

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia**

Fração P1G10 do látex de *Vasconcellea
cundinamarzensis*: atividade antitrombótica *in vivo* e
anticoagulante/antiagregante plaquetária *in vitro*.

Rogério Pereira Bilheiro

Belo Horizonte

2012

Rério Pereira Bilheiro

Fração P1G10 do látex de *Vasconcellea cundinamarcensis*: atividade antitrombótica *in vivo* e anticoagulante/antiagregante plaquetária *in vitro*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com ênfase em Farmacologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes

Co-Orientação: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho

Belo Horizonte

2012

Colaboradores

Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Prof. Dr. Ubirajara Agero, Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas da UFMG.

Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Substâncias Antitumorais, no Laboratório de Bioquímica de Produtos Naturais, ambos no ICB/UFMG; no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG e no Laboratório de Física Biológica do ICEx/UFMG.

***“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe.
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei”.***

Almir Sater

Dedico esta dissertação de Mestrado
a minha esposa Juliana, pelo incentivo a buscar meus sonhos, e
por compartilhar a busca comigo. A você o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes, pela oportunidade que me deu e pela confiança em mim depositada durante a realização deste mestrado. Sempre terei por você admiração profissional e sincero apreço.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho, pelas sugestões, ponderações e ensinamentos, que me permitiram gostar de pesquisar, o que é fundamental.

Aos colaboradores, Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares, Prof. Dr. Carlos Salas e Prof. Dr. Ubirajara Agero, que compartilharam generosamente do seu tempo e do seu conhecimento, tornando este trabalho possível.

A todos os que foram meus professores nas disciplinas teóricas, entre eles: André Klein, Steiner, Fátima Leite, Silvia Guatimosin, Robson Santos, Janetti Francischi, Igor e Fabrício. Vocês formaram meu pensamento crítico e analítico. Aos colegas de residência, Geovani e Danilo, pelos muitos papos, os científicos e os nem tanto produtivos.

Aos colegas de laboratório, Ana Cândida, Ariadne, Celso, Cinthia, Dalton, Heveline, Luiz Felipe, Fernanda, Kátia, Imaculada e Verlane, pela ajuda nos experimentos e pelas inúmeras sugestões, todas oportunas, de como melhorar o meu trabalho. Tive muita sorte de trabalhar em um laboratório com um grupo tão competente, tão amigo e tão unido.

A meu pai, Luiz Paulo, pelo exemplo de bom humor, amizade, honestidade, generosidade para com o próximo e de carinho para com a família, de quem aprendi valores que me serviram e servirão várias vezes na vida. A minha mãe, Lauricy, pelo exemplo de firmeza, retidão e sensatez, onde posso sempre buscar bom senso e sabedoria. Ao meu irmão Sandro e a minha irmã Bruna, pela amizade, suporte e por serem meus companheiros e cúmplices nesta vida.

Às secretárias do Programa, Cinthia e Nilda, por me ajudarem a dar solução às questões administrativas e pela prestatividade com que sempre me atenderam.

Aos funcionários do Biotério, pela ajuda sempre pronta e pelas orientações preciosas sobre a manipulação de animais.

Aos funcionários técnicos, Márcio e Fátima, do Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia e a Luciana, do Laboratório de Substâncias Antitumorais, por pacientemente me mostrarem onde as coisas ficam e me ensiarem a operar os equipamentos.

A CAPES, a FAPEMIG e a CNPq, pelo apoio financeiro.

Resumo

Estudos prévios sugeriram que P1G10, uma cisteína protease obtida do latex de *Vasconcellea cundinamarcensis*, pudesse atuar sobre o sistema hemostático, uma vez que, em doses tóxicas, causou hemorragia em ratos Wistar. Além disto, há relatos na literatura de outras cisteínas proteases capazes de impedir a formação trombótica, assim como alterar o padrão de coagulação do sangue e da agregação plaquetária *in vitro*. Baseado nisto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito antitrombótico de P1G10 em um modelo de obstrução trombótica induzida em microvasos da orelha de camundongos *hairless*, assim como propor um mecanismo de ação coerente para este efeito. A indução trombótica foi feita com 0,15 mL de FITC-dextran *i.v.* (6 %) e luz azul de mercúrio em um microscópio de epi-iluminação. P1G10 (2,5, 5,0 ou 7,5 mg/kg), P1G10 com sua atividade proteolítica inibida por iodoacetamida - P1G10-IAA (5,0 mg/kg) ou salina foram administrados por via *s.c.* 25 min antes da indução trombótica. Apesar de P1G10-IAA não ter sido diferente do controle, na dose de 2,5 mg/kg, observou-se um prolongamento do tempo até a formação de um trombo estável, enquanto nas doses de 5,0 e 7,5 mg/kg, não foi observada obstrução trombótica estável durante o tempo de observação do vaso (20 min). Em ensaios *in vitro*, P1G10 inibiu a agregação plaquetária em PRP de forma significativa nas concentrações de 0,5 µg/µL e de 1,0 µg/µL. Na avaliação do TP, observou-se prolongamento do tempo de coagulação em 1,0 µg/µL e completa anticoagulação em 2,0 µg/µL, enquanto pelo TTPA, P1G10 prolongou o tempo de coagulação em 0,5 e 1,0 µg/µL e promoveu completa anticoagulação em 2,0 µg/µL. Na avaliação do TT, observou-se um prolongamento significativo do tempo de coagulação a partir de 0,25 µg/µL, e completa anticoagulação a partir de 0,5 µg/µL. Observou-se ainda que a concentração de fibrinogênio em plasma foi significativamente reduzida em 0,05 µg/µL, e indetectável a partir de 0,5 µg/µL. Ao se avaliar a atividade proteolítica sobre fibrina moldada em placa de Petri, observou-se que 1,0 µg de P1G10 demonstra uma importante atividade fibrinolítica. Diante desses resultados, pode-se sugerir que P1G10 possui atividade antitrombótica *in vivo* e antiplaquetária/anticoagulante *in vitro*.

Abstract

Previous studies have suggested that P1G10, a cysteine protease obtained from the latex of *Vasconcellea cundinamaricensis* may have an effect on the hemostatic system, given that signs of haemorrhage were found in Wistar rats during toxicological assays. In addition, the literature describes not only an important antithrombotic effect of other cysteine proteases *in vivo*, but also their capacity to inhibit coagulation and platelet aggregation *in vitro*. Based on this, this study aimed at evaluating the effect of P1G10 in a light/dye model of thrombotic obstruction in the ear microvessels of hairless mice, as well as to propose a coherent pharmacological mechanism for such effect. For the thrombotic obstruction, 0.15 mL of FITC-dextran (6%) was injected in the tail vessel and the ear microvessels were subjected to continuous blue mercury light exposure on an epi-illumination microscope. P1G10 (2.5, 5.0 or 7.5 mg/kg), P1G10-IAA (5.0 mg/kg) or saline were injected s.c. 25 min before the thrombus induction. While P1G10-IAA showed no significant antithrombotic effect; at the dose of 2.5 mg/kg an important prolongation of the time for a stable thrombus formation was observed, whereas at 5.0 and 7.5 mg/kg, no stable thrombotic obstruction of the vessels was observed in the time elapsed for experimental analysis (20 min). In *in vitro* assays, P1G10, at the final concentrations of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, significantly inhibited platelet aggregation in PRP. In coagulation assays, a significant prolongation in the coagulation time was observed by PT at the final concentration of 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, whereas no coagulation was observed at 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. By APTT, P1G10 significantly prolonged the coagulation time at 0.5 and 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, and no coagulation was observed at 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. In the TT assay, an important prolongation in the coagulation time was observed at 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, and no coagulation was observed at 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. When plasma fibrinogen concentration was measured *in vitro* after incubation with P1G10, there was a significant decrease in fibrinogen levels at 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, which then became undetectable at the 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. In the fibrin plate assay, P1G10 showed fibrinolytic effect at 1.0 μg . Based on these results, we suggest that P1G10 has antithrombotic activity *in vivo* and antiplatelet / anticoagulant activity *in vitro*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Participação de agonistas e receptores na ativação plaquetária.	5
Figura 2. Representação esquemática da cascata de coagulação.	10
Figura 3. Fases do modelo de coagulação na superfície celular.	11
Figura 4. Representação esquemática dos principais aspectos do sistema fibrinolítico.	13
Figura 5. Ação fibrinogenolítica de CMS2MS2.	16
Figura 6. Desenho experimental do protocolo da avaliação da atividade antitrombótica de P1G10 em função do tempo.	24
Figura 7. Set up da microscopia intravital fruoescendente.	25
Figura 8. Imagens obtidas para a determinação da velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV).	27
Figura 9. Curva de calibração da concentração de fibrinogênio (mg/dL)	29
Figura 10. Efeito de P1G10 sobre o tempo de protrombina (TP) <i>in vitro</i> .	33
Figura 11. Efeito de P1G10 sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) <i>in vitro</i> .	34
Figura 12. Efeito P1G10 sobre a velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV) na circulação da orelha de camundongos <i>hairless</i> após obstrução trombótica induzida por FITC-dextran	38
Figura 13 Determinação do perfil de agregação plaquetária em função da concentração de ADP e do número de plaquetas em plasma rico em plaquetas (PRP).	40
Figura 14. Inibição da agregação plaquetária na presença de P1G10.	43
Figura 15. Determinação do tempo de trombina (TT) frente a concentrações de P1G10 <i>in vitro</i> .	44
Figura 16. Efeito de P1G10 sobre a concentração de fibrinogênio <i>in vitro</i> .	46
Figura 17. Efeito fibrinolítico de P1G10	48

Lista de abreviaturas mais usadas e seus significados

μg	micrograma (10^{-3} mg)
μL	microlitros (10^{-3} mL)
M	molar
cm	centímetro (10^{-2} m)
Da.	Daltons
et al	e outros (do latim Et alli)
g	grama
G	força gravitacional ($9,81 \text{ m. s}^{-2}$)
<i>i.m.</i>	intramuscular
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravascular
kDa	kilodalton (103 Da.)
kg	kilograma
M	concentração molar (moles/L)
mg	miligrama (10^{-3} g)
min	minutos
mL	mililitro (10^{-3} L)
mm	milímetro (10^{-3} m)
nm	nanômetros
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
s.c.	subcutâneo
V	Volts
v.o.	via oral
W	Watts

Lista de siglas mais usadas e seus significados

5-HT	5-Hidroxitriptamina ou Serotonina
ADP	Difosfato de Adenosina (<i>Adenosine Diphosphate</i>)
ANOVA	Análise de variância (<i>Analysis of Variance</i>)
AMC _c	Monofosfato de adenosina cíclica (<i>Adenosine Monophosphate Cyclic</i>)
COX ₁	Ciclooxigenase 1
DTT	Ditiotreitol
HMWK	Cininogênio de alto peso molecular (<i>High molecular weight kininogen</i>)
IAA	Iodoacetamida
NOAEL	Menor dose em que não se observa efeito adverso (<i>No Observed Adverse Effect Level</i>)
PAR	Receptor ativado por protease (<i>Protease Activated Receptor</i>)
PAI	Inibidor do ativador do plasminogênio (<i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>)
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PK	Pré-caliceína
TAFI	Inibidor de fibrinólise ativado pela trombina (<i>Thrombin activated fibrinolysis inhibitor</i>)
TP	Tempo de protrombina
t-PA	Ativador tecidual do plasminogênio (<i>Tissular Plasminogen Activator</i>)
TT	Tempo de trombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
TF	Fator tissular (<i>Tissue factor</i>)
u-PA	Ativador urokinase do plasminogênio (<i>urokinase plasminogen activator</i>)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
vWF	Fator de von Willebrand (<i>von Willebrand Factor</i>)
TXA ₂	Tromboxano A ₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.	1
1.1 O sistema hemostático	1
1.2 Agregação plaquetária à camada subendotelial	2
1.3 A coagulação sanguínea.	6
1.4 O modelo de coagulação baseado em superfícies celulares	7
1.5 Papel de co-fatores na hemostasia	9
1.6 Regulação do sistema de coagulação	12
1.7 Atividades farmacológicas de cisteíno-proteases do látex de <i>Vanconcella cundinamarcensis</i> (<i>Carica candamarcensis</i>)	13
1.8 Cisteíno-proteases no processo hemostático	17
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Animais	20
4.2 Obtenção e purificação das amostras de P1G10	20
4.3 Inibição da atividade proteolítica de P1G10 por iodoacetamida (IAA)	21
4.4 Coleta de sangue	21
4.5 Obtenção do plasma rico em plaquetas e do plasma pobre em plaquetas	21
4.6 Avaliação do Tempo de Protrombina	22
4.7 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	22
4.8 Avaliação por microscopia intravital fluorescente do efeito de P1G10 em um modelo de trombose induzida em orelha de camundongo hairless	22
4.9 Avaliação da agregação plaquetária	28
4.10 Tempo de trombina (TT) e concentração plasmática de fibrinogênio	29
4.11 Avaliação do efeito fibrinolítico de P1G10	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Efeito de P1G10 sobre o Tempo de Protrombina	31
5.2 Efeito de P1G10 sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada	32

5.3 Avaliação do efeito antitrombótico de P1G10 <i>in vivo</i> por microscopia intravital fluorescente	35
5.4 Avaliação do efeito antiagregante plaquetário de P1G10	39
5.5 Efeito de P1G10 sobre o Tempo de Trombina	42
5.6 Efeito de P1G10 sobre a concentração de fibrinogênio <i>in vitro</i>.	45
5.7 Avaliação do efeito fibrinolítico de P1G10	47
6 DISCUSSÃO.	49
7 CONCLUSÕES.	63
8 REFERÊNCIAS	64

1. Introdução

1.1 O Sistema Hemostático

O sistema hemostático tem como objetivo manter o sangue circulante no seu estado fluido sob condições fisiológicas e, ao mesmo tempo, responder de forma rápida e localizada promovendo a interrupção da perda de sangue em um vaso lesado. Na ocorrência de uma lesão vascular, o sistema hemostático imediatamente inicia uma série de eventos celulares e moleculares que culminam na formação de um trombo, ou tampão hemostático (JACKSON et al, 2003).

Os componentes do sistema hemostático incluem vasos sanguíneos, com endotélio e subendotélio, plaquetas circulantes, proteínas e co-fatores da coagulação sanguínea, além de proteínas dos sistemas anticoagulante e fibrinolítico (FURIE et al, 2011). Na formação do trombo, a agregação plaquetária se dá após ativação das plaquetas por diversas substâncias, estejam tais substância circulantes, presentes no endotélio lesado ou até mesmo liberadas pelas próprias plaquetas (MENDOLICCHIO, 2007). Já a coagulação se dá pela formação de uma rede de fibrina, molécula que sustenta o trombo, a partir da ação de fatores de coagulação (proteases plasmáticas) no local onde o vaso se encontra lesado (DAVIE et al, 1964). A agregação plaquetária e a coagulação não são processos separados, ao contrário, estão intimamente relacionados, já que na trombogênese, a fibrina é formada a partir de reações que se dão na superfície das plaquetas, o que resulta em uma malha sólida de plaquetas e fibrina, além de hemácias e leucócitos, aderida à parede endotelial, culminando na formação do trombo (MONROE et al, 2007). Entretanto, uma vez cumprida a sua função hemostática, o trombo deve ser dissolvido. Para isto, este sistema conta, também, com fatores proteolíticos capazes de degradar a malha de fibrina (processo chamado de fibrinólise), permitindo que o fluxo sanguíneo se reestabeleça sem prejuízo para os tecidos adjacentes (CESARMAN-MAUS et al, 2005). Apesar do organismo, claramente, se beneficiar desse sistema sofisticado de reparo da parede dos vasos sanguíneos, a formação indevida de trombos em locais críticos pode ter

efeitos deletérios sobre a fisiologia. A aterotrombose, os acidentes vasculares encefálicos, o tromboembolismo pulmonar, a angina de peito e o infarto agudo do miocárdio são sabidamente condições clínicas potencialmente fatais resultantes de desequilíbrios no sistema hemostático. No entanto, a importância da trombose não se limita à patogênese de doenças cardiovasculares. Recentemente, um número crescente de estudos têm demonstrado haver uma relação íntima entre fenômenos trombóticos e a progressão de diversas doenças crônico-degenerativas com grande incidência na sociedade moderna, como o câncer (BOKEMEYER et al, 2011), a diabetes, a doença arterial coronariana (FARHAN et al., 2010) e a doença de Alzheimer (STRICKLAND et al, 2010). Por essa razão, existe atualmente um grande empenho da comunidade científica no sentido de descobrir as sutilezas do sistema hemostático e suas relações com diversas doenças crônico-degenerativas, tendo sempre como foco principal o desenvolvimento de instrumentos inovadores que permitam avanços no diagnóstico, bem como no tratamento clínico e farmacológico de tais doenças.

Como esta introdução não pretende esgotar um campo de estudo tão vasto como a hemostasia e trombose, em seguida serão abordados objetivamente apenas os aspectos relevantes à compreensão da presente investigação.

1.2 Agregação plaquetária à camada subendotelial

As plaquetas (ou trombócitos) são fragmentos citoplasmáticos discóides, de 2 a 4 micrômetros de diâmetro, constituídas de membrana, citoplasma, grânulos e organelas. São originárias de megacariócitos produzidos na medula óssea, que normalmente produzem entre 5.000 e 10.000 plaquetas, cada um. Na circulação sua contagem está entre 150.000 a 400.000/ μ L em indivíduos normais, sendo sua meia-vida de circulação de aproximadamente 10 dias (ANDREWS et al, 2004; GIBBINS, 2004).

Embora tenha aumentado o conhecimento a respeito das funções das plaquetas na modulação da resposta imune e inflamatória (WEBER, 2007), o seu papel na hemostasia e trombose ainda é o mais bem conhecido. Estas são responsáveis pelo fechamento inicial da parede do vaso lesado através da

formação de um tampão de plaquetas, ou agregado plaquetário (ANDREWS et al, 2004; GIBBINS, 2004).

Quando em contato com a lesão vascular, as plaquetas são ativadas dando início a um processo de adesão ao vaso lesado. Isto ocorre, sobretudo, através da ação de agentes ativadores plaquetários, de fibrinogênio e de glicoproteínas (GP), receptores expressos na superfície plaquetária (Figura 1). A GP Ib/IX/V é um importante mediador desta adesão ao ligar-se ao fator de von Willebrand (vWF) expresso na camada subendotelial dos vasos lesados (ANDREWS et al., 2003). Também a GP $\alpha\beta 1$ exerce um importante papel na adesão inicial das plaquetas ao vaso lesado ao se ligar ao colágeno presente na matriz extracelular (EMSLEY et al., 2000). Tanto o vWF como colágeno são moléculas abundantemente expressas na camada subendotelial exposta no vaso sanguíneo lesado. Essa adesão inicial das plaquetas à matriz extracelular leva à ativação plaquetária, além de iniciar a formação do tampão hemostático (DAVÌ et al., 2007).

Uma vez as plaquetas ativadas, uma variedade de mecanismos de amplificação são iniciados através da liberação do conteúdo dos grânulos (densos e alfa) o que resulta em recrutamento adicional, assim como agregação das plaquetas. Os grânulos alfa contêm uma variedade de substâncias, como P-selectina, vWF e fibrinogênio. Enquanto a P-selectina participa do processo de secreção granular e adesão plaquetária ao endotélio, o vWF e o fibrinogênio secretados atuam diretamente na ativação e na agregação plaquetária (BLAIR et al., 2009).

Nos grânulos densos armazenam e liberam, entre outras substâncias, íons Ca^{2+} e adenosina difosfato (ADP). O aumento de Ca^{2+} intracelular ativa diretamente o receptor GP IIb/IIIa, além de estimular a síntese de tromboxano A_2 (TXA₂) pela ciclooxygenase 1 (COX₁). Tanto TXA₂ como ADP são biomoléculas que exercem uma potente função estimulante sobre as plaquetas, caracterizando um sistema de reforço positivo da ativação plaquetária (MCNICOL et al., 1999). Enquanto o ADP atua sobre o receptor P2Y, inibindo a adenilato ciclase e reduzindo a concentração de AMPc intracelular, o TXA₂, atuando sobre o receptor TP, promove aumento da concentração de Ca^{2+} . A elevação da concentração de Ca^{2+} e a redução da concentração de AMPc

intracelulares, resultam em um aumento da expressão de GP IIb/IIIa (DAVÌ et al., 2007), o principal receptor para adesão e agregação plaquetária (KULKARNI et al., 2000).

Após a sua ativação, as plaquetas sofrem mudança de forma, emitindo diversos pseudópodes, que aumentam a sua superfície de contato. Moléculas de fibrinogênio plasmático, ou recém liberadas por grânulos alfa, desempenham um papel fundamental ao ligarem-se às glicoproteínas IIb/IIIa expressas na superfície das plaquetas ativadas. Desta forma, o fibrinogênio realiza a ligação entre as plaquetas formando um agregado plaquetário, o qual ganha volume, contribuindo para o crescimento do trombo (ANDREWS et al., 2004; FURIE et al., 2005). Esta ligação entre o fibrinogênio e a GP IIb-IIIa é essencial para a agregação plaquetária, e defeitos nestes receptores podem prejudicar significativamente a hemostasia (TULLU et al., 2001).

A maior parte da conversão de fibrinogênio em malha de fibrina se dá na superfície fosfolipídica das plaquetas ativadas (MONROE et al., 2007). Essa conversão é feita pela trombina, uma serino-protease que atua também como agente agregante plaquetário ao clivar e ativar os receptores ativados por proteases (PAR) PAR-1 e PAR-4 localizados na membrana plaquetária (COUGHLIN et al., 2000). Uma vez ativados, os receptores PAR na superfície plaquetária modulam o aumento de Ca^{2+} e AMPc, o que resulta na ativação das plaquetas e aumento da expressão da GP IIa/IIIb (COUGHLIN et al., 2000). Cumpre ressaltar que a polimerização da rede de fibrina é essencial para a consolidação do trombo, o qual adquire a consistência adequada para interromper o extravasamento de sangue do vaso lesado (FURIE et al., 2005).

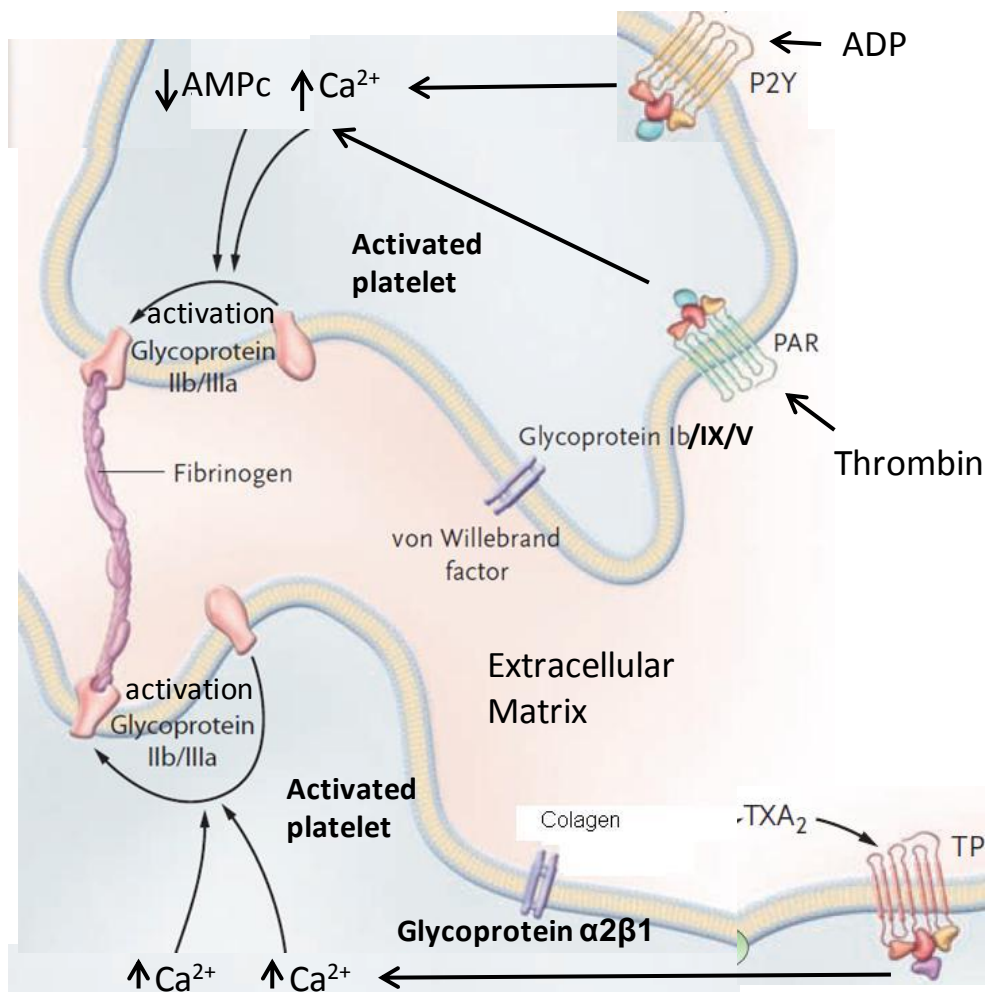


Figura 1. Participação de agonistas e receptores na ativação plaquetária. A ativação plaquetária é induzida pela interação de vários agonistas com receptores expressos na membrana plaquetária. Os receptores de trombina (PAR), de ADP (P2Y) e de TXA₂ (TP) levam ao aumento do cálcio (Ca²⁺) e a redução da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) no interior das plaquetas. Esta modulação da concentração de AMPc e de Ca²⁺ leva a ativação de Glicoproteína IIb/IIIa, um receptor que promove a adesão interplaquetária ao se ligar à molécula simétrica de fibrinogênio. A adesão das plaquetas à matriz extracelular ocorre por meio da ligação do colágeno à glicoproteína α2β1 e do fator de von Willerbrand à glicoproteína Ib/IX/V. (Adaptado de DAVÌ et al., 2007).

1.3 A coagulação sanguínea

A fisiologia da coagulação do sangue foi inicialmente proposta em 1964 pela hipótese de “cascata”, segundo a qual a coagulação ocorre como resultado da ativação proteolítica sequencial de proteases plasmáticas, resultando na formação de trombina que, então converte fibrinogênio em rede de fibrina, dando ao plasma uma consistência gelatinosa. Esta cascata de coagulação foi classificada em duas vias, a intrínseca e a extrínseca (Figura 2) (DAVIE et al., 1964; MACFARLANE et al., 1964).

A via intrínseca, ou via de ativação por contato, tem início a partir da interação do colágeno exposto no vaso lesado com cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e pré-caliceína (PK) circulantes. O complexo colágeno/HMWK/PK ativa o fator Hageman, ou fator XII (FXII). A cascata de coagulação é então iniciada com a ativação sequencial dos zimogênios (fatores inativos) XI, IX e VIII nos seus respectivos fatores de coagulação ativados XIa, VIIIa e IXa. Esses dois últimos formam o complexo tenase, que converte FX em FXa, reação que ocorre na superfície de plaquetas ativadas que fornecem o substrato fosfolipídico necessário. A partir desse ponto tem início a via comum, onde o FXa forma o complexo protrombinase com o FVa e, também na superfície plaquetária, converte protrombina (FII) em trombina (FIIa), a qual finalmente fará a conversão de fibrinogênio (FI) em fibrina (FIa) (MACFARLANE et al., 1964).

Considera-se que a principal via na iniciação *in vivo* da coagulação sanguínea é a via extrínseca, ou via do fator tissular (TF) (NEMERSON et al., 1973; NEMERSON, 1992). Essa via desencadeia grande produção de trombina, a qual pode ser considerada como o fator de coagulação mais importante, já que além de converter diretamente fibrinogênio em fibrina, também tem papel essencial na retroalimentação positiva de várias etapas do processo de coagulação, ativando os FV, FVII, FVIII e FXI (FURIE et al., 1992; GENTRY, 2004). Além disto, a trombina atua diretamente estimulando a ativação e agregação plaquetária via receptores PARs (SAMBRANO et al., 2001). Após a lesão do vaso, o fator VII é ativado por proteases circulantes e entra em contato com TF, expresso na superfície de diversas células, como fibroblastos

e monócitos, formando o complexo FVIIa/TF. Esse complexo converte FX em FXa, que forma o complexo protrombinase com o FVa e, como visto anteriormente, converte protrombina em trombina. Embora se pensasse que as duas vias eram independentes e possuíam igual importância, pesquisas atuais demonstram que, no organismo, não há separação clara entre estas vias, e que fatores ativados em uma delas podem ativar fatores na outra. A observação de que o complexo FVIIa/TF ativa não apenas o FX, como também FIX (OSTERUD et al., 1977) sugere que as duas vias estão interligadas *in vivo*.

Mesmo não correspondendo ao que realmente ocorre *in vivo*, o modelo de cascata ainda é válido para a compreensão de resultados de avaliação de coagulação *in vitro*. A determinação do tempo de protrombina (TP), por exemplo, permite avaliar se um prolongamento no tempo de coagulação de uma amostra de plasma se deve a um defeito de fatores de coagulação peculiares da via extrínseca. Já a avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) aponta alteração dos fatores peculiares da via intrínseca. Da mesma forma, uma alteração no tempo de coagulação medido tanto pelo TP como pelo TTPA sugere haver defeito de um ou mais fatores.

1.4 O modelo de coagulação baseado em superfícies celulares

Considerando a importância do papel celular e, assim, refletindo de forma mais fiel o fenômeno tal como se dá *in vivo*, foi proposto um novo modelo para a hemostasia, baseado na participação celular, o qual tem substituído o modelo clássico da cascata da coagulação. Este modelo considera a relevância de células que possuem TF em sua superfície (sobretudo fibroblastos e monócitos). Além disto, esse modelo descreve o papel fundamental das plaquetas, que fornecem a superfície fosfolipídica necessária à conversão da trombina na coagulação (HOFFMAN et al, 2003a, HOFFMAN et al, 2003b).

Este modelo é composto por três fases que se sobrepõem: iniciação, amplificação, propagação (MACFARLANE et al., 1964) (Figura 3, A-E). Na fase de iniciação (Figura 3A) o FVIIa forma um complexo com o TF na superfície de algumas células presentes na camada subendotelial do vaso lesado, como

fibroblastos, além de monócitos circulantes. Este complexo, além ativar o zimogênio IX em FIXa, também cataliza a formação de FXa. Este, juntamente com FVa (complexo protrombinase) dá início à formação de trombina. O processo de coagulação é efetivamente iniciado, entretanto, quando a trombina produzida na superfície celular participa da ativação de plaquetas e fatores de coagulação, como FVIIIa, FXIa e FVa, no processo de amplificação (Figura 3B). Na superfície fosfolipídica das plaquetas ativadas tem lugar a fase de propagação (Figura 3C). Ela é caracterizada pela ativação sequencial (descrita anteriormente como via intrínseca) de fatores de coagulação, que culmina em um aumento notável na produção de trombina (MACFARLANE et al., 1964). Esta é responsável pela produção da fibrina, a qual, juntamente com plaquetas, consolida o trombo (FURIE et al., 2005). Alguns autores sugerem que, baseando-se neste modelo, as vias intrínseca e podem ser melhor compreendidas. Assim, a via extrínseca (Fig 3D) consistiria do complexo TF/FVIIa atuando conjuntamente com o complexo FXa/FVa na superfície de células que expressam TF para iniciar e amplificar a coagulação. Já a via intrínseca (Fig 3E) seria caracterizada pelo FXIa, atuando juntamente com os complexos FVIIIa/FIXa e FXa/Va sobre a superfície das plaquetas ativadas, causando um ápice na produção de trombina, necessário à consolidação do coágulo.

1.5 Papel de co-fatores na hemostasia

No processo hemostático há importantes co-fatores, como o cálcio e fosfolípidios encontrados, sobretudo, na membrana de plaquetas ativadas, cuja presença se faz necessária para que ocorram as reações do processo de coagulação. Sendo um mediador da ligação dos complexos tenase e protrombinase aos fosfolípidios, o cálcio é essencial para a ativação de fatores de coagulação (NESBITT, 2003). Outro importante co-fator no processo de coagulação é a vitamina K, também conhecida como fitomenadiona, a qual é importante para a síntese hepática de diversos fatores de coagulação, tais como FII, FVII, FIX e FX. Nessas reações a vitamina K participa da carboxilação do ácido glutâmico, formando resíduos gama-carboxilglutamato, com afinidade para ligarem-se ao cálcio no processo de ativação dos fatores de coagulação (WALLIN, et al., 2004).

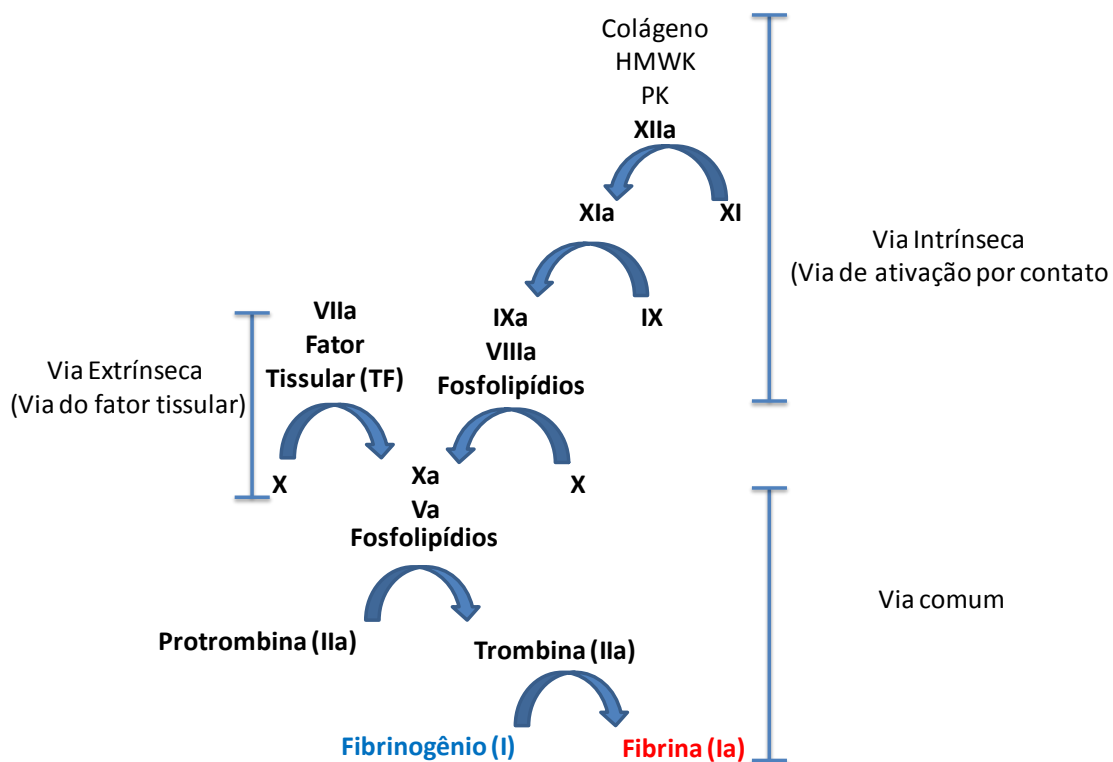


Figura 2. Representação esquemática da cascata de coagulação. A via extrínseca tem início pela interação do fator tissular (TF) com o FVIIa e a via intrínseca através do contato entre cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e pré-caliceína com colágeno exposto na matriz subendotelial. Ambas as vias levam à formação do complexo de fatores Xa/Va, que converte protrombina em trombina, a qual converte fibrinogênio em fibrina. *Fosfolípidio* indica que a reação requer uma superfície fosfolípídica para ocorrer, normalmente a superfície de plaquetas ativadas (MACFARLANE et al.1964).

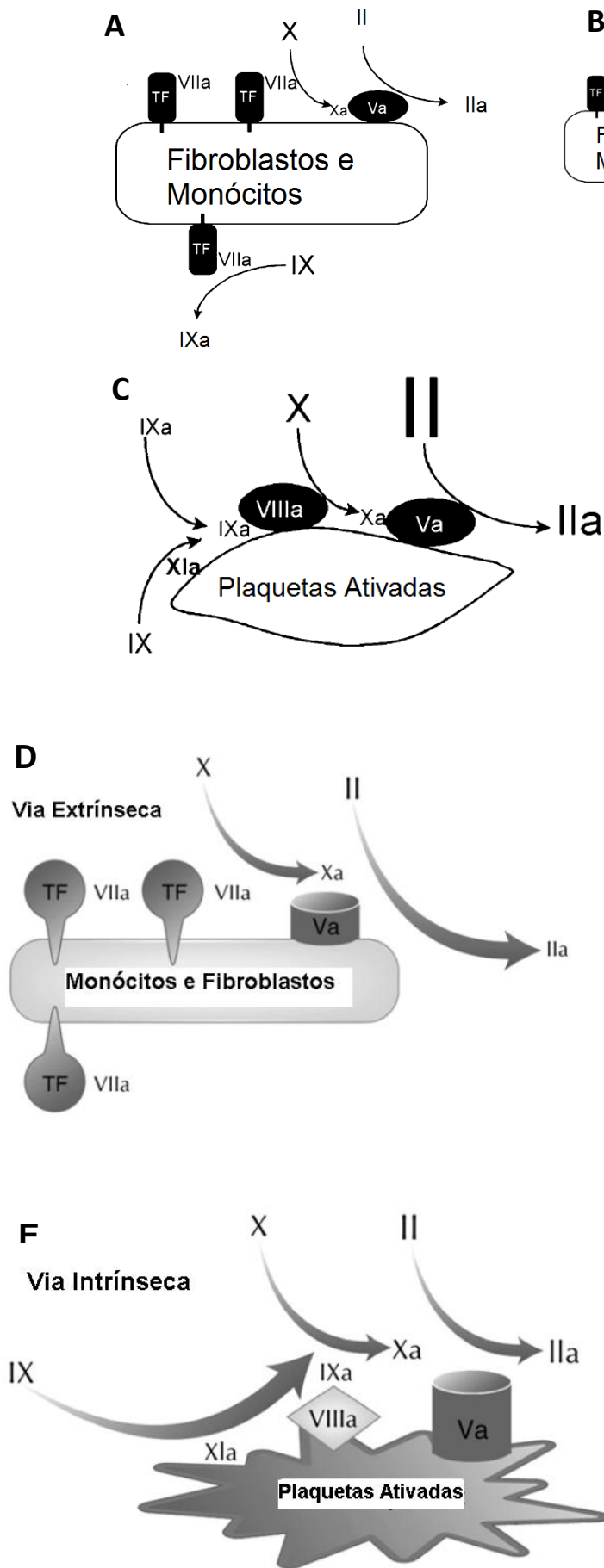


Figura 3 – Fases do modelo de coagulação na superfície celular. (A) A iniciação ocorre em células com TF em suas superfícies, como monócitos e fibroblastos, onde FX combina com FV_a, catalizando a produção de pequenas quantidades de trombina. (B) A trombina gerada nessas células amplifica a resposta procoagulante ativando FV, FVIII, FXI e plaquetas. (C) Ocorre grande formação de trombina na superfície fosfolipídica das plaquetas ativadas durante a propagação do coagulação. (D) Vias extrínscas e (E) intrínscas do processo de coagulação segundo o modelo baseado em superfícies celulares. Adaptado de MONROE et al (2007).

1.6 Regulação do sistema de coagulação

Para garantir o equilíbrio hemostático, evitando a formação e/ou persistência de trombos que poderiam causar danos ao organismo, o sistema hemostático possui uma série de reguladores. A proteína C, por exemplo, é um anticoagulante fisiológico de grande importância. Trata-se de uma serino-protease dependente de vitamina K que é convertida pela trombina em proteína C ativada (APC). Juntamente com a proteína S e com fosfolípidios, seus cofatores, a proteína C degrada FVa e FVIIIa, ambos importantes para a formação de trombina (CLOUSE, et al., 1987). Outro regulador importante é a antitrombina, um inibidor de serino-protease que degrada, além da trombina, os fatores IXa, Xa, XIa e XIIa. A antitrombina está constantemente ativada, mas sua ação inibitória é marcadamente aumentada na presença de heparina, um anticoagulante clássico amplamente usado em procedimentos médico-cirúrgicos e como medicação (HIRSH, 1991).

Uma vez formado o trombo e cumprida a sua função hemostática, é essencial que este seja degradado, de modo que seja restabelecida a circulação sanguínea no local da lesão. O principal componente do sistema fibrinolítico é a plasmina, um regulador de extrema importância que cliva a malha de fibrina responsável pela sustentação do trombo (Figura 4). A plasmina é formada a partir do plasminogênio, sintetizado nas células hepáticas. O plasminogênio circulante liga-se à fibrina emaranhada ao trombo, mas é somente após a sua ativação pelo ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) e pelo ativador uroquinase do plasminogênio (u-PA) que este se torna ativo. Assim, ocorre a formação da plasmina, que reage proteoliticamente com as moléculas de fibrina, desfazendo a malha ao redor do trombo, processo chamado de fibrinólise. A própria plasmina é um ativador desse sistema, induzindo a sua formação ao estimular a geração de mais formas ativas de t-PA e u-PA. É importante salientar que o processo fibrinolítico possui reguladores negativos que impedem que sua ação seja excessiva, levando a um risco de hemorragia. Tanto t-PA como a u-PA têm sua ação suprimida pelos inibidores do ativador do plasminogênio (PAIs), uma serino protease produzida, principalmente, por células endoteliais (GERBER et al, 2011). A atividade fibrinolítica da plasmina

também é regulada pela alfa-2-macroglobulina e pela alfa-2-antiplasmina, macromoléculas que inibem alostericamente a plasmina (SCHALLER et al., 2011), bem como, pelo inibidor de fibrinólise ativado por trombina (TAFI), o qual impede a função da fibrina como co-fator na conversão de plasmina.

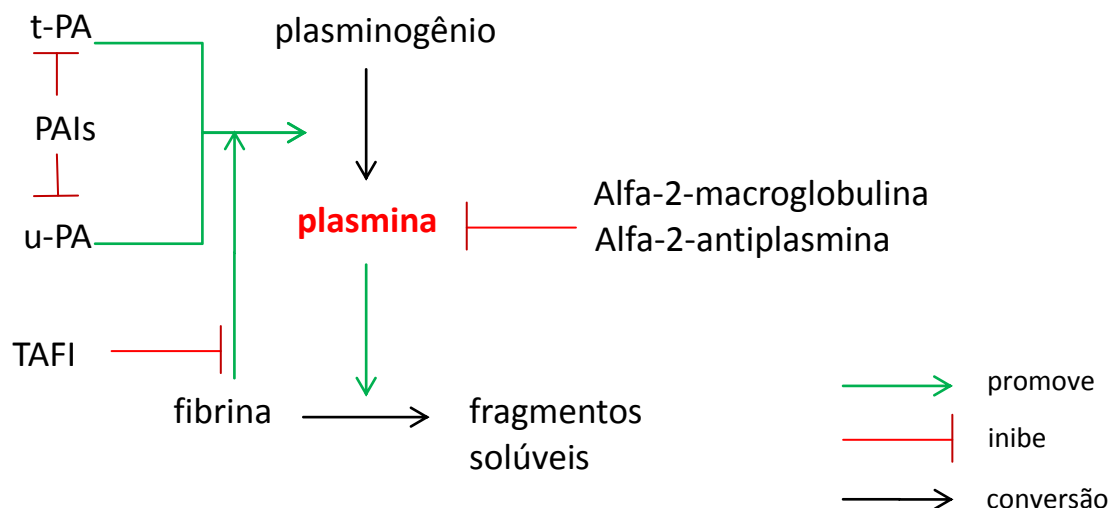


Figura 4. Representação esquemática dos principais aspectos do sistema fibrinolítico. A principal substância fibrinolítica endógena é a plasmina, que promove a clivagem proteolítica da malha de fibrina emaranhada ao trombo. A plasmina é produzida a partir do plasminogênio pela ação do ativador tissular do plasminogênio (t-PA) e do ativador uroquinase do plasminogênio (u-PA). A contra-regulação deste sistema é feita pelos inibidores do ativador do plasminogênio (PAIs), por moléculas plasmáticas inibidoras da plasmina, sobretudo a alfa-2-macroglobulina e alfa-2-antiplasmina, além do inibidor de fibrinólise ativado por trombina (TAFI).

1.7 Atividades farmacológicas de cisteíno-proteases do látex de *Vanconcella cundinamarcensis* (*Carica candamarcensis*)

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo vem estudando as propriedades bioquímicas e farmacológicas de cisteíno-proteases encontradas no látex da espécie *Vanconcella cundinamarcensis*, de sinonímia *Carica candamarcensis*. Essa é uma planta típica da costa oeste da América do Sul, apresentando um tronco grosso, geralmente ramificado, medindo até 5 m de altura e contendo uma coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. Seu fruto é elipsóide, amarelo quando maduro, sendo que a

polpa é delgada, aquosa e aromática, comestível somente após o cozimento (LEON, 1987).

Pela separação cromatográfica do látex de *V. cundinamarcensis* em Sephadex G10, são obtidos dos picos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, sendo o primeiro rico em cisteíno-proteases com alta atividade proteolítica (GRAVINA et al., 1994), algumas das quais estão ausentes no látex de *Carica papaya* (BAEZA et al., 1990) de onde é obtida a papaína, uma cisteíno-protease empregada em diversos processos industriais. Além disso, as enzimas proteolíticas encontradas o látex de *V. cundinamarcensis* apresentam características bioquímicas diferentes das descritas para a papaína, tais como: pH ótimo, ponto isoelétrico, atividade catalítica e reatividade imunológica (BRAVO et al., 1994).

Apesar do papel biológico das cisteíno-proteases presentes no látex dessas plantas não estar totalmente elucidado, acredita-se que sua função esteja relacionada à proteção do fruto. Uma observação desse tipo é constatada no fruto verde, no qual o processo de cicatrização se inicia depois de produzida uma lesão. Nesse caso, a cicatrização é precedida pela formação do coágulo de látex no local lesado. Alguns resultados demonstram que a ativação das proteases do látex precede a formação do coágulo, sendo que esta ativação é de natureza sequencial, de forma semelhante ao que ocorre no processo de coagulação sanguínea (SILVA et al., 1997; MOUTIM et al., 1999).

Nosso grupo de pesquisa já obteve considerável volume de informações a respeito das propriedades farmacológicas e toxicológicas da fração proteolítica P1G10. Resumidamente, estudos *in vivo* demonstraram uma capacidade cicatrizante cutânea, dependente da dose, de P1G10 em modelo murino de dermoabrasão (MELLO et al., 2006) e queimadura (GOMES et al., 2010), além de terem sido evidenciadas atividades protetora e cicatrizante gástrica em modelos de lesões ulcerativas agudas e crônicas (MELLO et al., 2008; SILVA, 2009). Essa atividade cicatrizante pode ser justificada pelas ações mitogênica, angiogênica e proteolítica de P1G10 (GOMES et al., 2005; MELLO et al. 2006), bem como pela promoção do recrutamento de células envolvidas na regeneração de tecidos (CHRISTIANO, 2008).

Outra linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida em nosso laboratório tem sido a determinação das atividades farmacológicas de P1G10 no tratamento de tumores. Estudos em modelos murinos de melanoma com baixo potencial metastático, B16-F1, melanoma com alto potencial metastático, B16-F10, carcinoma de Ehrlich e carcinoma de colon CT26WT, P1G10 mostrou considerável efeito antitumoral e antimetastático (VIANA et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009, DITZ et al., 2010). Nessas publicações foi sugerido que as atividades antiangiogênica e imunomodulatória sejam responsáveis pela eficácia antitumoral e que, alterações promovidas na superfície das células tumorais, resultando em menor capacidade de adesão, participem do efeito antimetastático.

Essas observações abriram caminho para que nosso grupo realizasse esforços para a elaboração de um produto para uso farmacêutico. Isto tornou necessária a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos da fração P1G10. A avaliação dos parâmetros farmacocinéticos foi definida e se mostrou que a biodisponibilidade de P1G10 por via subcutânea é comparável àquela por via endovenosa, sendo a via oral a que forneceu menor biodisponibilidade (8%) (LEMOS, et. al., submetido). Através das avaliações pré-clínicas de toxicidade aguda foi determinada a dose de 10 mg/kg/dia (NOAEL) como a dose máxima segura para futuros estudos pré-clínicos crônicos e clínicos, além de indicar a ausência de um potencial mutagênico/genotóxico da fração proteolítica P1G10 (VILLALBA et al., 2010)

Dentre os diversos testes toxicológicos realizados, nosso grupo se deparou com resultados que sugeriam uma possível ação de P1G10 sobre o processo hemostático. Em estudos de toxicidade aguda, após terem recebido 2.000 mg/kg de P1G10 por via oral ou 50 mg/kg por via intraperitoneal ou endovenosa, ratos Wistar apresentaram sinais de hemorragia (VILLALBA et al., 2010). Além disto, em estudos sub-crônicos, o grupo de animais que recebeu 300 mg/kg de P1G10 por v.o. morreu após 8 semanas de tratamento, sendo que a partir da sexta semana apresentavam hemorragia nasal, sangramento nos olhos e unhas escurecidas (SALAS et al., 2010). Mesmo que estes estudos tenham tido, inicialmente, o objetivo de determinar a segurança de P1G10, eles nos permitiram lançar a hipótese de que a fração P1G10 poderia inibir o

processo de coagulação *in vivo* se administrada nas doses seguras usualmente já utilizadas em experimentos farmacológicos. Essa hipótese foi reforçada quando estudos preliminares permitiram observar uma atividade fibrinogenolítica considerável de CMS2MS2, uma proteína purificada a partir de P1G10 (Figura 5). Através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE 10%) se observou que a incubação de fibrinogênio com CMS2MS2 resultava em clivagem da molécula de fibrinogênio, sendo que a degradação da molécula aumentava em função do tempo de incubação (0 – 120 min) (BILHEIRO et al., 2009).

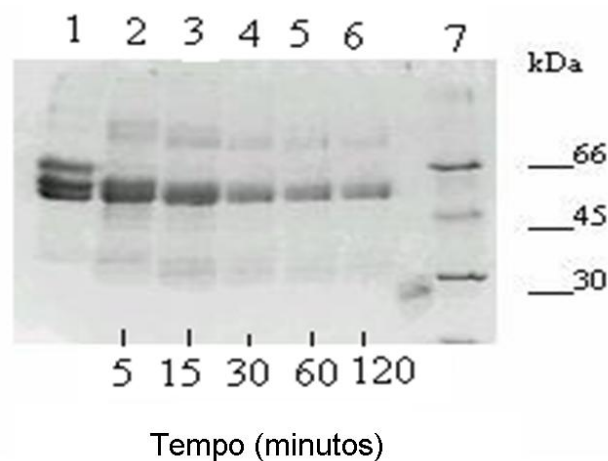


Figura 5 – Ação fibrinogenolítica de CMS2MS2. Clivagem progressiva do fibrinogênio ao longo do tempo (0 120 min) medido por eletrofore (SDS-PAGE 10%). Canaletas: 1- fibrinogênio (6.25 mM); 2 – 6 fibrinogênio após tratamento com CMS2MS2 (8 µg) em intervalos específicos e 7 – Marcadores de massa molecular (Sigma): albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (30 kDa).

1.8 Cisteíno-proteases no processo hemostático

Estudos relacionados ao processo hemostático, ou seja, que envolvem trombogênese, coagulação sanguínea e agregação de plaquetas, já foram realizados com cisteíno-proteases presentes na bromelina, um extrato aquoso obtido das folhas do abacaxi (*Ananas comosus*). Em modelos murinos a bromelina aumentou a atividade fibrinolítica de uma forma dependente da dose (PIROTTA et al., 1978), sendo a fração fibrinolítica isolada mais tarde por métodos bioquímicos (AKO et al., 1981). Também foi demonstrado que a bromelina aumenta o tempo de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa), bem como reduz a agregação plaquetária induzida por ADP (HEINICKE, et al., 1972; LIVIO et al., 1978). Esse último efeito parece estar relacionado à atividade proteolítica da bromelina, já que a inibição desta o aboliu (MORITA et al., 1979).

Em um estudo comparativo, foi avaliada a ação da bromelina e da papaína (cisteíno-proteases obtida da planta *Carica papaya*) sobre a adesão *in vitro* de plaquetas marcadas com BCECF-AM a células endoteliais (BKEz-7). Quando as plaquetas foram incubadas com papaína ou com bromelina, previamente à ativação por trombina, observou-se uma redução de 22% e 28% na adesão plaquetária às células endoteliais, respectivamente. Nesse mesmo estudo foi usado um modelo *in vivo* de trombose induzida por laser em ratos, em que a administração oral de bromelina reduziu 11% a formação de trombo nas arteríolas mesentéricas (METZIG et al., 1999). Além disso, *in vitro*, a bromelina foi capaz de ativar o plasminogênio, formando plasmina, a qual é o principal fibrinolítico endógeno (MAURER et al., 2000). Um depósito de patente já foi feito das proteases da bromelina para inibir a coagulação sanguínea (Patent WO PCT/EP 98/04406).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que enzimas proteolíticas estão entre os componentes que modulam a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária; os trabalhos descritos na literatura científica em que se observa que outras cisteíno proteases possuem efeito anti-hemostático; os efeitos hemorrágicos de P1G10 em ensaios de toxicidade aguda e crônica e, finalmente, os resultados prévios obtidos por nosso grupo que apontam para uma ação proteolítica de P1G10 sobre a molécula de fibrinogênio, foi hipotetizado neste estudo que P1G10, em doses seguras, possui efeito antitrombótico. Assim, esforços foram envidados no sentido de compreender as alterações de origem hemorrágica observadas durante os estudos toxicológicos, bem como expandir o conhecimento sobre a ação de P1G10 sobre o sistema hemostático. Como oportuna complementação, foi também analisada a possibilidade de P1G10 constituir um candidato a fitoterápico usado no tratamento de eventos trombóticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antitrombótica da fração proteolítica P1G10 *in vivo* e, ainda, avaliar seus efeitos anticoagulante e antiagregante plaquetário *in vitro* como possíveis mecanismos de ação.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antitrombótica de P1G10 por microscopia intravital em modelo de trombose induzida por luz/corante fluorescente na microcirculação da orelha de camundongos *hairless*.
- Avaliar o efeito anticoagulante de P1G10 pela determinação do tempo de protrombina, do tempo de tromboplastina parcial ativada, do tempo de trombina e da concentração de fibrinogênio em plasma de ratos Wistar por coagulometria foto-óptica.
- Avaliar o efeito antiagregante plaquetário de P1G10 em plasma de ratos Wistar por agregometria por impedância.
- Avaliar o efeito fibrinolítico de P1G10 sobre coágulo de fibrina moldado em placa de Petri.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os testes de coagulação e de agregação plaquetária foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 120 e 150 g, com aproximadamente 8 semanas de vida, obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Nos ensaios de microscopia intravital foram utilizados camundongos da linhagem *hairless*, machos, pesando entre 20 e 25 g, com aproximadamente 8 a 10 semanas de vida, cuja colônia é mantida no biotério do Departamento de Farmacologia, ICB, UFMG. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG (CETEA – PROTOCOLO 247/2011).

4.2 Obtenção e purificação das amostras de P1G10

A obtenção e purificação da fração P1G10 foi realizada pelo Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo do laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, UFMG, conforme descrito anteriormente (TEIXEIRA et al., 2008). Brevemente, a partir de incisões no epicarpo de frutos maduros, o látex foi coletado e armazenado a 4°C, sendo a seguir liofilizado e novamente armazenado a -20°C. No processo de separação cromatográfica foram dissolvidos 15,0 g do látex liofilizado em 75,0 mL de solução tampão de ativação. A seguir, a mistura foi agitada durante 30 min e centrifugada (9.000 G) durante 10 min a 4 °C. Após a filtração do sobrenadante, o resíduo obtido foi novamente submetido ao procedimento descrito acima, utilizando agora 25,0 mL de tampão de ativação. O produto filtrado foi aplicado em uma coluna de filtração contendo resina Sephadex® G-10 equilibrada com tampão de acetado de sódio 1,0 M. As frações protéicas coletadas foram triadas mediante a determinação da absorbância a 280 nm, formando dois picos de perfis cromatográficos distintos, sendo as do primeiro pico reunidas para compor a fração P1G10.

4.3 Inibição da atividade proteolítica de P1G10 por iodoacetamida (IAA)

A iodoacetamida (IAA) foi utilizada para promover a inibição irreversível da atividade enzimática de P1G10, conforme previamente descrito (GOMES et al., 2005). Inicialmente, foi preparada uma solução aquosa (35,0 mL) de P1G10 na concentração de 2,0 mg/mL, à qual foram adicionados 4,9 mg de DTT. A solução resultante foi incubada a 4 °C por 30 min sob agitação constante. A seguir, esta solução foi deixada em incubação por 1 h e 40 min com 2,94 g de IAA. Para eliminar o excesso de IAA, a amostra então foi dialisada a 4 °C, por 48 h, com leve agitação contra 2.500 mL de água mili-Q (troca de água a cada 12 h). A seguir, a amostra foi esterilizada e disponibilizada para utilização nos ensaios biológicos.

4.4 Coleta de sangue

Para realização dos ensaios de coagulação e de agregação plaquetária foi utilizado o sangue de ratos Wistar, conforme características descritas acima. Após anestesia por via *i.m.*, utilizando uma mistura de 80 mg/Kg de quetamina (Vetnil[®], 100mg/mL) e 10 mg/kg de xilazina (Sytec[®], 20mg/mL), foi realizada laparotomia para permitir acesso à veia cava caudal. Utilizando uma agulha de 25x7 (Embramac[®]) e seringa de 5 mL (Embramac[®]) foram coletados 3,5 mL de sangue e transferidos para tubos (Vacuette[®]) contendo o anticoagulante citrato de sódio (3,8%, 9:1 v/v). Depois de colhido o sangue, os animais, ainda anestesiados, foram exsanguinados até a morte por um corte na artéria aorta abdominal.

4.5 Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e do plasma pobre em plaquetas (PPP).

A amostra de sangue foi centrifugada em 1.500 rpm por 10 minutos a fim de se obter o PRP a ser utilizado nos ensaios de agregação plaquetária. Para a obtenção do PPP (plasma), utilizado para diluir o PRP e para os ensaios de coagulação, o sangue foi centrifugado por mais 20 min em 3.000 rpm. O sangue coletado de cada animal forneceu um volume de PRP (aproximadamente 800 µL) insuficiente para que se pudesse fazer repetições para análise estatística. Assim, optou-se por realizar cada repetição a partir de

um *pool* de PRPs. Para o ensaio de agregação plaquetária foram utilizados 4 *pools* de PRP (5 animais/*pool*).

4.6 Avaliação do Tempo de Protrombina

A determinação do Tempo de Protrombina (TP) foi realizada com a incubação por 5 min, a 37°C, de 50 µL de plasma com 2 µL de P1G10 (0,25, 0,5, 1,0 ou 2,0 µg/µL), ou P1G10-IAA 2,0 µg/µL ou água deionizada. A seguir, foram adicionados à cubeta 100 µL de Thromborel[®] (tromboplastina cálcica), desencadeando o processo de coagulação. O tempo necessário para a formação do coágulo foi aferido automaticamente em coagulômetro Dade-Behring BFT II[®].

4.7 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

Na determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA), 50 µL do plasma foram incubados a 37°C, por 5 min, com 2 µL P1G10 (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 µg/µL), ou P1G10-IAA (2,0 µg/µL) ou água deionizada. A seguir, foram adicionados à cubeta 50 µL de Dade Actin[®] (cefaloplastina ativada) e, a seguir, 50 µL de CaCl₂ 0,02M (Dade[®] Cloreto de cálcio), desencadeando o processo de coagulação. O tempo necessário para a formação do coágulo foi aferido automaticamente em coagulômetro Dade-Behring BFT II[®].

4.8 Avaliação por microscopia intravital fluorescente do efeito de P1G10 em um modelo de trombose induzida em orelha de camundongo hairless.

Inicialmente, os animais (n = 5/grupo) foram anestesiados por injeção intramuscular de uma mistura de 150mg/kg de quetamina (Vetnil[®], 10%) e 10 mg/kg de xilazina (Sytec[®], 2%). Após a canulação da veia caudal, os animais receberam diferentes doses de P1G10 (2,5, 5,0 ou 7,5 mg/kg), ou P1G10-IAA (5mg/kg) ou salina por via s.c. sendo deixados em repouso sobre manta térmica com temperatura constante de 36° C. Em seguida, foram cuidadosamente transportados ao microscópio com epi-iluminação (Nikon Ti-E), equipado com um filtro de luz azul (lâmpada de mercúrio 100W, comprimento de onda de excitação de 465-495 nm e de emissão de 515-555 nm). Foram então selecionadas vênulas variando entre 10 e 15 µm de diâmetro

(observadas com objetiva de aumento de 60x) e feito o registro da velocidade basal das hemácias (fluxo sanguíneo) por um período de aproximadamente 2 minutos (Figura 6). Vinte e cinco minutos após a administração da P1G10 ou P1G10-IAA ou salina, foi realizada a indução trombótica de acordo com um método previamente descrito por ROESKEN et al (1997). Brevemente, através da cauda canulada, foi realizada a administração *i.v.* de 0,15 mL (6 % p/v) do fluorocromo isotiocianato de fluoresceína-dextrana (FITC-dextrana, peso molecular 150.000, Sigma, EUA), o qual fornece o contraste para visualização do plasma, além de participar da indução trombótica fotoquímica (ROESKEN et al 1997). A seguir, a trombose foi induzida na microcirculação da superfície dorsal da orelha do camundongo por exposição (10 min) do FITC-dextrana a luz azul. A área de exposição da orelha à fotoestimulação foi de aproximadamente 300 μm e o campo de observação de 150 μm . Após 10 min de estimulação contínua da formação trombótica, o fluxo no vaso foi registrado por um outro período de 10 min (utilização de luz verde, incapaz de induzir trombose fotoquímica), afim de avaliar a ocorrência ou não de recanalização. No *set up* de gravação das imagens obtidas pela microscopia intravital (Figura 7) foi utilizada uma câmera de vídeo Dage-MTI[®], ligada a um sistema de gravação com mesa de edição DVCAM (Sony[®]), sendo os vídeos convertidos em computador para o formato AVI pelo programa VirtualDub, afim de permitir a análise posterior das imagens digitais.

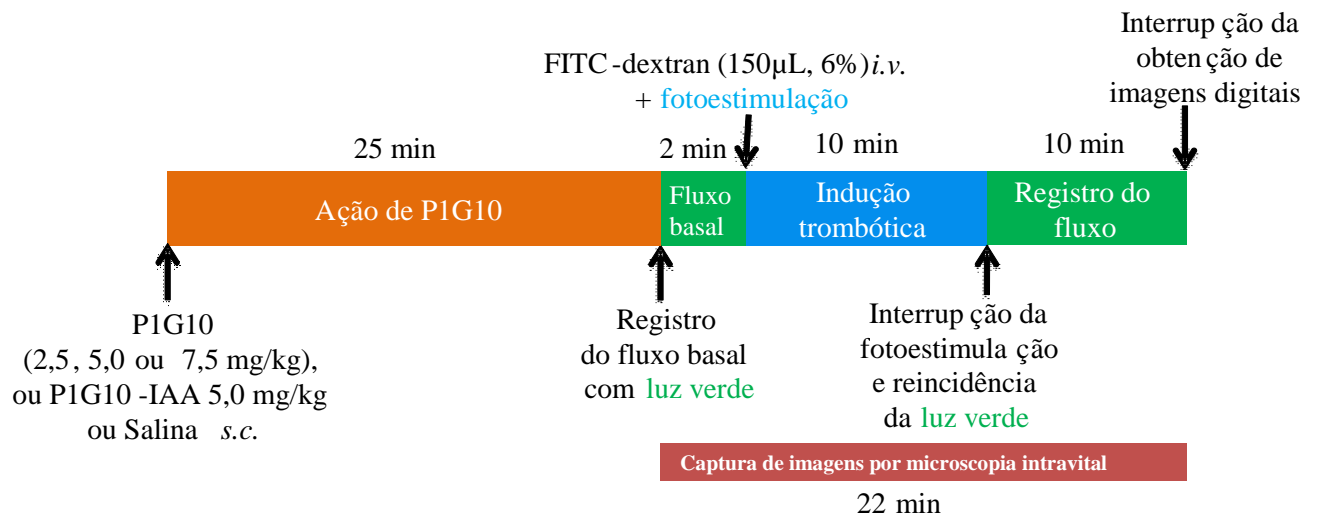


Figura 6. Desenho experimental do protocolo da avaliação da atividade antitrombótica de P1G10 em função do tempo. Depois de anestesiado, cada camundongo recebeu P1G10 (2,5, 5,0 ou 7,5 mg/kg), ou P1G10-IAA ou salina por via s.c.. Após 25 min, o animal foi colocado sob o microscópio e, uma vez selecionado o vaso, as imagens do fluxo sanguíneo basal foram registradas por pelo menos 2 min. A seguir, o trombo foi induzido através da injeção *i.v.* de FITC-dextran (150µL, 6%) e fotoestimulação com luz azul por 10 min. O fluxo sanguíneo foi registrado por 20 minutos para posterior obtenção da Velocidade dos Glóbulos Vermelhos (VGV, expressa em µm/s).



Figura 7. Set up da microscopia intravital fruoescnte. Imagem fotográfica do sistema de aquisição, captura e análise das imagens do fluxo sanguíneo da microcirculação da orelha dos camundongos, obtidas por microscopia intravital, após indução do trombo fotoquímico. A seta em primeiro plano indica o animal anestesiado sobre o microscópio de epi-iluminação invertido o qual está acoplado a uma câmera de vídeo (não mostrada) durante a fotoestimulação do FITC-dextran. Ao fundo, seta dupla mostrando sistema *on-line* de captura e gravação de imagens, consistindo de gravador DVCAM (esquerda) e computador (direita). No monitor, pode-se observar o contraste da albumina fluorescente contra a imagem escura dos glóbulos vermelhos no interior do vaso sanguíneo (seta).

A análise das imagens digitais foi feita através do programa ImageJ (*National Institute of Health*, EUA). Com a finalidade de obter a velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV), em $\mu\text{m/s}$, foi traçado sobre cada vaso analisado uma régua virtual (Figura 8), cujo comprimento arbitrário é dado em um número conhecido de *pixels* (um *pixel* é a menor unidade que forma uma imagem digital e, nas imagens analisadas, mede $4,7 \mu\text{m}$). Em seguida mediu-se o número de quadros (*frames*), necessários para um glóbulo vermelho atravessar a régua virtual. A conversão da velocidade para $\mu\text{m/s}$ foi realizado por regra de três, sabendo-se que, nos vídeos obtidos, cada pixel da régua mede $4,7 \mu\text{m}$ e que, através do sistema de filmagem utilizado, captura-se 29,97 quadros/s. A determinação *offline* da VGV no vaso foi feita em intervalos de 10 s e, a seguir, o valor de cada velocidade foi normalizado em função da média da VGV obtida da análise do fluxo sanguíneo basal.

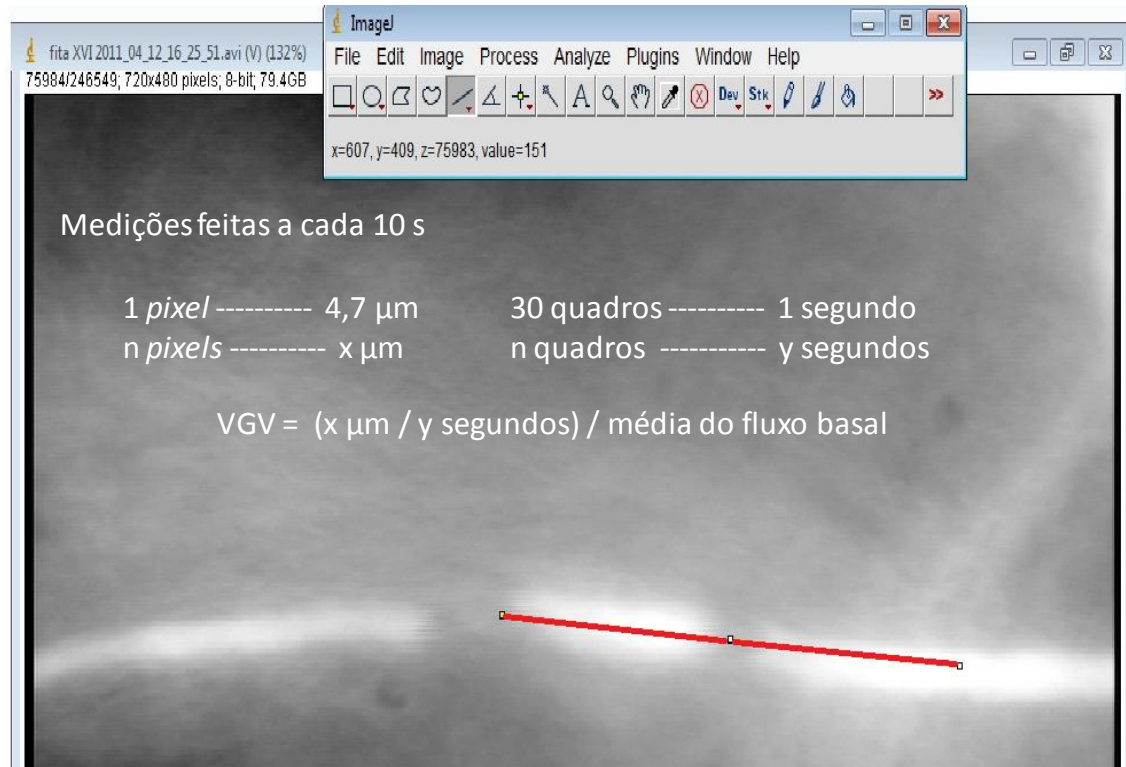


Figura 8. Imagens obtidas para a determinação da velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV). Os vídeos obtidos durante os experimentos foram analisados *offline* utilizando-se o programa ImageJ, a fim de obter a velocidade das hemácias. Para isto, foi traçada sobre o vaso analisado uma régua virtual (em vermelho), com seu comprimento definido arbitrariamente com um número de *pixels* conhecido. O número de quadros necessário para que cada hemácia cobrisse toda a régua foi medido a cada 10 segundos. Sabendo que cada segundo de filmagem contém 30 quadros e que cada pixel corresponde a 4,7 µm foi possível converter a VGV de quadros/pixel para µm/s. O valor da VGV em cada momento da análise foi normalizado em função da VGV média do vaso durante seu fluxo basal, o qual foi considerado como 1.

4.9 Avaliação da agregação plaquetária

Após a separação do plasma rico em plaquetas (PRP), o sangue remanescente no tubo foi novamente centrifugado (3.000 rpm, 20 min) para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). A seguir foi feita a determinação inicial do número de plaquetas na amostra de PRP (Coulter[®] T-890, Chrono-log) e o número de plaquetas foi ajustado com PPP para se obter $3,0 \times 10^8$ plaquetas/mL. Os ensaios de agregação plaquetária foram adaptados do método descrito por BORN e CROSS (1963). Brevemente, 450 μ L de PRP foram incubados por 10 min com P1G10 (0,25, 0,50 ou 1,0 μ g/ μ L), ou P1G10-IAA (1,0 μ g/ μ L) ou água deionizada. A seguir, 50 μ L do agente agregante ADP (600 μ M) (Serva[®] Electrophoresis) foram adicionados ao PRP, desencadeando a agregação plaquetária. O processo de agregação foi aferido por 10 minutos (600 s) e a percentagem de agregação máxima das plaquetas foi registrada por um computador acoplado a um agregômetro de modelo PACKS-4[®] (Helena Laboratories), sendo os dados obtidos (curvas e porcentagem de agregação máxima) impressos para posterior análise quantitativa e qualitativa. Todas as amostras de P1G10 foram adicionadas em volume de 5 μ L e todos os reagentes foram mantidos à temperatura de 37°C durante o ensaio.

4.10 Tempo de trombina (TT) e concentração plasmática de fibrinogênio.

Os ensaios de tempo de trombina (TT) foram realizados conforme descrito por CLAUSS e colaboradores (1957). Inicialmente foi determinada a curva de calibração (Figura 9) que relaciona o tempo de trombina à concentração de fibrinogênio na amostra, a partir de fibrinogênio (TriniCAL[®], plasma humano citratado e liofilizado) que acompanha o kit Triniclot[®] Fibrinogen (Trinity Biotech), conforme instruções do fabricante. O kit também contém um reagente de trombina bovina (75 NIH U/mL). Os ensaios *in vitro* foram realizados em plasma de ratos Wistar machos (n = 5), usando o mesmo reagente de trombina descrito acima. Nestes ensaios, concentrações crescentes de P1G10 (0,25, 0,50, 1,0 ou 2,0 µg/µL), ou P1G10-IAA (2,0 µg/µL), ou água deionizada (5 µL) foram incubadas a 37°C com 100 µL de plasma obtido como descrito anteriormente. A seguir, foram acrescentados ao plasma 50 µL de reagente de trombina pré-incubado a 37°C e o tempo até a coagulação foi medido automaticamente. Tanto para a determinação da curva de calibração quanto para os ensaios com P1G10 foi utilizado um coagulômetro da marca STAGO ST4.

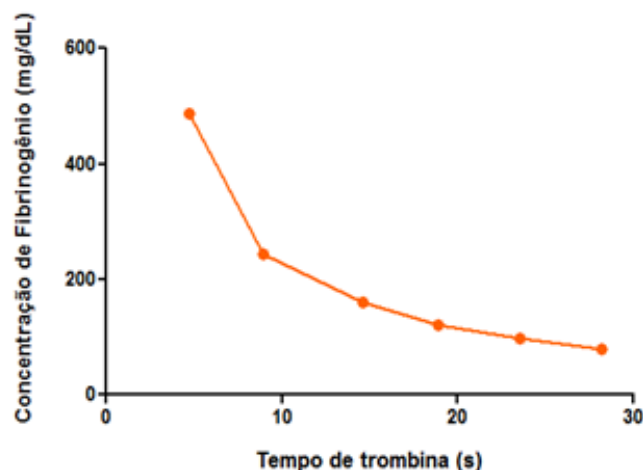


Figura 9. Curva de calibração da concentração de fibrinogênio (mg/dL) em função do tempo de trombina (s) obtida conforme instruções do kit TriniCLOT[®] Fibrinogen.

4.11 Avaliação do efeito fibrinolítico de P1G10

O efeito fibrinolítico de P1G10 foi avaliado pelo método da placa de fibrina (ESTÊVÃO-COSTA et al, 2000). Brevemente, 63 μL de uma solução de trombina (Sigma, USA) a 32 NIH U/mL foram adicionados a 15 mL de uma solução de fibrinogênio (Sigma, USA) (3,0 mg/mL) dissolvida em tampão de Tris-HCl (pH 7,4). A mistura foi homogeneizada, vertida sobre uma placa de Petri e mantida em temperatura ambiente por 2 h, para formação do coágulo de fibrina. A seguir, 5 μL de soluções contendo diferentes concentrações de P1G10 (0,10; 0,20; 0,40; 0,70 ou 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram adicionados à superfície de diferentes placas de fibrina, as quais foram incubadas *overnight*. Finalmente, os diâmetros dos halos formados sobre a placa de fibrina foram medidos e expressos em função da concentração de P1G10 testada.

5. RESULTADOS

Para avaliar a atividade da fração P1G10 sobre a coagulação sanguínea *in vitro* foi inicialmente determinada sua ação sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). Tendo sido observado um prolongamento significativo no tempo de coagulação através de ambos os parâmetros, buscamos conhecer o efeito da fração P1G10 sobre a formação de trombos *in vivo*, utilizando o modelo de trombose induzida por reação fotoquímica (FITC-dextrana) na microcirculação da orelha de camundongos hairless. A partir da observação de uma importante atividade antitrombótica da P1G10 nesse modelo, propusemo-nos a tentar elucidar, ao menos parcialmente, os mecanismos envolvidos nesta atividade utilizando ensaios *in vitro*. Foram avaliadas as atividades fibrinogenolítica e antiagregante plaquetária de P1G10 em amostra de plasma de ratos Wistar, bem como, a clivagem de fibrina (fibrinólise). Todos os resultados são detalhadamente descritos abaixo.

5.1 Efeito de P1G10 sobre o Tempo de Protrombina

A ação de P1G10 sobre a coagulação plasmática pelo tempo de protrombina (TP), avaliada em diferentes concentrações (0,25, 0,50, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), foi determinada (Figura 10). Embora na concentração de 0,25 e 0,50 não tenha sido observada qualquer alteração no TP, em 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ houve um prolongamento significativo do tempo de coagulação ($15,8 \pm 2,4$ s) em relação ao controle ($10,7 \pm 0,4$ s) ($p < 0,05$, One Way ANOVA, post-test Bonferroni). Quando a concentração foi elevada para 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, não houve coagulação do plasma no período de 200 segundos, sendo então a contagem interrompida manualmente ($p < 0,0001$, One Way ANOVA, post-test Bonferroni). No entanto, a coagulação plasmática na presença de P1G10-IAA ($8,3 \pm 0,5$ s) não sofreu qualquer alteração.

5.2 Efeito de P1G10 sobre o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

Para a avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) (Figura 11) foram testadas as mesmas concentrações plasmáticas de P1G10 utilizadas no experimento anterior. Embora na concentração de 0,25 não tenha sido observada qualquer alteração no TTPA, houve um prolongamento concentração-dependente no tempo de coagulação nas demais concentrações testadas. Enquanto observou-se um prolongamento significativo nos tempos de coagulação nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($47,0 \pm 6,3$ s) e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($92,4 \pm 11,7$ s) em relação ao controle ($19,0 \pm 2,1$ s) ($p < 0,0001$, One-Way ANOVA, post-test Bonferroni), na concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ não houve coagulação do plasma no período de 200 segundos, quando a contagem foi interrompida manualmente ($p < 0,0001$, One-Way ANOVA, post-test Bonferroni). Entretanto, o efeito anticoagulante de P1G10 não foi importante quando o plasma foi incubado com P1G10-IAA ($17,4 \pm 1,7$).

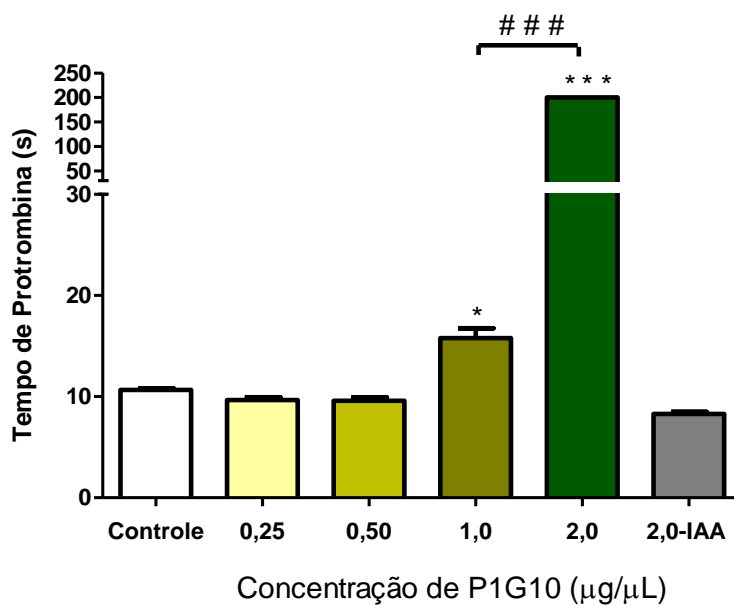


Figura 10. Efeito de P1G10 sobre o tempo de protrombina (TP) *in vitro*. Amostras de plasma (50µL) de ratos Wistar (n=5) foram analisadas após incubação (5 min) com concentrações crescentes de P1G10 (0,25, 0,50, 1,0 2,0 µg/µL) ou P1G10-IAA, ou água deionizada. Após a adição de Thromborel® (100µL) o tempo de formação do coágulo foi determinado em coagulômetro (*p<0.05; *** p<0,0001 em relação ao controle; ### p<0,0001 entre concentrações; One-Way ANOVA, Post-test Bonferroni).

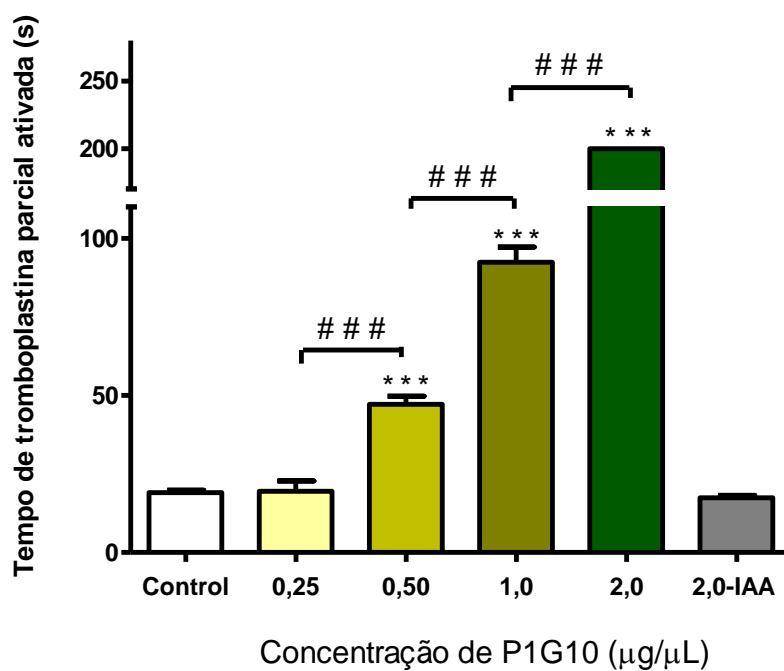


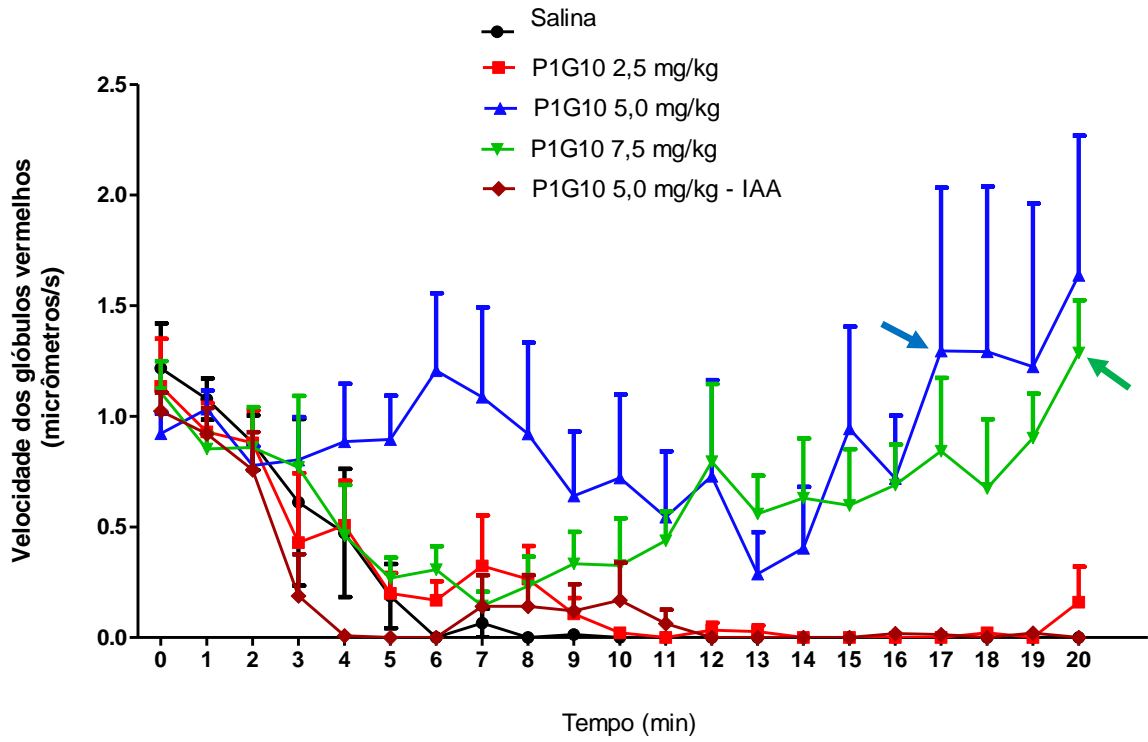
Figura 11. Efeito de P1G10 sobre o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) *in vitro*. Amostras de plasma (50µL) de ratos Wistar (n=5) foram incubadas (5 min) com concentrações crescentes de P1G10 (0,25, 0,50, 1,0 2,0 µg/µL) ou P1G10-IAA, ou água deionizada. Após este período, foram adicionados Actin® (50 µL) e cloreto de cálcio (50µL, 0,025mol/L) à amostra, e o tempo de formação do coágulo foi determinado em coagulômetro (**p<0,0001em relação ao controle; ### p<0,0001 entre concentrações, One-Way ANOVA, pos-test Bonferroni).

5.3 Avaliação do efeito antitrombótico de P1G10 in vivo por microscopia intravital fluorescente.

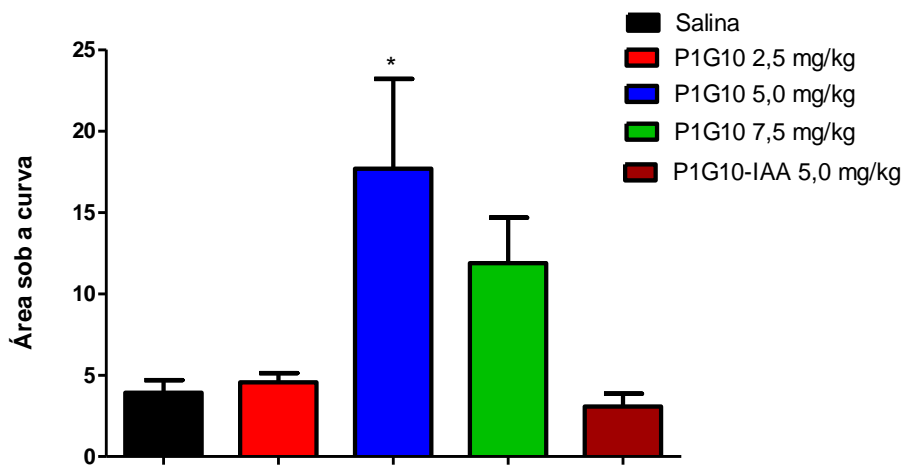
Depois de anestesiados, camundongos *hairless* receberam dose única (s.c.) de P1G10 (2,5, 5,0 ou 7,5 mg/kg) ou P1G10-IAA 5 mg/kg, ou salina. A atividade de P1G10 sobre a formação de trombos foi avaliada, por microscopia intravital, em modelo de trombose induzida fotoquimicamente na microcirculação da orelha, conforme descrito em Materiais e Métodos. Em todos os animais, a administração do FITC-dextran foi feita 2 min após o registro do fluxo sanguíneo basal. Na avaliação estatística do efeito de P1G10 sobre a VGV em grupos de camundongos *hairless* (n = 5/grupo) (Figura 12A), observou-se que no grupo controle houve uma completa interrupção do fluxo 6 min após a indução trombótica, e esta obstrução se manteve estável ao longo de todo o período experimental (20 min). Apesar de, na dose de 2,5 mg/kg, se observar a formação de trombo na microcirculação, este processo aconteceu tardiamente (10 min) em relação ao grupo controle. Notavelmente, porém, nos grupos que receberam doses de 5,0 e de 7,5 mg/kg de P1G10, a avaliação da VGV mostrou que não houve obstrução trombótica estável do fluxo sanguíneo durante todo o período de análise dos vasos. Além disso, na dose de 5 mg/kg, a VGV retornou a um nível equivalente à velocidade basal 17 min após a indução do trombo (seta), enquanto na dose de 7,5 mg/kg, este retorno ocorreu 20 min após a indução trombótica (seta). Quando 5 mg/kg de P1G10-IAA foi administrada, não foi observado qualquer efeito antitrombótico.

Com a finalidade de quantificar, nos grupos testados, a significância do efeito antitrombótico observado, foi determinada a área sob a curva ao longo da escala de tempo de análise da VGV em cada grupo (Figura 12B). Dessa maneira, observou-se que na dose de 2,5 mg/kg ($4,6 \pm 1,3$), P1G10 não alterou significativamente a obstrução trombótica dos vasos analisados em relação ao controle ($3,9 \pm 1,7$). Contudo, na dose de 5,0 mg/kg, verificou-se um importante efeito antitrombótico ($17,7 \pm 12,3$, $p < 0,05$, One-Way ANOVA, post-test Bonferroni). Por outro lado, na dose de 7,5 mg/kg, embora se observe uma clara tendência de aumento da área sob a curva ($11,9 \pm 6,2$), não foi encontrada diferença estatística. Da mesma forma, no grupo que recebeu P1G10-IAA 5,0 mg/kg, não houve diferença estatística da VGV em relação ao grupo controle. Nos gráficos da Figura 11 evidenciamos as alterações da velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV) nos vasos de um animal, nas diferentes condições experimentais (controle, P1G10, e P1G10-IAA) (Figura 12C, gráficos A-E).

A



B



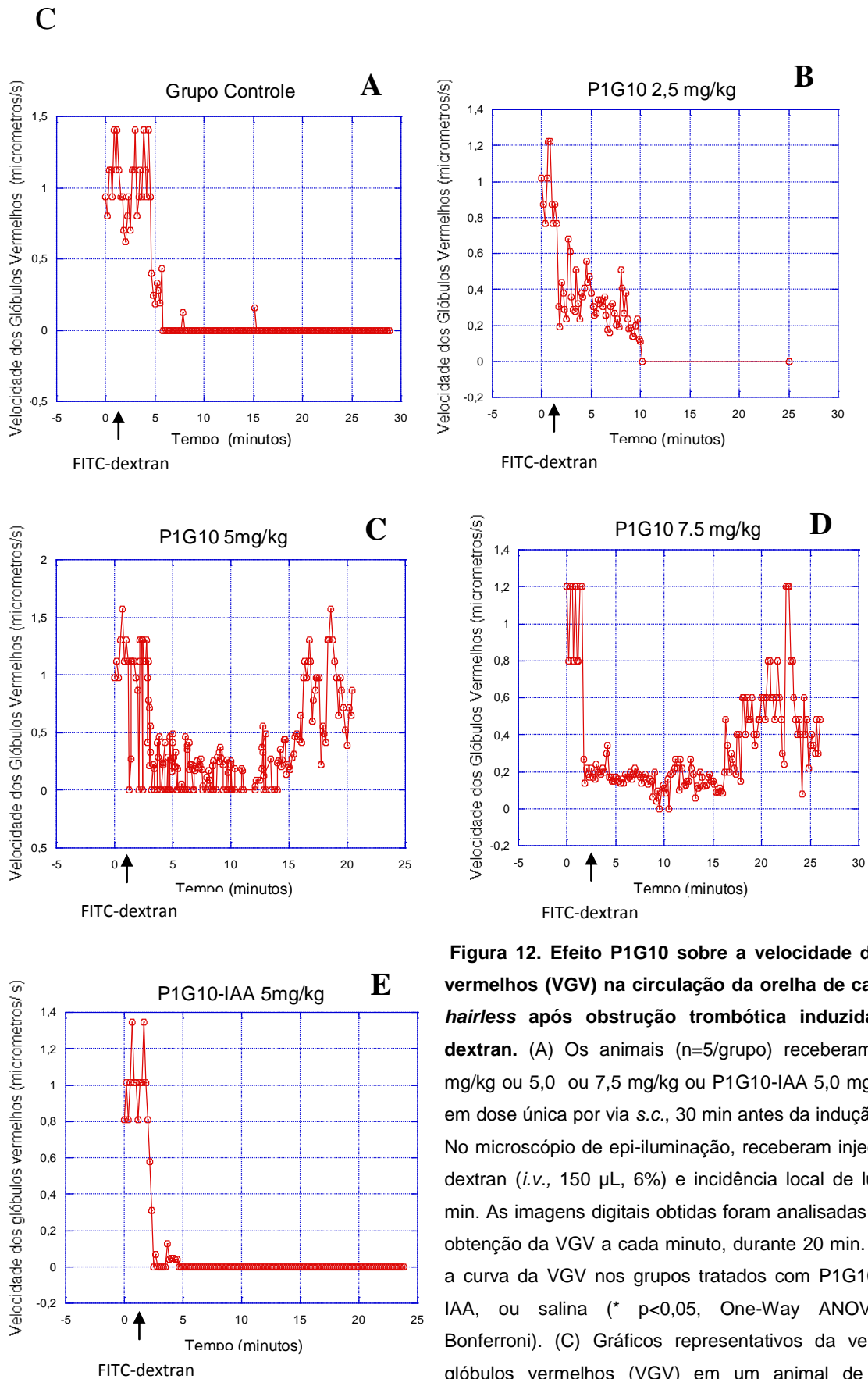


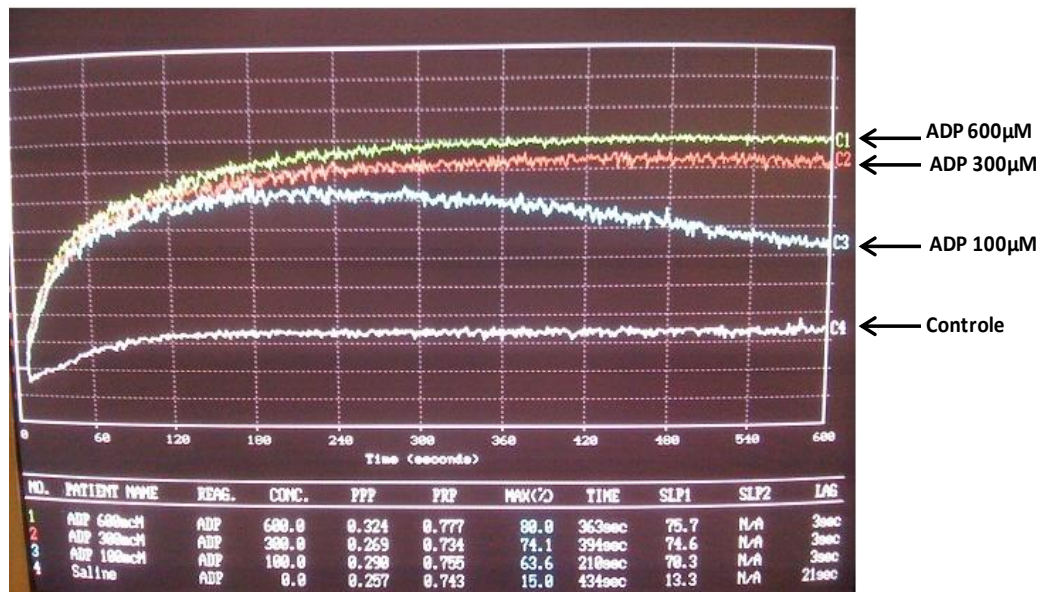
Figura 12. Efeito P1G10 sobre a velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV) na circulação da orelha de camundongos *hairless* após obstrução trombótica induzida por FITC-dextran. (A) Os animais (n=5/grupo) receberam P1G10 2,5 mg/kg ou 5,0 ou 7,5 mg/kg ou P1G10-IAA 5,0 mg/kg ou salina em dose única por via s.c., 30 min antes da indução trombótica. No microscópio de epi-iluminação, receberam injeção de FITC-dextran (*i.v.*, 150 μ L, 6%) e incidência local de luz de por 10 min. As imagens digitais obtidas foram analisadas “offline” para obtenção da VGV a cada minuto, durante 20 min. (B) Área sob a curva da VGV nos grupos tratados com P1G10 ou P1G10-IAA, ou salina (* $p < 0,05$, One-Way ANOVA, post-test Bonferroni). (C) Gráficos representativos da velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV) em um animal de cada grupo experimental. Seta indica momento da administração do FITC-dextran.

5.4 Avaliação do efeito antiagregante plaquetário de P1G10

Inicialmente foram definidas as condições experimentais ideais para se obter a máxima agregação plaquetária, além de saturação da curva de agregação. Para isso, inicialmente foram definidas a melhor concentração de adenosina difosfato (ADP) a ser usada como agente agregante e, a seguir, o número de plaquetas no plasma rico em plaquetas (PRP), obtido da amostra de sangue coletado de ratos Wistar. Na avaliação da saturação da curva de agregação (Figura 13A), na concentração de 300 μM e 600 μM de ADP, nota-se a formação de um platô, o que não foi observado na concentração de 100 μM , indicando ocorrer desagregação plaquetária na menor concentração de ADP. Nos resultados de experimentos realizados em triplicadas, através de análise estatística, não foi observada diferença (One-Way ANOVA, post-test Bonferroni) na percentagem de agregação plaquetária máxima entre as concentrações de ADP testadas (100, 300 e 600) (dados não mostrados).

Diante dos resultados, optou-se por realizar os experimentos seguintes fixando a concentração do ADP em 600 μM , de modo a permitir um excesso deste agente agregante durante os experimentos e evitar desagregação das plaquetas. Para investigar se a agregação máxima obtida poderia melhorar dependendo do número de plaquetas, foi avaliada a percentagem de agregação plaquetária em 1,0, 3,0 e 5,0x10⁸ plaquetas/mL (Figura 13B). Foi observado que a agregação em 5,0x10⁸ plaquetas/mL (79,4 \pm 3,4%) e em 3,0x10⁸ (71,5 \pm 7,2%) se equivalem, porém ambas foram superiores a obtida com 1,0x10⁸ (49 \pm 5,0%, $p < 0,05$, One-way ANOVA, post-test Bonferroni). Diante dessa observação, optou-se por fixar o número de plaquetas do PRP em 3,0x10⁸ (* $p < 0,05$ em relação a 1,0x10⁸, One-way ANOVA, post-test Bonferroni).

A



B

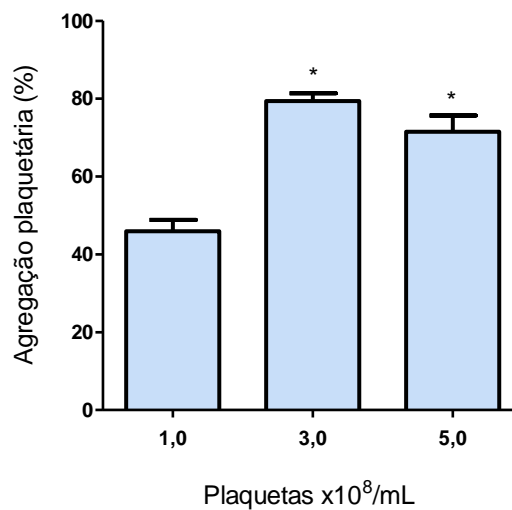


Figura 13. Determinação do perfil de agregação plaquetária em função da concentração de ADP e do número de plaquetas em plasma rico em plaquetas (PRP). (A) Amostras de PRP ($3,0 \times 10^8$ /mL) de ratos Wistar foram ativadas por concentrações crescentes de ADP (100, 300 e 600 μ M) e o perfil da agregação plaquetária foi registrado durante 10 min (600 segundos). (B) A agregação plaquetária máxima (%) de amostras de PRP em densidades crescentes (1,0, 3,0 e $5,0 \times 10^8$ plaquetas/mL) foi avaliada após ativação com 600 μ M de ADP (* $p < 0,05$ em relação a $1,0 \times 10^8$ plaquetas/mL, One-way ANOVA, post-test Bonferroni). Ensaios feitos em triplicata por agregometria de transmissão.

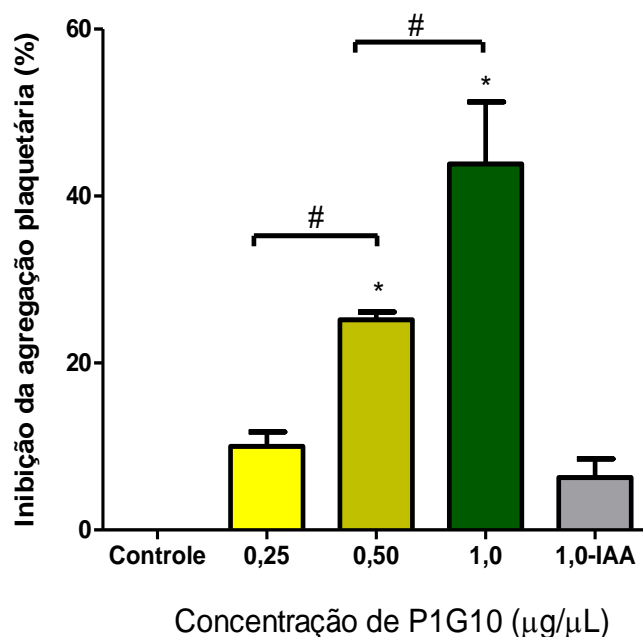
Nos experimentos de inibição da agregação plaquetária por P1G10, a percentagem média de agregação em amostras controle, em que se adiciona salina e ADP, foi considerada como 100% e, assim, 0% de inibição (Figura 14A). Amostras de PRP (n = 4) foram incubadas a 37°C por 10 min com água deionizada, ou concentrações crescentes de P1G10 (0,25, 0,5 e 1,0 µg/µL) ou P1G10-IAA 1,0 µg/µL. Observou-se uma tendência de inibição da agregação das plaquetas na concentração de 0,25 µg/µL ($10 \pm 3,4\%$), que, porém, não assumiu significância estatística em relação ao controle. Entretanto, verificou-se uma inibição significativa da agregação plaquetária nas concentrações de 0,5 µg/µL ($25,3 \pm 1,9\%$, $p < 0,05$) e de 1,0 µg/µL ($43,9 \pm 14,9\%$, $p < 0,05$), onde foi observada uma relação dependente da dose ($p < 0,05$) do efeito antiagregante de P1G10. A inibição por P1G10-IAA 1,0 µg/µL ($6,3 \pm 4,5\%$) não foi significativa (One-way ANOVA, post-test Bonferroni). A figura 14B ilustra o perfil da inibição da agregação plaquetária nas diferentes concentrações de P1G10 avaliadas.

5.5 Efeito de P1G10 sobre o Tempo de Trombina

A avaliação do tempo de trombina (TT) do plasma de ratos Wistar ($n = 5$) após a incubação (5 min) de 100 μL de plasma com concentrações crescentes de P1G10 (0,25, 0,5, 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), ou P1G10-IAA 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ou água deionizada (Figura 15A) mostrou que na concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, P1G10 prolongou o TT em 3,6 vezes (28 ± 9 s, $p < 0,0001$) em relação ao controle (8 ± 1 s). Além disso, nas concentrações de 0,5, 1,0 ou 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, não houve coagulação detectável do plasma durante 200 s ($p < 0,0001$), quando a contagem do tempo foi interrompida automaticamente. Entretanto, quando P1G10-IAA 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ foi incubada com a amostra, o TT não foi diferente do controle ($***p < 0,0001$, One-way ANOVA, Post-test Bonferroni).

A fim de estabelecer uma relação de concentração-resposta de P1G10 sobre o TT nas amostras de plasma, foram realizadas avaliações utilizando concentrações menores de P1G10 (0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 ou 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figura 15B). Os resultados demonstraram que a menor concentração de P1G10 capaz de prolongar o tempo de trombina foi a de 0,20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (29 ± 9 s, $p < 0,0001$), não havendo diferença estatística entre este prolongamento do TT e aquele observado na concentração 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($***p < 0,0001$, One-way ANOVA, post-test Bonferroni).

A



B

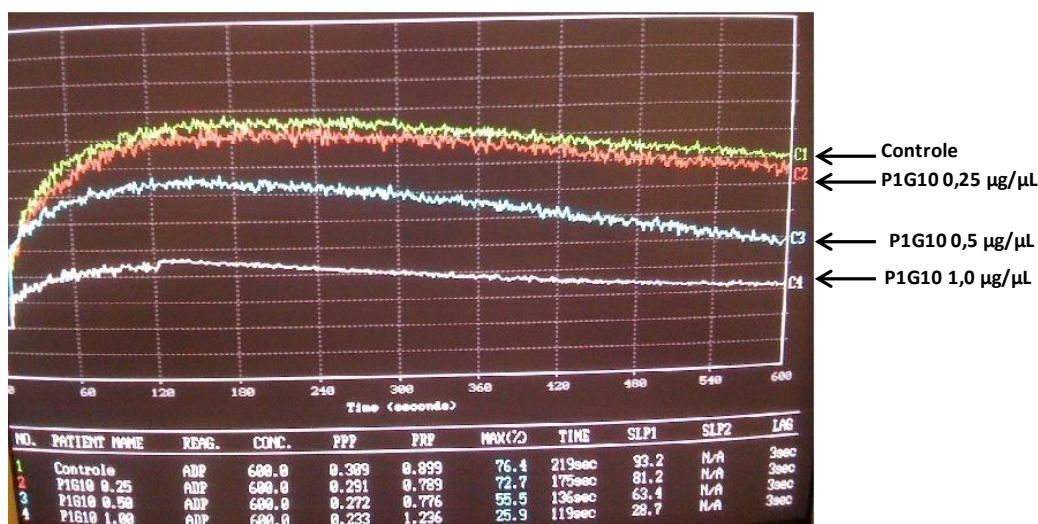


Figura 14. Inibição da agregação plaquetária na presença de P1G10. (A) Após incubadas a 37°C por 10 min com água deionizada ou P1G10 (0,25, 0,50 ou 1,0 µg/ µL), ou P1G10-IAA, amostras (450 µL) de PRP ($3,0 \times 10^8$ plaquetas/mL) foram ativadas pela adição de 50 µL de ADP (600 µM) e a agregação registrada por 10 min por agregometria de transmissão. As médias das percentagens de inibição da agregação plaquetária foram divididas pela média da agregação nas amostras controle (considerados como 100% de agregação, logo 0% de inibição) de cada *pool*, e expressas como média \pm SEM. (* $p < 0,05$ em relação ao controle, # $p < 0,05$ entre concentrações, One-way ANOVA, post-test Bonferroni). (B) Imagem ilustrativa de curvas de inibição da agregação plaquetária por P1G10.

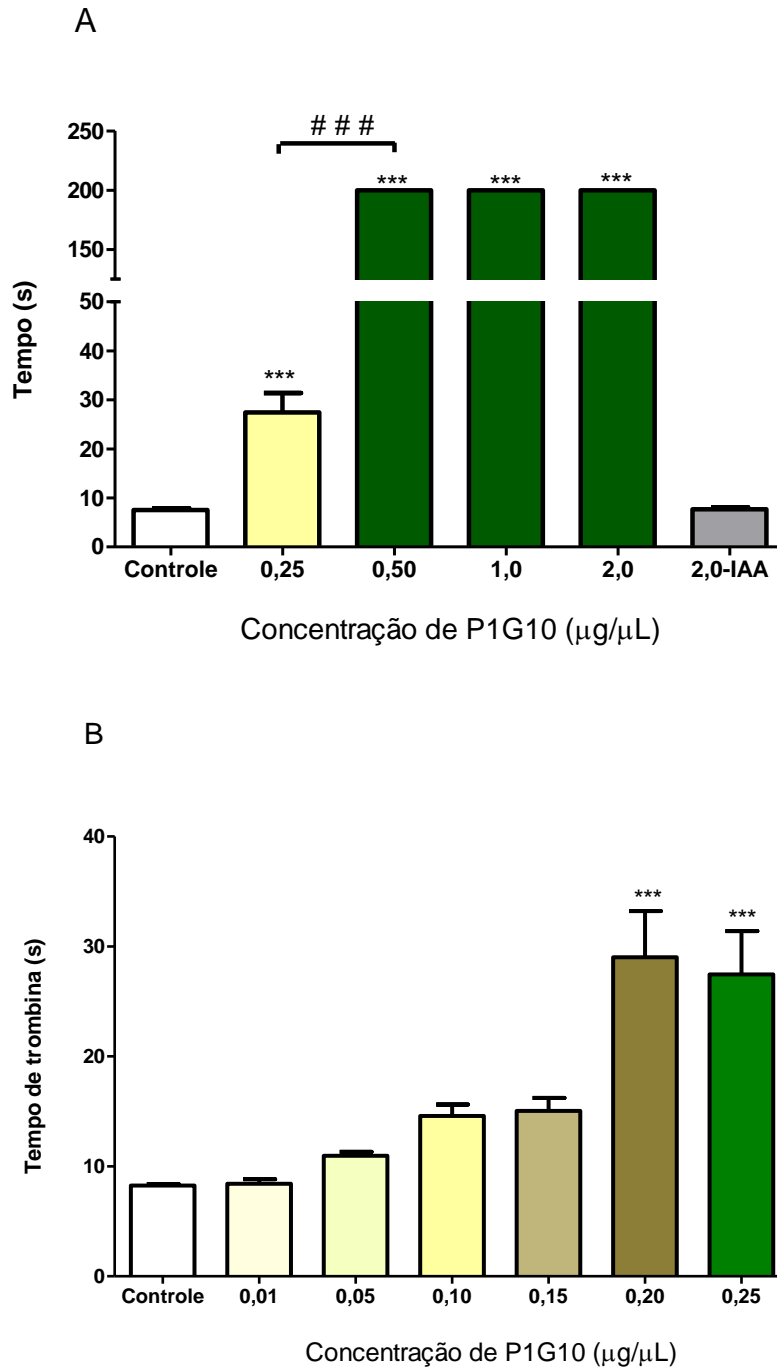


Figura 15. Determinação do tempo de trombina (TT) frente a concentrações crescentes de P1G10 *in vitro*. (A) P1G10 (0,25, 0,50, 1,0, 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), ou P1G10-IAA (2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), ou água deionizada foi incubada (5 min) com plasma (100 μL) de ratos Wistar ($n=5$) e, a seguir, foi avaliado o TT. (B) Nas mesmas condições, avaliou-se o efeito de concentrações menores de P1G10 (0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 ou 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre o TT. O tempo de trombina foi avaliado por coagulometria e os resultados expressos em média \pm E.P.M. (***) $p < 0,0001$ em relação ao controle, ### $p < 0,0001$ entre concentrações, One-way ANOVA, post-test Bonferroni).

5.6 Efeito de P1G10 sobre a concentração de fibrinogênio *in vitro*.

Na determinação *in vitro* da concentração de fibrinogênio em plasma (100 μL), pré-incubado por 5 min com concentrações crescentes de P1G10 (0,25, 0,5, 1,0 e 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figura 16A), observou-se uma redução significativa nos níveis de fibrinogênio ($27,4 \pm 8,8$ mg/dL, $p < 0,0001$) já na concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Essa redução foi de aproximadamente 10 vezes em relação ao controle ($303,6 \pm 32,8$ mg/dL). Nas concentrações seguintes, os níveis de fibrinogênio decaíram intensamente, de modo que suas concentrações não foram detectadas pelo coagulômetro. No entanto, na presença de P1G10-IAA 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, não foi verificada qualquer alteração significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$, One-way ANOVA, post-test Bonferroni).

A fim de estabelecer uma relação de concentração-resposta de P1G10 sobre o nível de fibrinogênio nas amostras de plasma, foram realizadas avaliações utilizando concentrações menores de P1G10 (0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 ou 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Figura 16B). Os resultados mostram uma redução significativa nos níveis de fibrinogênio a partir de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de P1G10 ($207,5 \pm 15,2$ mg/dL, $p < 0,001$) em relação ao controle ($273,7 \pm 9,9$ mg/dL). Essa redução se torna mais expressiva em função do aumento das concentrações para 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de P1G10 ($157,7 \pm 25,0$ mg/dL, $p < 0,0001$), 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($153,8 \pm 24$ mg/dL, $p < 0,0001$), 0,20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($84,2 \pm 24,3$ mg/dL, $p < 0,0001$) e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($27,4 \pm 8,8$ mg/dL, $p < 0,0001$). Foi observada, ainda, uma relação concentração-resposta entre 0,05 e 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de P1G10 ($p < 0,05$), 0,15 e 0,20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,0001$) e entre 0,20 e 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($p < 0,001$) (One-way ANOVA, post-test Bonferroni).

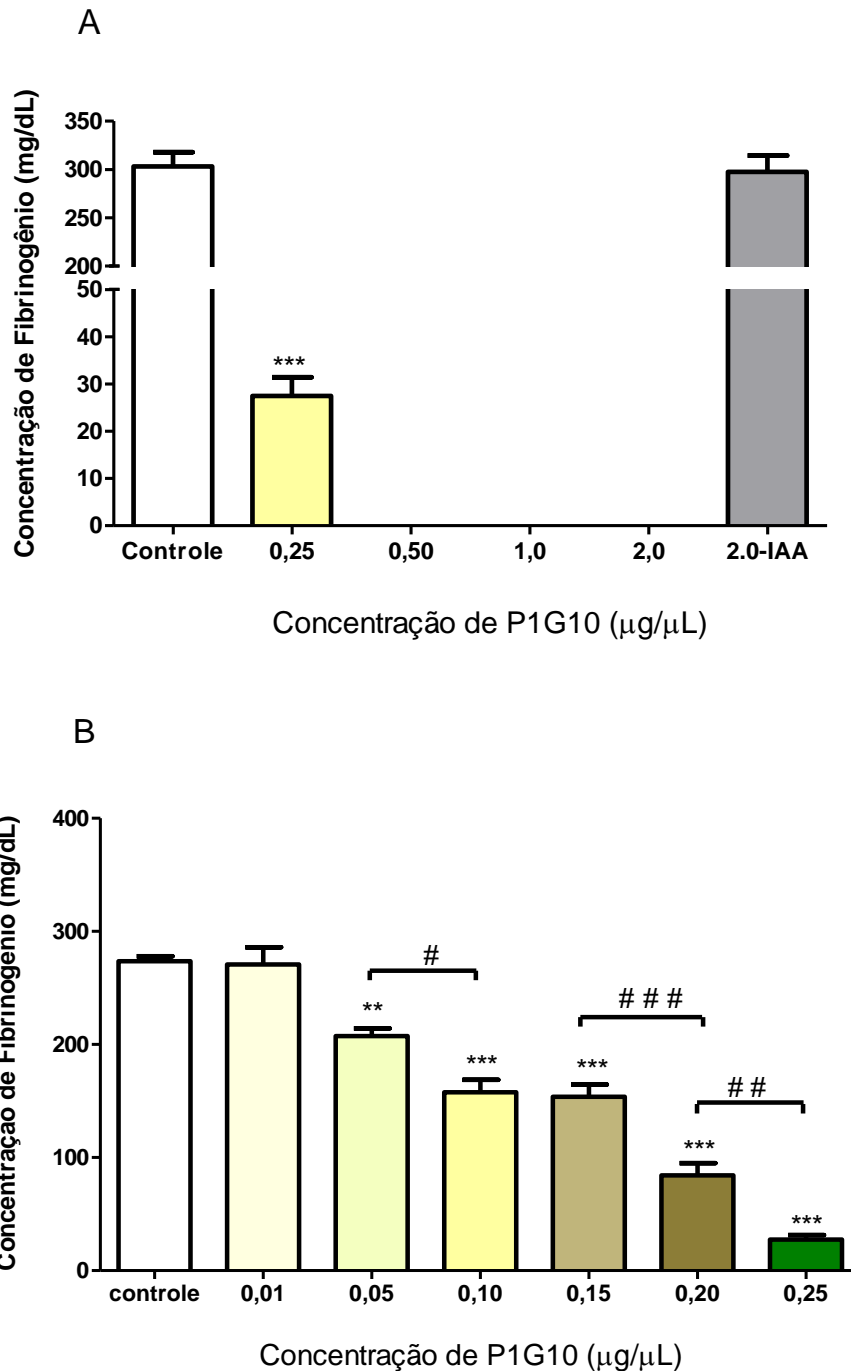
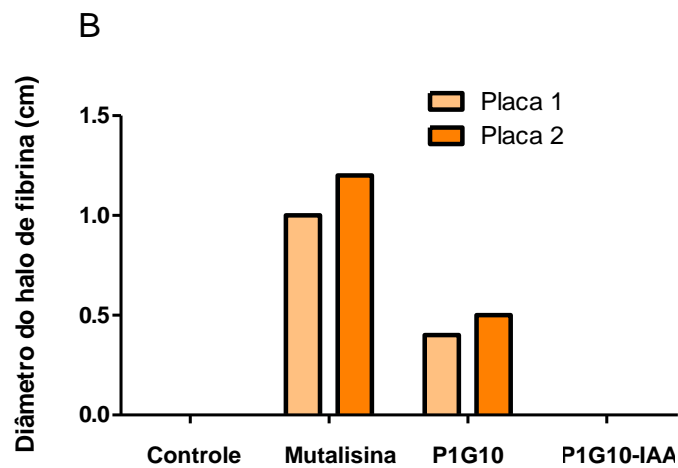
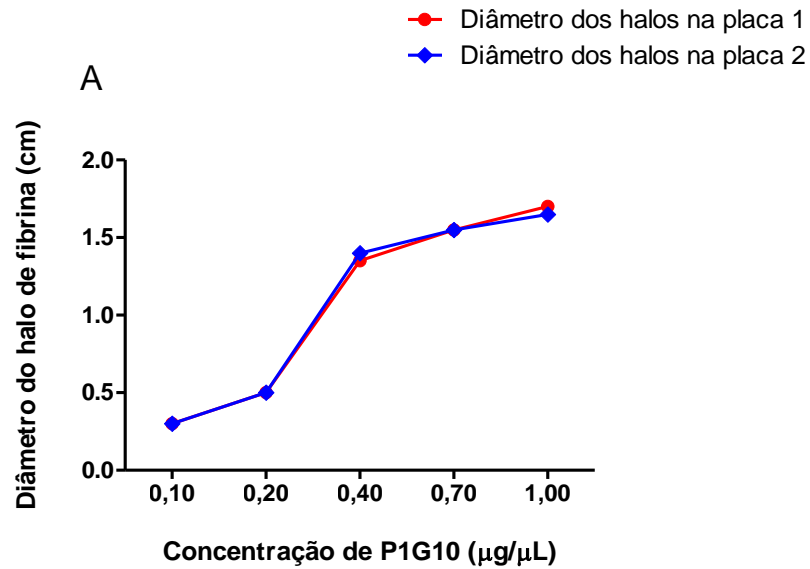


Figura 16. Efeito de P1G10 sobre a concentração de fibrinogênio *in vitro*. (A) P1G10 (0,25, 0,50, 1,0 ou 2,0 µg/µL) ou P1G10-IAA ou água deionizada foi incubada (5 min) com plasma (100 µL) de ratos Wistar (n = 5) e, a seguir, foi avaliada a concentração de fibrinogênio (mg/dL) na amostra. (B) Nas mesmas condições, avaliou-se o efeito de concentrações menores de P1G10 (0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20µg/µL) sobre a concentração de fibrinogênio. A concentração de fibrinogênio foi avaliada por coagulometria e os resultados expressos em média ± E.P.M. (**p<0,001, *** p<0,0001 em relação ao controle, # p<0,05, ## p<0,001 ### p<0,0001 entre concentrações, One-way ANOVA, post-test Bonferroni).

5.7 Avaliação do efeito fibrinolítico de P1G10

A atividade fibrinolítica de P1G10 foi qualitativamente avaliada pelos diâmetros dos halos produzidos em malha de fibrina em placa de Petri (Figura 17A). Concentrações crescentes de P1G10 (0,10, 0,20, 40, 0,70, 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram adicionadas sobre a fibrina formada nas placas ($n = 2$) e, após incubação (“*overnight*”, a 37°C), os diâmetros dos halos produzidos foram medidos. Observou-se um efeito fibrinolítico dependente da concentração, em que o diâmetro dos halos aumentou em função da concentração de P1G10 adicionada à placa de fibrina. Nas 3 primeiras concentrações de P1G10 testadas (0,1, 0,2, e 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), o aumento médio dos halos foi maior (0,3, 0,5 e 1,37 cm, respectivamente). Nas últimas concentrações (0,7 e 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), observa-se uma tendência à formação de um platô nos valores médios dos diâmetros (1,55 e 1,67 cm, respectivamente).

A atividade fibrinolítica de P1G10 e de P1G10-IAA foi qualitativamente comparada à da toxina mutalisina (Figura 17B). Cada substância foi adicionada na dose de 1 μg (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) às placas contendo polímero de fibrina, que foram incubadas *overnight*, a 37°C . Observou-se que o diâmetro médio (0,45 cm) do halo formado por P1G10 foi de aproximadamente 41% daquele formado (1,1 cm) por mutalisina. Além disto, a adição de P1G10-IAA não resultou em formação de halo na malha de fibrina. 5 μL de água deionizada foram usadas como controle. A figura 16C ilustra a placa de fibrina, onde se pode observar os halos formados por P1G10 (B) e mutalisina (D), enquanto nota-se ausência de halos no controle (A), bem como quando P1G10-IAA foi utilizada.



C

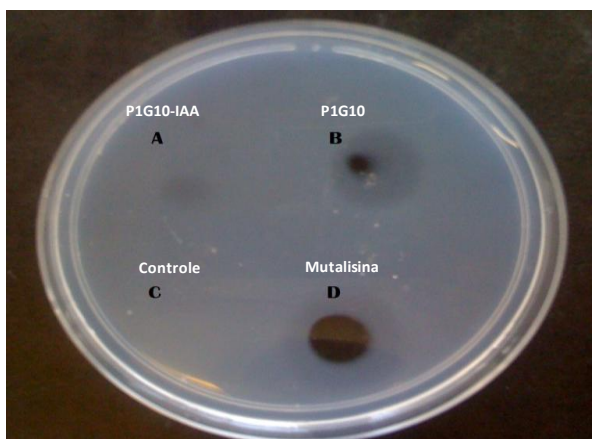


Figura 17. Efeito fibrinolítico de P1G0. (A) A atividade fibrinolítica de P1G10 foi medida em duplicata através do diâmetro do halo produzido em placas de fibrina após sua incubação (*overnight*, 37°C) com concentrações crescentes de P1G10 (0,10, 0,20, 40, 0,70, 1,0µg/µL). (B) A atividade fibrinolítica de P1G10, P1G10-IAA e da toxina mutalisina foi comparada qualitativamente (duplicata) em função dos diâmetros dos halos produzido em placas de fibrina após incubação com 1,0 µg (0,2 µg/µL) de cada substância ou controle (5 µL de água deionizada). (C) Imagem representativa dos halos produzidos na placa de fibrina após incubação com 1 µg (0,2µg/µL) de P1G10, P1G10-IAA e Mutalisina.

6. DISCUSSÃO

Para avaliar a atividade da fração P1G10 sobre a coagulação sanguínea foi, inicialmente, determinada sua ação sobre o tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) em plasma de ratos Wistar. Tendo sido observado um prolongamento significativo no tempo de coagulação em ambas as técnicas, buscou-se conhecer o efeito da fração P1G10 sobre a formação de trombos venosos em ensaios *in vivo*, utilizando o modelo de trombose induzida por luz/corante fluorescente em microvasos da orelha de camundongos *hairless*. A partir da observação de uma importante atividade antitrombótica nesse modelo, foi proposto desvendar, ao menos parcialmente, os mecanismos envolvidos nesta atividade utilizando para isto ensaios *in vitro*. Foram avaliadas as atividades fibrinogenolítica e antiagregante plaquetária de P1G10 em amostra de plasma de ratos Wistar, bem como a fibrinólise em placa de Petri. Os resultados analisados em conjunto, discutidos a seguir, permitem sugerir um mecanismo coerente para o efeito antitrombótico observado.

A formação de trombos não é um evento causado por um fator isolado e bem delineado. Trata-se, ao contrário, do resultado de uma complexa interação entre plaquetas e moléculas presentes no plasma e nos vasos sanguíneos, que de uma forma invariavelmente complementar, constituem o sistema hemostático (FURIE et al., 2005). Para determinar a ação de P1G10 sobre a coagulação, foram realizados, inicialmente, os testes de TP e TTPA (Figura 1). Nas doses testadas, P1G10 foi capaz de prolongar tanto o TP, como o TTPA. Por si só, essas observações não são suficientes para definir o mecanismo responsável pelas hemorragias observadas nos estudos toxicológicos, pois tais testes não são capazes de apontar quais fatores poderiam ser alterados pela ação de P1G10. Esses resultados também não levam em conta a participação das plaquetas que, em conjunto com os fatores da coagulação plasmática, têm um papel determinante na hemostasia (JACKSON et al, 2003). Por outro lado, o prolongamento observado no TP e TTPA demonstra que P1G10 definitivamente possui ação sobre um ou mais dos componentes fundamentais para a formação do coágulo *in vitro*. Sabendo-se que o TP é sensível às deficiências de fatores das vias extrínseca (VII) e comum (X,V, II e I) e que o

TTPA é sensível às deficiências das vias intrínseca (XII, XI, IX e VIII) e comum (X,V, II e I), pode-se admitir que os prolongamentos observados em ambos os testes podem refletir um efeito sobre um único fator comum às duas vias ou um efeito sobre múltiplos fatores. Além disto, quando esta P1G10 foi utilizada com sua atividade proteolítica inibida IAA (iodoacetamida), os tempos de coagulação medidos não foram diferentes dos controles, evidenciando que a inibição da coagulação é dependente da atividade proteolítica de P1G10,

A atividade anticoagulante de P1G10 parece ser mais potente quando avaliada pelo TTPA, posto que por esta medida a inibição da coagulação se deu de forma significativa já na concentração de 0,5 µg/µL (concentração final no plasma), aumentando de uma forma dependente da concentração até 2,0 µg/µL. Contudo, pelo teste de TP, somente a partir de 1,0 µg/µL pôde ser observado efeito anticoagulante expressivo. Deve-se salientar que na determinação de TTPA a importância do cininogênio de alto peso molecular e da pré-caliceína são, também, consideradas na formação do coágulo (FURIE et al., 1992). Essas macropoteínas plasmáticas poderiam ser clivadas por P1G10, o que contribuiria para o efeito anticoagulante mais expressivo observado. Além disso, a maior potência de P1G10 em prolongar a coagulação pelo TTPA pode se dever também à clivagem, isoladamente ou em conjunto, dos fatores XII, XI, IX e VIII, os quais não estão envolvidos na coagulação *in vitro* avaliada pelo TP (MACFARLANE et al., 1964). Portanto, a via intrínseca, por ser naturalmente uma via mais complexa, comporta um maior número de sítios para a ação proteolítica de P1G10, e o conjunto desta ação prolonga de forma importante o tempo de coagulação.

Na atividade anticoagulante medida pelo TP, a participação do fator tissular (TF) é fundamental. Entretanto, o método não permitiu avaliar se P1G10 alteraria esse fator, pois este é adicionado, na forma de tromboplastina adicionada de íons Ca^{2+} , somente após a incubação da amostra com P1G10 e imediatamente antes de se iniciar a contagem do tempo de coagulação. De fato, é justamente a adição de tromboplastina cálcica que permite o início do processo de coagulação pelo teste do TP. Pode-se especular que o mecanismo pelo qual P1G10 atua sobre a via extrínseca pode estar relacionado ao seu efeito proteolítico sobre o FVII, que além de ser exclusivo

desta via, participa da iniciação da mesma (MACFARLANE et al., 1964). Entretanto, além de uma possível ação sobre a via extrínseca e intrínseca isoladamente, a análise conjunta dos resultados do TP e do TTPA permite inferir uma possível ação da P1G10 sobre fator (es) da via comum. Nesse caso, P1G10 poderia atuar, isoladamente ou em conjunto, sobre FX, FV, protrombina (FII), fibrinogênio (FI) ou fibrina (FIIa). Como visto anteriormente, o complexo protrombinase (FXa/FVa) participa na formação de trombina, a qual converte fibrinogênio em fibrina (MACFARLANE et al., 1964). Assim, a perda da função da trombina, seja por atuação direta de P1G10 sobre esta, seja por ação sobre o complexo protrombinase, naturalmente levaria ao prolongamento do tempo de coagulação, por ambos os testes, TP e TTPA. Da mesma forma, como a formação de fibrina, que compreende a última etapa do processo de formação do coágulo, depende do fibrinogênio, a ação proteolítica de P1G10 sobre este último levaria ao prolongamento tanto do TP como do TTPA.

Com base nos resultados acima, é possível admitir indubitavelmente que houve um prolongamento do tempo de coagulação na presença da fração P1G10 em cada um dos testes, resultante da ação desta sobre um ou mais fatores da coagulação.

Após essas primeiras evidências de ação anticoagulante de P1G10, foi investigado se esta fração possui efeito de natureza anti-hemostática *in vivo*. Para testar essa hipótese, foi utilizado o modelo de trombose microvascular induzida por luz/corante na orelha de camundongo *hairless*, estabelecido por Roesken et al. (1997).

A técnica envolve a administração sistêmica de um corante fluorescente associado a uma macromolécula, seguida de exposição local da orelha do camundongo à epi-iluminação em uma faixa de excitação apropriada. A fotoativação induz uma lesão endotelial limitada ao local que recebe o foco da epi-iluminação, e disto resulta um aumento gradual do trombo luminal na área de iluminação. Em arteríolas, mas não em vênulas, a resposta é, geralmente, acompanhada de vasoconstrição. A vasoconstrição arteriolar independe das plaquetas, uma vez que a redução das plaquetas circulatórias prolonga notavelmente o tempo até a formação do trombo, mas não influencia a

vasoconstrição (LINDBERG et al., 1994). Para induzir a lesão endotelial são necessários tanto a luz como o corante fluorescente, pois a presença de apenas um deles não se mostra capaz de induzir um trombo estável e, portanto, detectável. Além disso, a indução trombótica independe da ação da luz ultravioleta (UV) e do calor produzidos pela lâmpada de excitação, já que são interpostos filtros para a luz UV e calor no trajeto da luz (ROSENBLUM et al., 1977).

O mecanismo envolvendo a formação de trombos nesse modelo de luz/corante fluorescente parece ser mediado pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), especialmente o oxigênio atômico, o qual é gerado pela excitação do fluoróforo (SHINDO et al., 1996). De fato, agentes que capturam oxigênio atômico demonstraram inibir a formação trombótica induzida por luz/corante fluorescente tanto *in vitro* (RUMBAUT et al., 1999), como *in vivo* (HERRMANN et al., 1983).

Em arteríolas, em geral não se encontram células, apenas plaquetas, no trombo fotoquímico. Em vênulas, além de plaquetas, eventualmente podem ser vistos leucócitos, sobretudo neutrófilos, aderidos às bordas do trombo (ROESKEN et al., 1997). Além disto, uma característica marcante do modelo é a presença de adesão plaquetária ao endotélio vascular (POVLISHOCK et al., 1987). Não ocorre, portanto, denudação do endotélio como em métodos que utilizam cloreto férrico e *laser* como indutores trombóticos, onde as plaquetas se aderem, não ao endotélio, mas a componentes da matrix subendotelial (GORDON et al., 1973).

Um destaque interessante do modelo de indução trombótica por luz/corante é a observação freqüente de que a predisposição para a formação trombótica difere entre arteríolas e vênulas. Uma explicação possível para isto é a diferença de taxas de cisalhamento vascular entre vênulas e arteríolas, posto que alguns estudos descrevem a influência deste fenômeno vascular sobre a formação trombótica induzida por luz/corante em arteríolas (SATO et al., 1990). Entretanto, essa explicação não é totalmente satisfatória, pois outros estudos mostram que a indução trombótica persiste em vênulas cuja taxa de cisalhamento vascular é equivalente à de arteríolas (RUMBAUT et al., 2004).

Portanto, são ainda necessários estudos que possam esclarecer se as células endoteliais de vênulas e de arteríolas apresentam diferente sensibilidade ao modelo.

Com base nas informações conhecidas sobre o modelo, em nosso estudo, foi proposto utilizarem-se somente vênulas da microcirculação na orelha de camundongo *hairless*, tendo em conta sua predisposição à formação de trombos, além da já descrita responsividade à ação de agentes anti-hemostáticos (ROESKEN et al., 1997; AGERO et al., 2007). Com a finalidade de definir vênulas com aproximadamente o mesmo fluxo sanguíneo, termo usado aqui como sinônimo de vasão ou escoamento do sangue e cuja grandeza expressa pelo Sistema Internacional é m^3/s , selecionaram-se apenas vasos em que se podia observar o rolamento de leucócitos. A seguir, foi localizado um ponto de continuidade desses vasos cujo diâmetro estivesse entre 10 e 15 μm . Dessa forma, foi possível assumir que a velocidade (m/s) do sangue e o diâmetro (m^2) dos vasos estudados possuíam valores aproximados entre si. Além disto, com o fim de reduzir a variabilidade experimental e aumentar a reprodutibilidade do método, manteve-se a taxa de iluminação local em 450-490 nm e a dose administrada do corante isotiocianato de fluoresceína-dextrana (FITC-dextrana) em 6% p.v. Devemos, também, esclarecer que a via s.c. foi escolhida neste estudo para a administração de P1G10, por ser sabidamente segura e de fácil acesso. Além disso, estudos farmacocinéticos pré-clínicos conduzidos por nosso grupo demonstraram que P1G10 administrado pela via s.c. fornece biodisponibilidade equivalente à administração *i.v.* (LEMOS et al., submetido).

Com os experimentos de microscopia intravital (Figura 11) pôde-se observar que no grupo controle a velocidade dos glóbulos vermelhos (VGV) decresce já no primeiro minuto imediatamente após o início da indução trombótica, sendo o fluxo sanguíneo, finalmente, interrompido após cerca de 6 min de análise. Um perfil semelhante foi encontrado em relatos de ROESKEN et al. (1998), que avaliaram o efeito antitrombótico de hirudina (inibidor da trombina) em vênulas de orelhas de camundongos *hairless*, cujo trombo fotoquímico levou cerca de 5,7 min para obstruir completamente o fluxo em animais controle. Em outro estudo, relatado por SORG et al. (2006), onde se comparou o efeito

antitrombótico de heparina (ativador da antitrombina), hirudina e antitrombina (inibidor da trombina), observou-se que a completa oclusão das vênulas nos animais controle ocorreu cerca de 7 min após a indução trombótica. Dessa forma, no presente estudo, o grupo que recebeu injeção de salina s.c. foi utilizado como controle positivo para o método, validando-o. Ao mesmo tempo, fornece o parâmetro negativo para a comparação do efeito antitrombótico de P1G10.

Quando 2,5 mg/kg de P1G10 foram administrados, observou-se um prolongamento médio do tempo até a completa cessação do fluxo para aproximadamente 10 min, ou seja, ocorre um atraso de 66,6% no tempo até a formação de um trombo estável, em relação ao controle. Esse efeito foi mais intenso nas maiores doses testadas, onde observou-se que com 5,0 mg/kg não ocorreu formação de trombo estável ou interrupção do fluxo sanguíneo em qualquer momento do período experimental. Além disso, a partir de 17 min da análise, a VGV manteve-se sempre igual ou superior à VGV basal ($VGV \geq 1$), mostrando que P1G10 não somente foi capaz de impedir a obstrução trombótica do vaso, como também favoreceu o retorno do fluxo ao nível basal, revertendo o efeito trombótico da associação luz/corante fluorescente. A área sob a curva (AUC) da VGV durante 20 min da análise na dose de 5,0 mg/kg mostrou uma atividade antitrombótica significativa em relação ao controle.

Na dose de 7,5 mg/kg também não houve formação de um trombo estável que levasse à consistente interrupção do fluxo durante a análise. Entretanto, seu efeito foi menos expressivo, já que não foi observada significância estatística da área sob a curva da VGV durante 20 min da análise. Analisando-se a AUC da VGV entre 0 e 10 min e, em seguida, entre 10 e 20 min após a administração de P1G10 na dose de 7,5 mg/kg, nota-se que nos primeiros 10 min não ocorre efeito antitrombótico considerável em relação ao controle. Já nos últimos 10 min, o efeito antitrombótico é estatisticamente significativo (dados não mostrados). Isso mostra que, nesta dose, a inibição da formação de um trombo estável é atingida, embora de forma mais tardia. Além disso, na dose de 7,5 mg/kg, o retorno do fluxo ao nível basal ($VGV \geq 1$) ocorre 20 min após o início do período experimental, apenas 3 min mais tarde do que na dose de 5,0 mg/kg. Isto corrobora a observação de que esta dose é eficaz na

prevenção do trombo, ainda que seu efeito se dê mais tardiamente. A VGV de P1G10-IAA 5,0 mg/kg não foi estatisticamente diferente do controle, evidenciando que a atividade antitrombótica de P1G10 está estritamente ligada a sua atividade proteolítica.

Uma peculiaridade foi observada em todos os animais do grupo que recebeu P1G10 7,5 mg/kg: a formação de uma lesão cutânea no local da injeção. Essa lesão foi caracterizada, inicialmente, por vermelhidão local e edema, a qual, cerca de 5 h mais tarde, evoluiu para uma ferida circular de 2 a 2,5 cm de extensão, com marcada presença de hematoma nas bordas. Para avaliar se o efeito lesivo se deu como consequência da alta concentração de enzimas proteolíticas presentes na fração P1G10 nessa dose, uma injeção s.c. de P1G10-IAA 7,5 mg/kg foi administrada em camundongos *hairless* (n = 3), quando não foram observados sinais lesivos até 5 h após a injeção. Pode-se especular que a lesão produzida alterou a velocidade de absorção e ou a quantidade de P1G10 absorvida, atrasando o início da ação ou reduzindo a ação antitrombótica. Em estudos farmacocinéticos, observou-se que a concentração máxima sanguínea de P1G10 se deu em até 15 min (primeiro tempo avaliado) após a administração s.c. de ^{99m}Tc-P1G10 1 mg/kg (LEMOS et al., submetido). Pode-se inferir, assim, que a ação de P1G10 sobre os componentes de sistema hemostático atinge seu pico aos 15 min após a administração s.c. da fração. Um retardamento no tempo até atingir seu pico de concentração plasmática resultaria, como consequência, em uma diminuição significativa do seu efeito antitrombótico no intervalo de tempo experimental (20 min). Por outro lado, é preciso considerar que uma perda de integridade do tecido subcutâneo, bem como uma ruptura de microvasos locais, poderiam favorecer a absorção de P1G10. Assim, a fração atingiria seu pico de concentração plasmática em um período inferior a 15 min. Desta forma, no momento da indução trombótica, uma considerável parte da droga já teria sido distribuída, e seu efeito antitrombótico consequentemente reduzido. Portanto, para se conhecer com exatidão como a cinética de absorção e distribuição de P1G10 poderia ser alterada na dose de 7,5 mg/kg, fazem-se necessários ensaios comparativos de biodisponibilidade em função de o tecido subcutâneo estar íntegro ou lesado.

O efeito antitrombótico da fração proteolítica P1G10 pode ser comparado àquele de outras substâncias classicamente conhecidas como anti-hemostáticas. De forma bastante interessante, segundo ROESKEN et al. (1998), após a administração de 1 mg/kg de r-hirudina *i.v.* imediatamente antes da indução trombótica (FITC-dextran 150.000 *i.v.* e exposição a luz azul) em orelhas de camundongos *hairless*, observou-se um prolongamento do tempo para 9 min até a completa obstrução das vênulas. Em nosso estudo, um efeito semelhante pôde ser observado ao se administrar P1G10 2,5 mg/kg *s.c.* 25 min antes da indução trombótica, quando o tempo até a completa interrupção do fluxo subiu para cerca de 10 min. Ainda, segundo SORG et al. (2006), nos animais que receberam, 5 min antes da indução trombótica, injeção *i.v.* de heparina (100 UI/kg) ou hirudina (1 mg/kg) ou antitrombina (25 UI/kg), observou-se um prolongamento significativo ($p < 0,05$, ANOVA, test post-hoc) nesses tempos até a obstrução trombótica para aproximadamente 15, 17 e 17 min, respectivamente. Observa-se, assim, que o efeito antitrombótico de P1G10 relatado neste estudo pode ser comparado ao de outros agentes antitrombóticos testados no modelo aqui utilizado. É interessante notar que a hirudina, a heparina e a antitrombina são agentes que têm a trombina como seu principal alvo de ação antitrombótica. Entretanto, mesmo tendo aqui sido demonstrada a ação de P1G10 sobre o fibrinogênio, principal substrato da trombina, mais estudos são necessários para avaliar se o efeito antitrombótico de P1G10 pode ser dar também a partir de uma ação proteolítica sobre a própria molécula de trombina.

Assim, neste estudo, foi possível identificar uma dose (2,5 mg/kg) que prolonga o tempo até a obstrução do vaso, e duas doses (5,0 e 7,5 mg/kg) em que não ocorreu interrupção contínua do fluxo sanguíneo durante o tempo de análise experimental (20 min).

Uma vez tendo observada a ação antitrombótica de P1G10 *in vivo*, uma série de análises *in vitro* foram empreendidas a fim de propor um mecanismo de ação coerente para esse efeito. Observou-se que a ação antitrombótica de P1G10 não é consequência de um efeito isolado, antes, se dá como resultado de uma considerável atividade anticoagulante, antiagregante plaquetária,

fibrinogenolítica e fibrinolítica, as quais são abolidas quando P1G10 tem sua atividade proteolítica inibida por IAA (P1G10-IAA). Portanto, pode-se partir do pressuposto de que, mesmo que o efeito anti-hemostático de P1G10 não se deva exclusivamente a sua atividade proteolítica, esta exerce um papel fundamental para a ocorrência do mesmo.

Nesse contexto, a ação proteolítica de P1G10 sobre o fibrinogênio (ação fibrinogenolítica) fornece uma explicação consistente para os demais efeitos observados. Essa ação é evidenciada pelo prolongamento significativo do TT e na redução dos níveis de fibrinogênio quando diferentes concentrações de P1G10 foram incubadas com amostras de plasma. O efeito fibrinogenolítico inibe o processo de formação trombótica, tanto ao nível da coagulação, prolongando os tempos até a formação do coágulo pelos ensaios de TP e de TTPA, como ao da agregação plaquetária, mostrado pela redução da percentagem máxima de agregação pelo ensaio de agregometria. Vale esclarecer que tanto os testes coagulométricos, TP e TTPA, quanto o teste da agregação plaquetária, dependem de concentrações ótimas de fibrinogênio funcional para que valores normais sejam obtidos. Dessa forma, o fibrinogênio constitui um fator em comum e essencial, tanto nos testes coagulométricos quanto nos de agregometria.

O fibrinogênio é uma glicoproteína solúvel, de massa molecular 340 kDa, sintetizada no fígado e encontrada naturalmente no plasma (KAMATH et al., 2003). Possui três pares de cadeias polipeptídicas (alfa, beta e gama) ligadas umas às outras por ligações dissulfeto (DOOLITTLE et al., 1998). Embora novos estudos relacionem o fibrinogênio à inflamação (DAVALOS et al., 2012), é na hemostasia e, por conseqüência, na trombogênese, que seu papel é mais bem descrito. Ao nível plaquetário, o fibrinogênio desempenha um papel fundamental ao aumentar diretamente a deglanulação das plaquetas ativadas pelo ADP, atuando ele próprio como um reforço positivo sobre o processo de formação trombótica (SCHNEIDER et al., 1999). Além disso, durante a ativação plaquetária, a molécula simétrica do fibrinogênio liga-se à integrina $\alpha 2\beta 3$ presente em diferentes plaquetas, formando uma ligação entre elas. Dessa forma, o fibrinogênio permite o contato entre as plaquetas presentes no microambiente favorecendo a sua adesão, o que resulta na agregação

plaquetária essencial à formação do trombo plaquetário (BROOS et al., 2011). É importante salientar, entretanto, que esses efeitos proagregantes são observados somente quando a integridade da molécula de fibrinogênio está totalmente preservada (NIEWIAROWSKI et al., 1977). A integridade do fibrinogênio, no entanto, provavelmente não se manteve na presença de P1G10, como demonstram os resultados *in vitro* aqui descritos. O efeito fibrinogenolítico de P1G10 tem uma potência considerável, pois na concentração de 0,05 µg/µL (concentração final no plasma) houve uma redução significativa da concentração de fibrinogênio plasmático. Portanto, o efeito antiplaquetário *in vitro* de P1G10 pode dever-se, pelo menos parcialmente, a redução da disponibilidade de fibrinogênio plasmático, necessário à ligação entre as plaquetas via receptores $\alpha 2\beta 3$.

A redução do fibrinogênio nas amostras de plasma sugere a possibilidade de que a ação fibrinogenolítica de P1G10 possa se dar também *in vivo*, visto que esta fração apresenta biodisponibilidade de 100 % quando administrada por via s.c. Havendo essa ação, P1G10 promoveria a clivagem do fibrinogênio plasmático circulante de tal modo que sua disponibilidade no microambiente da indução trombótica estaria reduzida, o que inviabilizaria a formação trombótica. Outras análises são necessárias, porém, para se determinar se há uma correlação significativa entre o efeito antitrombótico de P1G10 e os níveis de fibrinogênio plasmático nos animais estudados.

Conforme mencionado anteriormente, além do seu papel na agregação plaquetária, o fibrinogênio é essencial para a formação do coágulo plasmático (FURIE et al., 1992). Dessa forma, o efeito fibrinogenolítico de P1G10 pode ter como conseqüência a redução de fibrinogênio plasmático disponível para a etapa final do processo de coagulação, a saber, a conversão de fibrinogênio em malha de fibrina, reduzindo a disponibilidade desta para a sustentação do trombo. Além disto, mesmo havendo fibrina no local de indução trombótica, formada a partir do fibrinogênio não clivado por P1G10, esta também poderá sofrer a ação proteolítica da fração, posto que, em placa de Petri, os resultados obtidos demonstram que P1G10 promove a clivagem proteolítica de fibrina. Como produto desses dois efeitos, fibrinogenolítico e fibrinolítico, a malha de fibrina formada poderá não ser suficientemente estável, e o trombo não será

capaz de resistir à pressão sanguínea local, sendo disperso pelo fluxo sanguíneo. Em concordância com isto, na avaliação por microscopia intravital, observa-se que quando P1G10 é administrada nas doses de 5,0 e de 7,5 mg/kg, apesar de se observar, inicialmente, a indução de um trombo, este não se mantém estável, contrariamente ao controle.

Os resultados descritos neste estudo fornecem uma explicação, ainda que parcial, para alguns efeitos observados em animais Wistar durante a avaliação do potencial toxicológico de P1G10. Nas doses testadas em ensaios de toxicidade aguda (50 *i.p.*, 50 *i.v.* e 2.000 mg/kg *v.o.*) e sub-crônica (300 mg/kg *v.o.*), foi observada morte dos animais com sinais de hemorragia em diversos órgãos (estômago, intestinos, pulmão, rins) (SALAS et al., 2010; Villalba et al., 2010). A hemorragia observada se deu, possivelmente, como resultado da ineficiência do sistema hemostático em produzir trombos estáveis que obstruíssem sangramentos em eventuais vasos lesados pelo efeito proteolítico nas doses tóxicas. Tal ineficiência seria o resultado da inibição da coagulação plasmática, bem como da agregação plaquetária, resultantes da drástica redução por P1G10 da disponibilidade de fibrinogênio e de fibrina, fatores essenciais a estes fenômenos. Em nosso estudo, no entanto, as doses administradas são consideravelmente inferiores às letais supracitadas, encontrando-se na faixa em que P1G10 é utilizada para avaliação de efeitos farmacológicos em ensaios pré-clínicos. Como esperado, nas doses farmacológicas, foi observada uma atividade anti-trombótica de P1G10, ao invés da atividade hemorrágica relacionada às doses tóxicas.

Além disto, o efeito antiplaquetário e anticoagulante de P1G10 pode explicar, pelo menos em parte, outro efeito farmacológico importante desta fração, já demonstrado em nosso grupo de pesquisa: o efeito antitumoral e antimetastático.

Em experimentos utilizando modelo antitumoral de melanoma murino B16-F1 inoculados no flanco de camundongos C57B16, observou-se uma redução estatisticamente significativa da massa tumoral no grupo tratado com P1G10 *s.c.* na dose de 5 mg/kg (1,05 ± 0,92 g) em relação ao grupo controle (2,36 ± 1,57g). Não houve diferença significativa, entretanto, entre o grupo que recebeu P1G10-IAA 5 mg/kg (1,23 ± 1,21 g) e o controle (FIGUEIREDO, 2009).

Nesse mesmo estudo, com o fim de avaliar o efeito de P1G10 sobre a angiogênese tumoral, foi determinada a concentração de hemoglobina. Observou-se uma redução significativa da quantidade de hemoglobina no tumor dos animais tratados ($2,15 \pm 1,19$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tumor) com P1G10 5 mg/kg em relação ao grupo controle ($7,90 \pm 2,04$) (FIGUEIREDO, 2009). Diante destes dados, nos perguntamos se os efeitos antitumoral e antihemostático de P1G10 poderiam estar mecanisticamente relacionados. De forma intrigante, nesse mesmo estudo sobre a atividade antitumoral, foi observada uma redução significativa dos níveis de fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF), em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tumor, no grupo tratado com P1G10 5 mg/kg ($1,4 \pm 0,35$) em relação ao controle ($3,09 \pm 0,80$) (FIGUEIREDO, 2009). É importante notar que o VEGF, uma citocina com potente atividade angiogênica (DVORAK et al, 1995; FERRARA et al, 1995; THOMAS 1996), foi originalmente identificado como um produto sintetizado por células tumorais (SENGER et al, 1983, 1986). Atualmente, porém, sabe-se que além de o VEGF ser produzido e armazenado nas plaquetas (BANKS et al., 1998; SALGADO et al., 2000), estas células são a principal fonte de VEGF sérico (BANKS et al., 1998; SALGADO et al., 1998). Além disso, foi demonstrado que a progressão tumoral está correlacionada ao aumento do estoque de VEGF plaquetário (VERHEUL et al., 1997; BANKS et al., 1998; SALGADO et al., 1998). Interessantemente, observa-se um aumento importante nos níveis de VEGF em plasma rico em plaquetas (PRP) exposto à trombina e ao cálcio, demonstrando que a liberação de VEGF por estas células aumenta após serem ativadas (WEBB et al., 1998, BANKS et al., 1998). Alguns autores sugerem que a adesão de células tumorais às plaquetas levaria a ativação plaquetária, com consequente liberação de VEGF, resultando em aumento da angiogênese local e permeabilidade endotelial, finalmente permitindo a migração tumoral (BANKS et al., 1998). Embora P1G10 tenha reduzido a produção de VEGF tumoral, não foi observada qualquer alteração nos níveis séricos desta citocina, sugerindo que P1G10 exerce seu efeito antiangiogênico em nível local (FIGUEIREDO, 2009). Como discutido anteriormente, a inibição da agregação plaquetária por P1G10 parece se dar, pelo menos em parte, através da clivagem proteolítica do fibrinogênio necessário à ativação e agregação plaquetária. Assim, o efeito fibrinogenolítico de P1G10 poderia ser parcialmente responsável pela redução do VEGF

observada no estudo de FIGUEIREDO (2009), uma vez que inibiria a ativação das plaquetas, e assim, a liberação de VEGF plaquetário, nas proximidades do tumor. Outras moléculas, no entanto, poderiam ser clivadas ou mesmo bloqueadas por P1G10, inibindo a ativação das plaquetas. Dentre os alvos possíveis estariam receptores de membrana e moléculas de adesão, encontrados na superfície plaquetária, no endotélio e na camada subendotelial. O presente trabalho não fornece evidências de que P1G10 tenha efeito inibitório sobre a liberação de VEGF relacionada à ativação plaquetária. Mais estudos, assim, se fazem necessários para avaliar a relação entre a atividade antihemostática de P1G10 e sua ação antiangiogênica na progressão tumoral.

Em outro estudo farmacológico com P1G10, avaliou-se o seu efeito antimetastático em animais portadores de carcinoma de colon (CT26.WT) ou de melanoma (B16-F10). O tratamento s.c. com P1G10 5 mg/kg reduziu os pontos metastáticos em 78% no fígado e em 82% no pulmão, respectivamente (DITZ, 2011). Estudos se encontram em curso, porém os mecanismos que explicam esse efeito não estão completamente elucidados. De forma bastante interessante, diversos trabalhos mostram haver uma relação entre o sistema hemostático e a evolução do quadro de diversos tipos de câncer. Sabe-se atualmente que a procoagulação induzida por células tumorais está relacionada com o avanço da doença e a piora do prognóstico de diversos tipos de tumores (KORTE et al., 2000). Além disto, o potencial metastático de um tumor correlaciona-se com o seu potencial de induzir agregação plaquetária (TANG et al., 1994, NASH et al., 2002). De fato, a formação do tumor-agregado plaquetário confere às células malignas vantagens ao protegê-las da vigilância imunológica (PHILIPPE et al., 1993, NIESWANDT et al., 1999,) permitindo que permaneçam no compartimento vascular e aumentem o seu potencial metastático (GASIC et al., 1968, PEARLSTEIN et al., 1984, POGGI et al., 1993). Além desse agregado de plaquetas, acredita-se que células tumorais sejam capazes de formar uma camada protetora ao seu redor ao polimerizarem fibrina e dela revestirem-se (LIPINSKI et al., 2000). Esse agregado tumoral-plaquetário é resistente à ação proteolítica de proteases endógenas, como a plasmina, e fornecem à célula tumoral uma proteção conveniente contra a ação do sistema imune (LIPINSKI et al., 2000).

Já está bem documentado na literatura científica que fármacos com atividade antitrombótica são capazes de reduzir o potencial metastático de tumores (HEJNA et al., 1999). Já nos anos 60 foi relatado que a heparina não somente prolonga a sobrevivência de animais que receberam injeção de células de carcinoma (AGOSTINO et al., 1961), como também reduz o número de pontos metastáticos (HAGMAR, 1968). Também a relação entre as plaquetas e o câncer levou à pesquisa do potencial antitumoral de fármacos antiplaquetários. Estudos com o ácido acetilsalicílico (AAS), um inibidor da síntese de tromboxano A₂ e, logo, um inibidor da agregação plaquetária (RAINSFORD, 2004), está associado à redução da prevalência de diversos tipos de cancer (THUN et al., 1993), havendo evidências de que o efeito antiagregante do AAS está diretamente relacionado ao seu efeito antitumoral (Mehta et al., 1986; De Laval et al., 2003). No que tange a atividade de cisteíno-proteases no combate a tumores, os efeitos da bromelina já estão bem descritos na literatura. A bromelina apresenta efeito considerável na redução do crescimento tumoral local (BEUTH et al., 2005; BAEZ et al., 2007), bem como na formação de metástases (BAEZ et al., 2007). Esse efeito *in vivo* da bromelina parece dever-se não apenas a inibição direta das células tumorais, mas também a outros efeitos sistêmicos relacionados à progressão tumoral (CHOBOTOVA et al., 2010). Visto que a ação proteolítica da bromelina pode reduzir a quantidade de fibrina no local do trombo (FENTON et al., 2004), especula-se que a bromelina seria capaz de causar “desencapsulação” das células tumorais circulantes ao reduzir a rede de fibrina e plaquetas ao redor destas células. Isto tornaria a célula tumoral passível de reconhecimento, logo, da ação, por parte do sistema imunológico (LIPINSKI et al., 2000). Além disto, tanto a administração oral de bromelina como avaliações *in vitro* resultaram em redução da ativação e da agregação de plaquetas (HEINICKE et al., 1972; METZIG et al., 1999), o que alimenta a hipótese de que a atividade inibidora tumoral da bromelina pode estar relacionada a seus efeitos anti-hemostáticos. A papaína também figura entre as cisteíno proteases que apresenta ao mesmo tempo atividade antihemostática (Metzig et al., 1999) e antitumoral (BELLELLI et al., 1990).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos do presente estudo permitem apontar as seguintes conclusões:

- P1G10 demonstra atividade antitrombótica *in vivo* em um modelo de trombose induzida por luz/corante em vênulas da micro-circulação da orelha de camundongos *hairless*;
- P1G10 demonstra atividade anticoagulante, antiagregante plaquetária, fibrinogenolítica e fibrinolítica *in vitro*, as quais são dependentes da concentração.
- O mecanismo da ação antitrombótica, anticoagulante e antiagregante plaquetário de P1G10 pode ser, pelo menos parcialmente, explicado pela clivagem proteolítica de fibrinogênio e da fibrina.

8. REFERÊNCIAS

AKO, H., CHEUNG, A.H.S., MATSURA, P.K. Isolation of a fibrinolysis enzyme activator from commercial bromelain. **Archives of International Pharmacodynamics** 254:157–67, 1981.

ALTIERI, D., CAPITANIO, A.M., MANNUCCI, P.M. Von Willebrand factor contaminating porcine FVIII concentrate (Hyate C) causes platelet aggregation. **British Journal of Haematology** 63:703-11, 1986.

AGERO, U., ARANTES, R.M.E, QUEIROZ, N.L., MESQUITA, O.N., MAGALHAES, A., SANCHEZ E.F., TAVARES. J.C. Effect of mutalysin II on vascular recanalization after thrombosis induction in the ear of the hairless mice model. **Toxicon** 50:698–706, 2007.

AGOSTINO, D., GROSSI, C.E., CLIFFTON, E.E. Effect of heparin on circulating Walker 256 carcinosarcoma cells. **Journal of the National Cancer Institute** 27:17, 1961.

AMIRKHOSRAVI A., AMAYA M., SIDDIQUI, F., BIGGERSTAFF, J.P., MEYER T.V., FRANCIS, J.L. Blockade of GpIIb/IIIa inhibits release of vascular endothelial growth factor (VEGF) from tumor cell-activated platelets and experimental metastasis. **Platelets** 10:285–92, 1999.

AMIRKHOSRAVI, A., MOUSA, S.A., AMAYA, M., FRANCIS, J.L. Antimetastatic effect of tinzaparin, a low-molecular-weight heparin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** 1:1972–6, 2003.

ANDREWS, R.K., GARDINER, E.E., SHEN, Y., WHISSTOCK, J.C., BERNDT, M.C. Glycoprotein Ib-IX-V. **The International Journal of Biochemistry and Cellular Biology** 35:1170–4, 2003.

ATANASOPOULOS, C.T., ILIOPOULOS, D.C., GAGOS, S., AGAPITOS, M.V., KARAYANNACOS, P.E., ROBOLI, S.K. In vitro effects of heparin on SW480 tumor cell matrix interaction. **Anticancer Research** 15:1411–6, 1995.

ANDREWS, R.K., BERNDT, M.C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research** 114:447-453, 2004.

BAEZA, G., CORREA, D., SALAS, C.E. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 51:1-9, 1990.

BAEZ, R., LOPES, M.T.P., SALAS, C.E., HERNÁNDEZ, M. *In vivo* antitumoral activity of Stem Pineapple (*Ananas comosus*) bromelain. **Planta Medica** 73:1-7, 2007.

BAJZAR, L., REG, M., NESHEIM, M.E., Purification and Characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry** 270(24): 14477-84, 1995.

BANKS, R.E., FORBES, M.A., KINSEY, S.E. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **British Journal of Cancer** 77(6):956-64, 1998.

BEKEMEIER, H., HIRSCHMANN, R., GIESSLER, A.J. Carrageenin-induced thrombosis in the rat and mouse as a test model of substances influencing thrombosis. **Biomedical Biochemical Acta** 43:S347–S350, 1984.

BELLELLI, A., MATTIONI, M., RUSCONI, V., SEZZI, M.L. Inhibition of tumor growth, invasion and metastasis in papain-immunized mice. **Invasion and Metastasis** 10:142-169, 1990.

BEUTH, J., BRAUN, J.M. Modulation of murine tumor growth and colonization by bromelaine, an extract of the pineapple plant (*Ananas comosum* L.). **In Vivo** 19:483–485, 2005.

BLAIR, P., FLAUMENHAFT, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. **Blood Reviews** 23(4):177–189, 2009.

BOBEK, V., KOVARIK, J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 58: 213-219, 2004.

BORN, G.V.R., CROSS, M.J. Cross Biochemistry of platelets. **The Lancet** 281:168, 1963.

BOKEMEYER, C., LANGER, F. Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. **Hamostaseologie** 31(4), 2011.

BIGGERSTAFF, J.P., WEIDOW, B., DEXHEIMER, J. WARNES G., VIDOSH, J., PATEL, S., NEWMAN, M., PATEL, P. Soluble fibrin inhibits lymphocyte adherence and cytotoxicity against tumor cells: implications for cancer metastasis and immunotherapy. **Clinical and Applied Thrombosis and Haemostasis** 14:193–202, 2008.

BILHEIRO, R.P., LOPES, M.T.P, SALAS, C.E., GOMES, M.T.R., RODRIGUES, K.C.L., CARVALHO, M.G., SANCHEZ, E., A proteolytic fraction from the *C. candamarsensis* latex exhibits thrombolytic activity and effects on haemostatic patterns *in vitro*. In: **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences**, Ribeirão Preto, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitative estimation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254, 1976.

BRAVO, L. M., HERMOSILLA, J., SALAS, C.E. A biochemical comparison between latex from *C. candamarcensis* and *C. papaya*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 27:2831-2862, 1994.

BROOS, K., DE MEYER, S.F., FEYS, H.B., VANHOORELBEKE, K., DECKMYN, H. Blood platelet biochemistry. **Thrombosis Research** doi:10.1016/j.thromres.2011.11.002, 2011.

CABRAL, H., LEOPOLDINO, A.M., TAJARA, E.H., GREENE, L.J., FAÇA, V.M., MATEUS, R.P., CERON, C.R., JUDICE, W.A.S, JULIANO, L., BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Preliminary Functional Characterization, Cloning and Primary Sequence of Fastuosain, a Cysteine Peptidase Isolated from Fruits of *Bromelia fastuosa*. **Protein & Peptide Letters** 13:83-89, 2006.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 33:179-189, 2000.

CESARMAN-MAUS G., HAJJAR K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. **British journal of haematology** 129(3):307–21, 2005.

CHEN, C. F., CHEN, S. M., CHOW, S. Y., HAN, P. W. Protective effects of *Carica papaya* Linn on the exogenous gastric ulcer in rats. **American Journal of Clinical Medicine** 9:205-212, 1981.

CHOBOTOVA, VERNALLIS, A.B., ADIBAH, F., MAJID, A. Bromelain's activity and potential as an anti-cancer agent: Current evidence and perspectives *Katya Cancer Letters* 290:148–156, 2010.

CHRISTIANO, S.C. Avaliação de parâmetros inflamatórios promovidos por fração obtida do látex de *C. candamarcensis* com atividade cicatrizante. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

CLOUSE, L.P., COMP P.C. The regulation of hemostasis: the protein C system. **New England Journal of Medicine** 314:1298-1304, 1986.

COUGHLIN S.R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature** 6801:258–264, 2000.

CONN, F, BAYNE, M.L., SODERMANN, D.D., Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived-growth factor. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 87(7):2628-32, 1990.

CREW, KATHERINE, D., NEUGUT, ALFRED I. Aspirin and NSAIDs: effects in breast and ovarian cancers. **Clinical Obstetrics and Gynecology**. 18(1):71-75, 2006.

DAVALOS, D. & AKASSOGLU, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. **Seminars in Immunopathology** 34:43–62, 2012.

DAVÌ, G. & PATRONO, C. Platelet Activation and Atherothrombosis. **New England Journal of Medicine** 357:2482-94, 2007.

DAVIE, E.W., RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science** 145:1310–2, 1964.

DE LEVAL, X., BENOIT, V., DELARGE, J., JULEMONT, F., MASEREEL, B., PIROTTE, B., MERVILLE, M.P., DAVID, J.L., DOGNE, J.M. Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (II/II). Effects of BM-567 on osteogenic sarcoma-cell-induced platelet aggregation. **Prostaglandins, Leukotriens and Essential Fatty Acids** 68:55–59, 2003.

DEJANA, E., CALLIONI, A., QUINTANA, A., DE GAETANO, G. Bleeding time in laboratory animals. II. A comparison of different assay conditions in rats. **Thrombosis Research** 15:191–197, 1979.

DENSON, K.W.E. Coagulant and anticoagulant actions of snake venoms. **Toxicon** 7:5–11, 1969.

DITZ, D., LOPES, M. T. P., FIGUEIREDO, C., VIANA, C. T. R., Salas, C. E. Antitumoral and antimetastatic activities of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* latex. In: **16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Copenhagen, Denmark**. 107:162-692, 2010.

DOOLITTLE, R.F., SPRAGGON, G., EVERSE, S.J. Three-dimensional structural studies on fragments of fibrinogen and fibrin. **Current Opinion in Structural Biology**. 8:792–8, 1998.

DVORAK, H.F., BROWN, I.F., DETMAR, M., DVORAK, A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **American Journal of Pathology** 146:1029-39, 1995.

EMSLEY, J., KNIGHT, C.G., FARNDALE, R.W., BARNES, M.J., LIDDINGTON, R.C. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. **Cell** 101:47–56, 2000.

ENGELBERG, H. Actions of heparin that may affect the malignant process. **Cancer** 85:257–72, 1999.

FARHAN, S., HÖCHTL, T., WOJTA, J., HUBER, K. Diabetic specific aspects in antithrombotic therapy in patients with coronary artery disease. **Minerva Medica** 101(4):239-53, 2010.

FENTON, G.E. Fibrinolytic and antithrombotic action of bromelain may eliminate thrombosis in heart patients. **Medical Hypotheses** 6:1123-33, 1980.

FIGUEIREDO, C. Avaliação das propriedades antitumoral e antimetastática de fração proteolítica do látex de *Carica candamarcensis* em modelo de melanoma murino. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

FERRARA, N., HEINSOHN, H., WALDER, C.E., BUNTING, S., THOMAS, G.R. The regulation of blood vessel growth by vascular endothelial growth factor. **Annals of the New York Academy of Science** 752:246-56, 1995.

FURIE, B., FURIE, B. C. Molecular and cellular biology of blood coagulation. **New England Journal of Medicine** 326: 800-806, 1992.

FURIE, B., FURIE, B. C. Thrombus formation *in vivo*. **The Journal of Clinical Investigation**. 115:3355-3362, 2005.

FURIE, B.C., BELLIDO-MARTIN, L., CHEN, V. JASUJA, R., FURIE, B. Imaging fibrin formation and platelet and endothelial cell activation *in vivo*. **Thrombosis and Haemostasis** 105:776-782, 2011.

GASIC, G.J., GASIC, T.B. STEWART, C.C. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 61:46-52, 1968.

GERBER S.S., SCHALLER. J. The plasmin–antiplasmin system: structural and functional aspects. **Cellular and Molecular Life Sciences** 68:785–801, 2011.

GENTRY, P.A., Comparative aspects of blood coagulation. **The Veterinary Journal** 168:238-251, 2004.

GIBBINNS, J.M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation. **Journal of Cell Science** 117:3415-3425, 2004.

GIESELER, F., STELCK, B., BLUME, L.F., DENKER, M., DOHRMANN, P., MUNDHENKE, C., BAUERSCHLAG, D., TIEMANN, M., KUNZE, T. Coagulation and formation of malignant effusions. **Hamostaseologie** 4:273-7, 2007.

GOMES, M. T. R., MELLO, V. J., RODRIGUES, K. C., BEMQUERER, M. P., LOPES, M. T. P., FAÇA, V. M., SALAS, C. E. Isolation of two plant proteinases in látex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. **Planta Medica** 71:244-248, 2005.

GOMES, F.S.L. ; SPÍNOLA, C.V. ; RIBEIRO, H.A. ; LOPES, M.T.P. ; CASSALI, G.D. ; SALAS, C.E. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. **Burns** 36:277-283, 2010.

GORDON, J.L., EVANS, R.J., GRESHAM, G.A. Experimental thrombus formation in mesenteric microvessels: evaluation of a method. **Microvascular Research** 6:108–115, 1973.

GRAVINA, M., C., TERMIGNONI, C., SALAS, C. E., Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis* L. **Plant Science** 102:11-18, 1994.

GUIMARAES-FERREIRA, C.A., RODRIGUES, E.G., MORTARA, R.A., CABRAL, H. SERRANO, F.A., SANTOS, R.R., TRAVASSOS, L.R., Antitumor Effects In Vitro and In Vivo and Mechanisms of Protection against Melanoma B16F10-Nex2 Cells By Fastuosain, a Cysteine Proteinase from *Bromelia fastuosa*. **Neoplasia** 9(9):723-733, 2007.

HAGMAR, B. Effect of heparin, epsilon-aminocaproic acid and coumarin on tumour growth and spontaneous metastasis formation. **Pathology Europe**. 3:622–30 1968.

HASHIMOTO, I., NAKANISHI, H., SHONO, Y., YAMANO, M., TODA, M. The features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase, and prostaglandin E1. **Plastic and Reconstructive Surgery** 111:2307–2314, 2003.

HEJNA, M., RADERE, M., ZIELINSKI, C.C. Inhibition of Metastases by Anticoagulants. **Journal of the National Cancer Institute** 91:22–36, 1999.

HEINICKE R. M., VAN DER WAL L., YOKOYAMA M. Effect of bromelain on human platelet aggregation. **Experientia** 28:844–845, 1972.

HERRMANN, K.S. Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. **Microvascular Research** 26:238–249, 1983.

HIRSH, J. Heparin. **New England Journal of Medicine** 324:1565-1574, 1991.

JACKSON, S.P., NESBITT, W.S., KULKARNI, S. Signalling events underlying thrombus formation. **Journal of Thrombosis and Hemostasis**. 1:1602-1612, 2003.

JOO, H.S., PARK, G.C., CHO, W.R., TAK, E., PAIK, S.R., CHANG, C.S. Purification and characterization of a prothrombin-activating protease from *Nephila clavata*. **Toxicon** 40: 289–296, 2002.

KALRA N., BHUI, K., ROY, P., SRIVASTAVA, S., GEORGE, J., PRASAD, S., SHUKLA, Y., Regulation of p53 nuclear factor kappaB and cyclooxygenase-2 expression by bromelain through targeting mitogen-activated protein kinase pathway in mouse skin, **Toxicology and Applied Pharmacology** 226:30–37, 2008.

KAMATH, S., LIP, G.Y.H. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. **QJM** 96:711–729, 2003.

KORTE, K., Changes in the coagulation and fibrinolysis system in malignancy: their possible impact on future diagnostic and therapeutic procedures. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** 38:679–692, 2000.

KULKARNI, S., DOPHEIDE, S.M., YAP, C.L., RAVANAT, C., FREUND, M., MANGIN, P., HEEL, K.A., STREET, A., HARPER, I.S., LANZA, F., JACKSON, S.P. A revised model of platelet aggregation. **Journal of Clinical Investigation** 105(6):783-91, 2000.

LAEMMLI, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680–685, 1970.

LEIPNER, J. & SALLER, R. Systemic enzyme therapy in oncology: effect and mode of Action. **Drugs** 59(4):769-780, 2000.

LEMOS, F.O., CARDOSO, V.N., SALAS, C.E., LOPES, M.T.P. Biodistribution and pharmacokinetic of a *Vasconcellea cundinamarcensis* proteinase fraction with pharmacological activity. **Drugs metabolism and pharmacokinetics** submetido.

LEON, J. Botánica de Los Cultivos Tropicales. San Jose: **IICA** 445, 1987.

LERSCH, C., GERICKE, D., CLASSEN, M. Efficacy of low-molecular-weight heparin and unfractionated heparin to prevent adhesion of human prostate and bladder carcinoma and melanoma cells to bovine endothelial monolayers. **Urologia Internationalis** 56:230–3, 1996.

LINDBERG, R.A., SLAAF, D.W., LENTSCH, A.B., MILLER, F.N. Involvement of nitric oxide and cyclooxygenase products in photoactivation-induced microvascular occlusion. **Microvascular Research** 47:203–221, 1994.

LIVIO M., DE GAETANO G., DONATI M. B. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex and platelet aggregation in the rat – a preliminary Report. **Drugs Experimental and Clinical Research** 1:49–53, 1978.

LIPINSKI, B., EGYUD, L.G., Resistance of cancer cells to immune recognition and killing. **Medical Hypotheses** 54:456–460, 2000.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature** 202:498–9, 1964.

MAURER H. R., ECKERT K., GRABOWSKA E., ESCHMANN K. Use of bromelain proteases for inhibiting blood coagulation. **Patent WO PCT/EP 98/04406**, 2000.

MCNICOL A, ISRAELS S.J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. **Thromb Research** 95:1–18, 1999.

MEHTA, P., LAWSON, D., WARD, M.B., LEE-AMBROSE, L., KIMURA, A. Effects of thromboxane A₂ inhibition on osteogenic sarcoma cell-induced platelet aggregation. **Cancer Research** 46 :5061–5063, 1986.

MELLO, V. J.; GOMES, M. T.; RODRIGUES, K. C.; LOPES, M. T. P.; SALAS, C. E. Plant proteinases: Their potential as therapeutic drugs In: **Recent progress in medicinal Plants - Drug Development from Molecules**. 1^o ed., Houston, Studium press, LLC.11:211-224, 2006.

MELLO, V.J.; GOMES, M.T.; LEMOS, F.O.; DELFINO, J.L.; ANDRADE, S.P.; LOPES, M.T.; SALAS, C.E.; The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine** 15:237–244, 2008.

MENDOLICCHIO, G.L. Adhesion mechanisms in platelet function. **Circulation Research** 100:1673-1685, 2007.

METZIG C., GRABOWSKA E., ECKERT K., REHSE K., MAURER H. R. Bromelain proteases reduce human platelet aggregation in vitro, adhesion to bovine endothelial cells and thrombus formation in rat vessels *in vivo*. **In vivo** 13: 7–12, 1999.

MICHELSON, A.D. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. **Blood** 87:4925-36, 1996.

MILBOUW G., BORN J.D., FLANDROY, P., REMACLE, J.M. Chemonucleolysis: A therapeutic alternative in extra-canalicular lumbar disk hernias. **Acta Neurologica Belgica** 89(2):71-80, 1989.

MORITA A. H., UCHIDA D. A., TAUSSIG S. J., CHON S. C., HOKAMA Y. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain, **Archives in International Pharmacodynamics**. 239:340–350, 1979.

MONROE, D.M., HOFFMAN, M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematology/Oncology Clinics of North America** 21:1-11, 2007.

MOUTIM, V., SILVA, L.G., LOPES, M.T.P., FERNANDES, G.W., SALAS, C.E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Plant Science** 142:115-121, 1999.

MURATA, J., SATAKE, M., SUZUKI, T. Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms. **Journal of Biochemistry** 53:431-443, 1963.

NASH, G.F., TURNER, L.F., SCULLY, M.F., KAKKAR, A.K. Platelets and cancer. **Lancet Oncology** 3:425-430, 2002.

NESBITT, W.S. Intracellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. **Journal of Cell Biology** 160:1151-1161, 2003.

NEMERSON, Y. The tissue factor pathway of blood coagulation. **Seminars in Hematology** 29:170-6, 1992.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products** 66:1022-1037, 2003.

NGUYEN, M., WATANABE, H., BUDSON, A.E., RICHIE, J.P., HAYES, D.F., FOLKMAN, J. Elevated concentrations of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. **Journal of the National Cancer Institute** 85:241-242, 1993.

NIESWANDT, B., HAFNER, M., ECHTENACHER, B., MANNEL, D.N. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. **Cancer Research** 59:1295-300, 1999.

NIEWIAROWSKI, S., BUDZYNSKI, A.Z., LIPINSKI, B. Significance of the intact polypeptide chains of human fibrinogen in ADP-induced platelet aggregation. **Blood** 49: 635-644, 1977.

OUYANG, C., TENG, C.M. Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus*. Venom. **Biochimica et Biophysica Acta** 420:298–308, 1976.

OSTERUD, B., RAPAPORT, S.I. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA** 74:5260–4, 1977.

OWEN, C.A. Anticoagulant treatment of rats with Walker 256 carcinosarcoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** 104:191–3, 1982.

PALUMBO, S.J., TALMAJE, K.E., MASSARI, J.V., LA JEUNESSE, C.M., FLICK, M.J., KOMBRINCK, K.W., HU, Z., BARNEY, K.A., DEGEN, J.L., Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. **Blood** 110(1):133-141, 2007.

PEARLSTEIN, E., AMBROGIO, C., KARPATKIN, S. Effect of anti-platelet antibody on the development of pulmonary metastases following injection of CT26 colon adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma and B16 amelanotic melanoma tumor cells in mice. **Cancer Research** 44:3884-3887, 1984.

PHILIPPE, C., PHILIPPE, B., FOUQUERY, B., PERIZ, J., LEBRET, M., BAUD, L. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity by platelets. **American Journal of Pathology** 143:1713-1723, 1993.

PLOW, E.F., HERREN, T., REDLITZ, A., MILES, A.L., HOOVER-PLOW, J.L., The cell biology of the plasminogen system. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal** 9:939-945, 1995.

POGGI, A., STELLA, M., DONATI, M.B. The importance of blood cell-vessel wall interactions in tumour metastasis. **Bailliere's Clinical Haematology** 6:731–52, 1993.

POVLISHOCK, J.T., ROSENBLUM, W.I. Injury of brain microvessels with a helium-neon laser and Evans blue can elicit local platelet aggregation without endothelial denudation. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** 111(5):415-21, 1987.

RAINSFORD, K.D. Pharmacology and Biochemistry of salicylates and related drugs. In: **Aspirin and Related Drugs**, Ed. Taylor & Francis 215–366, 2004.

RAJESH, R., SHIVAPRASAD, H.V., RAGHAVENDRAGOWDA, C.D., NATARAJU, A., DHANANJAYA, B.L., VISHWANATH, B.S., Comparative study on plant latex proteases and their involvement in hemostasis: a special emphasis on clot inducing and dissolving properties. **Planta Medica** 73:1061–1067, 2007.

ROESKEN, F., RUECKER, M., VOLLMAR, B., BOECKEL, N., MORGENSTERN, E., MENGER, M.D. A new model for quantitative in vivo microscopic analysis of thrombus formation and vascular recanalisation: the ear of the hairless (hr/hr) mouse. **Thrombosis and Haemostasis** 78(5):1408-14, 1997.

ROESKEN, F., VOLLMAR B., RÜCKER M., SEIFFGE D., MENGER M.D. *In vivo* analysis of antithrombotic effectiveness of recombinant hirudin on microvascular thrombus formation and recanalization. **Journal of Vascular Surgery** 28(3)498-505, 1998.

ROSENBLUM, W.I., EL-SABBAN, F. Platelet aggregation in the cerebral microcirculation: effect of aspirin and other agents. **Circulation Research** 40:320–328, 1977.

ROSENBLUM, W.I., EL-SABBAN, F., ELLIS, E.F. Aspirin and indomethacin enhance platelet aggregation in mouse mesenteric arterioles. **American Journal of Physiology** 239:H220–H226, 1980.

ROTHWELL, P.M., FOWKES, F.G.R., BELCH, J.F.F., OGAWA, H., WARLOW, C.P., MEADE, T.W. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. **Lancet** 377:31–41, 2011.

RUMBAUT, R.E., SIAL, A.J. Differential phototoxicity of fluorescent dye-labeled albumin conjugates. **Microcirculation** 6:205–213, 1999.

RUMBAUT, R.E., RANDHAWA, J.K., SMITH, C.W., BURNS, A.R. Mouse cremaster venules are predisposed to light/dye-induced thrombosis independent of wall shear rate, CD18, ICAM-1, or P-selectin. **Microcirculation** 11:239–247, 2004.

SAIKI I, MURATA J, NAKAJIMA M, TOKURA S, AZUMA I. Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cells. **Cancer Research** 50:3631–7, 1990.

SALAS, C.E., VILLALBA, M.I.C, MELLO, V., BILHEIRO, R.P., CASSALI, G., TAGLIATI, C., LOPES, M.T.P., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M., ANADON, A. Oral subchronic toxicity evaluation of a latex proteolytic fraction from *Carica candamarcensis*. **Toxicology Letters** 196:S258, 2010.

SALGADO. R., VERMEULEN, P.B., BENOY, I. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. **British Journal of Cancer** 80(5/6):892-7, 1999.

SAMBRANO, G.R., WEISS, E.J., ZHENG, Y., HUANG, W., COUGHLIN S.R. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. **Nature** 413:74-78, 2001.

SATO, M., OHSHIMA, N. Effect of wall shear rate on thrombogenesis in microvessels of the rat mesentery. **Circulation Research** 66:941–949, 1990.

SCHALLER, J., GERBER, S.S. The plasmin–antiplasmin system: structural and functional aspects. **Cellular and Molecular Life Science** 68:785–801, 2011.

SCHNEIDER, D.J., TAATJES, D.J., HOWARD, D.B., SOBEL, B.E. Increased reactivity of platelets induced by fibrinogen independent of its binding to the IIb-IIIa surface glycoprotein: a potential contributor to cardiovascular risk. **Journal of the American College of Cardiology** 33:261–6, 1999.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. Capítulo 15. p. 301-332, 2001.

SCHMITZ, G., ROTHE, G., RUF, A., BARLAGE, S., TSCHOPE, D., CLEMETSON, K.J. European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. **Thrombosis and Haemostasis** 79: 885-96, 1998.

SENGER, D.R., GALLI, S.J., DVORAK, A.M., PERRUZZI, C.A., HARVEY, V.S., DVORAK, H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science** 219:983-85, 1983.

SENGER, D.R., PERRUZZI, C.A., FEDER, J., DVORAK, H.F. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. **Cancer Research** 46:5629-32, 1986.

SHINDO M, MAJIMA M, OHNO T, SUGIMOTO K, OHWADA T. Induction mechanism of small intestinal lesions caused by intravenous injection of endotoxin in rats. **Surgery Today** 26:610–617, 1996.

SILVA, L. G., LOPES, M. T. P., GARCIA, O. S., SALAS C. E. Changes in protein profile during coagulation of latex of *Carica papaya*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 30: 615-619, 1997.

SILVA, A.C.A. Avaliação da atividade anti-úlcera gástrica e de vias envolvidas no modo de ação da fração obtida do látex de *C. candamarcensis*. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

SORG, H., HOFFMANN J.N., MENGER M.D., LINDENBLATT, N., GOEHRING, P., VOLLMAR, B. Antithrombin is as effective as heparin and hirudin to prevent formation of microvascular thrombosis in a murine model. **Thrombosis and Haemostasis** 96(3)239-389, 2006.

STRICKLAND, S., FENZ, K.M., BHUVANENDRAN, S., ZAMOLODCHIKOV, D., AHN, H.J., BRONSTEN, R., NORRIS, E.H., PAUL, J., CORTES-CANTELI, M. Fibrinogen and β -amiloid association alters thrombosis and fibrinolysis: a possible contribution factor to Alzheimer's disease. **Neuron** 66:695-709, 2010.

TANG, D.G., HONN, K.V. Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. **Invasion Metastasis** 14:109–22, 1994.

TAUSSIG, S.J., BATKIN, S. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update, **Journal of Ethnopharmacology** 22:191–203, 1988.

TEIXEIRA, R.D., RIBEIRO, H.A.L., GOMES, M.T.R., LOPES M.T.P., SALAS, C.E. The proteolytic activities of the latex from *Carica candamarcensis*. **Plant Physiology and Biochemistry** 46:956-961, 2008.

- THOMAS, K.A. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. **Journal of Biological Chemistry** 271:603-606, 1996.
- THORLACIUS, H., VOLLMAR, B., SEYFERT, U.T., VESTWEBER, D., MENGER, M.D. The polysaccharide fucoidan inhibits microvascular thrombus formation independently from P- and L-selectin function in vivo. **European Journal of Clinical Investigation** 30:804–810, 2000.
- THUN, M.J., NAMBOODIRI, M.M., CALLE, E.E., FLANDERS, W.D., HEATH JR, C.W. Aspirin use and risk of fatal cancer. **Cancer Research**. 53:1322–1327, 1993.
- TROUSSEAU, A. Phlegmasia alba dolens, **Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris**, J.B. Balliere et Fils, Paris. 3:654–712, 1865.
- TULLU, M.S., DIXIT, P.S., NAIR, S.B., KAMAT, J.R., VASWANI, R.K., SHETTY, S.D., PAWAR, A.R. Glanzmann's thrombasthenia. **Indian Journal of Pediatrics** 68(6):563-6, 2001.
- VERHEUL, H.M., HOEKMAN, K., LUYKX-DE BAKKER, S. Platelet: transporter of vascular endothelial growth factor. **Clinical Cancer Research** 3:2187-90, 1997.
- VIANA, C. T. R., SILVA, A. C. A., FIGUEIREDO, C., DITZ, D., KLEIN, A., SALAS, C. E., LOPES, M. T. P. Effects of proteolytic fraction of the latex from *Carica candamarcensis* on blood leukocytes and its relationship with its antitumoral activity. **In: 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, Porto de Galinhas. CD-BrazMedChem, 2008.
- VILLALBA, M.I.C., SILVA, A., TAGLIATI, C., CASSALI, G., SALAS, C., LOPES M. Acute systemic toxicological and mutagenic evaluation of a proteolytic fraction from the latex of *Carica candamarcensis*. **In: XII International Congress of Toxicology**. Barcelona, Spain, 2010.

XIAO, H., YANG, C.S., Combination regimen with statins and NSAIDs: a promising strategy for cancer chemoprevention, **International Journal of Cancer** 123:983–990, 2008.

WEBB, N.J.A., BOTTOMLEY, M.J., WATSON, C.J., BRENCHLEY, P.E.C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. **Clinical Science** 94(4):395-404, 1998.

WEBER, C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. **Circulation Research** 100:27-40, 2007.

WALLIN, R., HUTSON, S.M. Warfarin and vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. **Trends in Molecular Medicine** 10:299-302, 2004.

ZUCKER, M.B., Platelet aggregation measured by the photometric method. **Methods in Enzymology**. 169:118–133, 1989.