR Se Acad Sci**, v. 14, p. 366-368, 1842.
- ESMON, C.T.; FUKUDOME, K.; MATHER, T.; BODE, W.; REGAN, L.M.; STEARNS-KUROSAWA, D.J.; KUROSAWA, S. Inflammation, sepsis, and coagulation. **Haematologica**, v. 84, n. 3, p. 254–259, 1999.
- ESPOSITO, G.; VITAGLIANO, L.; COSTANZO, P.; BORRELLI, L.; BARONE, R.; PAVONE, L.; IZZO, P.; ZAGARI, A.; SALVATORE, F. Human aldolase A natural mutants: relationship between flexibility of the C-terminal region and enzyme function. **Biochem J**, v. 380 , p. 51-56, 2004.
- EZUMI, Y.; SHINDOH, K.; TSUJI, M.; TAKAYAMA, H. Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets. **J Exp Med**, v. 188, p. 267-276, 1998.
- FALET, H.; HOFFMEISTER, K.M.; NEUJAHN, R.; ITALIANO, J.E., Jr.; STOSSEL, T.P.; SOUTHWICK, F.S.; HARTWIG, J.H. Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 26, p. 16782-16787, 2002.
- FARRELL, D.H.; THIAGARAJAN, P.; CHUNG, D.W.; DAVIE, E.W. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, n. 22, p. 10729-10732, 1992.
- FICARRO, S.B.; ADELMANT, G.; TOMAR M.N.; ZHANG, Y.; CHENG, V.J.; MARTO, J.A. Magnetic bead processor for rapid evaluation and optimization of parameters for phosphopeptide enrichment. **Anal Chem**, v. 81, n. 11, p. 4566-4575, 2009.
- FLAUMENHAFT, R. Molecular basis of platelet granule secretion. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 7, p. 1152-1160, 2003.
- FLAUMENHAFT, R.; DILKS, J.R.; RICHARDSON, J.; ALDEN, E.; PATEL-HETT, S.R.; BATTINELLI, E.; KLEMENT, G.L.; SOLA-VISNER, M.; ITALIANO, J.E., Jr. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. **Blood**, v. 113, p. 1112-1121, 2009.

- FOLSOM, A.R.; LUTSEY, P.L.; HECKBERT, S.R.; CUSHMAN, M. Serum albumin and risk of venous thromboembolism. **Thromb Haemost**, v. 104, n. 1, p. 100–104, 2010.
- FOX, J.E. The platelet cytoskeleton. **Thromb Haemost**, v. 70, n. 6, p. 884-893, 1993.
- FOX, J.E. On the role of calpain and Rho proteins in regulating integrin-induced signaling. **Thromb Haemost**, v. 82, n. 2, p. 385-391, 1999.
- FOX, J.E. Cytoskeletal proteins and platelet signaling. **Thromb Haemost**, v. 86, p. 198-213, 2001.
- FOX, J.W.; SERRANO, S.M. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. **Curr Pharm**, v. 13: p. 2927-2934, 2007.
- FUNK, C.; GMÜR, J.; HEROLD, R.; STRAUB, P.W. Reptilase-R: a new reagent in blood coagulation. **Br J Haematol**, v. 21, n. 1, p. 43-52, 1971.
- GALT, S.W.; LINDEMANN, S.; ALLEN, L.; MEDD, D.J.; FALK, J.M.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M.; KRAISS, L.W.; ZIMMERMAN, G.A.; WEYRICH, A.S. Outside-in signals delivered by matrix metalloproteinase-1 regulate platelet function. **Circ Res**, v. 90, n. 10, p. 1093-1099, 2002.
- GANDHI, P.S.; CHEN, Z.; MATHEWS, F.S.; DI CERA, E. Structural identification of the pathway of long-range communication in an allosteric enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 6, p. 1832-1837, 2008.
- GANDHI, P.S.; CHEN, Z.; DI CERA, E. Crystal structure of thrombin bound to the uncleaved extracellular fragment of PAR1. **J Biol Chem**, v. 285, n. 20, p. 15393-15398, 2010.
- GARCIA, A.; PRABHAKAR, S.; BROCK, C.J.; PEARCE, A.C.; DWEK, R.A.; WATSON, S.P.; HEBESTREIT, H.F.; ZITZMANN, N. Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, p. 656–668, 2004a.
- GARCÍA, A.; PRABHAKAR, S.; HUGHAN, S.; ANDERSON, T.W.; BROCK, C.J.; PEARCE, A.C.; DWEK, R.A.; WATSON, S.P.; HEBESTREIT, H.F.; ZITZMANN, N. Differential proteome analysis of TRAP-activated platelets: involvement of DOK-2 and phosphorylation of RGS proteins. **Blood**, v. 103, p. 2088-2095, 2004b.
- GARCÍA, B.A.; SMALLEY, D.M.; CHO, H.; SHABANOWITZ, J.; LEY, K.; HUNT, D.F. The platelet microparticle proteome. **J Proteome Res**, v. 4, p. 1516–1521, 2005.
- GARCÍA, A. Proteome analysis of signaling cascades in human platelets. **Blood Cells Mol Dis**, v. 36, n. 2, p. 152-156, 2006.
- GARDINER, E.E.; KARUNAKARAN, D.; SHEN, Y.; ARTHUR, J.F.; ANDREWS, R.K.; BERNDT, M.C. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 7, p. 1530-1537, 2007.

- GERSZTEN, R.E.; CHEN, J.; ISHII, M.; ISHII, K.; WANG, L.; NANEVICZ, T.; TURCK, C.W.; VU, T.K.; COUGHLIN, S.R. Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. **Nature**, v. 368, n. 6472, p. 648-651, 1994.
- GIBBINS, J.M.; BRIDDON, S.; SHUTES, A.; VAN VUGT, M.J.; VAN DE WINKEL, J.G.; SAITO, T.; WATSON, S.P. The p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase associates with the Fc receptor gamma-chain and linker for activator of T cells (LAT) in platelets stimulated by collagen and convulxin. **J Biol Chem**, v. 273, p. 34437-34443, 1998.
- GIDDINGS, J. C. Two-dimensional separations: concept and promise. **Anal Chem**, v. 56, n. 12, p. 1258A-1260A, 1984.
- GIL-BAZO, I.; CATALÁN, V.; PÁRAMO, J.; QUERO, C.; ESCRIVÁ DE ROMANÍ, S.; PÉREZ-OCHOA, A.; ARBEA, L.; NAVARRO, V.; DE LA CÁMARA, J.; GARRÁN, C.; ESPINÓS, J.; ROCHA, E.; GARCÍA-FONCILLAS, J.; MARTÍN-ALGARRA, S. Von Willebrand factor as an intermediate between hemostasis and angiogenesis of tumor origin. **Rev Med Univ Navarra**, v. 47, n. 3, p. 22-28, 2003.
- GNATENKO, D.V.; DUNN, J.J.; MCCORKLE, S.R.; WEISSMANN, D.; PERROTTA, P.L.; BAHOU, W.F. Transcript profiling of human platelets using microarray and serial analysis of gene expression. **Blood**, v. 101, p. 2285-2293, 2003.
- GOEL, M.S.; DIAMOND, S.L. Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and independent mechanisms. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 21, p. 2093-2098, 2001.
- GRYGLEWSKI, R.J. Prostacyclin among prostanoids. **Pharmacol Rep**, v. 60, p.3-11, 2008.
- HANNA, S.L.; SHERMAN, N.E.; KINTER, M.T.; GOLDBERG, J.B. Comparison of proteins expressed by Pseudomonas aeruginosa strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microbiology**, v. 146, p 2495-2508, 2000.
- HANTGAN, R.R.; ROCCO, M.; NAGASWAMI, C.; WEISEL, J.W. Binding of a fibrinogen mimetic stabilizes integrin alphaIIb beta3's open conformation. **Protein Sci**, v. 10, n. 8, p. 1614-1626, 2001.
- HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha-granules. **Blood Rev**, v. 7, n. 1, p. 52-62, 1993.
- HARTLEY, P. S. Platelet senescence and death. **Clin Lab**, v. 53, p. 157-66, 2007.
- HARTWIG, J.H.; BARKALOW, K.; AZIM, A.; ITALIANO, Jr. The elegant platelet: signals controlling actin assembly. **Thromb Haemost**, v. 82, n. 2, p. 392-398, 1999.
- HAVERSTICK, D.M.; COWAN, J.F.; YAMADA, K.M.; SANTORO, S.A. Inhibition of platelet adhesion to fibronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibronectin. **Blood**, v. 66, n. 4, p. 946-952, 1985.

- HEIJNEN, H.F.; DEBILI, N.; VAINCHENCKER, W.; BRETON-GORIUS, J.; GEUZE, H.J.; SIXMA, J.J. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet alpha-granules. **Blood**, v. 91, n. 7, p. 2313-2325, 1998.
- HENRIQUES, O.B.; LAVRAS, A.C.; FICHMAN, M.; MANDELBAUM, F.R.; HENRIQUES, S.B. The proteolytic activity of the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochem J**, v. 68, n. 4, p. 597-605, 1958.
- HERNANDEZ-RUIZ, L.; VALVERDE, F.; JIMENEZ-NUNEZ, M.D.; OCANA, E.; SAEZ-BENITO, A.; RODRIGUEZ-MARTORELL, J.; BOHORQUEZ, J.C.; SERRANO, A.; RUIZ, F.A.. Organellar proteomics of human platelet dense granules reveals that 14-3-3zeta is a granule protein related to atherosclerosis. **J Proteome Res**, v. 6, p. 4449–4457, 2007
- HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Anal Biochem**, v. 102, n. 1, p. 196-202, 1980.
- HOLMSEN, H. Platelet secretion and energy metabolism. In: HIRSH, J.; MARDER, V.; SALZMAN, E.W. **Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**, 3. ed. 1993.
- HOUNG, A.; POLGAR, J.; REED, G.L. Munc18-syntaxin complexes and exocytosis in human platelets. **J Biol Chem**, v. 278, p. 19627-19633, 2003.
- HOXIE, J.A.; AHUJA, M.; BELMONTE, E.; PIZARRO, S.; PARTON, R.; BRASS, L.F.; Internalization and recycling of activated thrombin receptors. **J Biol Chem**, v. 268, p. 13756–13763, 1993.
- HU, L.; ROTH, J.M.; BROOKS, P.; LUTY, J.; KARPATKIN, S. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. **Cancer Res**, v. 68, n. 12, p. 4666-4673, 2008.
- HUANG, M.; SANNANINGAIAH, D.; ZHAO, N.; GONG, Y.; GRONDOLSKY, J.; HOOVER-PLOW, J. EMILIN2 regulates platelet activation, thrombus formation, and clot retraction. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0115284, 2015.
- HUTTON, R.A.; WARRELL, D.A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Rev**, v. 7, p. 176-189, 1993.
- ISHII, K.; HEIN, L.; KOBILKA, B.; COUGHLIN, S.R. Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling. **J Biol Chem**, v. 268, n. 13, p. 9780-9786, 1993.
- ITALIANO, J.E., Jr.; RICHARDSON, J.L.; PATEL-HETT, S.; BATTINELLI, E.; ZASLAVSKY, A.; SHORT, S.; RYEOM, S.; FOLKMAN, J.; KLEMENT, G.L. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. **Blood**, v. 111, p. 1227-1233, 2008.
- JALALI, S.; DEL POZO, M.A.; CHEN, K.; MIAO, H.; LI, Y.; SCHWARTZ, M.A.; SHYY, J.Y.; CHIEN, S. Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 3, p. 1042-1046, 2001.

- JEIMY, S.B.; FULLER, N.; TASNEEM, S.; SEGERS, K.; STAFFORD, A.R.; WEITZ, J.I.; CAMIRE, R.M.; NICOLAES, G.A.; HAYWARD, C.P. Multimerin 1 binds factor V and activated factor V with high affinity and inhibits thrombin generation. **Thromb Haemost**, v. 100, n. 6, p. 1058-1067, 2008.
- JENNEWEIN, C.; TRAN, N.; PAULUS, P.; ELLINGHAUS, P.; EBLE, J.A.; ZACHAROWSKI, K. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. **Mol Med**, v. 17, n. 5-6, p. 568-573, 2011.
- JOHNSON, G.J.; LEIS, L.A.; KRUMWIEDE, M.D.; WHITE, J.G. The critical role of myosin IIA in platelet internal contraction. **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 7, p. 1516-1529, 2007.
- JOHNSON, M.D.; TORRI, J.A.; LIPPMAN, M.E.; DICKSON, R.B. The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 53, p. 873-877, 1993.
- JONNALAGADDA, D.; IZU, L.T.; WHITEHEART, S.W. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. **Blood**, v. 120, n. 26, p. 5209-5216, 2012.
- JØRGENSEN, K.A.; STOFFERSEN, E. On the inhibitory effect of albumin on platelet aggregation. **Thromb Res**, v. 17, p. 13-18, 1980.
- KAHN, M.L.; NAKANISHI-MATSUI, M.; SHAPIRO, M.J.; ISHIHARA, H.; COUGHLIN, S.R. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. **J Clin Invest**, v. 103, p. 879–887, 1999.
- KAMYKOWSKI, J.; CARLTON, P.; SEHGAL, S.; STORRIE, B. Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet alpha granules. **Blood**, v. 118, p. 1370-1373, 2011.
- KELM, R.J.; MANN, JR, K.G. Human platelet osteonectin: release, surface expression, and partial characterization. **Blood**, v. 75, n. 5, p. 1105-1113, 1990.
- KIEFFER, N.; GUICHARD, J.; FARCET, J.P.; VAINCHENKER, W.; BRETON-GORIUS, J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. **Eur J Biochem**, v. 164, p. 189-195, 1987.
- KIEMA, T.; LAD, Y.; JIANG, P.; OXLEY, C.L.; BALDASSARRE, M.; WEGENER, K.L.; CAMPBELL, I.D.; YLÄNNE, J.; CALDERWOOD, D.A. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. **Mol Cell**, v. 21, n. 3, p. 337-347, 2006.
- KIM, S.; DANGELMAIER, C.; BHAVANASI, D.; MENG, S.; WANG, H.; GOLDFINGER, L.E.; KUNAPULI, S.P. RhoG Protein Regulates Glycoprotein VI-Fc Receptor γ-Chain Complex-mediated Platelet Activation and Thrombus Formation. **J Biol Chem**, v. 288, n. 47, p. 34230–34238, 2013.
- KING, S.M.; REED, G.L. Development of platelet secretory granules. **Cell & Developmental Biology**, v. 13, p. 293–302, 2002.
- KLOCKENBUSCH, C.; WALSH, G.M.; BROWN, L.M.; HOFFMAN, M.D.; IGNATCHENKO, V.; KISLINGER, T.; KAST, J. Global proteome analysis identifies

- active immunoproteasome subunits in human platelets. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 12, p. 3308-3319, 2014.
- KOWALSKA, M.A.; RAUOVA, L.; PONCZ, M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis. **Thromb Res**, v. 125, n. 4, p. 292-296, 2010.
- KULIOPULOS, A.; COVIC, L.; SEELEY, S.K.; SHERIDAN, P.J.; HELIN, J.; COSTELLO, C.E. Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. **Biochemistry**, v. 38, n. 14, p. 4572-4585, 1999.
- KUNAPULI, S.P. Functional characterization of platelet ADP. **Platelets**, v. 9, p. 343-351, 1998.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANE, T.F.; SAGE, E.H. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions **FASEB J**, v. 8, p. 163-173, 1994.
- LATALLO, Z.S.; LOPACIUK, S. New approach to thrombolytic therapy: the use of Defibrase in connection with streptokinase. **Thromb Diath Haemorrh Suppl**, v. 56, p. 253-264, 1973.
- LEEVERS, S.J.; VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M.D. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. **Cur. Opin Cell Biol**, v. 11, p. 219-225, 1999.
- LEFEBVRE, J.M.; QANADLI, S.D.; KACHER, S.; ABERKANE, L.; RIGAUD, M.; LACOMBE, P.; ROCHA, P. A new vascular sealant (Sealgel) to achieve rapid hemostasis after percutaneous angioplasty in anticoagulated patients: clinical feasibility and preliminary results. **Eur Radiol**, v. 11, p. 454-459, 2001.
- LEMONS, P.P.; CHEN, D.; WHITEHEART, S.W. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: requirements for alpha-granule release. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 267, n. 3, p. 875-880, 2000.
- LESLIE M. Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets. **Science**, v. 328, n. 5978, p. 562-564, 2010.
- LESURTEL, M.; GRAF, R.; ALEIL, B.; WALTHER, D.J.; TIAN, Y.; JOCHUM, W.; GACHET, C.; BADER, M.; CLAVIEN, P.A. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. **Science**, v. 312, n. 5770, p. 104-107, 2006.
- LETO, G.; GEBBIA, N.; RAUSA, L.; TUMMINELLO, F.M. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases. **Anticancer Res**, v. 12, p. 235-240, 1992.
- Li, Q.X.; Berndt, M.C.; Bush, A.I.; Rumble, B.; Mackenzie, I.; Friedhuber, A.; Beyreuther, K.; Masters, C.L. Membrane-associated forms of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in human platelets and brain: surface expression on the activated human platelet **Blood**, v. 84, p. 133-142, 1994.

- LINDEMANN, S.; TOLLEY, N.D.; DIXON, D.A.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A.; WEYRICH, A.S. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. **J Cell Biol**, v. 154, n. 3, p. 485-490, 2001.
- LINK, A.J.; ENG, J.; SCHIELTZ, D.M.; CARMACK, E.; MIZE, G.J.; MORRIS, D.R.; GARVIK, B.M.; YATES, J.R., 3rd. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. **Nat Biotechnol**, v. 17, n. 7, p. 676-682, 1999.
- LOUACHE, F.; DEBILI, N.; CRAMER, E.; BRETON-GORIUS, J.; VAINCHENKER, W. Fibrinogen is not synthesized by human megakaryocytes. **Blood**, v. 77, n. 2, p. 311-316, 1991.
- LU, D.; KALAFATIS, M.; MANN, K.G.; LONG, G.L. Comparison of activated protein C/protein S-mediated inactivation of human factor VIII and factor V. **Blood**, v. 87, n. 11, p. 4708-4717, 1996.
- LUM, H.; MALIK, A.B. Regulation of vascular endothelial barrier function. **Am J Physiol**, v. 267, p. L223-L241, 1994.
- MA, L.; PERINI, R.; MCKNIGHT, W.; DICAY, M.; KLEIN, A.; HOLLENBERG, M.D.; WALLACE, J.L. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, p. 216-220, 2005.
- MA, Y.Q.; QIN, J.; WU, C.; PLOW, E.F. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of β 3 integrins. **J Cell Biol**, v. 181, n. 3, p. 439-446, 2008.
- MACQUARRIE, J.L.; STAFFORD, A.R.; YAU, J.W.; LESLIE, B.A.; VU, T.T.; FREDENBURGH, J.C.; WEITZ, J.I. Histidine-rich glycoprotein binds factor XIIa with high affinity and inhibits contact-initiated coagulation. **Blood**, v. 117, n. 15, p. 4134-4141, 2011.
- MADHAVAN, R.; JACOBS, B.S.; LEVINE, S.R. Stroke trials: what have we learned? **Neurol Res**, v. 24, p. 27-32, 2002.
- MAGDELDIN, S.; MORESCO, J.J.; YAMAMOTO, T.; YATES, J.R., 3rd. Off-Line Multidimensional Liquid Chromatography and Auto Sampling Result in Sample Loss in LC/LC-MS/MS. **J Proteome Res**, 2014, *in press*.
- MAGUIRE, P.B.; WYNNE, K.J.; HARNEY, D.F.; O'DONOGHUE, N.M.; STEPHENS, G.; FITZGERALD, D.J. Identification of the phosphotyrosine proteome from thrombin activated platelets. **Proteomics**, v. 2, p. 642-648, 2002.
- MAGUIRE, P.B.; FOY, M.; FITZGERALD, D.J. Using proteomics to identify potential therapeutic targets in platelets. **Biochem Soc Trans**, v. 33, p. 409, 2005.
- MÁJEK, P.; REICHELTOVÁ, Z.; STIKAROVÁ, J.; SUTTNAR, J.; SOBOTKOVÁ, A.; DYR, J.E. Proteome changes in platelets activated by arachidonic acid, collagen, and thrombin. **Proteome Sci**, v. 8, n. 56, p. 1-13, 2010.
- MALKOWSKI, M.G.; WU, J.Y.; LAZAR, J.B.; JOHNSON, P.H.; EDWARDS, B.F. The crystal structure of recombinant human neutrophil-activating peptide-2 (M6L) at 1.9-Å resolution. **J Biol Chem**, v. 270, n. 13, p. 7077-7087, 1995.

MANN, K.G.; KALAFATIS, M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 20-30, 2003.

MARCUS, K.; IMMLER, D.; STERNBERGER, J.; MEYER, H.E. Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry and detection of tyrosine-phosphorylated proteins. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2622–2636, 2000.

MARCUS, K.; MOEBIUS, J.; MEYER, H.E. Differential analysis of phosphorylated proteins in resting and thrombin-stimulated human platelets. **Anal Bioanal Chem**, v. 376, p. 973-993, 2003.

MAROUN, R.C.; SERRANO, S.M.T. Identification of the substrate-binding exosites of two snake venom serine proteinases: molecular basis for the partition of two essential functions of thrombin. **J Mol Recognit**, v. 17, p. 51-61, 2004.

MARTENS, L.; VAN DAMME, P.; VAN DAMME, J.; STAES, A.; TIMMERMAN, E.; GHESQUIERE, B.; THOMAS, G.R.; VANDEKERCKHOVE, J.; GEVAERT, K. The human platelet proteome mapped by peptide-centric proteomics: A functional protein profile. **Proteomics**, v. 5, p. 3193–3204, 2005.

MARTIN, J.F.; SUGGETT, A.J.; LEACH, E.; MONCADA, S. The effect of prostacyclin on platelet aggregation and disaggregation in vivo. **Thromb Res**, v. 18, n. 5, p. 749-751, 1980.

MATHEWS, J.I.; PADMANABHAN, K.P.; GANESH, V.; TULINSKY, A.; ISHII, M.; CHEN, J.; TURCK, C.W.; COUGHLIN, R.S.; FENTON, J.W. 2nd. Crystallographic structures of thrombin complexed with thrombin receptor peptides: existence of expected and novel binding modes. **Biochemistry**, v.33, p. 3266-3279, 1994.

MAYNARD, D.M.; HEIJNEN, H.F.; HORNE, M.K.; WHITE, J.G.; GAHL, W.A. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. **J Thromb Haemost**, v. 5, p. 1945-1955, 2007.

MAYNARD, D.M.; HEIJNEN, H.F.; GAHL, W.A.; GUNAY-AYGUN, M. The α -granule proteome: novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome. **J Thromb Haemost**, v. 8, n. 8, p. 1786-1796, 2010.

MCNICOL, A.; ISRAELS, S.J. Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. **Thrombosis Research**, v. 95, p. 1-18, 1999.

McREDMOND, J.P.; PARK, S.D.; REILLY, D.F.; COPPINGER, J.A.; MAGUIRE, P.B.; SHIELDS, D.C.; FITZGERALD, D.J. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. **Mol Cell Proteomics**, v. 3, n. 2, p. 133-144, 2004.

MERLA, G.; UCLA, C.; GUIPPONI, M.; REYMOND, A. Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. **Hum Genet**, v. 110, n. 5, p. 429-438, 2002.

MILIOLI, M.; IBÁÑEZ-VEA, M.; SIDOLI, S.; PALMISANO, G.; CARERI, M.; LARSEN, M.R. Quantitative proteomics analysis of platelet-derived microparticles reveals

distinct protein signatures when stimulated by different physiological agonists. **J Proteomics**, v. 121, p. 56-66, 2015.

MOAKE, J.L.; TURNER, N.A.; STATHOPOULOS, N.A.; NOLASCO, L.H.; HELLUMS, J.D. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. **J Clin Invest**, v. 78, p. 1456-1461, 1986.

MOEBIUS, J.; ZAHEDI, R.P.; LEWANDROWSKI, U.; BERGER, C.; WALTER, U.; SICKMANN, A. The human platelet membrane proteome reveals several new potential membrane proteins. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, p. 1754-1761, 2005.

MORTZ, E.; KROGH, T. N.; VORUM, H.; GORG, A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. **Proteomics**, v. 1, p. 1359-1363, 2001.

MOTOYAMA, A.; XU, T.; RUSE, C.I.; WOHLSCHEGEL, J.A.; YATES, J.R., 3rd. Anion and cation mixed-bed ion exchange for enhanced multidimensional separations of peptides and phosphopeptides. **Anal Chem**, v. 79, n. 10, p. 3623-3634, 2007.

MURAYAMA, N.; SAGUCHI, K.; OHI, H.; FUJITA, Y.; ASSAKURA, M.T.; MENTELE R.; CAMARGO, A.C.M.; SERRANO, S.M.T. Molecular cloning of Bothrops proteinase A (BPA), an unusually highly glycosylated serine peptidase from the venom of the snake *Bothrops jararaca*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1652, p. 1-6, 2003.

MURPHY, C.T.; WESTWICK, J. Selective inhibition of protein kinase C. Effect on platelet activating-factor-induced platelet functional responses. **Biochem J**, v. 283, p.159-164, 1992.

MURUGAPPAN, S.; SHANKAR, H.; KUNAPULI, S.P. Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A2. **SeminThromb Hemost**, v. 30, p. 411-418, 2004.

MURUGAPPAN, S.; KUNAPULI, S.P. The role of ADP receptors in platelet function. **Front Biosci**, v. 11, p. 1977-1986, 2006.

MUSTOE, T.A.; PIERCE, G.F.; THOMASON, A.; GRAMATES, P.; SPORN, M.B.; DEUEL, T.F. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. **Science**, v. 237, p. 1333-1336, 1987.

MUSZBEK, L.; BERECZKY, Z.; BAGOLY, Z.; KOMÁROMI, I.; KATONA, É. Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. **Physiol Rev**, v. 91, p. 931-972, 2011.

NACHMIAS, V.T.; YOSHIDA, K. The cytoskeleton of the blood platelet: A dynamic structure. **Adv Mol Cell Biol**, v. 2, p. 181-211, 1988.

NAKAGAKI, T.; KAZIM, A.L.; KISIEL, W. Isolation and characterization of a protein C activator from tropical moccasin venom. **Thromb Res**, v. 58, n. 6, p. 593-602, 1990.

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

- NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, n. 6, p. 255-262, 1988.
- NIEUWENHUIS, H.K.; VAN, OOSTERHOUT, J.J.; ROZEMULLER, E.; VAN IWAARDEN, F.; SIXMA, J.J. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. **Blood**, v. 70, n. 3, p. 838-845, 1987.
- NIEMIAROWSKI, S.; KIRBY, E.P.; BRUDZYNSKI, T.M.; STOCKER, K. Thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. **Biochemistry**, v.18, p. 3570-3577, 1979.
- NIIYA, K.; HODSON, E.; BADER, R.; BYERS-WARD, V.; KOZIOL, J.A.; PLOW, E.F.; RUGGERI, Z.M. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. **Blood**, v. 70, n. 2, p. 475-483, 1987.
- NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine proteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p. 1843-1849, 1994.
- NUYTENS, B.P.; THIJS, T.; DECKMYN, H.; BROOS, K. Platelet adhesion to collagen. **Thromb Res**, v. 127, p. S26-S29, 2011.
- O'NEILL, E.E.; BROCK, C.J.; VON KRIEGSHEIM, A.F.; PEARCE, A.C.; DWEK, R.A.; WATSON, S.P.; HEBESTREIT, H.F. Towards complete analysis of the platelet proteome. **Proteomics**, v. 2, p. 288-305, 2002.
- O'BRIEN, P.J.; MOLINO, M.; KAHN, M.; BRASS, L.F. Protease activated receptors: theme and variations. **Oncogene**, v. 20, n. 13, p. 1570-1581, 2001.
- OFFERMANN, S.; TOOMBS, C.F.; HU, Y.H.; SIMON, M.I. Defective platelet activation in Gq-deficient mice. **Nature**, v. 389, p. 183-186, 1997.
- OFOSU, F.A.; LIU, L.; FREEDMAN, J. Control mechanisms in thrombin generation. **Semin Thromb Hemost**, v. 22, n. 4, p. 303-308, 1996.
- OLSON, S.T.; BJORK, I. Role of protein conformational changes, surface approximation and protein cofactors in heparin-accelerated antithrombin-proteinase reactions. **Adv Exp Med Biol**, v. 313, p. 155-165, 1992.
- OSLER, W. An Account of certain Organisms occurring in the Liquor Sanguinis. **The Monthly Microscopical Journal**, v. 12, n. 3, p. 141-148, 1874.
- OSLER, W. Cartwright lectures on certain problems in the physiology of the blood corpuscles. **The British Medical Journal**, v. 1, p. 807-808, 1886.
- ØSTERGAARD, O.; NIELSEN, C.T.; IVERSEN, L.V.; JACOBSEN, S.; TANASSI, J.T.; HEEGAARD, N.H. Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. **J. Proteome Res**, v. 11, n. 4, p. 2154-63, 2012.

- PABLA, R.; WEYRICH, A.S.; DIXON, D.A.; BRAY, P.F.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Integrin-dependent control of translation: engagement of integrin α IIb β 3 regulates synthesis of proteins in activated human platelets. **J Cell Biol**, v. 144, n. 1, p. 175-184, 1999.
- PAES LEME, A.F.; PREZOTO, B.C.; YAMASHIRO, E.T.; BERTHOLIM, L.; TASHIMA, A.K.; KLITZKE, C.F.; CAMARGO, A.C.; SERRANO, S.M.T. Bothrops proteinase A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **J Thromb Haemost**, v. 6, p. 1363-1372, 2008.
- PARGUIÑA, A.F.; ROSA, I.; GARCÍA, A. Proteomics applied to the study of platelet-related diseases: aiding the discovery of novel platelet biomarkers and drug targets. **J. Proteomics**, v. 76, p. 275-286, 2012.
- PARRY, M.A.; JACOB, U.; HUBER, R.; WISNER, A.; BON, C.; BODE, W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1195-1206, 1998.
- PATEL, S.R.; HARTWIG, J.H.; ITALIANO, J.E., Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. **J Clin Invest**, v. 115, n. 12, p. 3348-3354, 2005.
- PEARSE, B.M. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 73, n. 4, p. 1255-1259, 1976.
- PENG, J.; ELIAS, J.E.; THOREEN, C.C.; LICKLIDER, L.J.; GYGI, S.P. Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. **J Proteome Res**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2003.
- PETZELBAUER, P.; ZACHAROWSKI, P.A.; MIYAZAKI, Y.; FRIEDL, P.; WICKENHAUSER, G.; CASTELLINO, F.J.; GRÖGER, M.; WOLFF, K.; ZACHAROWSKI, K. The fibrin-derived peptide B β 15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury. **Nat Med**, v. 11, p. 298-304, 2005.
- PIERSMA, S.R.; BROXTERMAN, H.J.; KAPCI, M.; DE HAAS, R.R.; HOEKMAN, K.; VERHEUL, H.M.; JIMÉNEZ, C.R. Proteomics of the TRAP-induced platelet releasate. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 1, p. 91-109, 2009.
- PIKAS, D.S.; LI, J.P.; VLODAVSKY, I.; LINDAHL, U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. **J Biol Chem**, v. 273, n. 30, p. 18770-18777, 1998.
- PLOW, E.F.; MCEVER, R.P.; COLLIER, B.S.; WOODS, V.L., Jr.; MARGUERIE, G.A.; GINSBERG, M.H. Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. **Blood**, v. 66, n. 3, p. 724-727, 1985.
- PLOW, E.F.; GINSBERG, M.H. Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. **Prog Hemost Thromb**, v. 9, p. 117-156, 1989.
- POOLE, A.; GIBBINS, J.M.; TURNER, M.; VAN VUGT, M.J.; VAN DE WINKEL, J.G.; SAITO, T.; TYBULEWICZ, V.L.; WATSON, S.P. The Fc receptor gamma-chain and

the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. **EMBO J**, v. 16, n. 9, p. 2333-2341, 1997.

PRICE, M.J. Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy. **Circulation**, v. 119, p. 2625-2632, 2009.

PRUDOVA, A.; SERRANO, K.; ECKHARD, U.; FORTELNY, N.; DEVINE, D.V.; OVERALL, C.M. TAILS N-terminomics of human platelets reveals pervasive metalloproteinase-dependent proteolytic processing in storage. **Blood**, v. 124, n. 26, p. e49-60, 2014.

PURI, R.N.; ZHOU, F.; HU, C.J.; COLMAN, R.F.; COLMAN, R.W. High molecular weight kininogen inhibits thrombin-induced platelet aggregation and cleavage of aggrecan by inhibiting binding of thrombin to platelets. **Blood**, v. 77, n. 3, p. 500-507, 1991.

QIU, Y.; BROWN, A.C.; MYERS, D.R.; SAKURAI, Y.; MANNINO, R.G.; TRAN, R.; AHN, B.; HARDY, E.T.; KEE, M.F.; KUMAR, S.; BAO, G.; BARKER, T.H.; LAM, W.A. Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 40, p. 14430-14435, 2014.

QURESHI, A.H.; CHAOJI, V.; MAIGUEL, D.; FARIDI, M.H.; BARTH, C.J.; SALEM, S.M.; SINGHAL, M.; STOUT, D.; KRSTINS, B.; OGIHARA, M.; ZAKI, M.J.; GUPTA, V. Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: insights into integrin signaling. **PLoS One**, v. 4, p. e7627, 2009.

RABHI-SABILE, S.; PIDARD, D.; LAWLER, J.; RENESTO, P.; CHIGNARD, M.; LEGRAND, C. Proteolysis of thrombospondin during cathepsin-G-induced platelet aggregation: functional role of the 165-kDa carboxy-terminal fragment. **FEBS Letters**, v. 386, p. 82-86, 1996.

RAMANATHAN, A.; KARURI, N. Fibronectin alters the rate of formation and structure of the fibrin matrix. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 443, n. 2, p. 395-399, 2014.

RAO, G.H.; REDDY, K.R.; WHITE, J.G. The influence of epinephrine on prostacyclin (PGI₂) induced dissociation of ADP aggregated platelets. **Prostaglandins Med**, v. 4, n. 6, p. 385-397, 1980.

RAPPSILBER, J.; ISHIHAMA, Y.; MANN, M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. **Anal Chem** v. 75, n. 3, p. 663-670, 2003.

REMENYI, G.; SZASZ, R.; FRIESE, P.; DALE, G.L. Role of mitochondrial permeability transition pore in coated-platelet formation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 2, p. 467-471, 2005.

RENESTO, P.; CHIGNARD, M. Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation. **Blood**, v. 82, n. 1, p. 139-144, 1993.

RICHARDSON, D.L.; PEPPER, D.S.; KAY, A.B. Chemotaxis for human monocytes by fibrinogen-derived peptides. **Br J Haematol**, v. 32, p. 507-513, 1976.

- ROBINSON, B.R.; HOUNG, A.K.; REED, G.L. Catalytic life of activated factor XIII in thrombi. Implications for fibrinolytic resistance and thrombus aging. *Circulation*, 102: 1151–1157, 2000.
- ROBSON, S.C.; SHEPHARD, E.G.; KIRSCH, R.E. Fibrin degradation product D-dimer induces the synthesis and release of biologically active IL-1 beta, IL-6 and plasminogen activator inhibitors from monocytes in vitro. **Br J Haematol**, v. 86, p. 322-326, 1994.
- ROCHA E SILVA, M. Definition of bradykinin and other kinins. *Biochemical Pharmacology*, v. 10, p. 3–21, 1962.
- ROLLETT, A. The blood In: STRICKER, S. **Manual of human and comparative histology**, The New Sydenham Society, London, 1870, v, 1.
- RUF, W.; MUELLER, B.M. Thrombin generation and the pathogenesis of cancer. **Semin Thromb Hemost**, v. 326, p. 1-68, 2006.
- RUGGERI, Z.M. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. **Thromb Res**, v. 120, S5–9, 2007.
- SAITO, H. Purification of high molecular weight kininogen and the role of this agent in blood coagulation. **J Clin Invest**, v. 60, n. 3, p. 584-594, 1977.
- SANABRIA, H.; MILLER, J.H.; MERSHIN, A.; LUDUENA, R.F.; KOLOMENSKI, A.A.; SCHUESSLER, H.A.; NANOPOULOS, D.V. Impedance Spectroscopy of α - β Tubulin Heterodimer Suspensions. **Biophysical Journal**, v. 90, n. 12, p. 4644–4650, 2006.
- SANTOS, B.F.; SERRANO, S.M.; KULIOPULOS, A.; NIEWIAROWSKI, S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. **FEBS Lett**, v. 477, p. 199–202, 2000.
- SAVAGE, B.; SALDIVAR, E.; RUGGERI, Z.M. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. **Cell**, v. 84, p. 289–297, 1996.
- SAWICKI, G.; SALAS, E.; MURAT, J.; MISZTA-LANE, H.; RADOMSKI, M.W. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. **Nature**, v. 386, p. 616–619, 1997.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.
- SCHERAGA, H.A.; LASKOWSKI, M., Jr. The Fibrinogen-Fibrin Conversion. **Advances in Protein Chemistry**, v. 12, p. 1-131, 1957.
- SCHILLING, O.; HUESGEN, P.F.; BARRÉ, O.; AUF DEM KELLER, U.; OVERALL, C.M. Characterization of the prime and non-prime active site specificities of proteases by proteome-derived peptide libraries and tandem mass spectrometry. **Nat Protoc**, v. 6, n. 1, p. 111-120, 2011.
- SCHILLING, O.; OVERALL, C.M. Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 6, p. 685-694, 2008.

SCHULTZE, M. Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes. **Archiv für mikroskopische Anatomie**, v. 1, p. 1-42, 1865.

SCHWERTZ, H.; TOLLEY, N.D.; FOULKS, J.M.; DENIS, M.M.; RISENMAY, B.W.; BUERKE, M.; TILLEY, R.E.; RONDINA, M.T.; HARRIS, E.M.; KRAISS, L.W.; MACKMAN, N.; ZIMMERMAN, G.A.; WEYRICH, A.S. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. **J Exp Med**, v. 203, n. 11, p. 2433-2440, 2006.

SEARLE, BC. Scaffold: A bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomics studies. **Proteomics**, v. 10, p. 1265-1269, 2010.

SEHGAL, S.; STORRIE, B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. **J Thromb Haemost**, n. 5, n. 10, p. 2009-2016, 2007.

SENIOR, R.M.; GRIFFIN, G.L.; HUANG, J.S.; WALZ, D.A.; DEUEL, T.F. Chemotactic activity of platelet alpha granule proteins for fibroblasts. **J Cell Biol**, v. 96, n. 2, p. 382-385, 1983.

SENIS, Y.A.; TOMLINSON, M.G.; GARCIA, A.; DUMON, S.; HEATH, V.L.; HERBERT, J.; COBBOLD, S.P.; SPALTON, J.C.; AYMAN, S.; ANTROBUS, R.; ZITZMANN, N.; BICKNELL, R.; FRAMPTON, J.; AUTHI, K.S.; MARTIN, A.; WAKELAM, M.J.; WATSON, S.P. A comprehensive proteomics and genomics analysis reveals novel transmembrane proteins in human platelets and mouse megakaryocytes including G6b-B, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif protein. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, p. 548-64, 2007.

SERRANO, S.M.T.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C.A.M.; FINK, E. Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 34, p. 7186-7193, 1995.

SERRANO, S.M.T.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; SAMPAIO, C.A.M.; CAMARGO, A.C.M.; FINK, E. Purification, characterization, and molecular cloning of KN-BJ, a kinin-releasing and fibrinogen-clotting enzyme from the venom of *Bothrops jararaca*. **Eur J Biochem**, v. 251, p. 845-853, 1998.

SERRANO, S.M.T.; SAMPAIO, C.A.M.; FINK, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. **Thromb Haemost**, v. 83, p. 438-444, 2000.

SERRANO, S.M.T.; MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.

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

SERRANO, S.M.T.; OLIVEIRA, A.K.; MENEZES, M.C.; ZELANIS, A. The proteinase-rich proteome of *Bothrops jararaca* venom. **Toxin Reviews**, v. 33, p. 169-184, 2014.

SHEN, M.Y.; HSIAO, G.; FONG, T.H.; CHEN, H.M.; CHOU, D.S.; LIN, C.H.; SHEU, J.R.; HSU, C.Y. Amyloid beta peptide-activated signal pathways in human platelets. **Eur J Pharmacol**, v. 588, p. 259-266, 2008.

SHERMAN, D.G. Ancrod. **Curr Med Res Opin**, v.18, p. 48-52, 2002.

SHIRAKAWA, R.; HIGASHI, T.; TABUCHI, A.; YOSHIOKA, A.; NISHIOKA, H.; FUKUDA, M.; KITA, T.; HORIUCHI, H. Munc13-4 is a GTP-Rab27-binding protein regulating dense core granule secretion in platelets. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 10730-10737, 2004.

SHOCK, D.D.; HE, K.; WENCEL-DRAKE, J.D.; PARISE, L.V. Ras activation in platelets after stimulation of the thrombin receptor, thromboxane A2 receptor or protein kinase C. **Biochem J**, v. 321, p. 525-530, 1997.

SIFFERT, W.; FOX, G.; GROS, G. The effect of carbonic anhydrase inhibition on the velocity of thrombin-stimulated platelet aggregation under physiological conditions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 121, n. 1, 266-270, 1984.

SIMS, P.J.; WIEDMER, T.; ESMON, C.T.; WEISS, H.J.; SHATTIL, S.J. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation on the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: An isolated defect in platelet procoagulant activity. **J Biol Chem**, v. 264, p. 17049-17057, 1989.

SKOVRONSKY, D.M.; LEE, V.M.; PRATICÒ, D. Amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in human platelets. Role of cyclooxygenase and protein kinase C. **J Biol Chem**, v. 276, n. 20, p. 17036-17043, 2001.

SMYTH, S.S.; WHITEHEART, S.; ITALIANO, J.E., Jr.; COLLIER, B.S. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: LICHTMAN, M.A.; KIPPS, T.J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J.T. **Williams Hematology**, 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2010. cap. 114, p. 1735-1814.

SNYDER, K.M.; KESSLER, C.M. The pivotal role of thrombin in cancer biology and tumorigenesis. **Semin Thromb Hemost**, v. 34, p. 734-741, 2008.

SOEJIMA, K.; MIMURA, N.; HIRASHIMA, M.; MAEDA, H.; HAMAMOTO, T.; NAKAGAKI, T.; NOZAKI, C. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor-cleaving protease? **J Biochem**, v. 130, p. 475-480, 2001.

SONKAR, V.K.; KULKARNI, P.P.; DASH, D. Amyloid β peptide stimulates platelet activation through RhoA-dependent modulation of actomyosin organization. **FASEB J**, v. 28, n. 4, p. 1819-1829, 2014.

SPORN, L.A.; MARDER, V.J.; WAGNER, D.D. Inducible secretion of large biologically potent von Willebrand factor multimers. **Cell**, v. 46, p. 185-190, 1986.

SREERAMKUMAR, V.; ADROVER, J.M.; BALLESTEROS, I.; CUARTERO, M.I.; ROSSAINT, J.; BILBAO, I.; NÁCHER, M.; PITAVAL, C.; RADOVANOVIC, I.; FUKUI, Y.; MCEVER, R.P.; FILIPPI, M.D.; LIZASOAIN, I.; RUIZ-CABELLO, J.; ZARBOCK, A.; MORO, M.A.; HIDALGO, A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science**, v. 346, n. 6214, p. 1234-1238, 2014.

- STATON, C.A.; BROWN, N.J.; RODGERS, G.R.; CORKE, K.P.; TAZZMAN, S.; UNDERWOOD, J.C.; LEWIS, C.E. Alphastatin, a 24-amino acid fragment of human fibrinogen, is a potent new inhibitor of activated endothelial cells in vitro and in vivo. **Blood**, v. 103, n. 2, p. 601-606, 2004.
- STEGNER, D.; NIESWANDT, B. Platelet receptor signaling in thrombus formation. **J Mol Med**, v. 89, n. 2, p. 109-121, 2011.
- STOCKER K.; BARLOW G.H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin), **Methods Enzymol**, v. 45, p. 214-223, 1976.
- STOCKER, K. Fibrinolytics and antifibrinolytics. In: MARKWARDT, F. Springer, Berlin, 1978, p. 451-484.
- STOCKER, K.; FISCHER, H.; MEIER, J.; BROGLI, M.; SVENDSEN, L. Characterization of the protein C activator Protac from the venom of the southern copperhead (*Agkistrodon contortrix*) snake. **Toxicon**, v. 25, p. 239-252, 1987.
- STOCKER, K.F. **Hematology** In: PIRKLE, H.; MARKLAND, F.S. 1988, v. 7, p. 525-540.
- STUBBS, M.T.; BODE, W. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. **Thromb Res**, v. 69, p. 1-58, 1993.
- STULL, J.T.; BROSTROM, C.O.; KREBS, E.G. Phosphorylation of the inhibitor component of troponin by phosphorylase kinase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 16, p. 5272-5274, 1972.
- SUADES, R.; PADRO, T.; VILAHUR, G.; BADIMON, L. Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. **Thromb Haemost**, v. 108, p. 1208-1219, 2012.
- SUDHOF, T.C.; ROTHMAN, J.E. Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. **Science**, v. 323, p. 474-477, 2009.
- THOMPSON, W.D.; SMITH, E.B.; STIRK, C.M.; MARSHALL, F.I.; STOUT, A.J.; KOCCHAR, A. Angiogenic activity of fibrin degradation products is located in fibrin fragment E. **J Pathol**, v. 168, p. 47-53, 1992.
- TOCANTINS, L.M. Historical notes on blood platelets. **Blood**. v. 3, n. 10, p. 1073-1082, 1948.
- TOKUNAGA, F.; NAGASAWA, K.; TAMURA, S.; MITAYA, T.; IWANAGA, S.; KIESEL, W. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from *Russell's viper* venom. Identification of isoproteins RVV-V alpha, -V beta, and -V gamma and their complete amino acid sequences. **J Biol Chem**, v. 263, p. 17471-17481, 1988.
- TRIVEDI, V.; BOIRE, A.; TCHERNYCHEV, B.; KANEIDER, N.C.; LEGER, A.J.; O'CALLAGHAN, K.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Platelet matrix metalloprotease-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site. **Cell**, v. 137, n. 2, p. 332-343, 2009.
- TUCKER, K.L.; KAISER, W.J.; BERGERON, A.L.; HU, H.; DONG, J.F.; TAN, T.H.; GIBBINS, J.M. Proteomic analysis of resting and thrombin-stimulated platelets

reveals the translocation and functional relevance of HIP-55 in platelets. **Proteomics**, v. 9, p. 4340-4354, 2009.

VAN HOLTEN, T.C.; BLEIJERVELD, O.B.; WIJTEN, P.; DE GROOT, P.G.; HECK, A.J.; BARENDRECHT, A.D.; MERKX, T.H.; SCHOLTEN, A.; ROEST, M. Quantitative proteomics analysis reveals similar release profiles following specific PAR-1 or PAR-4 stimulation of platelets. **Cardiovasc Res**, v. 103, n. 1, p. 140-146, 2014.

VAN NISPEN TOT PANNERDEN, H.; DE HAAS, F.; GEERTS, W.; POSTHUMA, G.; VAN DIJK, S.; HEIJNEN, H.F. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes. **Blood**, v. 116, p. 1147-1156, 2010.

VARGA-SZABO, D.; PLEINES, I.; NIESWANDT, B. Cell adhesion mechanisms in platelets. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 403-412, 2008.

VAVAEV, A.V.; BURYACHKOVSKAYA, L.I.; UCHITEL, I.A.; TISHCHENKO, E.G.; MAKSIMENKO, A.V. Effect of Hydrogen Peroxide and Catalase Derivatives on Functional Activity of Platelets. **Bull Exp Biol Med**, v. 152, p. 307-312, 2012.

VÉLEZ, P.; IZQUIERDO, I.; ROSA, I.; GARCÍA, Á. A 2D-DIGE-based proteomic analysis reveals differences in the platelet releasate composition when comparing thrombin and collagen stimulations. **Sci Rep**, v. 5, p. 8198, 2015.

VLODAVSKY, I.; ELDOR, A.; HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A.; MATZNER, Y.; ISHAI-MICHAELI, R.; LIDER, O.; NAPARSTEK, Y.; COHEN, I.R.; FUKS, Z. Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation. **Invasion Metastasis**, v. 12, n. 2, p. 112-127, 1992.

VU, T.K.H.; HUNG, D.T.; WHEATON, V.I.; COUGHLIN, S.R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor action. **Cell**, v. 64, n. 1057-1068, 1991.

WAGNER, C.L.; MASCELLI, M.A.; NEBLOCK, D.S.; WEISMAN, H.F.; COLLIER, B.S.; JORDAN, R.E. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. **Blood**, v. 88, p. 907-914, 1996.

WALKER, F.J. Regulation of activated protein C by a new protein: a possible function for bovine protein S. **Journal of Biological Chemistry** 1980, v. 255, p. 5521-5524.

WALKER, F.J.; CHAVIN, S.I.; FAY, P.J. Inactivation of factor VIII by activated protein C and protein S. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 252, p. 322-328, 1987.

WASHBURN, M.P.; WOLTERS, D.; YATES, J.R., 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. **Nat Biotechnol**, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2001.

WEBER, T.; ZEMELMAN, B.V.; MCNEW, J.A.; WESTERMANN, B.; GMACHL, M.; PARLATI, F.; SÖLLNER, T.H.; ROTHMAN, J.E. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 759-772, 1998.

WEISEL, J.W. Fibrinogen and fibrin. **Adv Protein Chem**, v. 70, p. 247-299, 2005.

- WEYRICH, A.S.; DIXON, D.A.; PABLA, R.; ELSTAD, M.R.; MCINTYRE, T.M.; PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A. Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 5556–5561, 1998.
- WEYRICH, A.S.; LINDEMANN, S.; ZIMMERMAN, G.A. The evolving role of platelets in inflammation. **J Thromb Haemost**, v. 1, p. 1897-1905, 2003.
- WEYRICH, A.S.; SCHWERTZ, H.; KRAISS, L.W.; ZIMMERMAN, G.A. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. **J Thrombosis Haemostasis** v. 7, p. 241–246, 2009.
- WHITE, J.G.; ESCOLAR, G. The blood platelet open canalicular system: a two-way street. **Eur J Cell Biol**, v. 56, n. 2, p. 233-242, 1991.
- WIJTEN, P.; VAN HOLTEN, T.; WOO, L.L.; BLEIJERVELD, O.B.; ROEST, M.; HECK, A.J.; SCHOLTEN, A. High precision platelet releasate definition by quantitative reversed protein profiling-brief report. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 33, n. 7, p. 1635-1638, 2013.
- WRIGHT, J. The origin and nature of blood platelets. **Boston Med Surg J**, v. 154, p. 643-645, 1906.
- WU, Y.P.; BLOEMENDAL, H.J.; VOEST, E.E.; LOGTENBERG, T.; DE GROOT, P.G.; GEBBINK, M.F.; DE BOER, H.C. Fibrin-incorporated vitronectin is involved in platelet adhesion and thrombus formation through homotypic interactions with platelet-associated vitronectin. **Blood**, v. 104, n. 4, p. 1034-1041, 2004.
- YAMASHIRO, E.T.; OLIVEIRA, A.K.; KITANO, E.S.; MENEZES, M.C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; PAES LEME, A.F.; SERRANO, S.M. Proteoforms of the platelet-aggregating enzyme PA-BJ, a serine proteinase from *Bothrops jararaca* venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1844, n. 12 , p. 2068-2076, 2014.
- YAN, B.; CALDERWOOD, D.A.; YASPAN, B.; GINSBERG, M.H. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. **J Biol Chem**, v. 276, n. 30, p. 28164-28170, 2001.
- YATES, L.A.; FÜZÉRY, A.K.; BONET, R.; CAMPBELL, I.D.; GILBERT, R.J. Biophysical analysis of Kindlin-3 reveals an elongated conformation and maps integrin binding to the membrane-distal β -subunit NPXY motif. **J Biol Chem**, v. 287, n. 45, p. 37715-37731, 2012.
- YEO, EL.; SHEPPARD, J.A.; FEUERSTEIN, I.A. Role of P-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). **Blood**, v. 83, n. 9, p. 2498-2507, 1994.
- ZAHEDI, R.P.; LEWANDROWSKI, U.; WIESNER, J.; WORTELKAMP, S.; MOEBIUS, J.; SCHÜTZ, C.; WALTER, U.; GAMBARYAN, S.; SICKMANN, A. Phosphoproteome of resting human platelets. **J Proteome Res**, v. 7, p. 526-534, 2008.
- ZANETTI, M.; BRAGHETTA, P.; SABATELLI, P.; MURA, I.; DOLIANA, R.; COLOMBATTI, A.; VOLPIN, D.; BONALDO, P.; BRESSAN, G.M. EMILIN-1

deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 2, p. 638-650, 2004.

ZEILER, M.; MOSER, M.; MANN, M. Copy number analysis of the murine platelet proteome spanning the complete abundance range. **Mol Cell Proteomics**, v. 13, n. 12, p. 3435-3445, 2014.

ZELANIS, A.; HUESGEN, P.F.; OLIVEIRA, A.K.; TASHIMA, A.K.; SERRANO, S.M.; OVERALL, C.M. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **J Proteomics**, v. 113, p. 260-267, 2015.

ZELLNER, M.; OEHLER, R. Sample preparation variables in platelet proteomics for biomarker research. In: GARCÍA, A.; SENIS, Y.A. **Platelet proteomics: principles, analysis and applications**. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc. 2011. P. 67-86.

ZIMMERMANN, G. Ueber die Formgebilde des menschlichen Blutes in ihrem rn Verhältnis zum Processe der Entzündung und Eiterung aus Rust's magazin für die gesamte Heilkunde 2, **Reimer Verlag Berlin**, 171-232, 1846.

ZIMMERMANN, G. Zur Blutkörperchenfrage aus Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin 18, **Druck und Verlag von G. Reimer Berlin**, 138-193, 1860.

7.0 ANEXOS

7.1 Tabelas Suplementares

Tabela Suplementar 1. Identificação de proteínas presentes no proteoma do sedimento plaquetário por digestão in gel com tripsina e LC-MS/MS.

Tabela Suplementar 2. Identificação e quantificação das proteínas presentes no sedimento plaquetário por digestão com tripsina em solução e LC-MS/MS.

Tabela Suplementar 3. Identificação das proteínas presentes na fração proteica do sobrenadante plaquetário por digestão in gel com tripsina e LC-MS/MS.

Tabela suplementar 4. Identificação e quantificação das proteínas presentes no sobrenadante plaquetário por digestão com tripsina em solução e LC-MS/MS.

Tabela suplementar 5. Identificação dos peptídeos presentes no sobrenadante plaquetário por LC-MS/MS.

Súmula Curricular

Ana Karina de Oliveira

Nascimento 14/07/1976 - São Paulo/SP – Brasil

Endereço eletrônico ankaoliv@gmail.com
ana.karina@butantan.gov.br

Informações adicionais:

MyResearcherID:

<http://www.researcherid.com/rid/G-7597-2012>

MyCitations do Google Scholar:

<http://scholar.google.com.br/citations?user=hRqLpYAAAAJ>

Currículo Lattes:

<http://lattes.cnpq.br/3339188648996616>

Formação:

- 2010** **Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica)**
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2009** **Mestrado em Biotecnologia**
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia –USP – IPT – Instituto Butantan
- 2002 - 2005** **Bacharel em Biomedicina.**
Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, São Paulo, Brasil
- 1993 - 1995** **Curso profissionalizante - Auxiliar de Enfermagem**
SENAC – São Paulo

Formação complementar:

- 2014** Primeira Escola de Espectrometria de Massas
BrMASS – Natal - RN
- 2014** Método Lógico para Redação Científica
Ministrado pelo Prof. Dr. Gilson Luiz Volpato
Instituto Butantan– São Paulo
- 2013** Curso de Treinamento no Uso de Animais de Experimentação
Instituto de Ciências Biomédicas – USP – São Paulo
- 2012** Computational Mass Spectrometry-Based Proteomics
Max-Planck- Institute of Biochemistry – Munique – Alemanha
- 2011** Extensão universitária em Biologia molecular da transformação

	maligna.
	Departamento de Bioquímica – USP - SP.
2011	Abordagens proteômicas para a Biologia Sistêmica Instituto Butantan - São Paulo
2009	Proteômica quantitativa e interpretação de espectros de peptídeos Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas - Campinas
2007	Mecanismos celulares que modulam sistemas homeostáticos Instituto Butantan - São Paulo
2007	Curso de educação à distância: Oficina de tutores SENAC - São Paulo
2005	Citometria de Fluxo Faculdade SENAC de Educação em Saúde - São Paulo

Atuação profissional:

1. Instituto Butantan

Laboratório de Especial de Toxinologia Aplicada - LETA – CeTICS/CePID

2010 - Atual	Vínculo: Estagiária/Bolsista FAPESP Enquadramento funcional: Aluna de doutorado Orientadora: Dra. Solange M. T. Serrano
2006 - 2009	Vínculo: Estagiária Enquadramento funcional: Aluna de mestrado Orientadora: Dra. Solange M. T. Serrano
2005 - 2005	Vínculo: Estagiária Enquadramento funcional: Aluna de iniciação científica Orientadora: Dra. Solange M. T. Serrano

2. Goethe Universität Frankfurt am Main – Alemanha

Department of Vascular Matrix Biology

2012 – 2012	Vínculo: Aluna de doutorado Enquadramento funcional: Visiting Graduate Student Carga horária: 170 horas Supervisão Prof. Dr. Johannes A. Eble
--------------------	--

3. Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU

Faculdade de Biomedicina

2004 – 2004	Vínculo: Estudante Enquadramento funcional: Aluna de Iniciação Científica Orientadora: Dra. Zuleica Caulada Benedetti
--------------------	---

Artigos completos publicados em periódicos:

1. Zelanis, A, Huesgen, PF, **Oliveira, AK**, Tashima, AK, Serrano, SMT, Overall, CM. **2015**. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. *Journal of Proteomics*, 113, 260-267.
2. Yamashiro, ET, **Oliveira, AK**, Kitano, ES, Menezes, MC, Junqueira-de-Azevedo, IL, Paes Leme, AF, Serrano, SMT. **2014**. Proteoforms of the platelet-aggregating enzyme PA-BJ, a serine proteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, 1844, 2068-2076.
3. Carvalho, DC; Kuniyoshi, AK, Kodama, RT, **Oliveira, AK**, Serrano, SMT, Tambourgi, DV, Portaro, FV. **2014**. Neuropeptide Y family-degrading metalloproteinases in the *Tityus serrulatus* venom partially blocked by commercial antivenoms. *Toxicological Sciences*, 142, 418-426.
4. Serrano, SMT, **Oliveira, AK**, Menezes, MC, Zelanis, A. **2014**. The proteinase-rich proteome of *Bothrops jararaca* venom. *Toxin Reviews*, 33: 169-184.
5. Asega, AF, **Oliveira, AK**, Menezes, MC, Neves-Ferreira, AGC, Serrano, SMT. **2014**. Interaction of *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases with protein inhibitors. *Toxicon*, 80:1-8.
6. Paes Leme, AF, Sherman, N, Smalley, DM, Sizukusa, LO, **Oliveira, AK**, Menezes, MC, Fox, JW, Serrano, SMT. **2012**. Hemorrhagic activity of HF3, a snake venom metalloproteinase: insights from the proteomic analysis of mouse skin and blood plasma. *Journal of Proteome Research*, 11:279-291.
7. Komegae, EN, Ramos, AD, **Oliveira, AK**, Serrano, SMT, Lopes-Ferreira, M, Lima, C. **2011**. Insights into the local pathogenesis induced by fish toxins: role of natterins and natterectin in the disruption of cell-cell and cell- extracellular matrix interactions and modulation of cell migration. *Toxicon*, 58:509-517.
8. Menezes, MC, **Oliveira, AK**, Melo, RL, Lopes-Ferreira, M, Rioli, V, Balan, A, Paes Leme, AF, Serrano, SMT. **2011**. Disintegrin-like/cysteine-rich domains of the reprotolysin HF3: Site-directed mutagenesis reveals essential role of specific residues. *Biochimie*, 93(2):345-351.
9. **Oliveira, AK**, Paes Leme, AF, Asega, AF, Camargo, ACM, Fox, JW, Serrano, SMT. **2010**. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *Thrombosis and Haemostasis*, 104(3):485-497.
10. Paes Leme, AF, Escalante, T, Pereira, JGC, **Oliveira, AK**, Sanchez, EF, Gutiérrez, JM, Serrano, SMT, Fox, JW. **2010**. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. *Journal of Proteomics*, 74(4):401-410.

11. **Oliveira, AK**, Paes Leme, AF, Assakura, MT, Menezes, MC, Zelanis, A, Tashima, AK, Lopes-Ferreira, M, Lima, C, Camargo, ACM, Fox, JW, Serrano, SMT. **2009**. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 53(7-8):797-801.

Capítulos de livros publicados:

1. Menezes, MC, **Oliveira, AK**, Serrano, SMT. . Hemorrhagic Factor 3 (HF3). In: Neil D. Rawlings; Guy S. Salvesen,. (Org.). *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3ed.: Oxford: Academic Press, **2013**, v1, 997-999.
2. **Oliveira, Ana Karina**; Yamazaki, Kendi; Tomishige, Toshiro. Mucosectomia e Dissecção Submucosa. In: Silva, M.G.; Maluf Filho, F.; Sakai, P.; Moura, E.G.H.. (Org.). *Enfermagem em Endoscopia Digestiva e Respiratória*. 1ed.São Paulo: Editora Atheneu, **2010**, v1, 199-205.

Participação em Eventos Científicos:

Eventos Científicos no Brasil

Workshop de Proteômica - LNBio – CNPEM – 2010, 2012 e 2014
 Reuniões Científicas do Instituto Butantan- 2005-2014
 Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMass - 2009
 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq -2006
 Congresso Brasileiro de Biomedicina -2004

Congressos Internacionais

Gordon Research Conference, Itália, 2014
 HUPO 12th Annual World Congress, Japão, 2013
 IX Pan-American Congress International Society on Toxinology – IST, México, 2007

Participação em comitês

Membro avaliador da Mostra Paulista de Ciências e Engenharia. Governo do Estado de São Paulo, desde 2012.
 Membro avaliador de Feira Brasileira de Ciências e Engenharias, FEBRACE. Universidade de São Paulo, desde 2013
 Membro da Comissão da SBTx Jovem - Sociedade Brasileira de Toxinologia (SBTx), desde jan/2014.