Jaqueline Gomes Rosa

Efeitos do veneno da serpente *Bothrops jararaca* sobre a agregação e secreção de plaquetas humanas e de camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de mestre em
Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Dr. Marcelo Larami Santoro

São Paulo

2018

Jaqueline Gomes Rosa

Efeitos do veneno da serpente *Bothrops jararaca* sobre a agregação e secreção de plaquetas humanas e de camundongos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Dr. Marcelo Larami Santoro

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rosa, Jaqueline Gomes

Efeitos do veneno da serpente *Bothrops jararaca* sobre a agregação e secreção plaquetária de plaquetas humanas e de camundongos / Jaqueline Gomes Rosa. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Marcelo Larami Santoro.

Descritores: 1. *Bothrops jararaca* 2. Plaquetas 3. Agregação plaquetária 4. Secreção plaquetária 5. Venenos de serpentes 6. Trombocitopenia 7. Camundongos 8. Seres humanos 9. Síndrome de Hermansky-Pudlak 10. Espectrometria de massas

USP/FM/DBD-432/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Primeiramente agradeço ao meu orientador Dr. Marcelo L. Santoro por todos os anos de orientação e exemplo de profissionalismo, fundamentais para o meu crescimento como profissional.

À Dra. Solange M. T. Serrano e sua equipe pela realização da espectrometria de massas das frações do veneno.

À Dra. Vânia G. M. Mattaraia e Cynthia Z. de Albuquerque pela criação e manutenção dos camundongos pérolas.

Ao Dr. Jorge Ferreira do Setor Multiusuário de Citometria de fluxo do Instituto Butantan pela realização dos ensaios de citometria de fluxo.

À Dra. Marisa Rocha do Laboratório de Herpetologia pela liofilização de nossas amostras.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica por disponibilizarem a utilização de equipamentos.

À Dra. Marília Seelaender e à sua doutoranda Joana Correia Lima do Laboratório de Metabolismo e Câncer por gentilmente nos conceder o anticorpo para citometria de fluxo.

Agradeço a todos os alunos, funcionários e pesquisadores do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan pela convivência diária e toda ajuda direta ou indireta essencial para a realização deste projeto.

Aos meus pais, Tâmara e Ismael, por sempre acreditarem em mim e incentivarem os meus sonhos, por todo amor e carinho de sempre.

Ao meu amado irmão, Mateus, pela amizade, amor e companheirismo.

Ao meu melhor amigo e companheiro, André, pelo amor, força e paciência em todos os momentos do desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus queridos amigos de curta e longa data por sempre estarem ao meu lado, em todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins.

Ao Instituto Butantan e à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

Ao apoio financeiro do CNPq e FAPESP (processo número 2013/25177-0) sem os quais eu não conseguiria realizar esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender. ”

Clarice Lispector

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Importância do envenenamento botrópico.....	12
1.2	Principais famílias do veneno botrópico	15
1.3	Plaquetas.....	17
1.4	Plaquetas e veneno botrópico	20
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Materiais	24
3.2	Espécies utilizadas.....	24
3.2.1	Camundongos.....	24
3.2.2	Seres humanos	24
3.3	Coleta de sangue e lavagem de plaquetas.....	25
3.3.1	Camundongos BALB/c, C57BL/6 e <i>Ap3b1</i> ^{-/-}	25
3.3.2	Humanos	26
3.4	Caracterização da pureza de plaquetas lavadas	26
3.5	Agregação e secreção dos grânulos plaquetários	27
3.5.1	Quantificação de ATP	27
3.5.2	Dosagem de PF4 e β -hexosaminidase.....	29
3.5.3	Dosagem de lactato desidrogenase	30
3.6	Atividade de agregação plaquetária induzida pelo veneno total após inibição das principais famílias de enzimas do veneno.....	31
3.7	Experimentos <i>in vivo</i>	32
3.7.1	Ultrafiltração do veneno	32
3.7.2	Ensaio <i>in vivo</i>	33
3.7.3	Atividade enzimática das frações do VBJ aquecido, VBJ total e frações (< 30 kDa, <50 kDa, > 50 kDa).....	34
3.7.4	Contagem plaquetária.....	34
3.7.5	Dosagem de fibrinogênio	34
3.8	Dosagem de proteínas	35

3.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	35
3.10	Análise por espectrometria de massa (LC-MS/MS) da fração de UF 50 kDa com atividade de induzir trombocitopenia.....	35
3.11	Análise Estatística.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Ensaio <i>ex vivo</i> com as plaquetas.....	38
4.1.1	Contaminação de eritrócitos e leucócitos na suspensão de plaquetas lavadas .	38
4.1.2	Determinação da concentração-resposta do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	40
4.1.3	Agregação plaquetária	42
4.1.4	Secreção dos grânulos plaquetários	45
4.1.5	Dosagem de LDH	47
4.1.6	Efeito do VBj tratado com inibidores das principais famílias de enzimas do veneno sobre a agregação plaquetária	48
4.2	Ensaio <i>in vivo</i> com as plaquetas	50
4.2.1	Dosagem de proteína e porcentagem das atividades enzimáticas.....	50
4.2.2	Gel SDS-PAGE	52
4.2.3	Contagem plaquetária, níveis de fibrinogênio plasmático e hemorragia local...	53
4.3	Análise espectrometria de massas da amostra de UF 50 kDa	56
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	70
7	REFERÊNCIAS.....	71
	Anexo I.....	80

Lista de abreviaturas

ADP	Difosfato de adenosina
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
Ap3b1	Complexo AP-3 subunidade 1 β
ATP	Trifosfato de adenosina
GPIb	Receptor plaquetário glicoproteína Ib
GPIIb/IIIa	Receptor plaquetário glicoproteína IIb/IIIa
LAAO	L-aminoácido oxidase
LDH	Lactato desidrogenase
PDF	Produto de degradação de fibrina
PF4	Fator plaquetário 4
PTLC	Proteína similar à lectina do tipo-C
SB	Sobrenadante
SVMP	Metaloproteinases do veneno de serpente
SVSP	Serinaproteases do veneno de serpente
TXA₂	Tromboxano A₂
UF	Ultrafiltrado
VBj	Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>
vWF	Fator de von Willebrand

Lista de Figuras

Figura 1: Serpente adulta <i>Bothrops jararaca</i> e sua distribuição pelo Brasil ...	13
Figura 2: Representação esquemática do processo de ultrafiltração do veneno de <i>B. jararaca</i>	33
Figura 3: Gráficos em <i>dotplot</i> de citometria de fluxo do concentrado de plaquetas lavadas de humanos	38
Figura 4: Gráficos em <i>dotplot</i> de citometria de fluxo do concentrado de plaquetas lavadas de camundongos BALB/c	39
Figura 5: Determinação da concentração do VBj responsável por resposta plaquetária máxima	42
Figura 6: Comparação entre o efeito agonista de VBj e de trombina em plaquetas lavadas de humanos e camundongos	44
Figura 7: Secreção de ATP por plaquetas humanas e de camundongos BALB/c, C57BL/6 e <i>Ap3b1</i> ^{-/-}	45
Figura 8: Dosagem de PF4 no sobrenadante de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c	46
Figura 9: Porcentagem da secreção lisossomal em plaquetas de humanos e de camundongos BALB/c	47
Figura 10: Dosagem de LDH no sobrenadante de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c	48
Figura 11: Agregações plaquetárias por VBj previamente tratado com Na ₂ EDTA ou AEBSF	50
Figura 12: Eletroforese SDS-PAGE 12 % do VBj total, aquecido e frações	52
Figura 13: Contagem plaquetária e dosagem de fibrinogênio plasmático de camundongos BALB/c envenenados	54
Figura 14: Fotografias do dorso de camundongos BALB/c	55
Figura 15: Representação gráfica das principais famílias de enzimas do VBj presentes no UF 50 kDa	57

Lista de tabelas

Tabela 1: Dosagem de proteínas e atividade enzimática 51

Tabela 2: Resumo dos distúrbios hemostáticos em camundongos BALB/c após
inoculação subcutânea do VBj total e suas frações 56

Resumo

Rosa JG. *Efeitos do veneno da serpente Bothrops jararaca sobre a agregação e secreção de plaquetas humanas e de camundongos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Trombocitopenia e diminuição da função plaquetária são achados comuns em pacientes picados por serpentes do gênero *Bothrops*. Sabe-se que o veneno de *Bothrops jararaca* (VBj) apresenta compostos com características pró e anti-agregantes plaquetárias, porém existem poucos estudos sobre a influência do veneno total assim como das principais famílias de proteínas que o compõem sobre as funções plaquetárias. A utilização de modelos experimentais é essencial para entender as desordens plaquetárias em humanos que culminam em sangramentos diversos. Portanto, o objetivo deste estudo foi (i) comparar as respostas *ex vivo* de plaquetas lavadas de humanos e de camundongos frente ao VBj, assim como entender a participação de serinaproteínases (SVSP) e metaloproteínases (SVMP) presentes no veneno sobre a agregação dessas plaquetas; e (ii) delimitar dentro do complexo proteico do veneno os compostos que induzem a trombocitopenia em camundongos após 3 horas do início do envenenamento botrópico. As plaquetas lavadas de humanos e camundongos BALB/c, C57BL/6 e do mutante natural pérola (*Ap3b1^{-/-}*) apresentaram respostas de agregação máxima ao VBj na concentração de 24,4 µg/mL, porém esta concentração provocou uma agregação menos intensa em plaquetas humanas quando comparada àquela observada nas linhagens BALB/c e C57BL/6. Mesmo em plaquetas de camundongos pérolas, deficientes em corpos densos plaquetários, o VBj se mostrou um potente agonista, promovendo a agregação plaquetária sem a necessidade da secreção do conteúdo granular. A ação agonista do veneno promoveu a secreção de ATP presente nos corpos densos plaquetários de humanos e das linhagens BALB/c e C57BL/6 de forma tão intensa quanto à provocada pela trombina, assim como a secreção de PF4 presente nos grânulos α de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c. Já em relação à secreção lisossomal, observou-se que as plaquetas humanas secretam níveis mais baixos de β -hexosaminidase quando estimuladas com VBj do que pela trombina, enquanto que em plaquetas de camundongos BALB/c a secreção lisossomal ao VBj foi superior à constatada com a trombina. Os baixos níveis de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das plaquetas estudadas mostraram ausência de atividade direta citotóxica pelo VBj. Para verificar se as principais classes de famílias de enzimas do VBj, SVMP e SVSP, estavam envolvidas na ativação plaquetária *ex vivo*, elas foram inibidas com Na₂EDTA (13 mM) e AEBSF (8 mM), respectivamente. Observou-se que em plaquetas humanas as serinaproteases são importantes para a agregação *ex vivo*, enquanto a agregação das plaquetas de camundongos BALB/c foi independente dessa classe de toxinas.

Os resultados dos ensaios *in vivo* demonstraram que as proteínas do VBj com peso molecular inferior a 50 kDa (UF<50 kDa) são importantes para o estabelecimento da trombocitopenia em camundongos BALB/c que receberam essa fração por via subcutânea e que esse quadro é independente de manifestações hemorrágicas e do desenvolvimento de coagulopatia durante o envenenamento botrópico. A caracterização dos compostos presentes no UF<50 kDa foi realizada por espectrometria de massas e foi observada a presença predominante de metaloproteinases (37%) e proteínas similares às lectinas do tipo-C (33%), enquanto serinaproteases (17%), fosfolipases A₂ (10%) e outros compostos (3%) somaram 30% da fração UF<50 kDa. Em conclusão, o veneno é um potente agonista plaquetário que promove agregação, aglutinação e secreção de plaquetas humanas e de camundongos, independente da secreção de corpos densos plaquetários, e a fração do veneno responsável pela trombocitopenia em camundongos BALB/c tem peso molecular menor que 50 kDa.

Descritores: *Bothrops jararaca*; plaquetas; agregação plaquetária; secreção plaquetária; venenos de serpentes; trombocitopenia; camundongos; seres humanos; síndrome de Hermansky-Pudlak; espectrometria de massas.

Abstract

Rosa JG. *Effects of Bothrops jararaca venom (BjV) on the aggregation and secretion of washed mouse and human platelets* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Thrombocytopenia and platelet dysfunction are common findings in patients bitten by *Bothrops jararaca* snakes. Pro- and anti-aggregating toxins have been isolated from *Bothrops jararaca* venom (BjV), but only few studies have been carried out about the effects of crude BjV and its main families of enzymes on platelet function *ex vivo*, as well as to understand their relevance to the pathophysiological events that occur during *B. jararaca* envenomation. Animal models have been used to understand platelet disorders in humans that culminate in bleeding manifestations. Thus, the aim of this study was to investigate (i) the effects of BjV, and snake venom serine proteinases (SVSP) and snake venom metalloproteinases (SVMP) contained therein, on aggregation and secretion in suspensions of washed human and mouse platelets, and (ii) to determine the BjV fractions, obtained by ultrafiltration, that induce thrombocytopenia in BALB/c mice after 3 h of administration of *Bothrops* envenomation. Washed platelets from humans and BALB/c, C57BL/6 and pearl (*Ap3b1^{-/-}*) mice showed maximal aggregation responses to BjV at the concentration of 24.4 µg/mL. However, this concentration aggregated less intensely platelets from humans than BALB/c or C57BL/6 mice. Even in pearl mouse platelets, which are deficient in dense bodies, BjV proved to be a potent agonist, promoting platelet aggregation without the requirement of granule content secretion. Nonetheless, BjV induced secretion of ATP, present in dense bodies, and PF4, present in α granules, in the same extent as thrombin, from platelets of humans and mice. In regard to lysosomal secretion, it was observed that human platelets secreted low β -hexosaminidase levels when stimulated by BjV than thrombin, whereas in BALB/c platelets higher secretion was induced by BjV than by thrombin. Release of lactate dehydrogenase (LDH) was similar between BjV and thrombin, evidencing the absence of cytotoxic activity by BjV on platelets. Inhibition of SVMP and SVSP, using Na₂EDTA (13 mM) and AEBSP (8 mM), respectively, demonstrated that SVSP are important for *ex vivo* aggregation only in human platelets, whilst BALB/c platelet aggregation was independent of both of them. In *in vivo* studies, only BjV toxins with molecular weight less than 50 kDa (UF50) caused thrombocytopenia when administered s.c. to BALB/c mice, and it was independent of hemorrhagic manifestations and consumptive coagulopathy. Characterization by mass spectrometry of these toxins present in UF50 showed the predominant presence of SVMP (37%) and type-C lectin proteins (33%) were observed, while SVSP (17%), phospholipases A₂ (10%) and other proteins (3%) accounted for the remaining toxins in UF50. In conclusion, BjV is a potent platelet activating agent that promotes aggregation, agglutination and secretion of human and mouse platelets, independent of secretion of dense platelet bodies, and the fraction of venom responsible for thrombocytopenia in BALB / c mice has a molecular weight less than 50 kDa.

Keywords: *Bothrops*; blood platelets; platelet aggregation; platelet secretion; snake venoms; thrombocytopenia; mice; humans; Hermansky-Pudlak syndrome; mass spectrometry.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância do envenenamento botrópico

As serpentes do gênero *Bothrops* estão distribuídas por todo território nacional sendo o gênero de maior importância em saúde pública (1-3). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o gênero *Bothrops* é responsável por 70 % dos acidentes notificados, atingindo 18 mil pessoas com mais de 100 mortes por ano (4). Além disso, a alta morbidade desses acidentes também é alarmante, já que as sequelas permanentes ocasionadas pela peçonha afetam significativamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Em cada região brasileira algumas espécies são mais frequentemente identificadas como causadoras do acidente devido à sua ampla distribuição geográfica, como por exemplo, *Bothrops atrox* na região Norte, *Bothrops erythromelas* no Nordeste, *Bothrops moojeni* nas regiões Centro-oeste e Sudeste e *Bothrops jararaca* nas regiões Sul, Centro-oeste e Sudeste (Figura1) (2, 5).

As serpentes *Bothrops jararaca* são popularmente conhecidas como jararaca e pertencem à família Viperidae. São serpentes vivíparas, têm coloração variada com tons castanhos ao preto com manchas em forma de “v” invertido ao longo do corpo e na fase adulta o seu tamanho médio pode variar de um metro a 1,5 m. Outras características morfológicas importantes dessas serpentes são a presença de aparelho inoculador do tipo solenóglifo e cabeça com formato triangular (6). Possuem grande capacidade adaptativa, podendo ser encontradas em áreas de floresta, agrícolas, periurbanas e urbanas, tendo preferência por ambientes úmidos, como áreas de mata e de cultivo (5).

As serpentes *B. jararaca* são exclusivamente carnívoras e sua alimentação baseia-se na busca predatória de pequenos vertebrados. O hábito alimentar modifica-se ao longo da vida da serpente; quando filhotes a alimentação é composta principalmente por anfíbios anuros e em menor proporção por lagartos, atraindo-os com o movimento da cauda, que geralmente possui extremidade de coloração branca a amarelada. Já os indivíduos adultos alimentam-se basicamente de roedores, de camundongos até preás (7).

Em São Paulo, a *B. jararaca* é a principal responsável pelos acidentes ofídicos notificados. Os indivíduos afetados em sua maioria são homens, trabalhadores rurais, com idade média de 30 anos, geralmente picados nos pés, mãos e pernas (2, 8, 9).

Figura 1: (a) Serpente *Bothrops jararaca* adulta. (Foto cedida por Frederico Alcântara, 2015) e (b) Distribuição da serpente *Bothrops jararaca* no Brasil (FUNASA, 2001).

As manifestações clínicas que acometem os indivíduos picados podem ser locais ou sistêmicas. Os sinais clínicos locais (aqueles observados no local da picada) mais comuns nos indivíduos picados são dor, formação de edema, sangramentos, equimose (podendo afetar uma porção extensa do membro acometido), bolhas em número e proporções variáveis e em alguns casos o desenvolvimento de quadro necrótico, com perda do membro acometido. Essa última é uma das complicações locais mais sérias ocasionadas pela picada dessa serpente (8, 9).

Em relação aos sinais clínicos que ocorrem distantes do local da picada, classificados como sistêmicos, são caracterizados pela presença de sangramentos (gengivorragia, púrpura, hematúria e petéquias), incoagulabilidade sanguínea e trombocitopenia (2, 10). O agravamento da situação clínica do paciente pode levar à insuficiência renal, choque e em alguns casos ao óbito (8).

O desencadeamento desses sinais clínicos se deve à complexidade da composição do veneno. Sabe-se que o veneno é constituído por diversas enzimas, toxinas sem atividade enzimática, proteínas não tóxicas, além de possuir compostos não proteicos como carboidratos, lipídeos, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres, porém as funções e mecanismos de atuação da maior parte desses compostos ainda são pouco conhecidas (1).

Dentre as toxinas do veneno com descrição da atividade biológica, encontram-se aquelas que têm atividade coagulante decorrente da ação de enzimas trombina-símbios (11-13) e enzimas pró-coagulantes que ativam os fatores II (12, 14, 15) e X (12, 14) da coagulação. A ação direta dessas enzimas do veneno causa diminuição do fibrinogênio plasmático e a formação de trombina intravascular (16, 17). O veneno também possui atividade proteolítica como a inflamatória caracterizada pelo aumento da adesão e migração de leucócitos (18), ativação de nociceptores (18, 19) e liberação de citocinas (20). Outra atividade proteolítica do veneno se refere à existência de hemorraginas as quais provocam danos graves ao endotélio vascular resultando em sangramentos diversos (11). Este veneno tem ação direta sobre as plaquetas, ativando-as ou inibindo as suas funções (21-23). Ao mesmo tempo, o veneno possui atividade anticoagulante, com a inibição da trombina e do fator Xa (24), e atividade fibrinolítica, pois o excesso de fibrina formada leva a uma ativação secundária da fibrinólise aumentando os níveis plasmáticos de produtos de degradação da fibrina (PDFs). Assim a combinação entre ativação excessiva dos fatores de coagulação e aumento de PDFs caracterizam a incoagulabilidade sanguínea observada nos pacientes envenenados (8, 17).

A coagulopatia adquirida no envenenamento botrópico apresenta similaridades com o quadro de coagulação intravascular disseminada (CID), pois a ação gradativa do veneno leva a um aumento dos níveis plasmáticos e expressão proteica do fator tissular (TF), diminuição dos níveis de fibrinogênio, aumento da formação de trombina intravascular e do complexo trombina-antitrombina, diminuição de fatores V, VIII e II e trombocitopenia (17, 25).

A principal terapia para o acidente botrópico é a administração intravenosa do antiveneno o mais rápido possível após a determinação da

gravidade das manifestações clínicas apresentadas pelo paciente (8). Cada ampola (10 mL) do soro antibotrópico é capaz de neutralizar 50 mg de veneno. O soro é produzido a partir da imunização de cavalos com a mistura de venenos de cinco espécies do gênero *Bothrops*: *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. neuwiedi* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%) e *B. jararacussu* (12,5%) (2). O soro antibotrópico não tem eficácia de 100% quanto às manifestações clínicas como edema, hemorragia local e lesões necróticas, que se desenvolvem no local da picada (26). Entretanto o soro tem se mostrado eficiente no controle das manifestações sistêmicas, uma vez realizada a administração do soro há interrupção de sangramentos, reestabelecimento dos níveis de fibrinogênio circulantes e normalização da contagem plaquetária (10, 27).

1.2 Principais famílias do veneno botrópico

O veneno da serpente *B. jararaca* é constituído por diversas famílias de proteínas dentre elas estima-se que 33,6% são as metaloproteinases (SVMP), 22,8% serinaproteases (SVSP), 18,2% proteínas similares às lectinas do tipo-C (PLTC), 6,3 % fosfolipases A_2 (PLA₂) e 1,3% peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP), dentre outros, sendo essas responsáveis pelo desencadeamento dos distúrbios observados no envenenamento botrópico (28).

As metaloproteinases são o grupo de enzimas predominantes no veneno botrópico e caracterizam-se principalmente pela presença de domínio catalítico dependente de zinco (29, 30). Elas são inibidas pela presença de quelantes de cálcio como o Na₂-EDTA (18, 25, 31). As principais funções das metaloproteinases no veneno botrópico são collagenolítica, fibrinogenolítica, hemorrágica e pró-inflamatórias (16, 31, 32). Elas são classificadas de PI a PIII, conforme a organização de seus domínios catalíticos: as enzimas PI apresentam apenas o domínio metaloproteinase, PII apresentam domínio metaloproteinase mais domínio tipo-disintegrina e a classe PIII apresenta em sua estrutura os domínios metaloproteinase, tipo-disintegrina e o domínio rico em cisteína (29). Além disso, as metaloproteinases também estão envolvidas

na atividade pró-coagulante do veneno, ativando os fatores II e X da coagulação (33), além de promover a inibição da agregação plaquetária (34).

As serinaproteases do veneno (SVSP) são caracterizadas pela presença de um resíduo serina altamente reativo e possuem diversas isoformas que dependendo de sua sequência ou estrutura interferem em suas atividades (13). Elas agem sobre a coagulação sanguínea, fibrinólise, sistema calicreína-cinina e agregação plaquetária (11). As SVSP são inibidas irreversivelmente por AEBSF e PMSF (33, 35).

Outra classe de toxinas presentes no veneno são as lectinas do tipo-C, proteínas não enzimáticas e são divididas em lectinas verdadeiras e em proteínas similares às lectinas do tipo-C (PTLC). As primeiras são proteínas homodiméricas que se ligam a mono e oligossacarídeos e estão em quantidades baixas no veneno, enquanto as segundas são proteínas heterodiméricas, composto com subunidades α e β , que apresentam domínios relacionados ao reconhecimento de carboidratos, mas se ligam a estruturas peptídicas de outras moléculas na ausência de cálcio (36) e estão em maior quantidade no veneno do que as verdadeiras (37). As PTLCs do veneno de serpentes possuem características diversas como antitrombótica, anticoagulante e pró-coagulante. As PTLCs atuam na inibição dos fatores de coagulação se ligando diretamente a eles como, por exemplo, o IX e o X, sendo essas PTLCs classificadas como ligantes de IX/X (38), além disso sabe-se que essas proteínas impedem a interação entre o fator Xa e seu cofator no complexo protrombinase (39). Outros elementos da coagulação como a protrombina e a trombina (24) são consideravelmente afetadas pela ação das PTLCs impedindo a formação do coágulo. Ademais essas proteínas podem tanto inibir quanto promover a agregação plaquetária se ligando de maneira específica sobre receptores presentes na superfície dessas células e geralmente os receptores afetados são aqueles importantes para a adesão e ativação plaquetárias (40-45).

Outras funções já foram atribuídas às PTLCs do veneno de serpentes como ação bactericida sobre bactérias gram-positivas (46, 47) e gram-negativas (47), ação antitumoral e mitogênica (48), além de promover a

aglutinação de promastigotas de *Leishmania* sp. (46) e inibição do parasitismo causado por *Toxoplasma* (49).

Apesar de estarem entre uma das classes de proteínas mais abundantes do veneno de jararaca, sendo algumas muito bem descritas tanto no que se refere a estrutura química como ação biológica, ainda são necessários mais estudos que possibilitem a identificação e a caracterização funcional das PTLCs do veneno.

1.3 Plaquetas

Depois dos eritrócitos, as plaquetas são as células em maior número na circulação sanguínea com papel vital na manutenção da hemostasia ao evitar a perda de sangue para o ambiente extravascular (50). Ademais, tem sido cada vez mais descrita a participação destas células em processos inflamatórios (3), imunológicos (51), infecciosos (52, 53), dentre outros (54, 55).

As plaquetas são originadas de megacariócitos (56). O número e tamanho das plaquetas variam conforme a espécie estudada. Em humanos, há cerca de $150-400 \times 10^3$ plaquetas/ μL enquanto em camundongos esse número varia entre $700 - 1500 \times 10^3$ plaquetas/ μL . Em compensação, essas plaquetas possuem tamanho modesto de 3-4 fL quando comparadas às plaquetas humanas que têm em média de 7-11 fL. O tempo médio de vida das plaquetas na circulação é de 7 a 11 dias em humanos, enquanto em camundongos sua duração é de 3 a 5 dias (57, 58). Morfologicamente as plaquetas são discoides e anucleadas, possuem em seu citoplasma diversas organelas como mitocôndrias, sistema tubular denso, sistema de canais abertos, citoesqueleto e os principais grânulos plaquetários são grânulos alfa, corpos densos e lisossomos (58-60).

Em condições normais as plaquetas permanecem na circulação sanguínea em estado quiescente, mas quando um vaso é lesado, inicialmente ocorre uma vasoconstrição reflexa que diminuiu o fluxo local e permite a proximidade das plaquetas na área afetada (58, 61). A exposição de componentes da camada subendotelial do vaso leva as plaquetas a se aderirem através de receptores em sua superfície como a glicoproteínas (GP) Ib/IX/V que se liga ao fator de von Willebrand (vWF) e as glicoproteínas GP

Ia/IIa e GPIIb/IIIa e GPVI que se ligam ao colágeno (62). Os ligantes desses receptores induzem o aumento de expressão das integrinas plaquetárias, incluindo a GPIa/IIa, que se liga ao colágeno, e a GPIIb/IIIa, que se liga ao fibrinogênio e/ou ao vWF, mediando a agregação plaquetária. Após a ativação inicial, há influxo de cálcio no citoplasma plaquetário e um aumento do número e função do receptor GPIIb/IIIa, envolvido com o mecanismo de agregação plaquetária. Há também mudança de morfologia, de discoide para esférica, direcionando o movimento dos grânulos para o centro da célula e consequente secreção do conteúdo granular (50, 63-66).

Durante este processo, as plaquetas sofrem uma amplificação de sua atividade biológica mediada pela ação de agonistas como a trombina e aqueles que são liberados de seus grânulos, como a serotonina, ADP e ATP. Além disso, ocorre a liberação do ácido araquidônico da membrana plasmática plaquetária pela fosfolipase A_2 . O ácido araquidônico, por sua vez, sofre a ação das ciclooxygenase, gerando-se as prostaglandinas G_2 e H_2 . Estas, sob ação da tromboxano sintetase, têm como produto final o tromboxano A_2 (TxA_2). Dessa forma, os agonistas ADP, ATP e TxA_2 se ligam aos seus respectivos receptores presentes na membrana plasmática da plaqueta e amplificam a ativação plaquetária (ADP se liga aos receptores $P2Y_{12}$, $P2Y_1$; ATP se liga $P2X_1$; TxA_2 se liga ao receptor de tromboxano (TP)) (65, 67-70). Esses agonistas ativam as plaquetas via receptores acoplados a proteína G (GPCR) desencadeando a ativação da enzima fosfolipase C, que hidrolisa o fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP₂) em inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) se ligam aos receptores no principal sítio de armazenamento de cálcio (Ca^{2+}) – o sistema tubular denso – iniciando o efluxo de Ca^{2+} para o citosol e, assim, elevando a concentração intracelular de Ca^{2+} . Este cálcio promove a liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários, como também se associa à calmodulina, promovendo o rearranjo na estrutura do citoesqueleto e modificando sua forma com emissão de prolongamentos. O DAG ativa a proteína-quinase C que, assim como o trifosfato de inositol (IP₃), induz a secreção dos componentes dos grânulos intracelulares (60, 71, 72).

Os grânulos plaquetários possuem uma grande quantidade de substâncias bioativas que determinam as funções plaquetárias. Os grânulos α

são organelas grandes e em maior número quando comparadas aos outros grânulos; concentram uma grande quantidade de proteínas como β -tromboglobulina, fator plaquetário 4 (PF4), fibrinogênio, fator de von Willebrand (vWF), fator V, cininogênio de alto peso molecular, receptores de imunoglobulinas (receptores Fc) e de crescimento celular (60, 73, 74). Os corpos densos, que estão em número menor do que os grânulos α , são caracterizados por apresentarem alta concentração de cálcio e magnésio, nucleotídeos de adenina, principalmente ADP e ATP, serotonina, pirofosfatos e polifosfatos. Por fim, os lisossomos são pouco abundantes e possuem em seu interior proteoglicanos, hidrolases ácidas, proteases e proteínas catiônicas com atividade bactericida (60). No entanto, recentemente descobriu-se que as plaquetas possuem um quarto grânulo, denominado grânulo T. Os grânulos T estão localizados de forma adjacente à membrana plasmática das plaquetas e possuem em seu interior proteínas como VAMP-8 (auxilia no processo de secreção granular) (75), receptores do tipo toll -TLR9 (regulação da resposta imune durante infecções por bactérias e vírus) (76) e isomerase de dissulfeto proteico (PDI) (regulação da atividade pró-coagulante do fator tissular e participação na formação de trombo) (77, 78).

Quando a secreção plaquetária é deficiente há o prejuízo frequente na contenção de sangramentos. As desordens fisiológicas em relação à secreção dos grânulos plaquetários têm sido atribuídas à uma diminuição significativa no número e no conteúdo de corpos densos e de grânulos α sendo denominadas como “Platelet Storage Pool Disease” ou “SPD” (79-81). Dentre as SPD, aquelas relacionadas aos corpos densos plaquetários são as mais comumente descritas na literatura. Um exemplo de SPD de corpos densos é a síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS), doença autossômica recessiva que afeta o conteúdo e/ou a secreção de organelas intracelulares incluindo melanossomos, lisossomos e corpos densos plaquetários (79, 82). Essas deficiências causam nos indivíduos acometidos hipopigmentação, tempo de sangramento prolongado e fibrose pulmonar (83). A HPS tem sido descrita em modelos animais, como em camundongos, os quais apresentam pelo menos 16 mutações distintas, enquanto em humanos mais de 5 tipos já foram descritos (por exemplo HPS1, HPS2, HPS3, HPS4, HPS5, dentre outros) (84-89). Os

camundongos mutantes que expressam o fenótipo de HPS2, conhecidos como camundongos pérola (*Ap3b1*^{-/-}) possuem pelagem clara e anormalidades na secreção dos corpos densos plaquetários, ademais essa é um dos tipos de HPS mais frequentemente observados em humanos (83). Os camundongos pérolas possuem mutações no gene *Ap3b1* responsável pela expressão da subunidade $\beta 1$ da proteína adaptadora 3 (AP-3) (90). A função do complexo AP-3 na formação de corpos densos plaquetários e outras organelas relacionadas aos lisossomos (LROs- outros exemplos: melanossomos) é organizar e transportar proteínas integrais de membrana recém sintetizadas para formação dessas estruturas (91).

A utilização de modelos animais é uma ferramenta essencial para compreender a fisiopatologia e a progressão de desordens plaquetárias que desencadeiam em sangramentos diversos como, por exemplo, as observadas no envenenamento botrópico.

1.4 Plaquetas e veneno botrópico

A trombocitopenia é caracterizada pela diminuição da contagem de plaquetas circulantes e muitas vezes determina a presença de sangramento generalizado. Durante o envenenamento por *B. jararaca*, as plaquetas podem ter sua função e número diminuídos, tanto em humanos como em modelos animais, agravando os distúrbios hemostáticos que ocorrem nesse envenenamento, visto que as plaquetas são células primordiais para a estabilização da hemostasia (10, 92, 93).

A acelerada queda na contagem plaquetária pode ocorrer nas primeiras horas após o envenenamento botrópico e eventualmente persistir por dias contribuindo para o aumento do risco de sangramento nos pacientes picados por *B. jararaca* (1). A gravidade do envenenamento e o desenvolvimento de sangramento sistêmico já foram associados à trombocitopenia (10) (32).

A trombocitopenia observada em humanos e animais experimentais no envenenamento tem origem multifatorial (93). A formação de trombina intravascular pelas enzimas pró-coagulantes do veneno seria uma das causas para o consumo acelerado das plaquetas circulantes, pois essas proteínas provocariam a ativação dessas células, seguido de sequestro (17, 32, 33, 94).

Outra possível causa de trombocitopenia no envenenamento seria a lesão endotelial resultante da ação de hemorraginas do veneno, entretanto apesar de existir lesões hemorrágicas evidentes em humanos (8), ratos (25, 95) e camundongos (96), sabe-se que essas proteínas não são as principais responsáveis pela queda no número de plaquetas circulantes (25). Ademais a presença de compostos no veneno com características pró-agregantes também poderia contribuir para a queda na contagem plaquetária. Alguns compostos com atividade agonista sobre as plaquetas têm sido descritos como algumas SVSP, como a PA-BJ que age de maneira similar à trombina sobre os receptores plaquetários PAR 1 e PAR 4 (97) e PTLCs como a botrocetina que aumenta a afinidade de ligação do vWF ao receptor plaquetário GPIb (41). Apesar da administração de botrocetina em animais experimentais causar trombocitopenia e queda nos níveis de vWF, em coelhos e humanos envenenados os níveis dessa proteína plasmática encontram-se dentro ou acima dos valores de referência (32, 98). Ainda outra hipótese seria a digestão enzimática de receptores plaquetários por proteases presentes no veneno ou a ação da plasmina gerada devido ao aumento dos níveis de fibrina na circulação (93).

Mesmo com intensa ativação plaquetária que leva ao sequestro definitivo de plaquetas para o pulmão, ainda é possível observar a presença de plaquetas ativadas e com déficit no conteúdo de seus grânulos na circulação sanguínea durante o envenenamento botrópico (92, 93, 98).

Além da trombocitopenia, a perda da função plaquetária também já foi observada em humanos (27) e em coelhos envenenados (98). Assim como a variedade de causas para o estabelecimento da trombocitopenia no envenenamento, a deficiência na funcionalidade fisiológica plaquetária também tem sido atribuída a diversos fatores. A presença de proteínas não enzimáticas de baixo peso molecular conhecidas como disintegrinas contêm o motivo RGD (Arginina, Glicina, Aspartato) que tem alta afinidade pelos receptores plaquetários como o GPIIb/IIIa, impedindo a ligação do fibrinogênio a este receptor consequentemente inibindo a agregação plaquetária (36, 99, 100). Algumas metaloproteinases são capazes de promover a clivagem de receptores importantes para a adesão e agregação plaquetária frente a

diversos agonistas (21). Outra hipótese seria a presença de níveis elevados de PDFs (92) no plasma de humanos e animais experimentais, que já foram considerados como um dos fatores de inibição de atividade plaquetária. Além disso, a intensa formação de trombina intravascular durante o envenenamento pode contribuir na dessensibilização das plaquetas circulantes frente a outros agonistas (98).

Ademais, a participação das plaquetas no processo inflamatório provocado pelo envenenamento botrópico já foi observado em ratos. As plaquetas e o seu conteúdo de secreção granular estão diretamente envolvidos na patogênese da dor provocada pela ação local do veneno de *Bothrops jararaca* (95).

Os níveis de plaquetas circulantes em pacientes picados retornam aos valores normais de referência, sem a necessidade de transfusão de plaquetas, após a administração do soro anti-botrópico (10).

A determinação e caracterização biológica dos compostos presentes no VBj são essenciais para o entendimento da complexidade envolvida na trombocitopenia assim como na disfunção plaquetária características do envenenamento por *B. jararaca*.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

As plaquetas têm participação fundamental no desenvolvimento da fisiopatologia dos distúrbios hemostáticos provocados pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca*, e durante o envenenamento botrópico as plaquetas são diretamente afetadas, tendo seu número e função diminuídos. Sendo assim os principais objetivos deste trabalho foram:

- a. Comparar as respostas de agregação e secreção *in vitro* de plaquetas lavadas de humanos e de camundongos quando estimuladas com VBJ; e entender a participação de serinaproteinases (SVSP) e metaloproteinases (SVMP) presentes no veneno sobre a agregação dessas plaquetas. A escolha dessas espécies se deve ao fato que os seres humanos são envenenados acidentalmente e os camundongos são as presas naturais dessa serpente.
- b. Identificar e caracterizar as proteínas do veneno que induzem a trombocitopenia em camundongos após 3 horas do início do envenenamento botrópico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Veneno:

O *pool* de veneno liofilizado foi obtido a partir de espécimes adultos, machos e fêmeas, de serpentes *Bothrops jararaca* mantidas em cativeiro no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. O *pool* de veneno era mantido a -20°C, e no momento da realização dos experimentos, ele foi diluído em salina 0,154 M com concentração final de 1mg /mL.

3.2 Espécies utilizadas

3.2.1 Camundongos

Os camundongos BALB/c e C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central no Instituto Butantan. As matrizes dos camundongos pérolas (*Ap3b1*^{-/-} B6Pin.C3-*Ap3b1*^{P^e}/J) – modelos da síndrome Hermansky-Pudlak e cujas plaquetas não apresentam corpos densos (83) – foram adquiridas do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, EUA) e reproduzidas no Biotério Central do Instituto Butantan. Machos (30-35g) foram mantidos com livre acesso a água e ração, em estantes ventiladas, ciclo claro/escuro e temperatura controlada de acordo com a necessidade da espécie (21°C) no biotério do Laboratório de Fisiopatologia. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (Protocolo nº 1163161115 e 5937060618) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 009/16).

3.2.2 Seres humanos

Foram selecionados doadores adultos hígidos, entre 18 e 45 anos que não fizeram uso de medicamentos que interferissem na função plaquetária por ao menos 10 dias. Todos os doadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os procedimentos realizados com o sangue dos doadores foram aprovados pela Plataforma Brasil (CAAE: 51368615.5.0000.0065).

3.3 Coleta de sangue e lavagem de plaquetas

3.3.1 Camundongos BALB/c, C57BL/6 e *Ap3b1*^{-/-}

Para fazer *pool* de plaquetas lavadas, 9 animais/ensaio foram induzidos e mantidos sob anestesia com isoflurano (Isoforine - Cristália) a 4% e 2,5% em aparato anestésico Fluovac (Harvard Apparatus, UK), respectivamente, para coleta de amostras de sangue total por punção da veia cava caudal. O sangue coletado (700 – 1000 μ L/ camundongo) foi imediatamente distribuído em 2 frascos sendo um com anticoagulante Na₂-EDTA 10% (proporção de 1 parte de anticoagulante para 99 partes de sangue) para realização do hemograma completo e outro contendo anticoagulante ACD (citrato trisódico 85 mM, ácido cítrico 71,4 mM, dextrose 111 mM) na proporção 6 partes de sangue para 1 uma parte de anticoagulante, para separação de plaquetas do sangue total.

Após a coleta do sangue, foi feita uma solução contendo 6 partes de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Sigma -D1152) e 1 parte de ACD (pH 6,2) que foi adicionada ao sangue total, na proporção de 1 parte de sangue para 2 partes de solução. O sangue diluído foi gentilmente transferido para um tubo cônico de 5 mL com 1mL de Histopaque 1077 (Sigma-10771) e logo em seguida centrifugado a 700 *g* por 30 minutos a 25°C (aceleração 9 e breque 0) em centrífuga 5810R (Eppendorf), com rotor de ângulo móvel, para obter desta forma o plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP foi separado e a ele adicionado 2,5 μ L de prostaglandina PGE₁ (200 μ g/mL em etanol) para cada 10 mL de PRP. As amostras foram centrifugadas a 9700 *g* por 1 minuto e 30 segundos e o *pellet* de plaquetas suspenso em solução contendo DMEM e ACD (pH 6,2). A esta suspensão de plaquetas foi adicionada novamente PGE₁ (2,5 μ L para cada 10 mL de PRP) e então centrifugada a 9700 *g* por 1 minuto e 30 segundos. Este procedimento foi repetido mais uma vez e as plaquetas finalmente foram ressuspensas em meio de cultura DMEM pH 7,4. A contagem de plaquetas lavadas foi realizada em contador celular automático BC-2800 Vet (Mindray, China) e diluídas para 5×10^5 plaquetas/ μ L.

3.3.2 Humanos

Foram coletados cerca de 20 mL de sangue total de cada doador (2 doadores por ensaio) da veia cefálica e divididos em 2 frascos contendo anticoagulantes, um com Na₂-EDTA 10% para realização de hemograma completo (99 partes de sangue total: 1 parte de anticoagulante) e outro com ACD (6 partes de sangue total : 1 de anticoagulante) para separação de plaquetas do sangue total. Para obtenção do PRP, o sangue total com ACD foi centrifugado a 190 g por 15 minutos à temperatura ambiente em centrífuga Eppendorf (Centrifuge 5810R). O procedimento de lavagem das plaquetas humanas e separação de amostras para os ensaios subsequentes foram os mesmos utilizados para camundongos. A contagem de plaquetas foi realizada em contador celular automático BC-2800 Vet (Mindray, China) e as plaquetas foram diluídas para 3×10^5 plaquetas/ μ L.

3.4 Caracterização da pureza de plaquetas lavadas

A eficácia do método utilizado para a separação das plaquetas de outros elementos celulares presentes no sangue total foi avaliada por citometria de fluxo. Assim como as plaquetas, outras células sanguíneas, como os leucócitos, são capazes de secretar β -hexosaminidase, enzima presente nos lisossomos (101). Para a citometria, alíquotas de 7 μ L de plaquetas humanas ou de camundongos BALB/c lavadas (1×10^6 plaquetas/ μ L) suspensas em tampão PBS (NaCl 136 mM, KH₂PO₄ 1,46 mM, Na₂HPO₄.12H₂O 1,67 mM e KCl 2,68 mM, pH 7,4), foram distribuídas em 5 tubos e incubadas com 5 μ L de anticorpos específicos para leucócitos e eritrócitos. Todas as amostras foram incubadas com os anticorpos no escuro em banho de gelo, para impedir a endocitose dos anticorpos pelas plaquetas.

As suspensões de plaquetas humanas receberam anticorpo anti-CD45 de leucócitos conjugado com FITC (cód. 555482, BD Pharmigen) e anti-glicoforina de eritrócitos (cód. G7650, Sigma) por 10 minutos. Após esse tempo, foi adicionado à mistura de plaquetas humanas incubada com anticorpo anti-glicoforina, 2 μ L de IgG de cabra conjugada com FITC anti-IgG de camundongo (Sigma F0257), permanecendo por mais 10 minutos no gelo. Como controle negativo do anticorpo anti-CD45, foi utilizada apenas a

suspensão de plaquetas (7 μ L) diluída em 1 mL de PBS; já para o controle de isotipo do anticorpo anti-glicoforina (IgG1), à suspensão plaquetária (7 μ L) foi adicionado 5 μ L de anticorpo monoclonal anti-*Loxosceles gaucho* (MoALg1) (Guilherme, et al. 2001) e 2 μ L do conjugado IgG de cabra anteriormente citado. A seguir, as amostras foram diluídas com 1 mL de PBS.

O mesmo procedimento foi utilizado para as plaquetas de camundongos, exceto que os seguintes anticorpos específicos para antígenos de camundongos foram utilizados: anti-CD45R para linfócitos T e B (e-Bioscience 12-0452), anti-Ly-6G para neutrófilos (e-Bioscience 12-593), anti-CD3e para linfócitos maduros (e-Bioscience 12-0031) e anti-Ter119 para eritrócitos maduros (e-Bioscience 12-5921-81). Todos os anticorpos utilizados para marcação de células murinas estavam conjugados com ficoeritrina (PE).

Foram analisados 10 000 eventos de cada amostra nos citômetros BD FACS Canto II e FACSCalibur (BD, EUA), do Laboratório de Imunoquímica. As amostras de plaquetas, sem incubação com anticorpos, foram diferenciadas das demais células pelas suas dispersões características dianteiras (*Forward scatter*, FSC) e laterais (*Side scatter* SSC), obtidas em escala logarítmica. Para a análise da porcentagem de células positivas e negativas. Utilizou-se o programa WinMDI, versão 2.9, em gráficos dispersão de pontos (*Dot plot*) com parâmetros de densidade de fluorescência *versus* o tamanho celular (FSC).

3.5 Agregação e secreção dos grânulos plaquetários

3.5.1 Quantificação de ATP

Primeiramente foi realizado o ensaio de agregação para determinar a concentração de veneno necessária para provocar ativação, secreção e agregação plaquetárias. As suspensões do *pool* de plaquetas lavadas humanas e de camundongos foram mantidas a 37°C em banho seco durante todo o procedimento. Alíquotas (0,4 mL) da suspensão de plaquetas lavadas em DMEM, pH 7,4, foram estimuladas com 10 μ L de soluções de VBJ diluído seriadamente na razão de 2 em NaCl 0,154 M, para que as concentrações finais de veneno na suspensão de plaquetas lavadas estivessem entre 48,8 μ g/mL e 0,768 μ g/mL. Como controle positivo da agregação e secreção, foi utilizada 10 μ L de uma solução de trombina bovina diluída em salina na

concentração de 4,1 U/mL (T4648-Sigma) (concentração final na suspensão de plaquetas: 0,1U/mL), mantida em banho de gelo durante os ensaios de agregações. A agregação plaquetária por transmissão de luz (Born, 1962) foi realizada em um agregômetro Chrono-log (modelo 560V), sob temperatura (37°C) e agitação (1000 rpm) constantes, e o registro das curvas de agregação foi feita pelo programa Aggro/Link versão 4.75 (Chrono-log, EUA). O agregômetro foi calibrado com plaquetas lavadas não estimuladas como 0% de transmitância e o DMEM como 100% de transmitância. A adição dos agonistas gerou uma curva de agregação que foi acompanhada por 5 minutos. O cálculo da intensidade de agregação foi feito a partir da integração da área formada entre o tempo transcorrido e a curva de agregação, utilizando o Microsoft Excel.

Com base nos resultados mostrados no item 4.1.2, foi escolhida a concentração final de 24 µg/mL de VBj, que induzia a máxima ativação e agregação de plaquetas lavadas de humanos e de camundongos BALB/c, C57BL/6 e *Ap3b1*^{-/-}, sendo então utilizada para a realização dos ensaios subsequentes. Para avaliar os efeitos do VBj, utilizamos plaquetas lavadas para os ensaios *in vitro* ao invés de plasma rico em plaquetas (PRP) devido a presença de enzimas coagulantes desse veneno (12, 33, 102) que poderiam interferir nos ensaios de agregação plaquetária.

Simultaneamente à agregação, foi realizada a determinação da intensidade de secreção de ATP de corpos densos plaquetários após o estímulo com o veneno. Para tanto, primeiramente foi feita a calibração da quantidade de ATP secretado, com a utilização de 360 µL da suspensão de plaquetas lavadas, 40 µL de solução luciferina/luciferase (Sigma L0633, 40 mg/mL) e 1,5 µL do padrão ATP 250 µM (Sigma A7699). O ganho de luminescência foi ajustado para x 0,005. Após a calibração, o mesmo volume de suspensão de plaquetas e da solução luciferina/luciferase foi utilizado para a adição dos agonistas trombina (0,1 U/mL) e VBj (24 µg/mL). A secreção foi registrada pelo programa Aggro/Link (Chrono-log) e a quantidade de ATP secretado foi calculada pelo período de 5 minutos após a adição dos agonistas, a partir da fórmula:

$$ATP \text{ secretado (nanomoles)} = \left(\frac{\text{Área sob a curva da luminescência da trombina ou BjV}}{\text{Área sob a curva da luminescência padrão}} \right) \times 3,75$$

Os ensaios de agregação e secreção foram repetidos em 3 dias diferentes sendo que em cada dia foram feitas duplicatas das ações de cada agonista.

3.5.2 Dosagem de PF4 e β -hexosaminidase

PF4 e β -hexosaminidase são considerados marcadores clássicos de secreção de grânulos α e lisossomos, respectivamente. Para verificar a eficiência do veneno em comparação à trombina na indução da secreção desses grânulos, as plaquetas humanas e de camundongos BALB/c foram lavadas como descrito, porém ressuspensas em solução completa de Tyrode (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; NaH_2PO_4 3 mM; HEPES 10mM; dextrose 5.6 mM; MgCl_2 1 mM; CaCl_2 2 mM; pH 7,4), na concentração de 3 e 5×10^5 plaquetas/ μL , respectivamente.

Para a dosagem de PF4, alíquotas de 0,4 mL de plaquetas lavadas foram ativadas com ambos os agonistas (como descrito anteriormente no item 3.5) e salina como controle negativo, por 1 minuto e para interromper a agregação e secreção plaquetárias foi adicionado o anticoagulante CTAD (citrato trisódico 85 mM, ácido cítrico 71,4 mM, dextrose 111 mM – ACD + inibidores teofilina 15 mM; adenosina 3,7 mM; dipiridamol 0,198 mM, 2 μM de imipramina) (103) a 4°C na proporção 1:1. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9700 g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi aliqotado e armazenado no freezer -80°C. Previamente a dosagem de PF4 as amostras do sobrenadante plaquetário de camundongos e humanos após estímulo com trombina ou VBj foram diluídas 1:20000 em solução de PBS 1X + de BSA 1% e os sobrenadantes provenientes de incubação com salina também foram diluídos mas na proporção 1:5000 em PBS 1X + BSA 1%. Após a diluição das amostras foi realizada a dosagem de PF4 utilizando-se kits específicos, pelo método ELISA, de acordo com as especificações do fabricante (PF4 humano-DY795 e camundongo DY595, R&D, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em ng/mL.

Para a dosagem de β -hexosaminidase, o *pool* de plaquetas foi suspenso em tampão Tyrode pH 7,4 e ativado por VBj, trombina ou salina por 5 minutos e imediatamente submetido a resfriamento em gelo. Para o controle da secreção total dessa enzima foi feita a lise plaquetária com Triton X-100 diluído em Tyrode com cálcio na concentração final de 0,2% por 20 minutos. O sobrenadante foi obtido como descrito acima. O método colorimétrico descrito por Holmsen e Dangelmaier (1989)(104) foi modificado e adaptado à microplaca de 96 poços. Para a solução reagente de β -hexosaminidase, adicionou-se imediatamente antes do uso 2 partes do tampão citrato 0,1 M (pH 5,0) + 1 parte do substrato *p*-nitrofenil-*N*-acetil β -D-glucosaminida (Sigma-N9376), na concentração de 20 mM. Na microplaca foram adicionadas 1 parte de amostra (50 μ L) para 1 parte de solução reagente (50 μ L), sendo então incubadas as amostras por 2 h a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 80 mM de NaOH (100 μ L) e a quantidade de *p*-nitrofenol produzido foi determinada no comprimento de onda de 410 nm e a leitura da absorbância realizada pelo programa SoftMax Pro 5.4.1 no equipamento Spectra MAX 190 (Molecular Devices, EUA). Primeiramente foi determinada a concentração de *p*-nitrophenol usando o coeficiente de extinção ($\epsilon_{405nm}^{1mM} = 18/cm$), sendo a atividade específica de β -hexosaminidase expressa em nmol de *p*-nitrofenol/min/plaqueta. Os resultados foram representados em porcentagem de secreção, sendo as amostras de plaquetas lisadas (1 volume) com Triton X-100 (1 volume) consideradas 100% de secreção de β -hexosaminidase. As amostras dosadas foram obtidas a partir de 3 ensaios em dias distintos sendo feita duplicata de cada agonista testado.

3.5.3 Dosagem de lactato desidrogenase

A enzima lactato desidrogenase (LDH) está presente no citoplasma das plaquetas e só é liberada quando há algum dano na membrana plasmática, sendo considerada um marcador apropriado para identificar lise celular em ensaios *in vitro* (105). Para determinar se o VBj seria capaz de promover a lise de plaquetas nos testes *in vitro*, as plaquetas de humanos e camundongos BALB/c suspensas em solução de Tyrode com cálcio (pH 7,4) foram submetidas a agregação por 5 minutos com veneno (24,4 μ g/mL), trombina (0,1

U/mL) e salina (NaCl 0,154 M). Após o término das agregações, as amostras foram centrifugadas a 9700 g por 5 minutos para separar o *pellet* plaquetário do sobrenadante. A dosagem da enzima LDH foi realizada nas amostras de sobrenadante de plaquetas ativadas pela metodologia descrita por Burtis e Ashwood (1986) (106) modificada para que fosse feita em microplaca de 96 poços para leitor de ELISA. Na microplaca foram aplicados 5 µL de amostras + 200 µL de solução de reação contendo 170 µM de β-NADH (Sigma- N8129), diluída em tampão Tris 56 mM-EDTA 5,6 mM + solução piruvato de sódio (Merck-106619) 14 mM, pH 7,4. A leitura da reação foi feita na absorbância de 339 nm, por meio de ensaio cinético com medições de 0 a 4 minutos a 37 °C, com intervalos entre as leituras de 1 min. O cálculo da atividade enzimática de LDH se deu pela fórmula:

$$U/L(\mu\text{mol}/\text{min}/L) = \frac{\Delta A/\text{min}}{6,3 \times 10^{-3}} \times \frac{0,205}{0,005}$$

Onde, ΔA é igual a diminuição da absorbância máxima por minuto, $6,3 \times 10^{-3}$ é o coeficiente de absorção micromolar de NADH a 339 nm, 0,205 o volume do poço na microplaca e 0,005 o volume da amostra.

3.6 Atividade de agregação plaquetária induzida pelo veneno total após inibição das principais famílias de enzimas do veneno

Para avaliar qual (is) componente (s) do veneno são responsáveis por estimular a agregação plaquetária *in vitro*, o VBj (1 mg/mL) foi incubado:

- Inibidor de metaloproteinases: Na₂EDTA 13 mM (52 µL de Na₂EDTA 269 mM + 948 µL de VBj) (25);
- Inibidor de serinaproteases: AEBSF 8 mM (hidrocloreto fluoreto de 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil – Sigma A8456) (100 µL AEBSF 200 mM em salina+ 900 µL de VBj);

Após incubação por 1 hora a 37°C, os venenos tratados foram acondicionados em banho de gelo e então adicionados à suspensão de plaquetas humanas e de camundongos (0,4 mL) e as curvas de agregação foram registradas durante 5 minutos. O veneno que recebeu salina foi utilizado como controle. As agregações foram calculadas como descrito no item 3.5,

exceto que a agregação provocada pelo veneno que recebeu salina foi considerada como 100%.

3.7 Experimentos *in vivo*

3.7.1 Ultrafiltração do veneno

Para os ensaios *in vivo*, o VBj (1 mg/mL) foi diluído em salina. Em seguida, foram realizadas filtrações do veneno a fim de delimitar no veneno quais proteínas são responsáveis pela trombocitopenia no envenenamento de camundongos. Os processos realizados para tal fim estão esquematizados na Figura 2.

Após a diluição do veneno em salina, cada um dos microtubos Amicon Ultra (0,5 mL Centrifugal filter units – Millipore) com membranas de *cutoffs* de 30 kDa e 50 kDa receberam 0,5 mL da solução do veneno previamente citado e foram submetidos a centrifugação a 14 000 *g* por 15 min a 4°C em centrífuga de microtubos Legend Micro 17 R (Thermo Scientific). Após o término desta primeira centrifugação, os ultrafiltrados foram retirados e colocados em microtubos (sem filtro) em banho de gelo. O tubo contendo a membrana de 50 kDa recebeu cerca de 375 µL adicionais de salina, enquanto o tubo com a membrana de 30 kDa recebeu 200 µL de salina, e foram novamente submetidos a centrifugação. Esse processo de lavagem da membrana foi repetido mais uma vez. Após a terceira centrifugação apenas o microtubo com o filtro de 30 kDa foi submetido a mais 2 lavagens, uma vez com 200 µL e a última com 150 µL de salina. Ao final desta primeira etapa, o volume final dos ultrafiltrados de 30 e 50 kDa foi de 1250 µL, sendo mantidos durante todo processo em banho de gelo.

A segunda etapa das centrifugações foi realizada para promover a retirada dos componentes do veneno de VBj com massa superior 50 kDa da membrana do tubo de ultrafiltração. Para isso foi adicionado 0,5 mL de salina no filtro e gentilmente foi feita uma homogeneização com a micropipeta para promover a retirada dos compostos do veneno aderidos à membrana e então, de acordo com as instruções do fabricante, o filtro foi invertido e centrifugado a 14 000 *g* por 15 min a 4°C. A realização da lavagem da membrana de 50 kDa seguiu de forma similar ao descrito anteriormente, exceto pelo fato de que a

cada lavagem da membrana, o filtro foi invertido e centrifugado. Essa segunda etapa de centrifugações, foi coletada a fração do veneno > 50 kDa, com volume final de 1250 μ L.

Ultrafiltração VBj

Figura 2: Representação esquemática do processo de ultrafiltração do veneno de *B. jararaca*.

3.7.2 Ensaios *in vivo*

Camundongos BALB/c ($n = 5 - 8/\text{grupo}$) foram injetados pela via subcutânea (s.c) com VBj aquecido a 70°C por 10 minutos, os ultrafiltrados com massa molecular < 30kDa, < 50 kDa ou > 50kDa, todos na dose 1,6 mg/kg (dose estabelecida em estudos anteriores por provocar nos animais os distúrbios hemostáticos característicos do envenenamento por *B. jararaca* (96). O volume de cada solução injetado nos animais foi de 120 μ L a cada 30 g de peso vivo, sendo o mesmo injetado nos animais que receberam VBj (controle positivo) e salina (controle negativo), equivalente à dose acima, para que todas as tivessem concentrações aproximadas do veneno total. Ademais, o grupo em que o VBj foi aquecido a 70°C por 10 minutos foi realizado para eliminar a atividade proteolítica presente no veneno (107). Após 3 horas, os animais anestesiados com isoflurano (item 3.3.1) tiveram seu sangue coletado pela veia cava caudal e imediatamente transferido para tubos contendo:

-1 µL de Na₂EDTA + 1 µL de soro antibotrópico (SAB, Instituto Butantan, lote 130577) para cada 99 µL de sangue, sendo utilizada para contagem plaquetária;

- 57 µL de CTAD + 4µL de soro antibotrópico (SAB, Instituto Butantan, lote 130577) para cada 350 µL de sangue, e então centrifugada 2500 g por 15 minutos a 4°C para dosagem de fibrinogênio plasmático.

Após a coleta do sangue, foram feitos registros fotográficos do dorso dos camundongos para caracterizar a presença ou não de hemorragia no local da inoculação do VBj, do VBj aquecido e das frações do VBj.

3.7.3 Atividade enzimática das frações do VBj aquecido, VBj total e frações (< 30 kDa, <50 kDa, > 50 kDa)

Foram realizadas as atividades colagenolítica (SVMP), amidolítica (SVSP) e de L-amino oxidases (LAAOs) das frações do veneno e do veneno aquecido de acordo com Antunes e colaboradores (2010) (108). O veneno total foi considerado como 100% das atividades avaliadas.

3.7.4 Contagem plaquetária

A contagem plaquetária dos animais foi realizada em contador de células automático Mindray, BC-2800 Vet.

3.7.5 Dosagem de fibrinogênio

A dosagem do fibrinogênio plasmático foi realizada por ensaio colorimétrico descrito por Ratnoff e Menzie (109). Foram pesados 0,5 g de vidro moído em tubos de centrifugação de 50 mL, do tipo Falcon, em seguida foram adicionados 5 mL de salina 0,85%, 25 µL de ácido ε-aminocaproico (EACA) 10%, 50 µL de plasma de camundongos BALB/c e 34,5 µL de trombina bovina (720 U/L). Para a formação do coágulo os tubos Falcon foram incubados a 37°C por 15 minutos e então centrifugados a 3000 rpm (1800 g) por 5 minutos. O coágulo foi espremido com bastão de vidro e novamente foi adicionado 5 mL de salina. Esse passo foi repetido mais 2 vezes. Adicionou-se ao coágulo formado 1 mL de NaOH 10% e então os tubos foram fracamente vedados com folha de alumínio e então levados ao banho-maria fervente por 10 minutos. Imediatamente após fervura os tubos foram esfriados e então foi

adicionado 7 mL de água destilada, 3 mL de Na₂CO₃ 20% e 1 mL de reagente ácido fenólico (Sigma). A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro Ultrospec 2100 (Pharmacia, Suécia) a 650 nm contra o branco de reação. Os dados obtidos foram calculados pelo programa Curve Expert 1.4 a partir da curva padrão de tirosina. Os resultados foram representados em mg/dL de fibrinogênio.

3.8 Dosagem de proteínas

A determinação da quantidade de proteínas presente nas frações isoladas do veneno foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de absorbância em UV. Cerca de 100 µL das amostras foram aplicadas em placa de quartzo com 96 poços e a leitura da absorbância das amostras foi feita no leitor de placa de ELISA Spectramax 190 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 280 nm. O cálculo estimado da quantidade de proteínas presente nas amostras testadas foi feito como descrito por Noble e Bailey (2009) (110) e a concentração de proteínas determinada em mg/mL.

3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Após a determinação da quantidade de proteínas, a fim de verificar a eficiência da separação das frações do veneno de *B. jararaca*, as proteínas foram submetidas à eletroforese em géis de SDS-PAGE 12% (111), sob condições redutoras (com tampão Nu-PAGE 4X concentrado (112) e não-redutoras. Aplicou-se cerca de 10 µg de proteína em cada poço e a corrida eletroforética foi realizada em amperagem de 20 mA. Após a corrida o gel foi submetido a coloração de prata conforme descrito por Blum e colaboradores (1987)(113).

3.10 Análise por espectrometria de massa (LC-MS/MS) da fração de UF 50 kDa com atividade de induzir trombocitopenia

Todos os procedimentos a seguir foram conduzidos no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada da Dra. Solange M. T. Serrano, Instituto Butantan. Inicialmente, foi realizada a digestão das proteínas em solução com tripsina (Sigma), como descrito anteriormente (114). Os peptídeos resultantes da digestão de proteínas em solução com tripsina foram secos por

centrifugação a vácuo (Christ) e dissolvidos em 15 μ L de ácido fórmico 0,1%, e deste volume 4 μ L foram submetidos à análise por espectrometria de massas utilizando o espectrômetro LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) acoplado ao sistema de nanoLC Easy II (Proxeon). O volume de 4 μ L foi injetado em uma pré-coluna de C18 (100 μ m x 40 mm x 5 μ m) (diâmetro interno x comprimento x tamanho de partícula) e os peptídeos foram separados em uma coluna analítica contendo *beads* da resina Reprosil-Pur C18-AQ (3 μ m, Dr. Maisch GmbH) (75 μ m x 150 mm x 3 μ m). A separação foi feita utilizando um gradiente linear com duração de 15 minutos composto por água (A) e acetonitrila (B) contendo 0,1% de ácido fórmico sob fluxo de 200 nL/min. O sistema partiu de uma concentração de 4% de B e chegou a 35% de B em 15 minutos. Os espectros de MS (114) foram obtidos pelo analisador FTMS com uma resolução de 30.000 na faixa de m/z de 300-2000 (*mass range*). O método de fragmentação escolhido foi *Collision-induced Dissociation* (CID) e apenas os dez íons mais intensos de cada MS foram selecionados para fragmentação. Para este processo foram selecionados apenas íons com duas cargas ou mais. A energia de colisão usada para a obtenção dos fragmentos (espectros de MS/MS) foi de 35 eV, e os fragmentos foram analisados no *ion trap*. A voltagem da fonte foi fixada em 2 kV e o tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 90 segundos, com uma lista contendo 50 íons, para diminuir a aquisição repetida de um mesmo valor de m/z .

O arquivo proveniente da análise por LC-MS/MS foi convertido para o formato MGF por meio do programa RawConverter (115) e este foi submetido à busca no banco de dados por meio do programa Mascot (versão 2.6.2.). O banco utilizado compreendeu as sequências depositadas no Uniprot na taxonomia serpentes (até o dia 21/07/2017; <http://www.uniprot.org/>; 70.087 sequências) mais 79 sequências completas de toxinas obtidas pelo sequenciamento dos transcritos da glândula de veneno de *B. jararaca* (116). Como modificações variáveis considerou-se os eventos de oxidação de resíduos de metionina, enquanto que a carbamidometilação de resíduos de cisteína foi estabelecida como modificação fixa. Os valores de tolerância para as massas observadas foram 10 ppm para os precursores selecionados no MS (114) e 0,5 Da para os fragmentos analisados no *ion trap*. A enzima

selecionada foi a tripsina, com a tolerância máxima de 1 sítio de clivagem perdido. Critérios da análise da lista de proteínas identificadas: *false discovery rate* menor que 1%.

3.11 Análise Estatística

Inicialmente, para verificar se havia normalidade e homocedasticidade dos dados obtidos, o programa StataMP™ 14.1 foi utilizado; as variáveis secreção de PF4 e fibrinogênio plasmático foram transformadas pelo método descrito anteriormente (117) neste programa. As análises estatísticas de comparação entre grupos foram realizadas utilizando o programa SPSS22. Para as variáveis fibrinogênio plasmático, contagem de plaquetas, inibição de agregação por tratamento com inibidores foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida de teste Bonferroni. Para as demais variáveis foi utilizada a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios *ex vivo* com as plaquetas

4.1.1 Contaminação de eritrócitos e leucócitos na suspensão de plaquetas lavadas

A análise por citometria de fluxo das suspensões de plaquetas lavadas foi utilizada para quantificar a contaminação por leucócitos e eritrócitos nos *pools* de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c isoladas a partir do sangue total.

Observou-se que o concentrado de plaquetas humanas não tinha contaminação por eritrócitos (Figura 3b, 0,2%) quando comparado ao seu controle (Figura 3a, 0,2%), enquanto os leucócitos foram as células encontradas em maior concentração no pool de plaquetas, contabilizando 0,5% (Figura 3d, vs. controle 0,0%, Fig. 3c).

Figura 3: Gráficos em *dotplot* FSC/ FITC em citometria de fluxo do concentrado de plaquetas lavadas de humanos. As plaquetas foram incubadas com: **(a)** anticorpo monoclonal anti-*Loxosceles gaucho* (MoALg1) – anticorpo controle do anticorpo anti-glicoforina, utilizado como controle de isotipo de IgG para o anticorpo anti-glicoforina; **(b)** anticorpo anti-glicoforina, específico para série eritrocitária humana; **(c)** sem anticorpos, controle do anti-CD45, **(d)** anticorpo anti-CD45. Foram analisados 10000 eventos em cada análise com os anticorpos.

A presença de eritrócitos na amostra de plaquetas lavadas de camundongos BALB/c foi de 0,4% (Figura 4b), enquanto os leucócitos totalizaram uma contaminação de 0,1% (Figura 4c, d, e). Nos camundongos, os linfócitos correspondem 70 – 80% dos leucócitos totais circulantes e no *pool* de plaquetas eles contabilizaram 0,1% (Figura 4c, e), enquanto não houve contaminação de granulócitos.

Figura 4: Gráficos em *dotplot* da FSC/PE citometria de fluxo do concentrado de plaquetas lavadas de camundongos BALB/c. As plaquetas foram incubadas com: (a) PBS 1X (controle), (b) anticorpo anti-Ter119 de camundongo, específico para a série eritrocitária; (c) anticorpo anti-CD45R de humanos e camundongos específico para linfócitos T e B; (d) anticorpo anti-Ly-6G (Gr-1), específico para granulócitos; (e) anticorpo anti-mouse CD3e, específico para linfócitos T maduros. Foram analisados 10000 eventos em cada análise com os anticorpos.

Portanto, a citometria de fluxo evidenciou que a presença de outras células sanguíneas além das plaquetas no concentrado de plaquetas foi igual a 0,5% na suspensão de plaquetas lavadas humanas e de camundongos, demonstrando que os dois métodos utilizados nesse projeto para isolar plaquetas proporcionaram uma baixa contaminação por outros tipos celulares, como leucócitos e hemácias.

4.1.2 Determinação da concentração-resposta do veneno de *Bothrops jararaca*

Quando adicionado à suspensão de plaquetas lavadas, o VBj provocou uma rápida e intensa resposta nas plaquetas das espécies estudadas, sendo que elas foram ativadas e deram início ao processo de agregação (Figura 5). Independentemente da concentração de VBj utilizada, é válido ressaltar que, assim como alguns agonistas plaquetários conhecidos, a ativação promovida pelo VBj induziu a mudança de forma nas plaquetas estudadas, de discoide para esférica, sendo esse fenômeno observado devido ao decréscimo inicial na transmissão da luz, como demonstrado nos gráficos da Fig. 5.

Em relação à resposta das plaquetas humanas às concentrações de VBj utilizadas foi possível observar na Figura 5a, que as concentrações de 12,2 a 48,8 µg/mL promoveram a agregação irreversível dessas plaquetas, porém a maior concentração utilizada (48,8 µg/mL) teve efeito menos intenso em relação à concentração de 24,4 µg/mL. Apesar da concentração de 6,10 µg/mL causar a mudança de forma nas plaquetas humanas, ela não foi suficiente para iniciar a formação do agregado plaquetário. Sendo assim, dentre as concentrações testadas para plaquetas humanas, a concentração de 24,4 µg/mL promoveu mudança de forma e uma intensidade de agregação máxima.

Em camundongos BALB/c (Figura 5b) e C57BL/6 (Figura 5c), as concentrações de 6,10 a 24,4 µg/mL foram responsáveis por uma agregação de máxima intensidade e assim como em humanos a concentração de 48,8 µg/mL provocou uma agregação menos intensa quando comparada a causada pela concentração de 24,4 µg/mL. Ao contrário do observado nas plaquetas de camundongos BALB/c (Figura 5b), em que a concentração de 3,05 µg/mL é suficiente para gerar curvas de agregação mesmo que de menor intensidade,

as plaquetas de C57BL/6 se apresentaram não-responsivas a essa concentração. A concentração de 1,52 µg/mL promove a mudança de forma nas plaquetas de camundongos BALB/c, porém é insuficiente para provocar a formação de agregado plaquetários.

Já em camundongos *Ap3b1*^{-/-}, cujos controles de fundo genético são os camundongos C57BL/6, a Fig. 5d demonstra que além das concentrações que causaram intensa agregação nas plaquetas humanas e das outras linhagens, as concentrações de 1,52 e 3,05 µg/mL também provocaram forte efeito agregante sobre as plaquetas desses camundongos, demonstrando que o veneno é capaz de ativar e manter a agregação plaquetária mesmo na ausência dos compostos presentes nos corpos densos.

Por fim, para os experimentos subsequentes com plaquetas humanas e murinas, que compararam a ação do VBJ em relação à trombina, foi utilizada a concentração de 24,4 µg/mL para caracterizar os efeitos de VBJ sobre as funções plaquetárias, haja vista que essa concentração produziu agregação máxima e irreversível em ambas as espécies.

Figura 5: Determinação da concentração do VBj suficiente para promover uma resposta máxima em (a) plaquetas humanas e nas linhagens de camundongos (b) BALB/c, (c) C57BL/6 e (d) *Ap3b1*^{-/-}. Diversas concentrações do VBj, de 0,76 a 48,8 µg/mL (10 µL), foram aplicadas na suspensão de plaquetas (0,4 mL) de camundongos ($500 \times 10^9/L$) e humanas ($300 \times 10^9/L$) a curva de agregação produzida foi registrada durante 5 minutos pelo programa Aggro/Link (Chrono-log). Resultados representativos de 2 experimentos diferentes.

4.1.3 Agregação plaquetária

Após a determinação da concentração do veneno capaz de provocar uma máxima resposta em plaquetas de humanos e camundongos, foram realizadas as ativações e agregações com a concentração de 24,4 µg/mL por 5 minutos a fim de comparar as agregações obtidas sob a ação do veneno em relação à trombina (0,1 U/mL), o mais potente agonista plaquetário conhecido. Para comparar os resultados de agregação plaquetária, utilizou-se o valor da área sob a curva (*area under curve* – AUC), calculado pela integração de cada curva de agregação plaquetária. Esse método foi eficiente para medir a totalidade intensidade de agregação nas diferentes espécies (Figura 6).

No que diz respeito às plaquetas humanas a trombina promoveu uma intensa agregação plaquetária como o esperado (Figura 5a e 5e), enquanto a curva de agregação formada após o estímulo com VBj se mostrou menos

intensa, sendo observada uma diferença significativa entre esses dois agonistas ($p < 0,01$) (Figura 6a).

A ativação e agregação promovida pela trombina em plaquetas de camundongos BALB/c (Figura 6b e 6f) foi de máxima intensidade assim como observado em plaquetas humanas. Em relação ao efeito do VBj, a curva de agregação formada se mostrou idêntica à gerada pela adição da trombina às plaquetas de BALB/c (Figura 6f), não sendo possível constatar diferença estatística entre esses dois agonistas ($p > 0,05$) (Figura 6b). No que diz respeito às plaquetas lavadas de camundongos C57BL/6 (Figura 6c e 6g), o resultado obtido foi similar ao observado nas agregações dos camundongos BALB/c, em que a trombina e o VBj não diferem de forma significativa na intensidade de agregação ($p > 0,05$). Os resultados das agregações de plaquetas de camundongos BALB/c e C57BL/6 demonstraram que o veneno tem ação agonista potente semelhante à trombina.

Para entender a relevância da secreção granular plaquetária após ativação com o VBj sobre a agregação, utilizamos as plaquetas lavadas de camundongos pérola (*Ap3b1^{-/-}*), nas quais não estão presentes os corpos densos. Os resultados obtidos demonstraram que houve diferença significativa entre a agregação promovida pela trombina e o VBj ($p < 0,05$) (Figura 6d). Enquanto o estímulo provocado pela trombina não foi suficiente para sustentar a agregação máxima durante o tempo de 5 minutos, observou-se que o VBj além de ativar as plaquetas desses animais, manteve a agregação durante todo o tempo estabelecido (Figura 6h). O resultado obtido demonstrou que a ativação e a manutenção da agregação plaquetária provocadas por VBj é independente do conteúdo presente nos corpos densos.

Figura 6: Comparação entre o efeito agonista de VBj (24,4 µg/mL) em relação à trombina (0,1 U/mL) em plaquetas lavadas de humanos, camundongos BALB/c, C57BL/6 e *Ap3b1*^{-/-} durante 5 minutos. **(a-d)** A intensidade de agregação plaquetária foi representada a partir do cálculo da AUC após a ativação com a adição de trombina ou VBj. **(e-h)** Curvas representativas de agregação plaquetária induzida por trombina ou VBj. Resultados expressos como média ± e.p.m (número de ensaios= 3). Diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas por barras horizontais.

4.1.4 Secreção dos grânulos plaquetários

Uma vez que o VBj foi capaz de induzir agregação plaquetária, a fim de caracterizar a ação do VBj sobre a secreção granular de plaquetas humanas e de camundongos, foi realizada a dosagem de ATP (corpos densos), PF4 (grânulos α) e β -hexosaminidase (lisossomos) após estimulação com trombina e VBj.

Quanto à secreção de ATP (Figura 7) pelos corpos densos plaquetários, observou-se que não foi constatada diferença significativa entre a secreção causada pelo VBj e a trombina em plaquetas humanas ($p = 0,851$), camundongos BALB/c ($p = 0,429$) e C57BL/6 ($p = 0,485$). Devido à ausência de corpos densos nas plaquetas de camundongos pérolas *Ap3b1*^{-/-} não foi observada secreção de ATP, independentemente do agonista utilizado. Os resultados mostraram que o VBj foi capaz de promover a secreção dos corpos densos, analisada pelo o ATP secretado, de maneira similar à trombina nas espécies utilizadas.

Figura 7: Quantificação do ATP secretado por corpos densos de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c, C57BL/6 e *Ap3b1*^{-/-} estimuladas com VBj (24,4 μ g/mL) em comparação às plaquetas expostas ao agonista controle, a trombina (0,1 U/mL). Resultados expressos como média $\pm$ e.p.m (número de ensaios/ grupo= 3). Não houve diferenças estatísticas significativas pela estimulação pela trombina nem VBj entre cada espécie ou linhagem.

No que se refere aos grânulos α (Figura 8), como previsto a ativação pela trombina promoveu a secreção de altos níveis de PF4 em relação ao grupo salina ($p < 0,001$), sendo que o estímulo com VBj também promoveu a secreção de quantidades significativas de PF4 em relação controle negativo

($p < 0,001$), porém em comparação à trombina não foi observado diferença estatística significativa ($p = 0,200$). As plaquetas de camundongos BALB/c (Figura 7) também secretaram uma grande quantidade de PF4 quando estimuladas com trombina ou VBj em relação ao controle salina ($p < 0,001$), não sendo observada diferença estatística entre a ação desses dois agonistas ($p = 0,763$) sobre a secreção dos grânulos α .

Figura 8: Dosagem de PF4 liberado de grânulos α de plaquetas humanas e de BALB/c quando ativadas com VBj, trombina ou salina. Resultados expressos como média $\pm$ e.p.m (número de ensaios/ grupo= 3). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão unidas por barras horizontais.

A secreção lisossomal em plaquetas humanas e de camundongos é desencadeada sob efeito de agonistas potentes não sendo secretado em sua totalidade (118, 119). Para caracterizar e comparar as ações dos agonistas, trombina e VBj, sobre a secreção lisossomal foi considerada como 100% de secreção de β -hexosaminidase as amostras de plaquetas lisadas com Triton X-100. A partir disso, foi possível observar que o estímulo da trombina sobre as plaquetas humanas promovia uma secreção lisossomal de 48% (Figura 9), sendo esse valor significativamente superior ($p < 0,001$) ao obtido no controle salina que apresentou uma secreção de 1,5%. Já em relação ao VBj, as plaquetas humanas secretaram cerca de 15,1% da β -hexosaminidase sendo significativa a presença dessa enzima no sobrenadante plaquetário quando comparado ao sobrenadante obtido a partir de plaquetas incubadas com salina ($p < 0,05$). As porcentagens de secreção lisossomal obtidas nas incubações com trombina e VBj demonstraram uma diferença estatística significativa ($p <$

0,001), sendo a ação do VBj menos intensa no que diz respeito à secreção de β -hexosaminidase.

Em plaquetas de camundongos BALB/c a secreção lisossomal pela ativação com trombina foi semelhante à observada em plaquetas humanas em torno de 47,2 %, sendo consideravelmente distinta da observada no controle negativo (3,7%) ($p < 0,001$). Ao contrário do resultado encontrado em plaquetas humanas, a ativação pelo VBj provocou uma secreção de 68,0 % da enzima β -hexosaminidase sendo este valor superior à obtida pela incubação com trombina ($p < 0,05$). Os resultados demonstrados na Fig. 9 mostram que o VBj tem ações distintas sobre secreção de β -hexosaminidase nas plaquetas das espécies estudadas.

Figura 9: Expressão em porcentagem da secreção lisossomal da enzima β -hexosaminidase em plaquetas de camundongos BALB/c e humanos que receberam VBj em relação aos controles positivo (trombina) e negativo (salina). Resultados expressos como média $\pm$ e.p.m (número de ensaios/ grupo= 3). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão unidas por barras horizontais.

4.1.5 Dosagem de LDH

Para determinar a capacidade do VBj em promover a lise de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c, foi realizada a dosagem da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) presente no sobrenadante plaquetário (Figura 10). Os resultados obtidos demonstraram que o LDH do sobrenadante de plaquetas humanas estimuladas com VBj não diferiram dos dados obtidos nos controles salina ($p = 1,000$) e trombina ($p = 1,000$). As

plaquetas de camundongos BALB/c apresentaram atividade de LDH mais alta que a das plaquetas humanas, mesmo quando incubadas com salina. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre a atividade de LDH no sobrenadante plaquetário de camundongos BALB/c estimulado com VBj quando comparada às observadas nos controles positivo ($p= 1,000$) e negativo ($p= 0,172$). Logo, foi possível afirmar a ausência de atividade citotóxica do VBj sobre plaquetas humanas e murinas.

Figura 10: Dosagem da atividade da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c após serem estimuladas por 5 minutos com salina, trombina (0,1 U/mL) ou VBj (24,4 µg/mL). Resultados expressos como média e.p.m $\pm$ (número de ensaios/ grupo= 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.1.6 Efeito do VBj tratado com inibidores das principais famílias de enzimas do veneno sobre a agregação plaquetária

O tratamento prévio do VBj com Na₂-EDTA e AEBSF por 1 hora teve como objetivo inibir as atividades de SVMPS e SVSP, respectivamente, a fim de verificar quais dessas enzimas são responsáveis por causar ativação e agregação *in vitro* de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c.

A inibição das SVMPS provocou uma intensidade de agregação similar ao VBj controle em plaquetas humanas (Figura 11a e a₁), não sendo observada diferença estatística entre esses dois grupos ($p= 1,000$). Entretanto a intensidade de agregação pelo VBj controle foi superior à obtida àquela de

plaquetas estimuladas com VBJ+AEBSF (Figura 11a e a₁), sendo uma diminuição significativa ($p < 0,05$), que determina a participação da classe de SVSPs na ativação e agregação de plaquetas humanas. Quanto às plaquetas de camundongos BALB/c observou-se na Fig. 11b, que os tratamentos previamente estabelecidos para o VBJ não interferiram na intensidade de agregação promovida pelo VBJ controle, não sendo constatado diferença significativa entre os grupos avaliados. Esses resultados indicam que *in vitro*, ativação e agregação das plaquetas de BALB/c são independentes das principais enzimas que compõem o veneno.

Assim, a participação das SVSPs, mostrou-se parcialmente importante para a ativação e agregação de plaquetas humanas em ensaios *in vitro*. Os dados em relação às plaquetas humanas diferem consideravelmente do que foi observado em plaquetas de camundongos BALB/c, no qual não foi possível inibir nos ensaios realizados o(s) componente(s) responsável (is) pela ativação e agregação plaquetárias.

Figura 11: Agregações plaquetárias promovidas pelo VBj + salina e pelo VBj previamente tratado com Na₂EDTA 13 mM e AEBSF 8 mM durante 5 minutos. **(a)** Agregações de plaquetas lavadas de humanos e **(b)** camundongos BALB/c representadas pela AUC (*area under curve*). Curvas típicas de agregação de plaquetas humanas **(a₁)** e de camundongos BALB/c **(b₁)**. Resultados expressos como média e.p.m $\pm$ (número de ensaios= 2-3). As diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão unidas por barras horizontais.

4.2 Ensaios *in vivo* com as plaquetas

4.2.1 Dosagem de proteína e porcentagem das atividades enzimáticas

A fim de iniciar a identificação e caracterização da (s) fração (ões) do VBj responsáveis pela conhecida diminuição do número de plaquetas circulantes e dos níveis de fibrinogênio plasmático, foram realizados ensaios *in vivo* em camundongos BALB/c. Entretanto, antes de injetar as amostras nos animais, elas tiveram sua concentração de proteínas e porcentagens de

atividade enzimática determinadas. As amostras utilizadas nos ensaios *in vivo* estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Dosagem de proteínas e porcentagem da atividade enzimática das amostras VBj aquecido, VBj total e frações.

	mg/mL de proteína	SVMP (%)	SVSP (%)	LAAO (%)
VBj	0,4	100	100	100
VBj aquecido	1,26	0,32	64,93	0
UF<30 kDa	0,08	0,81	0	0
UF<50 kDa	0,13	12,70	4,33	0
SB 50 kDa	0,17	89,90	89,70	90,51

Pelo método de absorvância UV 280nm observou-se que o VBj controle totalizou 0,4 mg/mL, enquanto que em seu fracionamento o ultrafiltrado de 30 kDa (UF<30), ultrafiltrado de 50 kDa (UF<50) e o sobrenadante de 50 kDa (SB50) somaram 0,38 mg/mL, semelhante dentro do erro experimental à dosagem do veneno total. O veneno aquecido apresentou uma concentração de proteínas mais alta que as outras amostras devido ao aumento da desnaturação e degradação de proteínas pelo aquecimento do veneno (Tabela 1), que as tornam mais opacas.

Em relação às atividades enzimáticas das amostras a serem injetadas nos camundongos BALB/c, o VBj total foi considerado como 100% das atividades de SVMP, SVSP e LAAO (Tabela 1). A amostra do veneno aquecido perdeu quase toda a sua atividade de SVMP, enquanto a atividade de SVSP permaneceu parcialmente. Os UF<30 e UF<50 apresentaram baixas porcentagens de atividades de SVMP e SVSP, enquanto a amostra com contendo compostos com peso molecular acima de 50 kDa (SB50) tiveram alta atividade de SVMP, SVSP e LAAO. A atividade de LAAO foi totalmente eliminada nas amostras UF<30, UF<50 e VBj aquecido.

4.2.2 Gel SDS-PAGE

Após a determinação da concentração de proteínas das amostras VBj, VBj aquecido, UF30, UF50 e SB50 foi realizado o perfil eletroforético dessas amostras sob condições reduzidas e não reduzidas como demonstrado na Figura 12.

Figura 12: Perfil eletroforético do VBj (2), VBj aquecido (3), UF 30 kDa (4), UF 50 kDa (5) e sobrenadante de 50 kDa (6). As amostras (10 µg) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE a 12% em (a) condições redutoras e (b) não redutoras. O padrão de peso molecular (1) variou de 250 a 15 kDa. As proteínas foram coradas com solução de nitrato de prata.

As amostras do gel sob condições redutoras (Figura 12a) apresentaram uma quantidade maior de bandas que as amostras que não foram reduzidas (Figura 12b). Quanto a essas últimas, foi possível observar que a amostra de VBj aquecido conseguiu minimamente adentrar ao gel. Em relação às amostras reduzidas observamos que todas apresentaram bandas de peso molecular menor que 75 kDa. O VBj total, VBj aquecido e o sobrenadante de 50 kDa revelaram a presença de 1 banda majoritária de peso molecular de 50 kDa, enquanto que nas amostras de UF<30 e UF<50, essa banda não foi observada. Todas as amostras reduzidas apresentaram bandas proteicas com peso molecular abaixo de 30 kDa.

A eletroforese confirmou o que se esperava da ultrafiltração com filtros de 30 e 50 kDa, pois pôde-se observar exclusivamente a presença de bandas com peso molecular menor que 30 kDa e 50 kDa, respectivamente, nas

amostras. Entretanto, quando observamos o sobrenadante de 50 kDa observamos que ainda havia uma contaminação com proteínas de peso molecular inferior a 50 kDa.

4.2.3 Contagem plaquetária, níveis de fibrinogênio plasmático e hemorragia local

Após 3 horas da administração por via s.c do veneno total, salina, VBj aquecido e das frações obtidas nas ultracentrifugações, o sangue dos animais foi coletado e os parâmetros em relação às plaquetas e o fibrinogênio foram avaliados como mostra a Fig. 13.

Os animais que receberam VBj total apresentaram uma redução de aproximadamente de 60% no número de plaquetas circulantes em relação ao grupo injetado apenas com salina ($p < 0,0001$) (Figura 13a). Ao contrário do grupo VBj total (controle positivo), a administração de VBj previamente aquecido a 70°C, da fração do VBj constituída de componentes de peso molecular inferior a 30 kDa (UF<30) e da fração contendo compostos com peso molecular superior a 50 kDa (SB50) não promoveu trombocitopenia nos animais injetados ($p < 0,0001$), que apresentaram um número de plaquetas circulantes similar ao observado nos animais do grupo salina ($p = 1,000$) (Figura 13a). Entretanto, assim como os animais do grupo VBj, a diminuição da contagem de plaquetas circulantes foi observada nos animais injetados com a fração do veneno de peso molecular inferior a 50 kDa (UF<50), sendo estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,0001$).

Figura 13: (a) Contagem plaquetária e (b) dosagem de fibrinogênio plasmático em camundongos BALB/c após 3 h da administração s.c (1,6 mg/kg) do VBj aquecido a 70 °C, do ultrafiltrado de 30 kDa (UF<30) do ultrafiltrado de 50kDa (UF<50) e do sobrenadante de 50 kDa (SB50) em comparação aos animais controle que receberam salina ou veneno de *B. jararaca* – VBj. Resultados expressos como média $\pm$ e.p.m. (n=5-12 animais/ grupo). * $p < 0,001$ quando comparados com animais tratados com salina. # $p < 0,05$ quando comparados com os animais tratados com VBj.

Em relação ao fibrinogênio plasmático (Figura 13b), como previsto os camundongos injetados com VBj total tiveram uma redução significativa em relação àqueles que receberam apenas salina ($p < 0,001$). A redução dos níveis de fibrinogênio plasmático também foi observada nos grupos de animais que receberam o VBj aquecido, o UF de 50 kDa, além do SB de 50 kDa, sendo estatisticamente distintos do controle salina ($p < 0,05$). Apenas os animais injetados com a fração do veneno com compostos de peso molecular inferiores a 30 kDa não apresentaram qualquer alteração nos níveis de fibrinogênio, pois os valores obtidos foram semelhantes àqueles observados no grupo salina ($p > 0,05$), mas significativamente diferentes dos resultados do fibrinogênio dos animais envenenados com VBj total ($p < 0,001$).

Os ensaios *in vivo* determinaram que as toxinas do VBj responsáveis pela diminuição na contagem plaquetária durante o envenenamento botrópico possuem peso molecular menor que 50 kDa e que a hemorragia provocada pelo veneno contribui minimamente para esse quadro, já que os animais injetados com essa fração não apresentaram qualquer sinal de hemorragia. Ademais, a ativação da coagulação também parece ter pouca participação na trombocitopenia já que animais injetados com veneno aquecido não tiveram queda no número de plaquetas circulantes apesar do consumo do fibrinogênio ter sido semelhante ao provocado pelo veneno total. Com o objetivo de evidenciar a presença ou não de quadro hemorrágico local, ao término dos experimentos *in vivo*, foram feitas imagens fotográficas do dorso de

camundongos no local onde foram injetados o VBj, salina, as frações do veneno e o VBj aquecido (Figura 14). Nos animais que receberam salina (controle negativo) não foi observado qualquer sinal de hemorragia no local da injeção, e o mesmo foi constatado nos animais injetados com as frações UF de 30 kDa, UF de 50 kDa e VBj aquecido, ou seja, a atividade hemorrágica do veneno não estava presente nessas frações. Conforme o esperado, os camundongos do grupo VBj apresentaram intensa hemorragia local, sendo esta mesma situação observada no dorso dos animais que receberam o sobrenadante de 50 kDa, o que determina a presença de componentes hemorrágicos do veneno nessas duas frações.

Figura 14: Fotografias do dorso de camundongos BALB/c injetados com salina, VBj total, UF30, UF50, SB50 e VBj aquecido.

O resumo dos resultados de administração das frações de ultrafiltração está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito do tratamento com salina, VBj aquecido, VBj total e frações sobre a contagem plaquetária, os níveis de fibrinogênio plasmático e a presença de hemorragia no local da injeção (dorso) em camundongos BALB/c (n= 5 – 14).

Grupos	Plaquetas	Fibrinogênio	Hemorragia
Salina (n=14)	N	N	-
VBj (n= 11)	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑
VBj 70°C (n= 5)	N	↓↓↓	-
UF<30 kDa (n= 6)	N	N	-
UF<50 kDa (n= 8)	↓↓	↓↓	-
SB 50 kDa (n=5)	N	↓↓↓	↑↑

4.3 Análise espectrometria de massas da amostra de UF 50 kDa

Após a realização do gel de eletroforese para análise da separação dos compostos do veneno, submetemos a amostra de UF 50 kDa responsável pela indução da trombocitopenia nos camundongos BALB/c à espectrometria de massas para identificação das proteínas presentes nessa amostra.

Foram identificadas 162 proteínas no total dentre essas 30 mostraram ser mais abundantes com escore de 200 a 800. A partir das proteínas mais abundantes foi feito um gráfico representando em porcentagem as principais famílias de toxinas presentes nessa amostra como mostra a Figura 15.

A classe de toxinas mais abundante foram as SVMP constituindo 37% do ultrafiltrado de 50 kDa, seguido pelas PTLC que representaram cerca de 33% da amostra. Dentre as toxinas menos abundantes no ultrafiltrado de 50 kDa ficaram as SVSP (17%), as fosfolipases (10%) e outras (3%).

A tabela com as proteínas mais abundantes no ultrafiltrado de 50 kDa estão no Anexo I.

Figura 15: Representação gráfica das principais famílias de enzimas do VBJ presentes no UF 50 kDa após identificação por espectrometria de massa.

5 DISCUSSÃO

As plaquetas são células importantes para a hemostasia e a perda de sua função ou a alteração em sua quantidade afetam seriamente o organismo envolvido. No envenenamento botrópico, as alterações hemostáticas sistêmicas são um achado clínico-laboratorial comum e afetam mais da metade dos pacientes atendidos. Esse quadro deve-se à ação tóxica do veneno sobre a integridade vascular, ao consumo dos fatores de coagulação e à diminuição do número e função das plaquetas circulantes. Diante disso, investiu-se na compreensão da ação do VBj sobre as plaquetas e realizou-se um estudo comparativo entre as plaquetas de humanos e de camundongos (modelo comumente utilizado em desordens plaquetárias e presa natural das serpentes). Este estudo fez-se necessário para entender os mecanismos envolvidos na ativação e secreção plaquetárias induzidas pelo VBj, bem como a relevância das proteínas do veneno na indução da trombocitopenia em camundongos.

A ação agregante do veneno de *Bothrops jararaca* sobre plaquetas humanas já havia sido descrita anteriormente (120, 121), assim como nas plaquetas de outras espécies como coelhos que também são ativadas e iniciam a formação de agregado plaquetário imediatamente após entrar em contato com VBj (122). Esse fenômeno corrobora com os resultados obtidos em relação às plaquetas das espécies utilizadas neste estudo. A concentração de VBj responsável pela máxima resposta plaquetária (24,4 µg/mL) foi idêntica àquela descrita anteriormente em plaquetas humanas lavadas (108). Ademais, observamos que em plaquetas de camundongos essa concentração também foi suficiente para promover uma agregação de máxima intensidade. Enquanto as plaquetas lavadas de coelhos parecem ser menos responsivas a baixas concentrações VBj atingindo sua máxima resposta em concentrações superiores a 40 µg/mL (122), as plaquetas humanas e murinas se mostraram menos responsivas quando utilizamos a concentração de 48,8 µg/mL. Apesar das diferenças entre espécies, as plaquetas humanas e de camundongos mostraram respostas similares em relação aos efeitos agregantes de VBj. Além disso, as plaquetas de camundongos se mostraram mais sensíveis ainda ao VBj quando comparadas às humanas, pois em concentrações menores, como

a de 6,10 µg/mL, houve em camundongos BALB/c e C57BL/6 curvas de agregação semelhantes àquela provocada pela concentração de 24,4 µg/mL. Inesperadamente, mesmo não tendo corpos densos plaquetários e apresentarem hipoagregação plaquetária à trombina e outros agentes plaquetários (123), as plaquetas dos camundongos pérolas (*Ap3b1^{-/-}*) além de agregarem nas concentrações descritas anteriormente de maneira intensa, se mostraram extremamente sensíveis com as menores concentrações utilizadas (1,52 e 3,05 µg/mL), pois o VBj foi capaz de manter a agregação mesmo na ausência de corpos densos.

Assim como em relação à diferença entre plaquetas humanas e de camundongos em resposta aos agonistas plaquetários conhecidos (124), o presente trabalho demonstrou que em relação ao VBj as distinções entre as espécies se mostraram presentes e que também devem ser consideradas em estudos envolvendo disfunções plaquetárias no envenenamento botrópico. A comparação da intensidade de agregação provocada pelo VBj em relação à trombina, o mais potente agonista plaquetário e o principal responsável pela formação do trombo *in vivo*, já foi caracterizada previamente em plaquetas humanas lavadas (120), em que observou-se que a agregação provocada pelo VBj foi de intensidade menor quando comparado à provocada pela trombina, sendo o mesmo efeito observado no presente estudo no que diz respeito às plaquetas humanas. Apesar do veneno de *B. jararaca*, ser considerado um agente agregante moderado, quando comparado ao veneno de outras espécies do gênero *Bothrops* (125), o VBj se mostrou um potente agonista plaquetário, em relação às plaquetas das linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 idêntico à ação potente da trombina. Em camundongos pérola, a ação da trombina não foi suficiente para manter a segunda onda de agregação plaquetária, enquanto o VBj promoveu intensa agregação sem a necessidade da adição de ADP exógeno.

A ocorrência de sangramentos distantes do local da picada é um sinal clínico comum em vítimas picadas pela serpente *B. jararaca* e às vezes esses pacientes apresentam trombocitopenia e disfunção plaquetária mesmo após tratamento com soro antiofídico e restauração do número de plaquetas circulantes (16, 27, 126). A perda da função plaquetária durante o

envenenamento foi descrita como decorrente da presença de altos níveis de produtos da degradação de fibrina (PDFs), contudo quando os níveis de PDFs diminuíram drasticamente, as plaquetas continuaram a não responder adequadamente aos estímulos externos (27). Outra possibilidade seria um prejuízo no processo de secreção que poderia estar afetando a função plaquetária.

A secreção granular é um processo vital para que as plaquetas consigam efetuar suas funções apropriadamente. A secreção plaquetária ocorre concomitantemente à agregação. Quando as plaquetas são expostas a agonistas, iniciam a secreção do conteúdo de seus grânulos principais – os corpos densos, grânulos α e lisossomos. Em ensaios *ex vivo*, após a ativação com colágeno ou trombina há uma primeira onda de agregação reversível que leva as plaquetas a secretarem o conteúdo de seus grânulos dentre eles o ADP, que por sua vez age como cofator da ativação, amplificando desta forma a resposta plaquetária, tornando a segunda onda de agregação irreversível (127). Os problemas relacionados à secreção dos corpos densos plaquetários podem ser devidos ao número reduzido de grânulos, diminuição do conteúdo granular ou anormalidade no processo de secreção, sendo que independente da causa, a ineficiência da secreção promove uma disfunção significativa na hemostasia primária (128). Para entendermos a relevância da secreção plaquetária na agregação induzida pelo VBj, utilizamos as plaquetas de camundongos pérola com mutação espontânea da síndrome de Hermansky-Pudlak do tipo 2 (HPS2) (83) que como o esperado secretaram quantidades ínfimas de ATP quando comparada a de outras linhagens, independente do agonista utilizado. A secreção de ATP por plaquetas de C57BL/6, BALB/c e de humanos quando estimuladas com trombina foram idênticas quando comparadas com VBj. Dessa forma ficou claro que apesar do veneno promover a secreção dos corpos densos, a agregação irreversível promovida pelo VBj é independente do conteúdo desses grânulos.

Outros compostos primordiais para a estabilização do agregado plaquetário estão presentes nos grânulos α plaquetários. As moléculas armazenadas nesses grânulos podem ser originadas da endocitose de plaquetas circulantes ou sintetizadas por megacariócitos (129). A secreção de

proteínas de origem megacariocítica dos grânulos α , como o PF4, pode ser utilizada como um marcador do grau de ativação plaquetária *in vivo* (130). A ativação plaquetária *in vivo* durante o envenenamento botrópico foi avaliada anteriormente no plasma de coelhos injetados com *B. jararaca* em que não houve diferença nos níveis plasmáticos de PF4 em relação aos animais controle, o que foi justificado pela meia vida curta dessa proteína na circulação (98). Assim como trabalhos realizados *in vivo*, em que a trombina promove a secreção de altos níveis de PF4 (131), nossos resultados mostraram que a trombina promoveu secreção significativa de PF4 tanto em plaquetas humanas como de camundongos BALB/c e que sob o estímulo de VBj foi possível observar uma secreção de PF4 similar à provocada pela trombina. Apesar dos níveis de PF4 plasmáticos estarem dentro dos valores de referência em coelhos envenenados, as plaquetas desses animais apresentaram alterações morfológicas significativas condizentes com estado de secreção e ativação plaquetárias (93).

De forma lenta e menos intensa do que a secreção dos grânulos α e corpos densos, a secreção do conteúdo lisossomal de plaquetas acontece apenas sob a ação de agonistas potentes, como por trombina e altas concentrações de colágeno (132-135). Mesmo sob altas concentrações de trombina, a exocitose do conteúdo lisossomal é parcial sendo em torno de 40 a 60% (118, 119). Isso corrobora com os nossos resultados em que a secreção da enzima lisossomal β -hexosaminidase proveniente da estimulação com trombina nas plaquetas humanas e camundongos BALB/c foi em média de 50%. A liberação de hidrolases ácidas de lisossomos plaquetários já foi descrita *in vivo* após ativação plaquetária em humanos (136), entretanto não há relatos sobre a liberação do conteúdo lisossomal em pacientes ou modelos experimentais de envenenamento botrópico. O presente estudo se atentou em avaliar se a ativação pelo VBj era suficiente para promover a secreção do conteúdo de lisossomos plaquetários. As plaquetas humanas sob o estímulo do VBj apresentaram uma baixa secreção da enzima β -hexosaminidase em relação à trombina. Sabe-se que a secreção lisossomal induzida pela trombina é dependente da ativação secundária por ADP (118), entretanto a razão pela qual o veneno promove um decréscimo na secreção lisossomal de plaquetas

humanas deve ser investigada. Ao contrário dos resultados de secreção lisossomal em plaquetas humanas, as plaquetas de camundongos BALB/c apresentaram um aumento significativo na atividade de β -hexosaminidase, superando a observada quando essas plaquetas foram estimuladas com trombina. O papel das hidrolases ácidas presentes nos lisossomos é contribuir para na remoção do agregado plaquetário facilitando a digestão e remoção do trombo (137). No entanto o presente estudo demonstrou diferenças de secreção lisossomal entre as espécies estudadas e mais investigações deverão ser realizadas para entender qual a influência da secreção lisossomal plaquetária nessas espécies quando o agonista é o VBj, e a importância dessas enzimas no contexto do envenenamento botrópico. Em suma, a ação agonista do VBj sobre a ativação, secreção e agregação das plaquetas é tão potente quanto à provocada pela trombina em camundongos.

O entendimento sobre a participação das principais famílias do VBj sobre a agregação *in vitro* de plaquetas humanas e de camundongos BALB/c fez-se necessário, já que no veneno existem componentes de ação pró e antiagregantes (11).

Dentre os compostos com propriedades inibitórias em relação à agregação plaquetária, sabe-se que a família de toxinas mais abundantes no veneno, as SVMPs (138, 139), possuem moléculas com atividade antiagregante muito bem estabelecida (21). Algumas SVMPs do veneno possuem em sua estrutura o domínio tipo disintegrina, como a jararagina C (derivada da região C- terminal da jararagina de alto peso molecular) que inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (140), enquanto que a jararagina (52 kDa) promove a degradação e clivagem de receptores de colágeno como $\alpha_2\beta_1$ presentes na superfície plaquetária causando prejuízos nos processos de adesão e agregação (141, 142). Para avaliarmos a atuação direta dessas enzimas sobre as plaquetas de humanos e camundongos, observamos que a incubação com o VBj + Na₂EDTA não causou qualquer alteração em relação à curva de agregação quando comparado com veneno total, ou seja, essa família de toxinas parece não ser importante para a ativação e agregação nessas duas espécies. Ademais, tampouco foi constatado qualquer aumento na curva de agregação em relação ao VBj total,

que indicasse que as SVMPs pudessem estar inibindo a agregação plaquetária *in vitro*. Ou seja, essa classe de enzimas parece não ter associação direta sobre a atividade plaquetária em camundongos e humanos.

Em relação às SVSPs, a enzima PA-BJ, presente no VBj, tem ação similar à trombina, pois age diretamente sobre os receptores PAR-1 e PAR-4, induzindo agregação (23) e secreção plaquetárias (143). Outra SVSP do VBj, a botrombina, provoca agregação plaquetária na presença de fibrinogênio exógeno, mas não induz a secreção granular plaquetária (144). As SVSPs do VBj total foram importantes para agregação de plaquetas humanas, mas a inibição da atividade enzimática dessa família sobre a agregação plaquetária não foi suficiente para impedir a formação de agregado plaquetário. Dessa forma, nossos resultados indicam que além das SVSP, outros compostos presentes no VBj estão envolvidos na ativação e consequente agregação das plaquetas. Já as plaquetas de camundongos mantiveram a curva de agregação, sem qualquer alteração em sua intensidade, quando estimuladas pelo VBj + AEBSF. Ou seja, a ativação e agregação em plaquetas de camundongos *ex vivo* é independente tanto de SVMP quanto de SVSP.

Outra família de proteínas encontrada no veneno que interfere na função plaquetária, mas que não possui atividade enzimática são PTLC (36). Dentre as PTLC do veneno de serpentes a botrocetina (coaglutinina) se destaca, pois, foi uma das primeiras PTCL isoladas do veneno de serpente com estrutura e função muito bem caracterizadas. A botrocetina modula a ligação do vWF ao receptor plaquetário GPIIb induzindo a aglutinação de plaquetas (41, 145), independente da massa molecular dos multímeros de vWF (146-148). Além da botrocetina, outra PTCL isolada do veneno chamada proteína ligadora de GPIIb (GPIIb-BP), como o próprio nome diz, se liga diretamente a esse receptor plaquetário causando efeito inibitório *ex vivo* na agregação induzida pela botrocetina na presença de vWF, mas quando as plaquetas são ativadas pelo ADP ou trombina não há prejuízo da formação do agregado plaquetário. Sua ação direta sobre a agregação e secreção de plaquetas não foi constatada (40). Assim como a GPIIb-BP, a lectina de *Bothrops jararaca* (BJL) isolada do veneno não possui atividade modulatória sobre o vWF e também não causa agregação plaquetária (149).

Apesar das CTLs constituírem ao menos um quarto do VBj total (139), ainda é escasso a quantidade de relatos sobre o isolamento e caracterização do mecanismo de ação dessas proteínas sobre as plaquetas. No transcriptoma da glândula de veneno de *B. jararaca* foi observada a presença PTLC similares às descritas em venenos de outras serpentes como a mamushigina beta (veneno da serpente japonesa *Agkistrodon blomhoffii*) (138). Esta última apresentou atividade agonista sobre as plaquetas de maneira similar à outra PTCL, a alboagregrina B (AL-B) proveniente do veneno da serpente do sudeste da Ásia, a *Trimeresurus albolabris*. Essas PTLCs atuam na aglutinação plaquetária sem a necessidade de cofatores ativando diretamente o receptor GPIb presente na superfície plaquetária (43, 150). Uma PTLC chamada rodocitina, isolada do veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma* (encontrada na região do sudeste asiático), se liga de forma específica ao receptor CLEC 2 (C-type lectin-like receptor 2) presente em abundância na superfície plaquetária induzindo a ativação e agregação (151, 152). As plaquetas de camundongos possuem muito mais receptores do tipo CLEC-2 em sua superfície do que plaquetas humanas (153, 154), o que pode nos auxiliar a compreender os resultados obtidos em nossos ensaios de agregação, onde observamos que as plaquetas de camundongos não foram afetadas pelas principais famílias de toxinas que compõem o veneno (SVMPs e SVSPs) e que a agregação das plaquetas humanas, mesmo que diminuídas devido a inibição de SVSPs, não tiveram sua agregação totalmente abolida. Assim, nossos dados indicam que é relevante considerar a participação das PLTCs na ativação e agregação plaquetária pelo VBj *in vitro*.

Os estudos plaquetários *ex vivo* nos permitiram inferir sobre os possíveis mecanismos pelos quais o VBj estaria atuando na ativação, agregação e secreção plaquetárias. A partir disso, investimos no fracionamento e tratamento do veneno a fim de delimitar as proteínas responsáveis por efeitos na ativação e sequestro de plaquetas circulantes em ensaios *in vivo*.

Como descrito anteriormente a trombocitopenia durante o envenenamento botrópico é um achado sistêmico comum em seres humanos e animais experimentais, de vital importância já que as plaquetas são essenciais para a manutenção da hemostasia. As razões para o estabelecimento da

trombocitopenia bem como a disfunção plaquetária se deve a diversos fatores. Apesar da abundância das SVMP no veneno de *B. jararaca* sabe-se que sua participação na trombocitopenia é mínima, já que em estudo realizado anteriormente, observou-se que o veneno total tratado com Na₂EDTA não preveniu a queda na contagem plaquetária de ratos, mas eliminou a hemorragia (25). O mesmo foi observado no nosso estudo em que constatamos que animais injetados com a fração do veneno UF 50 kDa sem a presença das principais hemorraginas do VBj, como a jararagina (52 kDa), HF3 (68 kDa) e botropasina (50 kDa) (155) não apresentaram quadro hemorrágico e a contagem de plaquetas diminuiu, permanecendo abaixo dos valores dos animais controles. Enquanto que em estudo realizado por Kamiguti e colaboradores (1992) (16), foi feita uma associação/correlação entre a presença de altos níveis de hemorragina na circulação sanguínea de pacientes picados por *B. jararaca* com a diminuição do número de plaquetas, em nosso trabalho observamos que nos animais injetados com a fração SB 50 kDa, fração onde estão presentes as hemorraginas mais potentes, houve a presença de quadro hemorrágico semelhante àquele observado nos animais injetados com VBj total. Entretanto, a presença das hemorraginas nessa fração não foram suficientes para promover trombocitopenia. Apesar da participação das SVMP de ação hemorrágica nessa situação ser mínima, não deixa de ser relevante, já que a contagem plaquetária dos animais injetados com UF 50 kDa se mostrou superior àquela observada nos animais injetados com o veneno total, ou seja, a ação proteolítica das SVMPs sobre as células endoteliais causando destruição das mesmas permite o extravasamento sanguíneo contribuindo assim para o agravamento da trombocitopenia.

Assim como as SVMP, as SVSP também contribuem para a ativação da cascata de coagulação e formação de fibrina instável (35, 156). Apesar das SVSP serem relevantes para ativação *in vitro* das plaquetas como visto em trabalhos anteriores (97) e no presente estudo para plaquetas humanas, Yamashita e colaboradores (2014) (25) demonstraram que em ratos injetados com VBj na presença de inibidor de SVSPs não preveniu a queda significativa das plaquetas.

A ação de atividades tóxica e coagulante do VBj sobre a trombocitopenia também foram avaliadas em nosso estudo. O aquecimento do VBj à temperatura de 70°C por 10 minutos eliminou a atividade tóxica do veneno, mas não sua atividade coagulante (Tabela 1) (107). A constatação desse quadro pôde ser observada nos animais injetados com VBj 70°C que, apesar de não apresentarem sinais de hemorragia, tiveram níveis baixos de fibrinogênio plasmático idêntico aos dos animais do grupo VBj total. No que diz respeito às plaquetas, observamos que a eliminação da atividade tóxica do VBj preveniu o decréscimo da contagem plaquetária nesses animais mesmo com a ativação da coagulação. A responsabilidade pela atividade tóxica do veneno já foi associada às SVMPs (157), assim como a ativação dos fatores da cascata de coagulação com formação de trombina intravascular (32). Ademais algumas PTLCs do veneno de serpentes também perdem sua atividade aglutinante devido ao aquecimento (158). A partir dos resultados obtidos constatamos que a atividade sobre o consumo das plaquetas circulantes foi prejudicada pelo aquecimento assim como a trombocitopenia observada no envenenamento não têm relação direta com a atividade coagulante do VBj.

O estudo do fracionamento e aquecimento do VBj nos permitiu ter uma noção sobre em qual parte desse complexo proteico estaria o(s) componente(s) responsável(eis) pela trombocitopenia no envenenamento. Conforme observamos, os compostos presentes na fração UF 50 kDa estariam envolvidos. A partir disso, em colaboração com a equipe da Dra. Solange Serrano, submetemos a fração em questão à espectrometria de massas e dentre as 162 proteínas contabilizadas cerca de 30 delas possuíam escore alto (200-800). As principais famílias de proteínas identificadas nessa fração foram: SVMP (37%), PTLCs (33%), SVSP (17%), PLA₂ e outras proteínas somaram 13%. Sendo a classe de proteínas mais abundante nessa fração – mesmo como os resultados *ex vivo* que mostram que as SVMP não são importantes para a agregação plaquetária – é impossível excluir até o momento totalmente a participação das SVMP na trombocitopenia do envenenamento, mas não podemos desconsiderar o que já foi provado e discutido em relação a essa família de toxinas quanto à sua pequena contribuição na trombocitopenia (25).

A segunda família de proteínas mais abundante nessa fração foram as PTLC. A participação dessas proteínas na trombocitopenia do envenenamento botrópico já foi descrita por Rucavado e colaboradores (2005) (159), que ao investigar qual proteína do veneno de *B. asper* seria responsável pela acelerada queda na contagem plaquetária, verificaram que a PTLC, aspercetina era a principal causadora desse quadro. A aspercetina têm similaridades funcionais com a botrocetina. Sabe-se que em ratos a trombocitopenia e o aumento no tempo de sangramento ocorreu após tratamento intravenoso com altas concentrações de botrocetina purificada, além de apresentarem baixos níveis plasmáticos de vWF (160). Em humanos envenenados por *B. jararaca* com plaquetopenina, os níveis de vWF se encontraram normais ou aumentados (32). Enquanto que em estudo recente realizado pelo nosso grupo a participação da botrocetina sobre a trombocitopenia do envenenamento botrópico foi descartada, pois tanto em ratos injetados com veneno mais anticorpo anti-botrocetina como em camundongos nocautes para vWF injetados apenas com VBJ total, houve intenso consumo das plaquetas circulantes (161). Nossos resultados também descartaram a botrocetina, de 28 kDa, como possível causadora pela trombocitopenia no envenenamento, pois os animais do grupo UF de 30 kDa tiveram contagem plaquetária similar à observada nos animais do controle salina. Além disso, na fração UF 50 kDa, a botrocetina foi identificada, porém seu escore foi baixo de apenas 49, mostrando que era uma proteína minoritária nessa fração, assim como no VBJ total em que a botrocetina aparece em quantidades reduzidas (1 - 2,5 mg em 500 mg) (162). Isso nos permitiu inferir que a participação dessa PTLC não é crucial para o consumo plaquetário e que os responsáveis pela trombocitopenia nos camundongos envenenados têm peso molecular entre 30 e 50 kDa.

Outra PTLC isolada e identificada por Fujimura e colaboradores (1995) (40), a GPIb-BP de 30 kDa tem ação inibitória sobre ativação plaquetária, além de provocar diminuição intensa na contagem de plaquetas em camundongos e cobaias poucas horas após a sua administração na dose de 10-30 µg/kg. Sabe-se que em 3 g de VBJ há cerca de 24 mg de GPIb-BP, o que corresponde quase 1% do veneno total (163). No proteoma do UF 50 kDa, a GPIb-BP teve

escore de 498 sendo abundante nessa fração. A partir da realização de cálculos em relação à dose de GPIb-BP presente no VBj total e na fração UF 50 kDa aplicada em nossos animais, observamos que os nossos camundongos receberam cerca de 12 µg/kg de GPIb-BP, indicando dessa forma a possibilidade desta PTLC participar da queda na contagem plaquetária desses animais.

Dentre as proteínas mais abundantes encontradas no proteoma da fração do UF 50 kDa também foram encontradas SVSPs, PLA₂s, dentre outros compostos que ainda não foram identificadas ou se foram não possuem sua atividade biológica descrita *in vivo*. Inclusive essa situação também foi observada em relação às SVMPs e PLTC que mesmo identificadas a grande maioria não tem sua função biológica determinada *in vivo*.

As proteínas com função biológica conhecida na fração UF 50 kDa foram descritas como fibrinolítica/ fibrinogenolítica (SVMP) (164-166), inibidores de trombina e de protrombina (PTLC) (167), inibidores de agregação plaquetária (SVMP e PTLC) (40, 168) ou sem atividade enzimática (PLA₂) (169, 170), entretanto a importância do isolamento e estudo dessas proteínas é vital para entender melhor sua participação não apenas sobre o consumo rápido das plaquetas circulantes, bem como sua influência em outros elementos do sistema hemostático e no desencadeamento de processos inflamatórios decorrentes do envenenamento botrópico.

Sabe-se que a ativação e secreção plaquetárias, bem como o sequestro dessas células ocorrem durante o envenenamento botrópico (93). Entretanto a fisiopatologia envolvida nessa desordem é complexa e multifatorial, sendo necessário um detalhamento da ação desse veneno sobre as plaquetas. A avaliação *in vitro* dos efeitos do veneno total as plaquetas lavadas tanto de humanos quanto de modelos experimentais foi essencial para entender a ação direta do veneno sobre essas células, sem a interferência de outros elementos sanguíneos, e compreender melhor o mecanismo pelo qual o veneno estimula *ex vivo* e *in vivo* essas plaquetas a ativarem, secretarem e agregarem e o quanto ele é capaz de interferir nessas funções básicas plaquetárias.

A identificação e caracterização biológica do complexo proteico existente no VBj foi essencial para que haja um entendimento aprimorado dos sintomas

e sinais desencadeados por esse veneno em humanos e camundongos e assim promover melhorias na eficácia do tratamento em relação aos distúrbios provenientes desse envenenamento.

6 CONCLUSÃO

1 - O VBj foi capaz de promover a agregação e secreção de plaquetas lavadas de humanos e de duas linhagens de camundongos – BALB/c e C57BL/6 – e sua ação é distinta em relação às espécies estudadas quando comparada com a trombina;

2 - Mesmo na ausência de corpos densos plaquetários, o VBj tem ação agonista potente sobre a agregação plaquetária de plaquetas de camundongos pérola, evidenciando que a agregação pelo VBj é independente da secreção plaquetária;

3 - A trombocitopenia desencadeada no envenenamento botrópico mostrou ser independente da capacidade de reduzir o fibrinogênio e da atividade hemorrágica presente no veneno;

4 - As famílias do VBj com atividades biológicas amplamente descritas na literatura, como as SVMP e SVSP são pouco ativas na ativação e agregação plaquetárias *ex vivo*, sendo as SVSP importantes apenas em ensaios envolvendo plaquetas humanas;

5 - A fração responsável pela trombocitopenia induzida pelo VBj corresponde a toxinas de peso molecular entre 30 – 50 kDa e que a probabilidade da participação de PLTC nesse processo é grande, porém mais estudos deverão ser realizados a partir dessa fração, para determinar se de fato os componentes do VBj responsáveis pelo rápido consumo de plaquetas circulantes em camundongos são PTLCs.

7 REFERÊNCIAS

1. França FOS, Málaque CMS. Acidente Botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad JV, editors. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 81-95.
2. França FOS, CMS. M. Acidente Botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, V. HJ, editors. Animais peçonhentos no Brasil – Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 81-95.
3. Ho-Tin-Noe B, Boulaftali Y, Camerer E. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation. *Blood*. 2018;131(3):277-88.
4. SINAN. Sistemas de Informação de Agravos de Notificações: Brasil; 2016 [cited 22 de setembro de 2018 22 setembro de 2018]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>.
5. FUNASA. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
6. Melgarejo AR. Serpentes Peçonhentas no Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad VJ, editors. Animais Peçonhentos no Brasil. 1 ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 33-61.
7. Marques OAV, Sazima I. História Natural das Serpentes. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad JV, editors. Animais Peçonhentos no Brasil. 1 ed. São Paulo: Sarvier; 2003. p. 62-71.
8. Cardoso JL, Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q J Med*. 1993;86(5):315-25.
9. Ribeiro LA, Jorge MT. [Bites by snakes in the genus *Bothrops*: a series of 3,139 cases]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(6):475-80.
10. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD, Warrell DA, et al. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon*. 2008;51(8):1440-8.
11. Sano-Martins IS, Santoro ML. Distúrbios Hemostáticos em Envenenamento por Animais Peçonhentos no Brasil. In: Cardoso JLCC, França FOS, Fan HW, Malaque CMS, Haddad JV, editors. Animais Peçonhentos no Brasil: Sarvier; 2003. p. 289-309.
12. Nahas L, Kamiguti AS, Barros MA. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb Haemost*. 1979;41(2):314-28.
13. Serrano SM, Maroun RC. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. 2005;45(8):1115-32.
14. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1791-9.
15. Kini RM. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. *Toxicon*. 2005;45(8):1133-45.
16. Kamiguti AS, Rugman FP, Theakston RD, França FO, Ishii H, Hay CR. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. Butantan Institute Antivenom Study Group. *Thromb Haemost*. 1992;67(4):484-8.
17. Maruyama M, Kamiguti AS, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Chudzinski AM, Santoro ML, et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). *Thromb Haemost*. 1990;63(3):449-53.
18. Zychar BC, Dale CS, Demarchi DS, Gonçalves LR. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*. 2010;55(2-3):227-34.
19. Chacur M, Picolo G, Teixeira CF, Cury Y. Bradykinin is involved in hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 2002;40(7):1047-51.

20. Carneiro AS, Ribeiro OG, De Franco M, Cabrera WH, Vorraro F, Siqueira M, et al. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon*. 2002;40(11):1571-9.
21. Kamiguti AS. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 2005;45(8):1041-9.
22. Clemetson KJ, Lu Q, Clemetson JM. Snake C-type lectin-like proteins and platelet receptors. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005;34(4-5):150-5.
23. Santos BF, Serrano SM, Kuliopulos A, Niewiarowski S. Interaction of viper venom serine peptidases with thrombin receptors on human platelets. *FEBS Lett*. 2000;477(3):199-202.
24. Zingali RB, Jandrot-Perrus M, Guillin MC, Bon C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*. 1993;32(40):10794-802.
25. Yamashita KM, Alves AF, Barbaro KC, Santoro ML. *Bothrops jararaca* venom metalloproteinases are essential for coagulopathy and increase plasma tissue factor levels during envenomation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5):e2814.
26. Gonçalves LR, Mariano M. Local haemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Mediators Inflamm*. 2000;9(2):101-7.
27. Sano-Martins IS, Santoro ML, Castro SC, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RD. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thromb Res*. 1997;87(2):183-95.
28. Nicolau CA, Carvalho PC, Junqueira-de-Azevedo IL, Teixeira-Ferreira A, Junqueira M, Perales J, et al. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. *J Proteomics*. 2017;151:214-31.
29. Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J*. 2008;275(12):3016-30.
30. Escalante T, Nunez J, Moura da Silva AM, Rucavado A, Theakston RD, Gutierrez JM. Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003;193(1):17-28.
31. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Shimaya K, Mihara H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. *Toxicon*. 1992;30(11):1387-97.
32. Kamiguti AS, Cardoso JL, Theakston RD, Sano-Martins IS, Hutton RA, Rugman FP, et al. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon*. 1991;29(8):961-72.
33. Santoro ML, Sano-Martins IS. Different clotting mechanisms of *Bothrops jararaca* snake venom on human and rabbit plasmas. *Toxicon*. 1993;31(6):733-42.
34. Kamiguti AS, Moura-da-Silva AM, Laing GD, Knapp T, Zuzel M, Crampton JM, et al. Collagen-induced secretion-dependent phase of platelet aggregation is inhibited by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1335(1-2):209-17.
35. Serrano SM, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CA, et al. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur J Biochem*. 1998;251(3):845-53.
36. Sajevec T, Leonardi A, Krizaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon*. 2011;57(5):627-45.
37. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*. 2005;272(24):6179-217.
38. Ishikawa M, Kumashiro M, Yamazaki Y, Atoda H, Morita T. Anticoagulant mechanism of factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. *J Biochem*. 2009;145(1):123-8.

39. Arlinghaus FT, Eble JA. C-type lectin-like proteins from snake venoms. *Toxicon*. 2012;60(4):512-9.
40. Fujimura Y, Ikeda Y, Miura S, Yoshida E, Shima H, Nishida S, et al. Isolation and characterization of jararaca GPIb-BP, a snake venom antagonist specific to platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*. 1995;74(2):743-50.
41. Read MS, Smith SV, Lamb MA, Brinkhous KM. Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor. *Blood*. 1989;74(3):1031-5.
42. Radis-Baptista G, Moreno FB, de Lima Nogueira L, Martins AM, de Oliveira Toyama D, Toyama MH, et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog of convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. *Cell Biochem Biophys*. 2006;44(3):412-23.
43. Peng M, Lu W, Kirby EP. Alboaggregin-B: a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib. *Biochemistry*. 1991;30(49):11529-36.
44. Peng M, Lu W, Beviglia L, Niewiarowski S, Kirby EP. Echicetin: a snake venom protein that inhibits binding of von Willebrand factor and alboaggregins to platelet glycoprotein Ib. *Blood*. 1993;81(9):2321-8.
45. Shin Y, Okuyama I, Hasegawa J, Morita T. Molecular cloning of glycoprotein Ib-binding protein, flavocetin-A, which inhibits platelet aggregation. *Thromb Res*. 2000;99(3):239-47.
46. Castanheira LE, Nunes DC, Cardoso TM, Santos Pde S, Goulart LR, Rodrigues RS, et al. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Int J Biol Macromol*. 2013;54:57-64.
47. Nunes DC, Rodrigues RS, Lucena MN, Cologna CT, Oliveira AC, Hamaguchi A, et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011;154(3):226-33.
48. Sartim MA, Sampaio SV. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2015;21:35.
49. Castanheira L, Naves de Souza DL, Silva RJ, Barbosa B, Mineo JR, Tudini KA, et al. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. *Int J Biol Macromol*. 2015;74:568-74.
50. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):195-8.
51. Cloutier N, Allaey I, Marcoux G, Machlus KR, Mailhot B, Zufferey A, et al. Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(7):E1550-E9.
52. Hamzeh-Cognasse H, Damien P, Chabert A, Pozzetto B, Cognasse F, Garraud O. Platelets and infections - complex interactions with bacteria. *Front Immunol*. 2015;6:82.
53. Chabert A, Hamzeh-Cognasse H, Pozzetto B, Cognasse F, Schattner M, Gomez RM, et al. Human platelets and their capacity of binding viruses: meaning and challenges? *BMC Immunol*. 2015;16:26.
54. Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):123-34.
55. Gay LJ, Felding-Habermann B. Platelets alter tumor cell attributes to propel metastasis: programming in transit. *Cancer Cell*. 2011;20(5):553-4.
56. Humphrey JH. Origin of blood platelets. *Nature*. 1955;176(4470):38.
57. Schmitt A, Guichard J, Masse JM, Debili N, Cramer EM. Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol*. 2001;29(11):1295-302.
58. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:781857.
59. Thon J N, J.E. I. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handb Exp Pharmacol* 2012. p. 3–22.

60. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.
61. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*. 2015;29(3):153-62.
62. Tomiyama Y, Shiraga M, S.J. S. Platelet membrane proteins as adhesion receptors. In: Gresele P, Page C, Fuster V, J. V, editors. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*: Cambridge University Press; 2002. p. 80-92.
63. Colman R, Clowes A, George J, Goldhaber S, Marder V. Overview of Hemostasis. In: Colman R, Clowes A, Goldhaber S, Marder V, George J, editors. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1-51.
64. Arnout J, Hoylaerts M, Lijnen H. Haemostasis. In: Higgs A, Moncada S, editors. *The Vascular Endothelium II*. 176: Springer Berlin Heidelberg; 2006. p. 1-41.
65. Clemetson KJ. Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost*. 1995;74(1):111-6.
66. Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Reimers HJ, Cazenave JP, Mustard JF. Mechanisms of platelet shape change, aggregation, and release induced by collagen, thrombin, or A23,187. *J Lab Clin Med*. 1977;90(4):707-19.
67. Inflamaço Aguda e Crnica. In: Cotran R, Abbas A, Fausto N, Robbins S, Kumar V, editors. *Robbins & Cotran Patologia-Bases Patolgicas da Doenas*. 7 ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 49-89.
68. Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mustard JF. Synergism between platelet aggregating agents: the role of the arachidonate pathway. *Thromb Res*. 1977;11(5):567-80.
69. Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res*. 2013;6(3):299-309.
70. Gachet C, JP. C. Platelet receptors: ADP. In: Gresele P, Page C, Fuster V, J. V, editors. *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders*: Cambridge University Press; 2002. p. 127-39.
71. Fox JE, Boyles JK, Berndt MC, Steffen PK, Anderson LK. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol*. 1988;106(5):1525-38.
72. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2341-9.
73. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009;23(4):177-89.
74. Whiteheart SW. Platelet granules: surprise packages. *Blood*. 2011;118(5):1190-1.
75. Ren Q, Ye S, Whiteheart SW. The platelet release reaction: just when you thought platelet secretion was simple. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(5):537-41.
76. Thon JN, Peters CG, Machlus KR, Aslam R, Rowley J, Macleod H, et al. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol*. 2012;198(4):561-74.
77. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):13932-7.
78. Kim K, Hahm E, Li J, Holbrook LM, Sasikumar P, Stanley RG, et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood*. 2013;122(6):1052-61.
79. White JG. Platelet granule disorders. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1986;4(4):337-77.
80. Ambrosio AL, Di Pietro SM. Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis. *Platelets*. 2017;28(2):138-46.
81. Chen CH, Lo RW, Urban D, Pluthero FG, Kahr WH. alpha-granule biogenesis: from disease to discovery. *Platelets*. 2017;28(2):147-54.

82. Swank RT, Novak EK, McGarry MP, Rusiniak ME, Feng L. Mouse models of Hermansky Pudlak syndrome: a review. *Pigment Cell Res.* 1998;11(2):60-80.
83. Feng L, Novak EK, Hartnell LM, Bonifacino JS, Collinson LM, Swank RT. The Hermansky-Pudlak syndrome 1 (HPS1) and HPS2 genes independently contribute to the production and function of platelet dense granules, melanosomes, and lysosomes. *Blood.* 2002;99(5):1651-8.
84. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 2000;14(10):1265-78.
85. Huizing M, Anikster Y, Gahl WA. Hermansky-Pudlak syndrome and related disorders of organelle formation. *Traffic.* 2000;1(11):823-35.
86. Anikster Y, Huizing M, White J, Shevchenko YO, Fitzpatrick DL, Touchman JW, et al. Mutation of a new gene causes a unique form of Hermansky-Pudlak syndrome in a genetic isolate of central Puerto Rico. *Nat Genet.* 2001;28(4):376-80.
87. Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell.* 1999;3(1):11-21.
88. Botero JP, Chen D, Majerus JA, Coon LM, He R, Warad DM, et al. Hermansky-Pudlak syndrome subtype 5 (HPS-5) novel mutation in a 65 year-old with oculocutaneous hypopigmentation and mild bleeding diathesis: The importance of recognizing a subtle phenotype. *Platelets.* 2018;29(1):91-4.
89. Sandrock-Lang K, Bockelmann D, Eberl W, Schmitt-Kastner S, Zieger B. A novel nonsense mutation in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome type 4. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;69:113-6.
90. Feng L, Rigatti BW, Novak EK, Gorin MB, Swank RT. Genomic structure of the mouse *Ap3b1* gene in normal and pearl mice. *Genomics.* 2000;69(3):370-9.
91. Bultema JJ, Ambrosio AL, Burek CL, Di Pietro SM. BLOC-2, AP-3, and AP-1 proteins function in concert with Rab38 and Rab32 proteins to mediate protein trafficking to lysosome-related organelles. *J Biol Chem.* 2012;287(23):19550-63.
92. Santoro ML, Sano-Martins IS. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thromb Haemost.* 2004;92(2):369-83.
93. Santoro ML, Sano-Martins IS, Chamone DA. *In Vivo* Platelet Activation Induced by *Bothrops jararaca* Venom in Rabbits. *Platelets.* 1994;5(3):162-70.
94. Nahas L, Kamiguti AS, Rzeppa HW, Sano IS, Matsunaga S. Effect of heparin on the coagulant action of snake venoms. *Toxicon.* 1975;13(6):457-63.
95. Yamashita KM, Nogueira TO, Senise LV, Cirillo MC, Gonçalves LR, Sano-Martins IS, et al. Involvement of circulating platelets on the hyperalgesic response evoked by carrageenan and *Bothrops jararaca* snake venom. *J Thromb Haemost.* 2011;9(10):2057-66.
96. Sachetto ATA. Alterações hemostáticas e de estado redox no envenenamento por *Bothrops jararaca*: modulação pelo antioxidante natural rutina (quercetina-3-rutinosídeo). São Paulo: Universidade de São Paulo; 2018.
97. Serrano SM, Mentele R, Sampaio CA, 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.* 1995;34(21):7186-93.
98. Santoro ML. Contribuição à investigação das alterações hemostáticas induzidas pelo veneno da serpente *Bothrops jararaca* em coelhos: estudo das glicoproteínas da membrana, função, secreção e sobrevivência plaquetárias: Universidade de São Paulo; 2002.
99. Matsui T, Hamako J, Titani K. Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. *Toxins (Basel).* 2010;2(1):10-23.
100. Koh CY, Kini RM. From snake venom toxins to therapeutics--cardiovascular examples. *Toxicon.* 2012;59(4):497-506.

101. Casal JA, Cano E, Tutor JC. Beta-hexosaminidase isoenzyme profiles in serum, plasma, platelets and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes. Clin Biochem. 2005;38(10):938-42.
102. Nahas L, Macfarlane RG, Denson KW. A Study of the Coagulant Action of Eight Snake Venoms. Thromb Diath Haemorrh. 1964;12:355-67.
103. Contant G, Gouault-Heilmann M, Martinoli JL. Heparin inactivation during blood storage: its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole-C.T.A.D. mixture. Thromb Res. 1983;31(2):365-74.
104. Holmsen H, Dangelmaier CA. Measurement of secretion of lysosomal acid glycosidases. In: Hawiger J, editor. Methods in Enzymology. 169. San Diego: Academic Press Inc.; 1989. p. 336-42.
105. Allen M, Millett P, Dawes E, Rushton N. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers *in vitro*. Clin Mater. 1994;16(4):189-94.
106. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Text book of clinical chemistry. 2 ed 1986.
107. Taborda L. Princípios tóxico, coagulante e proteolítico do veneno de *Bothrops jararaca*. Memórias do Instituto Butantan – Tomo XIV. São Paulo 1940. p. 167- 80.
108. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon. 2010;56(8):1443-58.
109. Ratnoff OD, Menzie C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. J Lab Clin Med. 1951;37(2):316-20.
110. Noble JE, MJA B. Quantitation of protein. In: Burgess RR, MP. D, editors. Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification. 463. 2 ed: Elsevier; 2009. p. 80-3.
111. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-5.
112. Aksamitiene E, Hoek JB, Kiyatkin A. Multistrip Western blotting: a tool for comparative quantitative analysis of multiple proteins. Methods Mol Biol. 2015;1312:197-226.
113. Blum H, Beier H, HJ. G. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 1987;8(2):93-9.
114. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods. 2009;6(5):359-62.
115. He L, Diedrich J, Chu YY, Yates JR, 3rd. Extracting Accurate Precursor Information for Tandem Mass Spectra by RawConverter. Anal Chem. 2015;87(22):11361-7.
116. Junqueira-de-Azevedo IL, Bastos CM, Ho PL, Luna MS, Yamanouye N, Casewell NR. Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. Mol Biol Evol. 2015;32(3):754-66.
117. Box GEP, Cox DR. An Analysis of Transformations. Journal of the Royal Statistical Society. 1964; 26,: 211-52.
118. Sodergren AL, Svensson Holm AC, Ramstrom S, Lindstrom EG, Grenegard M, Ollinger K. Thrombin-induced lysosomal exocytosis in human platelets is dependent on secondary activation by ADP and regulated by endothelial-derived substances. Platelets. 2016;27(1):86-92.
119. Vladutiu GD, Dangelmaier CA, Amigone V, Van Oost BA, Holmsen H. High- and low-uptake forms of beta-hexosaminidase in human platelets. Selective retention of the high-uptake form during stimulation with thrombin. Biochim Biophys Acta. 1984;802(3):435-41.
120. Davey MG, Luscher EF. Actions of some coagulant snake venoms on blood platelets. Nature. 1965;207(998):730-2.
121. Davey MG, Luscher EF. Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. Nature. 1967;216(5118):857-8.
122. Zingali RB, Carlini CR, Francischetti IM, Guimarães JA. *Bothrops jararaca* snake venom: effects on platelet aggregation. Thromb Res. 1990;58(3):303-16.

123. Weiss HJ. Inherited abnormalities of platelet granules and signal transduction. In: R.W. Colman JH, V. J. Marder and E.W. Salzman, editor. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. 3 ed: J. B. Lippincott; 1993. p. 673-84.
124. Nylander S, Mattsson C, Lindahl TL. Characterisation of species differences in the platelet ADP and thrombin response. *Thromb Res*. 2006;117(5):543-9.
125. Francischetti IM, Castro HC, Zingali RB, Carlini CR, Guimarães JA. *Bothrops* sp. snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1998;119(1):21-9.
126. Málaque CMS, Duayer IF, Santoro ML. Acute kidney injury induced by thrombotic microangiopathy in two cases of *Bothrops* envenomation. *Journal: Clinical Toxicology*. 2018.
127. Gachet C, Cazenave JP. Platelet receptors: ADP. In: Gresele P, Page C, Fuster V, Vermynen J, editors. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Cambridge University Press; 2002. p. 127-39.
128. Carr ME, Jr., Hines S, Carr SL, Todd WM, Taylor TL, Mohanty L. Storage pool disease in chronic lymphocytic leukemia: abnormal aggregation and secretion without bleeding. *Am J Med Sci*. 1997;313(3):176-81.
129. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 1993;7(1):52-62.
130. Kaplan KL, Owen J. Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood*. 1981;57(2):199-202.
131. Moriau M, Rodhain J, Noel H, Beys-Col CD, Masure R. Comparative effects of proteinase inhibitors, plasminogen antiactivators, heparin and acetylsalicylic acid on the experimental disseminated intravascular coagulation induced by thrombin. *Thromb Diath Haemorrh*. 1974;32(1):171-88.
132. Holmsen H, Day HJ. The selectivity of the thrombin-induced platelet release reaction: subcellular localization of released and retained constituents. *J Lab Clin Med*. 1970;75(5):840-55.
133. Metzelaar MJ, Clevers HC. Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb Haemost*. 1992;68(4):378-82.
134. Mirlashari MR, Rynningen A, Mikkelsen HM, Fukami MH. Differential secretion of blood platelet storage granules. *Platelets*. 1996;7(5-6):313-20.
135. Jonnalagadda D, Izu LT, Whiteheart SW. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood*. 2012;120(26):5209-16.
136. Ciferri S, Emiliani C, Guglielmini G, Orlacchio A, Nenci GG, Gresele P. Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation. *Thromb Haemost*. 2000;83(1):157-64.
137. Rendu F, Brohard-Bohn B. Platelet organelles. In: Gresele P, Page C, Fuster V, Vermynen J, editors. Platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Cambridge Press; 2002. p. 104-12.
138. Cidade DA, Simão TA, Dávila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, et al. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon*. 2006;48(4):437-61.
139. Zelanis A, Andrade-Silva D, Rocha MM, Furtado MF, Serrano SM, Junqueira-de-Azevedo IL, et al. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):e1554.
140. Usami Y, Fujimura Y, Miura S, Shima H, Yoshida E, Yoshioka A, et al. A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201(1):331-9.
141. De Luca M, Ward CM, Ohmori K, Andrews RK, Berndt MC. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, alpha 2 beta 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206(2):570-6.

142. Kamiguti AS, Hay CR, Zuzel M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem J.* 1996;320 (Pt 2):635-41.
143. Oliveira AK. Caracterização proteômica comparativa da agregação plaquetária induzida pela trombina e pela PA-BJ, uma serinaprotease do veneno da *Bothrops jararaca*: Universidade de São Paulo; 2015.
144. Nishida S, Fujimura Y, Miura S, Ozaki Y, Usami Y, Suzuki M, et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry.* 1994;33(7):1843-9.
145. Fukuda K, Doggett T, Laurenzi IJ, Liddington RC, Diacovo TG. The snake venom protein botrocetin acts as a biological brace to promote dysfunctional platelet aggregation. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(2):152-9.
146. Brinkhous KM, Read MS, Fricke WA, Wagner RH. Botrocetin (venom coagglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(5):1463-6.
147. Howard MA, Perkin J, Salem HH, Firkin BG. The agglutination of human platelets by botrocetin: evidence that botrocetin and ristocetin act at different sites on the factor VIII molecule and platelet membrane. *Br J Haematol.* 1984;57(1):25-35.
148. Fukuda K, Doggett TA, Bankston LA, Cruz MA, Diacovo TG, Liddington RC. Structural basis of von Willebrand factor activation by the snake toxin botrocetin. *Structure.* 2002;10(7):943-50.
149. Ozeki Y, Matsui T, Hamako J, Suzuki M, Fujimura Y, Yoshida E, et al. C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. *Arch Biochem Biophys.* 1994;308(1):306-10.
150. Sakurai Y, Fujimura Y, Kokubo T, Imamura K, Kawasaki T, Handa M, et al. The cDNA cloning and molecular characterization of a snake venom platelet glycoprotein Ib-binding protein, mamushigin, from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. *Thromb Haemost.* 1998;79(6):1199-207.
151. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, et al. Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem.* 2007;282(36):25993-6001.
152. Severin S, Pollitt AY, Navarro-Nunez L, Nash CA, Mourao-Sa D, Eble JA, et al. Syk-dependent phosphorylation of CLEC-2: a novel mechanism of hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif signaling. *J Biol Chem.* 2011;286(6):4107-16.
153. Gitz E, Pollitt AY, Gitz-Francois JJ, Alshehri O, Mori J, Montague S, et al. CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles. *Blood.* 2014;124(14):2262-70.
154. Zeiler M, Moser M, Mann M. Copy number analysis of the murine platelet proteome spanning the complete abundance range. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(12):3435-45.
155. Oliveira AK, Paes Leme AF, Assakura MT, Menezes MC, Zelanis A, Tashima AK, et al. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* 2009;53(7-8):797-801.
156. Watanabe L, Vieira DF, Bortoleto RK, Arni RK. Crystallization of bothrombin, a fibrinogen-converting serine protease isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2002;58(Pt 6 Pt 2):1036-8.
157. Chacon F, Oviedo A, Escalante T, Solano G, Rucavado A, Gutierrez JM. The lethality test used for estimating the potency of antivenoms against *Bothrops asper* snake venom: pathophysiological mechanisms, prophylactic analgesia, and a surrogate in vitro assay. *Toxicon.* 2015;93:41-50.

158. Mendonça-Franqueiro Ede P, Alves-Paiva Rde M, Sartim MA, Callejon DR, Paiva HH, Antonucci GA, et al. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from *Bothrops atrox* snake venom. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011;43(3):181-92.
159. Rucavado A, Soto M, Escalante T, Loría GD, Arni R, Gutiérrez JM. Thrombocytopenia and platelet hypoaggregation induced by *Bothrops asper* snake venom. Toxins involved and their contribution to metalloproteinase-induced pulmonary hemorrhage. *Thromb Haemost*. 2005;94(1):123-31.
160. Sanders WE, Read MS, Reddick RL, Garriss JB, Brinkhous KM. Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin. An animal model. *Lab Invest*. 1988;59(4):443-52.
161. Thomazini CM. Envolvimento do fator de von Willebrand na plaquetopenia do envenenamento experimental pela serpente *Bothrops jararaca*: participação da botrocetina e metaloproteínas do veneno. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2018.
162. Fujimura Y, Titani K, Usami Y, Suzuki M, Oyama R, Matsui T, et al. Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 1991;30(7):1957-64.
163. Fujimura Y, Kawasaki T, Titani K. Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. *Thromb Haemost*. 1996;76(5):633-9.
164. Bello CA, Hermogenes AL, Magalhães A, Veiga SS, Gremski LH, Richardson M, et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. 2006;88(2):189-200.
165. Gremski LH, Chaim OM, Paludo KS, Sade YB, Otuki MF, Richardson M, et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Toxicon*. 2007;50(1):120-34.
166. Maruyama M, Sugiki M, Yoshida E, Mihara H, Nakajima N. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon*. 1992;30(8):853-64.
167. Oliveira-Carvalho AL, Guimarães PR, Abreu PA, Dutra DL, Junqueira-de-Azevedo IL, Rodrigues CR, et al. Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. *Toxicon*. 2008;51(4):659-71.
168. Modesto JC, Junqueira-de-Azevedo IL, Neves-Ferreira AG, Fritzen M, Oliva ML, Ho PL, et al. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. *Biol Chem*. 2005;386(6):589-600.
169. Mancuso LC, Correa MM, Vieira CA, Cunha OA, Lachat JJ, de Araujo HS, et al. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I, a new myotoxic protein. *Toxicon*. 1995;33(5):615-26.
170. Dos Santos JI, Cardoso FF, Soares AM, Dal Pai Silva M, Gallacci M, Fontes MR. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA(2) inhibition. *PLoS One*. 2011;6(12):e28521.
171. Baldo C, Tanjoni I, Leon IR, Batista IF, Della-Casa MS, Clissa PB, et al. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararagin, a P-III SVMP. *Toxicon*. 2008;51(1):54-65.

Anexo I

Tabela - Análise por espectrometria de massas das proteínas presentes na amostra UF de 50 kDa. As proteínas estão descritas em ordem decrescente de escore, que reflete a combinação de todos os espectros de massa que podem ser atribuídos às sequências de aminoácidos dentro de determinada proteína, de tal modo que um escore mais alto indica um dado mais confiável.

Descrição da proteína / Espécie/ (código de acesso Uniprot)	Escore	Cobertura de sequência (%)	Classe de toxina	Função biológica descrita	Sequências identificadas
Zinc metalloproteinase/ disintegrin/ <i>Bothrops insularis</i> (Q5XUW8)	813	30,9	SVMP- PI	Inibe agregação plaquetária por ADP, trombina e colágeno, não- hemorrágica, possui atividade ativadora de protrombina ref (168).	001 MIQVLLVTIC LAFFPYQGSS IILESGNVND YEVVYARKVT ELPGKAVQPK YEDAMQYEFK 061 VNGEFVVLHL EKNKGLFSED YSETHYSPDG RQIITYPPFE DHCYYHGRIE NDADSTASIS 121 ACNGLKGHFQ LQGETYLIET LKLPDSEAHA VYKYENVEKE DEAPKMCVGT ETNWESYEPI 181 EKASQSNLTP EQQKFSPRYI ELAVVADHGM FTKYNSNLNT IRTRVHEMVN TLNGFFRSVN 241 VDASLANLEV WSKKDLIKVE KDSSKTLTFS GEWRERDLLP RISHDHAQLL TTIVFDQQT 301 GLAYTAGMCD PRQSVAVVMD HSKKNLQVAV TMAHELGHNL GMDHDDTCTC GAKSCIMAST 361 ISKGLSFEFS KCSQNQYQTY LTQHNPCIL NKPLTTVSGN ELLEAGEECD CGAPENPCCD 421 AATCKLRPA QCAEGLCCDQ CRFKGAGKIC RRARGDNFDD RCTGQSADCP RNRFHA
BJAR454SVMPPI01 *	682	25,1	SVMP-PI	Desconhecida	001 MIEVILVTIC LAVFFPYQGSS IILESGNVND YEVVYARKVT ALPKGAVQPK YEDAMQYEFK 061 VNGEFVVLHL EKNKGLFSED YSETHYSPDG RQIITYPPFE DHCYYHGRIE NDADSTASIS 121 ACNGLKGHFQ LQGETYLIET LKLLNSEVHA VYKYENVEKE DEAPKMCVGT ETNWESYEPI 181 KKASQSNLTP EQQKFSPRYI ELAVVADHGM FTKYNSNLNT IRTRVHEMLN TVNGFFRSVN 241 VKASLANLEV WSKKDLIKVE KDSSKTLTFS GEWRERDLLP RISHDHAQLL TTIVFDNVVI 301 GITKFGKMD PKLSVAVVMD HSKKNLQVAV TMAHELGHNL GMDHDDTCTC CNAPSCIMAD 361 TLSEVLSYEF SDCSQNQYQT YLTQHNPCIL LNKPLLTVSG NELLEA
BJAR454SVMPPII03 *	632	20,8	SVMP- PIII	Desconhecida	001 MIQVLLVTIC LAVFFPYQGSS IILESGNVND YEVVYARKVT ALPKGAVQPK YEDAMQYEFK 061 VNGEFVVLHL EKNKGLFSED YSETHYSPDG RQIITYPPFE DHCYYHGRIE NDADSTASIS 121 ACNGLKGHFQ LQGETYLIET LKLLNSEVHA VYKYENVEKE DEAPKMCVGT ETNWESYEPI 181 KKASQSNLTP EQQKFSPRYI ELAVVADHGM FTKYNSNLNT IRTRVHEMLN NINEVIRSVN 241 TRVSLTNVEI WSDQDLIDVQ SSSNTLNSF GEWRERDLLP RISHDHAQLL TAVVFDQQT 301 GRAYTAGMCD PRYSVGVMMD HSEINLQVAA TMAHELGHNL GMHHDGNQCH CNAPSCVMAD 361 TLSEGLSYEF SDCSQNQYQT YLTQHNPCIL LNEPLTIVSG NELLEAGEEC DCGAPENPCC 421 DAATCNLRPG AQCAEGLCCD QCRFMKEGTV CRIARGDDMD DYCTGQSAGC PRNPFHA
BJAR454SVMPPII06 *	612	27	SVMP-PII	Desconhecida	001 MIQVLLVTIC LAVFFPYQGSS IILESGNVND YEVVYARKVT ALPKGAVQPM YEDAMQYELK 061 VNGEFVVLHL EKNKGLFSKD YSETHYSPDG RQIITYPPFE DHCYYHGRIE NDADSTASIS 121 ACNGLKGHFQ LQGETYFIEP LELPDSEAHA VFKYENVEKE DEAPKMCVGT ETNWESYEPI 181 KKASQSNLTP EQQKFSPRYI ELAVVADHGM FTKYNSNLNT IRTRVHEMLN TVNGFFRSVN 241 VDASLANLEV WSKKDLIKVE KDSSKTLTFS GEWRERDLLP RISHDHAQLL TTIVFDNVVI 301 GITKFGKMD PKLSVGVMMD HSEINLQVAA AMAHELGHNL GMHHDGNQCH CNAPSCIMAD 361 TLSEGLSYEF SDCSQNQYET YLTQHNPCIL LNEPLTIVSG NELLEAGEEC DCGAPENPCC 421 DAATCNLRPG AQCAEGLCCD QCRFMKEGTV CRIARGDDMD DYCTGQSAGC PRNPFHA
Snake venom metalloproteinase BnP2 (P0C6S1)	551	100	SVMP-PI	Não possui atividade hemorrágica e miotóxica. Ela hidrolisa as cadeias α e β , sem afetar a cadeia γ . Induz apoptose de células endoteliais ref. (171)	001 YIELAVVDH GMFTKYNSNI DTIRVHEMVN TVDGFRRSMN VASIANIEV WSKTITSFGE 061 WRERDIIPR
Snaclec GPIB-binding protein subunit alpha (Q9PSM6)	498	50,7	PTLC	Liga-se ao receptor GPIb plaquetário inibindo a ligação do vWF a esse receptor. Não induz agregação ou secreção plaquetária <i>ex vivo</i> ref. (40) <i>In vivo</i> causa plaquetopenia ref. (163).	001 DTPFECPSDW STHRQYCYKF FQKESWDDR SEYDAERFCS EQAKGGHLVS IESDEEADFV 061 AQLVAPNIGK SKYYVWIGLR IENKKQCCSS KWSYDSSVS ENLVGRNVKK CFALEKQKGF 121 RKWVNIDCE GNPFVCKFIR PR
BJAR454CTL08 *	486	36,2	PTLC	Desconhecida	001 MGRFIFVSFG LLVVAVLSLG TDTFECPSD WSTRHQCYSK FQKESWDD VSWYDAERFC 061 SEQAKGGHLV SIESDEEADF VAQLVAPNIG ESKYYVWIGL R IENKKQCCS SKWSYDSSVS 121 YENLVRRNVK KCFALEKKQG FRKWVNIDCV EGNPFVCKFI RPR
Snaclec GPIB-binding protein subunit beta <i>Bothrops jararaca</i> (Q9PSM5)	474	47,2	PTLC	Liga-se ao receptor GPIb plaquetário inibindo a ligação do vWF a esse receptor. Não induz agregação ou secreção plaquetária <i>ex vivo</i> ref (40). <i>ex vivo</i> ref. (40). <i>In vivo</i> causa plaquetopenia ref. (163).	001 DTPFECPSDW STHRQYCYKF FQKESWDDR SEYDAERFCS EQAKGGHLVS IESDEEADFV 061 AQLVAPNIGK SKYYVWIGLR IENKKQCCSS KWSYDSSVS ENLVGRNVKK CFALEKQKGF 121 RKWVNIDCE GNPFVCKFIR PR
BJAR454CTL11 *	453	36,3	PTLC	Desconhecida	001 MGRFIFVSFG LLVVFLSLSG TAADCPDWS PYGGHCYKLF QORMNWADAE NLCAQQRKES 061 HLVSFHSSE VDFLVSITFP ILGPDLYWTG LSNINWGCSE EWSDGTKVNY NAWASESECV 121 ASKTTDNQWV SFPCTRLEYV VCEPQA
MP_I2 SVMP (E3UJL4) <i>Bothrops neuwiedi</i>	447	30	SVMP	Desconhecida	001 KMCVGTETNW ESDEPIEKAS QSNLTPEQQK FSPKYIELAV VADHGMFTKY NSNVNTIRTW 061 VHEMVNSLNG FFRSMNVDS LVLNVWSKK DLKVEKDS KTLTSFCEWR ERDLLRISH 121 DHAQLLTIV FDQQTIGIAY TAGMCDPSQS VAVVMDHSSK NIRVAVTMAH ELGHNLMGMD 181 DDTCTCGAKS CIMAISTISKG LSFESDCSQ NQYQTYVTKH NPQCILNKPL LTVSGNELLE 241 AGE
BJAR454CTL02 *	412	20,4	PTLC	Desconhecida	001 MGRFIFVSFG LLVVFLSLSG TVADCPDWS PYEGHCYKHF IKWMNWADAE RFCSEEVNGG 061 HLVSIESAGE ADFVAKLVAE NKHSRELNVW IGRVQKKEK QCNSKWSGDS SVSYENWSEA 121 ELKTCIGLE DSGFRKWSNL YCEQQIPFVC EA
MP_Ila SVMP (E3UJM0)	403	30,4	SVMP	Desconhecida	

<i>Bothrops neuwiedi</i>					001 KMCVGTETNW ESYEPIKKAS QSNLTPEQQR FSPRYVELAV VADNGMFTKY NSNLNTIRTR 061 VHEMVNTVNG FFRSMNVDS LANLEVMSKK DLIKVEKDSS KLTLTSFGGEWR ERDLLPRISH 121 DHAQLLTTIV FDNYVIGITK FGKMCDPKLS VGVVLDHSEI SLQVAVAMAH ELGHNLMGHH 181 DGNQCHCNAP SCIMADTLE ELSYEFSDCS QNQYQTYLTN RNPQCILNKP LLTVSGNELL 241 EAGEECDGCA PENPCDDAAT CKLRPGAQCA EGLCCDQCRF KGAGKICRRA RGDNPDRCRT 301 QGSADCPNR FHA
BJAR454CTL07 *	378	20,4	PTLC	Desconhecida	001 MGRFIFVSFG LLVVFLSLSG TAADCPDWS PYEGHCYKHF IKWMNWEDAE RFCSEEVNNG 061 HLVSIESDGE AAFVAKLVAE NKHSRELVNW IGMRVQGKEK QCNSKWSDGS SVSYENWSEA 121 ELKTCIGLEE DSGFRKWVNL YCEQQIPFVC EA
Basic phospholipase A₂ homolog piratoxin-1 (P58399) <i>Bothrops pirajai</i>	341	44,6	PLA ₂	Fosfolipase sem atividade enzimática mas que causa miotoxicidade e edema <i>in vivo</i> ref. (169, 170)	001 SLFELGKMIL QETGKNPAKS YGAYGCNCGV LGRGKPKDAT DRCCYVHKCC YKLLTGCPNK 061 KDRYSYSWKD KTIVCGENNP CLKELCECDK AVAICLREN GTYNKLYRYH LKPFCKKADD 121 C
Snake venom metalloproteinase leucorolysin-A (P84907)	340	36,6	SVMP-PI	Sem atividade hemorrágica, hidrolisa o fibrinogênio e a fibrina, inibe agregação plaquetária induzida por ADP ref. (164, 165)	001 QQFSPRYIEL VVVADHGMFK KYNSNLNTIR KWVHEMLNTV NGFFRSMNVD ASLVNLEVMS 061 KKDLIKVEKD SSKTLTSFGE WRERDLLPRI SHDHAQLLTIV IFLDEETIGI AYTAGMCDLS 121 QSVAVVMDHS KKNLRAVVTM AHELGNLNGM RHDGNCQCHCN APSCIMADTL SKGLSFEFSD 181 CSQNYQTYTL TKHNPQCILN KP
Snake venom serine protease HS114 (Q5W959) <i>Bothrops jararaca</i>	323	28,7	SVSP	Desconhecida	001 MVLVRVAVNL LILQLSYAQK VSELVVGDE CNINEHRSLV AIFNSTGFFC SGILLNQEWV 061 LTASHCDSTN FQMKIGVHSH KTINQDEQTR NPKEKIFCPN KNDDALDKD LMIVRLDSPV 121 SDSEHIAPLS LPSSPPSVGS VCRIMGWGS TPIQKTNPDV PHCANINLLD DAVCRAAYPE 181 LPAEYR TLCA GVPEGGIDTC NGDSGGPLIC NGQFGQIVFY GAHPCCGAPK PGLYITKVIDY 241 NTWIESVIAG NTAATCPP
BJAR454CRISP1 *	317	28,8	CRISP	Desconhecida	001 MIAFIVLLIL AAVLQSSSGS VDFDSESPRK PEIQNEIVDL HNSLRKSVNP TASNMLKMKW 061 YPEAAANAER WAYRCIESHS TPNSRVIGGI KCGENIYMS IPIKWTEIIH AWHGEYKNFK 121 YGTGAEPPTA VIGHYTIQIV YKSYLAGCAA AYCPSSSYKY FYVCQYCPAG NIRKGTATPY 181 KSGPFCGDCP SACDDGLCTN PCTKEDEYTN CDSMVQSTGC QDRMQLECP ATFCQCNKII
MP_11 SVMP (E3UJL3) <i>Bothrops neuwiedi</i>	312	29,2	SVMP	Desconhecida	001 KMCVGTETNW ESYEPIKKAS QSNLTPEQQR FSPRYVELAV VADNGMFTKY NSNLNTIRTR 061 VHEMVNTVNG FFRSMNVDS LANLEVMSKK DLIKVEKDSS KLTLTSFGGEWR ERDLLPRISH 121 DHAQLLTTIV FDQQTIGMAY TAGMCDPSQS VAVVMDHSHK NIRVAVTMAH ELGHNLMGMDH 181 DDTCTCGAKS CIMASTISK LSFEFSDCSQ NQYQTYVTKH NPQCILNKPL LTVSGNELLE 241 AGE
BJAR454PLA24 *	308	45,7	PLA ₂	Desconhecida	001 MRTLMIIVAVL LVGVEGNLWQ FGRMIQQETG KHPLFHYLSY GCYCGWGGGG QPKDATDRCC 061 YVHDCCYGVK TGCDPKIDY TYSKETGDIV CGGDDPCKKQ ICECDRVAAL CFQDNKDTYD 121 KKYRFLNAEN CQEASEAC
MTX-II chain A (I6L8L6) <i>Bothrops brazili</i>	272	45,1	PLA ₂	Desconhecida	001 SLVELGKMIL QETGKNPAKS YGAYGCNCGV LGRGKPKDAT DRCCYVHKCC YKLLTDCDPK 061 KDRYSYSWKD KTIVCGENNS CLKELCECDK AVAICLREN DTYNKKYRNN HLKPFCKKAD 121 PC
Snaclec bothroinsularin subunit alpha (P0C929) <i>Bothrops insularis</i>	264	22,7	PTLC	Inibidor de trombina e protrombina ref.(167).	001 DCPSDWSPYG QYCYKFFQKQ MNWADAERFC SEQAAGGHLV SFQSDGETDF VVNLTVEKIQ 061 SSDLYAMIGL RVQNKEKQCS SKWSDGSSVS YENVVGRITVK KCFALEKEQE FFWWINIYCG 121 QQNPFVCKSP PP
Zinc metalloproteinase/disintegrin- jararafilibrase 2 (Q98SP2) <i>Bothrops jararaca</i>	264	17,2	SVMP	Degrada rapidamente a cadeia α do fibrinogênio e mais lentamente a cadeia β , mas não tem ação sobre a cadeia γ ref. (166).	001 MIEVLLVTIC LAAPFYQGSS IILESIGNVD YEVIYPRKVT ALPKGAVOPK YEDAMQYELK 061 VNPEPVVLHL EKNKGLFSKD YSETHYSPDC RKITTNPPVE DHCYYHGRIE NDADSTASIS 121 ACNGLKGHF LQGETYLIEP LKLSDESAHA VFKFENVEKE DEAPKMGCVT QNWSEYEPK 181 KASQSNLTPE HQRYIELFLV VDHGMFMKYN GNSDKIRRR HQMVMNIMKEA YRILYIDIAL 241 TGVEIWSNKD MINVQPAAPQ TLDSPGEWRK TDLNKRSHD NAQLLTSTDF KDQITGLAYW 301 GSMCDPKRST AVIEDHSETD LLVAVTMAHE LGHNLGIRHD TGSCSCGGYS CIMAPVISHD 361 IAKYFSDCSY IQCWDIFIMKD NPQCILNKQL RTDVTSTPVS KNFGAGEEC DCGTPGNPCC 421 DAVTCKLRPG AQCAEGLCCD QCRFMKEGTV CRRARGDDMD DYCNISAGC PRNPFHA
BJAR454CTL16 *	236	29,5	PTLC	Desconhecida	001 MGRFIFVSFG LLVVFLSLSG TAADCPDWS PYEGHCYRVF NEMQNWADAE KFC TQQQTGG 061 HLVSFQSSSE ADFVLKLAQQ SIDYGIWFWM LSNLWNQCNW QWSDAATLKY KDWAESYCV 121 YFKSTNNKWR SMAC TQVAYF VCE FQV
BATXSVSP10 (A0A1L8D5U9) <i>Bothrops atrox</i>	233	21,5	SVSP	Desconhecida	001 MVLIRVLANL LILQLSYAQK ASELIIGGDE CNINEHRFLV ALYTSRSRRF HCGGTLINQE 061 WVLTAANCDR KNIRIKLGMH SKNVTNEDEQ TRVPKEKFFC LSSKTYTTKW KDIMLIRLKR 121 PVNDSPHIAP LSPSPSPSV GSVCRIMGW TISPTKVSYP DVPHCANINL LDYEVCAAH 181 GGLPATSR TL CAGILEGGKD SCQGDSSGGL ICNGQFQGIL SWGVPCHGQR LKPGVYTKVS 241 DYTEWIRSI II AGNTDVTCP
BATXSVSP7 (A0A1L8D5U8) <i>Bothrops atrox</i>	231	32,3	SVSP	Desconhecida	001 MLIRVLANL LILQLSYAQK SSELVVGDE CNINEHRFLA LVYSRDRFCG GTLINQEWVL 061 TAACHCDMRSM HIYLGVNHS VQYDDEQRRF PKKKYFCFNK KNDVDLKD MLIRLDRSPV 121 NSAHIAPLSL PSNPSPSVGS CRVMGWGTIS ASKVNLDPDV HCANINLLHY SVCAAAYPEL 181 PATSRTL CAG ILEGGKDTCN GDSSGPLICN GELQGIVSWG DDICAQPRKP GFYTKVFDYT 241 EWIQSIIAGN TDVTCPL
BJAR454SVSP_AB004067 *	227	29,6	SVSP	Desconhecida	001 MVLIRVLANL LILQLSYAQK ASELIIGGRP CDINEHRSLA LVKYGNFQCS GTLINQEWVL 061 SAACHDGEKM KIHLGVHSHK VPNKDKQTRV AKEKFFCLSS KNYTKWDKDI MLIRLDRSPV 121 NSAHIAPI SL PSSPPIVGSV CRIMGWGTIS TSKVILSDVP HCANINLLNY TVCRAAYPEL 181 PATSRTL CAG ILQGGKDTVC GDSSGPLICN GQFQGI SWGVPCHGQR ALYTKVSDYT
BJAR454SVSP03 *	223	15,9	SVSP	Desconhecida	001 MGLIRVLANL LILQLSYAQK SSELVVGDE CNINEHRSLA LVYITSGFLC AGTLINQEWV 061 LTAACHDRGN IVIFLGVHSL KGLNKNKPTR IAKEKFCIPN RKKNDEKDKD LMILIRLDRSPV 121 SNSEHIAPLS LPSSLPSVGS VCRVMGWGTIS SSPKVTLP PHCADINIFD YEVCRALKPE 181 LPATSRTL CAG GIMEGGKSSC DGDSGGPLIC NGELQGIVSW GGDICAQPRE PGHYTKVYDY 241 LPWINSIIAG NTDATCPE

BATXSVMPII3 (A0A1L8D5Z6)- <i>Bothrops atrox</i>	214	18,1	SVMP-PII	Desconhecida	001 MIQLLLVTIC LAVFPYQGSS IILESGNVND YEVVYPRKVT ELPKGAVQPK YEDAMQYEFK 061 VNGEPVVLHL EKNKELFSED YSETHYSPDG REITYTPPVE DHCYYRGRIE NDADSTASIS 121 ACNGLKGHFQ IQGETYLIEP LKLSDEAHA VYKYENVEKE DEAPK MCGVT ETNWESYEPI 181 KKASQSNLTP EQKFSSRYI DLVVVADHGM FKKYNSNLNT IRKVVHEMLN TVNGFFRSVD 241 VTASLANLEV WSKK DLIKVE KDSSKTLTSP GEWRERDLLP RISHDNAQLL TTIVFKGRTI 301 GITNFGEMCD PKLSVGIVRD HSKKNLRVAV TMAHELGHITL GMDHDDSCSC GAKSCIMASA 361 LSK GLSEFS KCSQNEYQTY LTHNPQCIL NKPLLTIVSGN ELLEAGEECD CGAPENPCCD 421 AATCK LRHGA QCAEGLCCDQ CRFKGAGKIC RRARGDNFDD RCTGQSADCP RNRPHA
BJAR454CTL18 *	206	22,6	PTLC	Desconhecida	001 MGRFIFVSFG LLVVFLSLSG TAADCPDWS PYEGHCYR VF TEPQNWADAE KFCTQQQTGG 061 HLVSFQSS KE ADFVLKLAQQ SIDYGIFWMG LSNLWNQCNW QWSNGATLKY KDWAEESYCL 121 YFKSKNNKWR SMACTQLAYV VCKFQA
BATXCTL39 (A0A1L8D632) <i>Bothrops atrox</i>	205	28,2	PTLC	Desconhecida	001 MGRFIFVSFG LLVGFLSLSG TAADCPSGWS SYEGNCYKFF QQKMNWADAE RFCSEQAQGG 061 HLVSIIKIYSG EADFGDLVT KNIQSSDLYA WIGLRVENKE KQCSSKWSDG SSVSYENVVE 121 RTVVKCFALE KDLGFVLWIN LYCAQKNPFV CKSPPP

*Sequência de proteínas (Andrade-Silva, D. et al., 2016, Proteomic and Glycoproteomic Profilings Reveal That Posttranslational Modifications of Toxins Contribute to Venom Phenotype in Snakes- Journal. Proteome Research, v. 15, p. 2658–2675) obtida pela tradução da sequência de mRNA presente em glândula de veneno de *B. jararaca* (116).

Os peptídeos em vermelho são as sequências identificadas pela espectrometria de massas.

As sequências sublinhadas correspondem ao sítio catalítico das metaloproteínases (HEXXHXXGXXH).