



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

STELLA GUIMARÃES ARAQUAM MEDEIROS

**METALOPROTEINASES E SERINOPROTEASES NA INDUÇÃO DE DISTÚRBIOS
HEMOSTÁTICOS DESENCADEADOS PELO VENENO BOTRÓPICO**

Trabalho de conclusão de curso em formato de artigo elaborado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da professora Graziela Silveira Araújo Alves.

BRASÍLIA, 2019

Metaloproteínas e Serinoproteases na Indução de Distúrbios Hemostáticos Desencadeados pelo Veneno Botrópico

Stella Guimarães Araquam Medeiros¹
Graziela Silveira Araújo Alves²

Resumo

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos no Brasil, e por ser um dos agravos com o maior número de notificação, constitui um grave problema de saúde pública. Seu veneno é formado por diversas substâncias proteicas que afetam atividades do organismo, principalmente, hemostáticas. Esta pesquisa consiste em uma revisão da literatura do tipo narrativa, com a finalidade de compreender e relacionar a atuação das metaloproteínas e serinoproteases nos distúrbios hemostáticos causados pelo veneno. A intensa hemorragia ocorre em mais da metade dos casos, sendo uma das principais causas de óbito. As metaloproteínas e as serinoproteases da peçonha são as principais enzimas causadoras dessas alterações da coagulação, causando sangramentos através de lesões no endotélio, disfunção de plaquetas e hidrólise de fatores da coagulação. Considerando o grande potencial dessas substâncias para fins terapêuticos, estudos mais aprofundados são necessários para uma melhor compreensão das suas propriedades.

Palavras-chave: Hemostasia; Metaloproteínas; Serinoproteases; veneno botrópico.

Metalloproteinases and Serine Proteases in the Induction of Hemostatic Disorders Unleashed by Botropic Venom

Abstract

Bothrops gender snakes are responsible for about 90% of ophidian accidents in Brazil, and for being one of the most reported injuries, is a serious public health problem. Its venom is made up of several protein substances that affect activities of the body, mainly hemostatic one. This research consists of a literature review of narrative type, with the purpose of understanding and relating the performance of metalloproteinases and serine proteases in hemostatic disorders caused by venom. The intense hemorrhage occurs in more than half of the cases, being one of the main causes of death. The metalloproteinases and the serine proteases of the venom are the major causative enzymes of these coagulation disorders, causing bleeding through endothelial lesions, platelet dysfunction and hydrolysis of coagulation factors. Considering the great potential of these substances for therapeutic purposes, further studies are necessary for a better understanding of their properties.

Keywords: Hemostasis; Metalloproteinases; Serine Proteases; Botropic Venom.

¹ Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - UniCeub

² Docente do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília - UniCeub

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Bothrops* é formado por serpentes conhecidas popularmente como jararaca, responsáveis por cerca de 90% dos acidentes ofídicos no Brasil, sendo a *Bothrops jararaca* a principal delas, representando 95% dos casos. É uma espécie adaptativa, e pode colonizar tanto áreas silvestres, quanto áreas urbanas, onde haja uma proliferação considerável de roedores (PINHO, 2001).

O veneno botrópico é constituído de uma combinação de proteínas e peptídeos que têm capacidade de gerar quadros de distúrbios hemostáticos. Os principais componentes do veneno responsáveis pelas alterações hemostáticas são as metaloproteinases e as serinoproteases. Esses componentes atuam a partir de interações com: os fatores da coagulação, plaquetas e endotélio vascular (YAMASHITA, 2013)

A integridade do sistema sanguíneo e da camada endotelial que reveste os vasos é importante para que exista uma fluidez adequada do sangue. Para manter essa integridade há um processo denominado hemostasia, que impede tanto a perda sanguínea excessiva quanto a formação de trombos. O sistema hemostático é dividido, didaticamente, em primário, constituído pelas plaquetas e vasos sanguíneos, e secundário, no qual atuam os fatores da coagulação. Para regular a produção da fibrina, as proteínas anticoagulantes também são ativadas durante o mecanismo hemostático. Por fim, há ação do sistema fibrinolítico para dissolução do coágulo formado (FRANCO, 2001).

Quando há uma lesão, ocorre uma vasoconstrição, e as plaquetas iniciam sua atividade com a adesão ao endotélio. Após a adesão, as plaquetas iniciam a liberação de grânulos para ativar e agregar outras plaquetas ao local lesionado a fim de formar o tampão plaquetário, finalizando assim a hemostasia primária (REZENDE, 2010). A hemostasia secundária se inicia concomitantemente a esse processo para fortalecer o tampão, dessa fase participam os fatores da coagulação, que atuam em cascata, para formar o coágulo de fibrina, que no fim do processo será dissolvido pela fibrinólise para não obstruir algum vaso caso venha a se soltar (HOFFBRAND; MOSS, 2013).

As metaloproteinases compõem cerca de 53% do veneno botrópico. São peptidases dependentes de zinco e estão relacionadas com as metaloproteinases que degradam matriz extracelular e as responsáveis pelos processos de ativação/comunicação celular. São consideradas toxinas fundamentais para o desenvolvimento das alterações hemostáticas causadas pelo envenenamento (FOX; SERRANO, 2008).

As serinoproteases são enzimas proteolíticas catalisadoras de hidrólise, que compõem cerca de 20% do veneno das serpentes do gênero *Bothrops*. Se isoladas não são letais, no

entanto, quando associadas a outros componentes do veneno contribuem para o efeito tóxico. Seus efeitos fisiológicos vão desde ativar/inativar fatores da coagulação, interferir na agregação plaquetária e até mesmo afetar a fibrinólise (MINAYA, 2012).

Laboratorialmente, observa-se que os pacientes que sofreram envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops* apresentam um consumo de fibrinogênio e de alguns outros fatores da coagulação, disfunção plaquetária, formação de trombina nos vasos e ativação da fibrinólise. Os distúrbios hemostáticos gerados pelo veneno ocorrem em mais de 50% dos casos em humanos, sendo que uma das principais causas do óbito nesses acidentes é a hemorragia acentuada (SANTORO et al., 2008).

De acordo com esse contexto, o presente trabalho tem como objetivo compreender e relacionar a atuação das metaloproteínases e das serinoproteases presentes no veneno das serpentes do gênero *Bothrops* na indução de distúrbios hemostáticos.

2. METODOLOGIA

Esta pesquisa se constituiu em uma revisão da literatura do tipo narrativo, que segundo Rother (2007), consiste em um documento que apresenta de forma descritiva um determinado tema, tendo grande importância na obtenção e no acréscimo de conhecimento, além disso, esse tipo de revisão não possui um protocolo para sua produção. A busca literária foi embasada no ano de publicação e nos objetivos, sendo utilizadas publicações que ocorreram entre os anos de 2001 a 2019.

A pesquisa foi realizada a partir de documentos encontrados nas bases de dados eletrônicas, nacionais e internacionais, como Google Acadêmico, Scielo (Scientific Electronic Library Online), PubMed, NCBI e BVS Brasil, utilizando as seguintes palavras-chave: hemostasia, metaloproteínases, serinoproteases, veneno botrópico, utilizadas sozinhas e em combinação duas a duas ou três a três, nos idiomas português e inglês. Para a elaboração desse trabalho, foram revisados um total de 57 artigos, destes, 38 foram incluídos na pesquisa.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Serpentes do gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* é constituído por serpentes pertencentes à família *Viperidae* conhecidas pelo nome Jararaca, possuindo o maior número de espécies causadoras de acidentes registrados no Brasil, como *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops pauloensis*, *Bothrops marajoensis*, *Bothrops barnetti* e, principalmente, a *Bothrops jararaca* (PINHO, 2001).

Essas espécies são caracterizadas por não possuírem guizo na cauda e por possuírem um aparelho inoculador do tipo solenóglifo (retráteis e localizados na parte anterior do maxilar superior), cabeça triangular e um “V” invertido ao longo do corpo (característica marcante). O seu padrão de cores pode variar dependendo da espécie e da região em que vivem, porém a sua variação de cores apresenta tons castanhos, esverdeado e preto (Figura 1). Essas serpentes possuem uma média de tamanho de um metro, sendo 1,5m o comprimento dos maiores exemplares da espécie. São serpentes vivíparas, com atividade noturna e se alimentam de roedores (MORAES, 2008).

Figura 1: Serpente *Bothrops jararaca*.



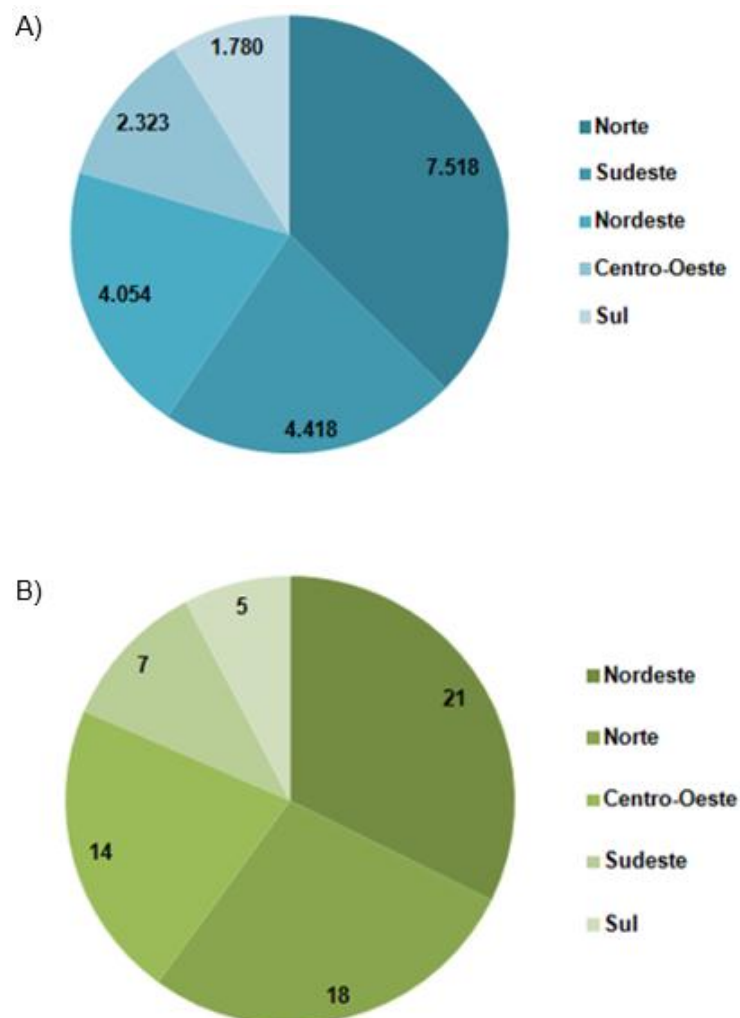
Fonte: FOLLY, 2014.

Serpentes botrópicas, por possuírem uma alta capacidade de se adaptarem a diversos ambientes, estão presentes em todo território nacional, podendo ser encontradas em beiras de rios e riachos, em áreas litorâneas e úmidas, silvestres, agrícolas, urbanas e suburbanas, cerrados, caatinga, e áreas abertas, sendo encontradas, principalmente, em locais com alta umidade e com alta taxa de roedores. Os acidentes com esses animais são mais comuns em épocas de verão, devido ao calor e umidade, e por ser uma época de reprodução (BRASIL, 2018).

Os acidentes ofídicos representam um grave problema de saúde pública no Brasil, estando diretamente relacionados ao clima e a atividade humana no campo, com uma predominância de acidentes envolvendo indivíduos na faixa etária de 15 a 49 anos, além da preponderância a indivíduos do sexo masculino (70%), por ser o grupo com maior taxa de trabalho no campo (BRASIL, 2018). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2018), foram notificados no ano de 2017, 20.093 casos de acidentes

com serpentes do gênero *Bothrops* no Brasil, além disso, nesse mesmo ano, 65 óbitos foram registrados. Em 2017, a região Norte aparece com o maior número de casos, cerca de 7.518 notificações, no entanto a região Nordeste possui o maior número de óbitos, cerca de 21 casos. Já a região Sul possui a menor quantidade de casos, cerca de 1.780 notificações e o menor número de óbitos, somente 5 casos (Figuras 2). O acidente botrópico corresponde a 90% dos envenenamentos, constituindo o acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país.

Figura 2: Número de acidentes (A) e número de óbitos (B) por região do Brasil no ano de 2017.



Fonte: SINAN, 2018.

No ano de 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu os acidentes ofídicos na lista de doenças tropicais negligenciadas. Devido ao alto número de casos notificados, esses acidentes foram inseridos na Lista de Notificação compulsória, sendo, segundo o SINAN, um dos agravos com maior número de notificações (BRASIL, 2018).

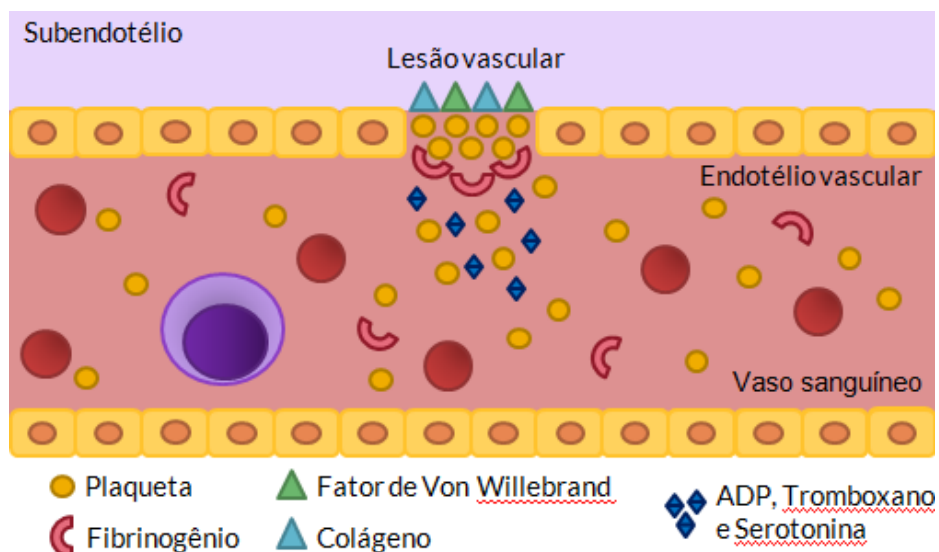
3.2 Hemostasia sanguínea

A hemostasia consiste em um sistema que possui três principais funções: 1) reparar um vaso lesionado, 2) manter o sangue sempre no seu estado fluido e 3) remover o coágulo formado a fim de evitar que se desloque e obstrua vasos de menor calibre. O sistema hemostático é mantido por um equilíbrio entre mecanismos pró-coagulantes, capazes de formar tampões no local lesionado, e mecanismos anticoagulantes, para evitar uma coagulação excessiva. Não havendo nenhuma lesão vascular, o sistema anticoagulante predomina sobre o pró-coagulante, mantendo assim o sangue íntegro (MANN et al., 2006).

Quando há uma lesão no endotélio de um vaso sanguíneo ou algum estímulo proveniente da trombina, adrenalina ou do Difosfato de Adenosina (ADP), ocorre uma vasoconstrição e é desencadeada uma série de processos a fim de diminuir a perda de sangue. A ativação das vias da coagulação ocorre simultaneamente e imediatamente após a lesão vascular, permitindo a formação do tampão hemostático (REZENDE, 2010).

A hemostasia primária se inicia com a adesão das plaquetas ao fator de Von Willebrand e ao colágeno no subendotélio exposto devido ao rompimento do vaso, essa adesão é feita através dos complexos glicoproteicos Ib/Gp IX e a integrina $\alpha 2\beta 1$. Após a adesão, as plaquetas iniciam a liberação de grânulos como ADP, Tromboxano A2 e Serotonina para recrutar e agregar outras plaquetas ao local lesionado. Essas irão expressar o complexo plaquetário IIb/IIIa, que irá se ligar com fibrinogênio da circulação sanguínea e formará o tampão plaquetário (Figura 3), finalizando assim a hemostasia primária (ANDREWS; BERNDT, 2004)

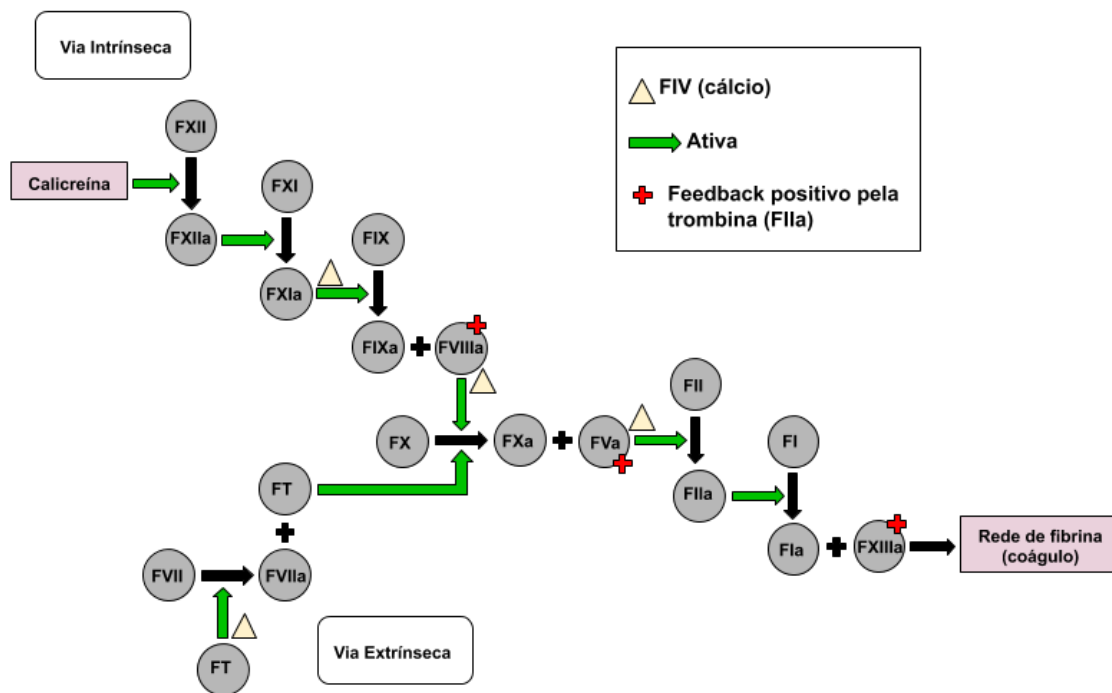
Figura 3: Hemostasia primária.



Fonte: Elaborado pela autora.

Simultaneamente à agregação das plaquetas, a hemostasia secundária pode iniciar-se por duas vias, a extrínseca proveniente de uma lesão vascular, e intrínseca proveniente de uma vasoconstrição, no qual todos os seus componentes já estão na corrente sanguínea (ativação por contato, cujo sangue entra em contato com superfícies de carga negativa) para fortalecer o tampão plaquetário. Essa é formada por fatores que funcionam em cascata, com a finalidade de criar uma rede de fibrina, finalizando o processo de coagulação (Figura 4). As duas vias se convergem no momento da ativação do FX, iniciando a via comum (FERREIRA et al., 2010).

Figura 4: Cascata da coagulação.



Fonte: Elaborado pela autora.

A cascata da via extrínseca se inicia a partir da lesão no endotélio, que expõe o Fator Tecidual (FIII) na corrente sanguínea e se une ao FVII, ativando-o (FVIIa). O complexo formado por esses dois fatores ativa o FX em FXa (momento de convergência entre a via intrínseca e a extrínseca). O FXa juntamente com FVa ativam a protrombina (FII) em trombina (FIIa). A trombina funciona como feedback positivo para FV, FVIII e FXIII, ativando-os. Já na superfície das plaquetas agregadas, FIIa ativa o fibrinogênio (FI) em fibrina (FIa), que se une ao FXIIIa, que é um estabilizador de FIa e forma a rede de fibrina, finalizando a cascata (VERSTEEG et al., 2013).

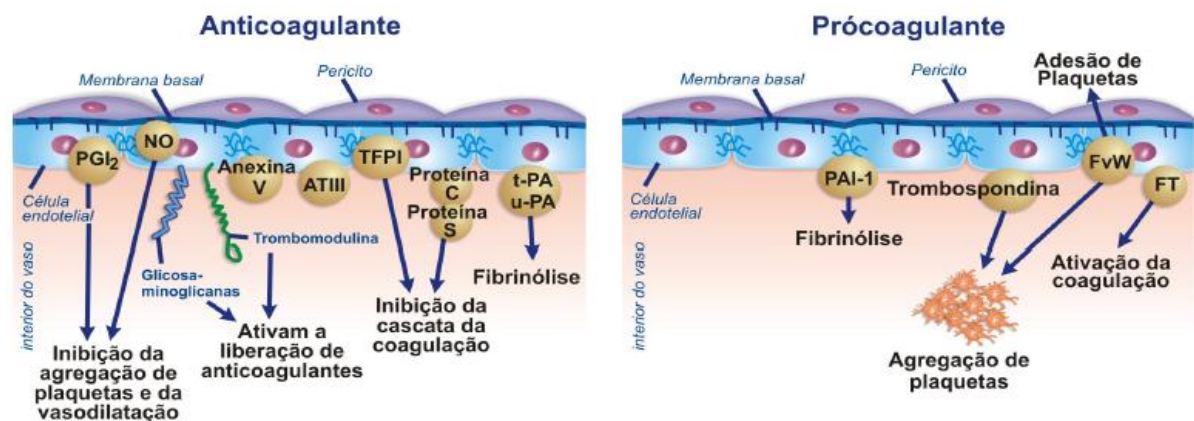
A via intrínseca se inicia com a ativação do FXII em FXIIa pela caliceína e pelo contato com superfícies com cargas negativas. O FXIIa ativa FXI em FXIa, que ativa o FIX em FIXa,

e juntamente com FVIII ativa o FX em FXa, dando continuidade pela via comum. O cálcio (FIV) atua na ativação de diversos fatores como FIX, FX, FII e FVIII, além de contribuir para a fixação de trombina e fibrina na superfície das plaquetas (HOFFMAN, 2001).

Ao final da coagulação, o sistema fibrinolítico irá atuar para dissolver o coágulo formado, a fim de evitar que ele se desprenda da parede do vaso e se desloque para vasos menores. Para dar início ao processo de fibrinólise, o plasminogênio é convertido em plasmina através de dois tipos de ativadores, o tecidual (t-PA) e o uroquinase (u-PA). A ligação desses ativadores ao plasminogênio promovem hidrólise e a consequente conversão em plasmina. Essa irá degradar a fibrina através de proteólise, gerando produtos da degradação da fibrina (PDF) que possuem ação anticoagulante (CESARMAN-MAUS; HAJJAR, 2005).

Vale ressaltar também, que para evitar uma ativação exorbitante da coagulação e um bloqueio dos vasos devido ao coágulo, existe um controle e regulação da hemostasia (Figura 6), na qual o endotélio vascular realiza a síntese de diversos anticoagulantes naturais, são eles: as proteínas C e S, a Proteína Inibidora do Fator Tecidual (PIFT), Antitrombina, Trombomodulina e Anexina V, no qual, cada um deles atua inibindo determinadas vias de ativação da coagulação (RODRIGUES, 2012).

Figura 6: Mediadores da Hemostasia.



Fonte: RODRIGUES, 2012.

4.3 O veneno botrópico

O veneno das serpentes tem como principal função paralisar e matar a presa, para que possa ser ingerida, além de fazer parte do sistema de defesa desses répteis. Cerca de 90% da peçonha é formada por uma gama de enzimas (principalmente proteolíticas), peptídeos e proteínas, que afetam atividades fisiológicas, neurotransmissoras e, principalmente, hematológicas do organismo. Essas substâncias podem atuar isoladamente ou sinergicamente, nesse caso, tendo seus efeitos potencializados. Outra parte do veneno é

formada por substâncias não proteicas, sendo elas lipídeos, carboidratos, aminas e aminoácidos, porém, sua função durante o envenenamento ainda não é totalmente elucidada. Por ser constituída de estruturas com diferentes composições químicas, a peçonha apresenta instabilidade na farmacodinâmica e farmacocinética, além de ter propriedades tóxicas e biológicas variáveis (KANG et al., 2011).

A picada dos acidentes ofídicos pode ser subcutânea ou intramuscular, e as manifestações clínicas são classificadas em locais ou sistêmicas. As manifestações locais envolvem edema, sangramento, equimose, dor, linfadenomegalia e bolhas. Em alguns casos mais graves, é necessária a amputação de algum membro devido à necrose local. As manifestações sistêmicas são aquelas que surgem distante do local da picada, incluem gengivorragia, epistaxe, hematúria, petéquias, equimoses e púrpuras, plaquetopenia e incoagulabilidade sanguínea. Febre, sudorese, náuseas, hipotensão arterial, insuficiência renal e choque também surgem como manifestações sistêmicas em alguns casos (YAMASHITA, 2013).

Uma das principais particularidades do envenenamento botrópico é a intensa hemorragia local, que em casos graves pode evoluir para hemorragia sistêmica. O desenvolvimento de sangramentos sistêmicos se dá através da associação de diversos fatores e alterações, como disfunção de plaquetas (ação antiagregante), consumo de fatores da coagulação, ação fibrinolítica, formação de PDF e lesões causadas ao endotélio vascular (ZINGALI et al., 2005).

Serpentes do gênero botrópico podem mostrar mudanças na composição e ação do seu veneno, devido a sua localização geográfica, idade, sexo, fatores genéticos e até mesmo pela dieta. Um exemplo são que as serpentes filhotes possuem uma ação coagulante prevalente, devido a um aumento nos ativadores de FII e FX na peçonha. Além disso, o veneno de serpentes fêmeas tem ação mais hemorrágica do que os machos (CUNHA, 2012).

O tratamento mais eficaz contra envenenamento ofídico consiste na administração de um soro antiofídico poliespecífico o mais precocemente possível após o acidente. Esse soro é obtido a partir da imunização de cavalos com uma mistura de venenos de cinco espécies botrópicas: *B. jararaca*, *B. alternarrus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. jararacussu*. Os anticorpos adquiridos pelos cavalos anulam diversos efeitos sistêmicos quando ministrado em humanos envenenados. No entanto, não são 100% eficaz contra as manifestações locais. O tempo decorrido entre o acidente e o tratamento é o fator prognóstico mais relevante (CABRAL, 2011). Porém, os anticorpos heterólogos obtidos pelos cavalos, induzem Reações Adversas Imediatas (RAIs), como urticária, vômitos, diarreia, obstrução da traqueia devido a edemas, bronco espasmos e hipotensão. E a partir disso, estratégias de terapia utilizando anticorpos

monoclonais antitoxinas têm sido avaliadas, visando evitar as RAIs. No entanto, são necessários estudos mais conclusivos acerca dos benefícios em substituir o soro antiofídico (FRAUCHES, 2007).

Tendo em vista a elevada seletividade e afinidade das toxinas do veneno por seus alvos moleculares, estudos têm sido feitos na indústria farmacêutica para elucidar de maneira mais precisa o mecanismo de ação das substâncias presentes, visto que, devido às atividades biológicas, muitas toxinas que constituem a peçonha têm capacidade para serem usadas como medicamentos para tratar não só os acidentes ofídicos, mas também doenças como hipertensão, distúrbios tromboticos e tumores, além disso, as serinoproteases são estudadas também para serem utilizadas em transplantes e cirurgias, a fim de evitar o surgimento de hemorragias, graças a sua capacidade de formar um coágulo, mesmo que instável (NICOLAU, 2016).

3.4 Metaloproteinases do veneno de serpentes (SVMPs)

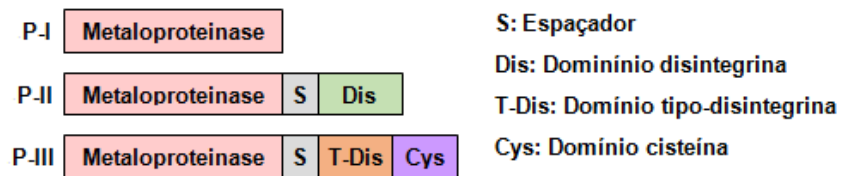
As metaloproteinases são as toxinas presentes em maior quantidade no veneno de serpentes viperíneas, formando cerca de 53% da composição do veneno. São consideradas fundamentais para o desenvolvimento das complicações hemostáticas do envenenamento, sendo as principais enzimas responsáveis pela hemorragia, graças a sua ação sobre componentes da lâmina basal e da matriz extracelular do endotélio vascular, tendo como principais atividades a ação fibrinogenolítica, colagenolítica e hemorrágica (CIDADE et al., 2006).

As SVMPs, em conjunto com as ADAMs (*Disintegrina and Metaloproteinase*), fazem parte da subfamília M12 das metaloproteinases, também conhecidas como reprotinas, que constituem uma superfamília de metzincinas, cujo sua estabilização se dá pela ligação a um átomo de zinco. No entanto, as SVMPs possuem função semelhante de degradação de matriz extracelular realizadas pelas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), já que as ADAMs são responsáveis pela ativação/comunicação celular (TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2011).

As SVMPs são sintetizadas a partir de um processamento proteolítico, resultando em domínios catalíticos e não-catalíticos. A partir de um gene ancestral comum, as SVMPs possuem propriedades catalíticas das MMPs e propriedades adesivas das ADAMs. Dessa forma, essa toxina é classificada de acordo com a presença ou ausência desses domínios em P-I, P-II e P-III. A classe P-I é composta por SVMPs que possuem um único domínio metaloproteinase (catalítico). Já as de classe P-II são formadas por um domínio metaloproteinase seguido de um desintegrina. SVMPs de classe P-III apresentam domínios

metaloproteinase, tipo-desintegrina e cisteína, como demonstrado na figura 7 (FOX; SERRANO, 2005).

Figura 7: Esquema de domínios de SVMPs.



Fonte: Elaborado pela autora.

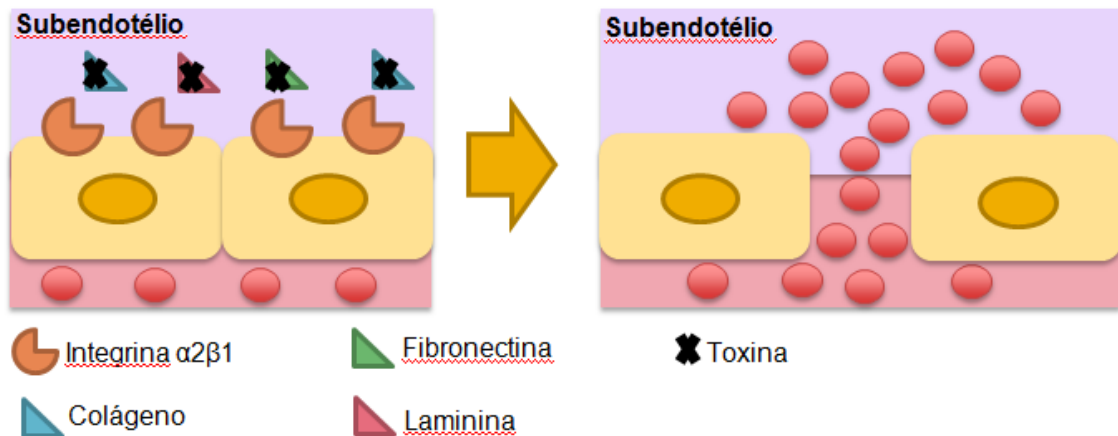
3.4.1 Atuação das SVMPs na hemostasia

A atuação das SVMPs sobre a hemostasia está relacionada, de um modo geral, com a proteólise de componentes da matriz extracelular, proteínas plasmáticas e de membrana, interação com receptores de plaquetas e de células endoteliais. A principal diferença entre as atividades das SVMPs consiste na presença dos diferentes domínios, que possuem funções distintas. O domínio catalítico está relacionado à proteólise dos componentes do plasma e da matriz extracelular, já os domínios não catalíticos estão associados à interação com receptores de plaquetas e de células endoteliais (BALDO, 2009).

A adesão entre as células endoteliais e a matriz extracelular é essencial para os processos da hemostasia, possuindo as integrinas como principais mediadoras da transdução de sinal. O quadro hemorrágico proveniente do envenenamento botrópico está relacionado com a ação das SVMPs sobre os capilares, gerando uma hemorragia interna. No entanto, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado, sendo descritos dois modelos básicos principais para o seu desencadeamento (BERRIER; YAMADA, 2007).

O primeiro é denominado hemorragia *per diapedesis* (Figura 8), no qual SVMPs de classe P-I e P-II, através da sua ação proteolítica, hidrolisam componentes da membrana basal dos vasos envolvidos na adesão e ativação celular, como o colágeno, a fibronectina e a laminina. Conseqüentemente, a integridade vascular é comprometida, ocorrendo formação de espaços, gerando hemorragia para o espaço intersticial (GUTIERREZ et al., 2016).

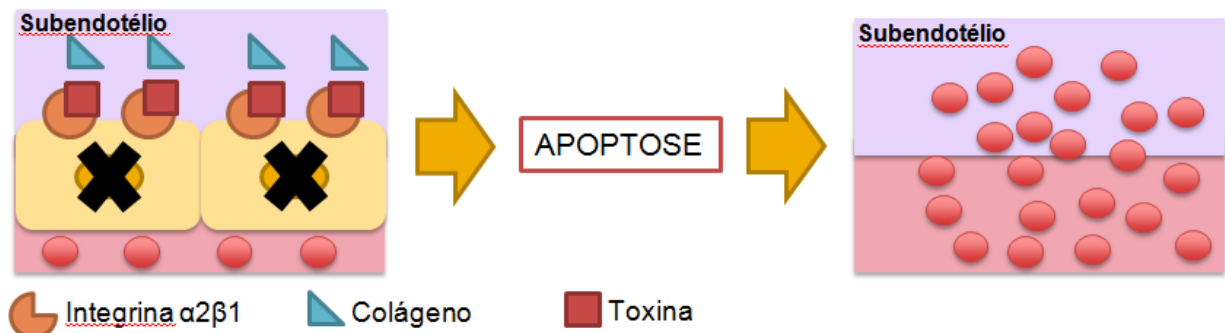
Figura 8: Demonstração do mecanismo *per diapedesis*.



Fonte: Elaborado pela autora.

O segundo modelo, demonstrado na figura 9, é denominado *per rhexis*, cujo SVMPs da classe P-III que possuem ação anti-adesivas inibem a ligação da integrina $\alpha 2\beta 1$ ao colágeno, levando a uma perda da interação célula-matriz, induzindo a apoptose, e resultando no surgimento de lesões hemorrágicas (GUTIERREZ et al., 2016).

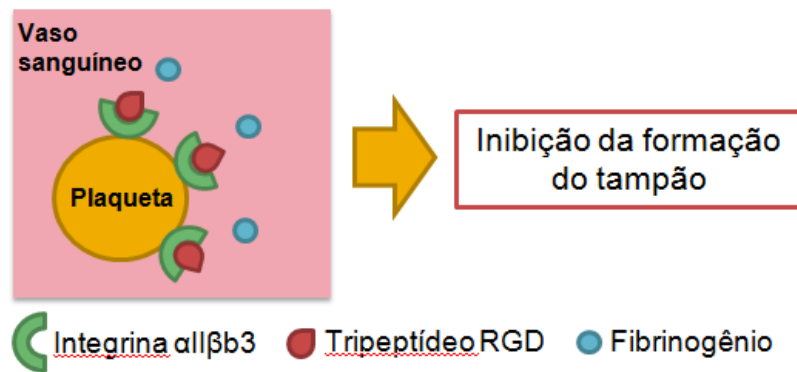
Figura 9: Demonstração do mecanismo *per rhexis*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação às plaquetas, as SVMPs atuam diferentes maneiras, dependendo da classe da toxina, porém, a principal classe que interfere nas plaquetas é a P-II, através do domínio desintegrina (Figura 10). A inibição da ação plaquetária induzida pela desintegrina é desenvolvida devido à presença de um tripeptídeo RGD, que tende a se ligar a integrina $\alpha II\beta 3$ presente na superfície das plaquetas, impedindo a ligação do fibrinogênio e consequentemente a formação do tampão plaquetário (BALDO, 2009).

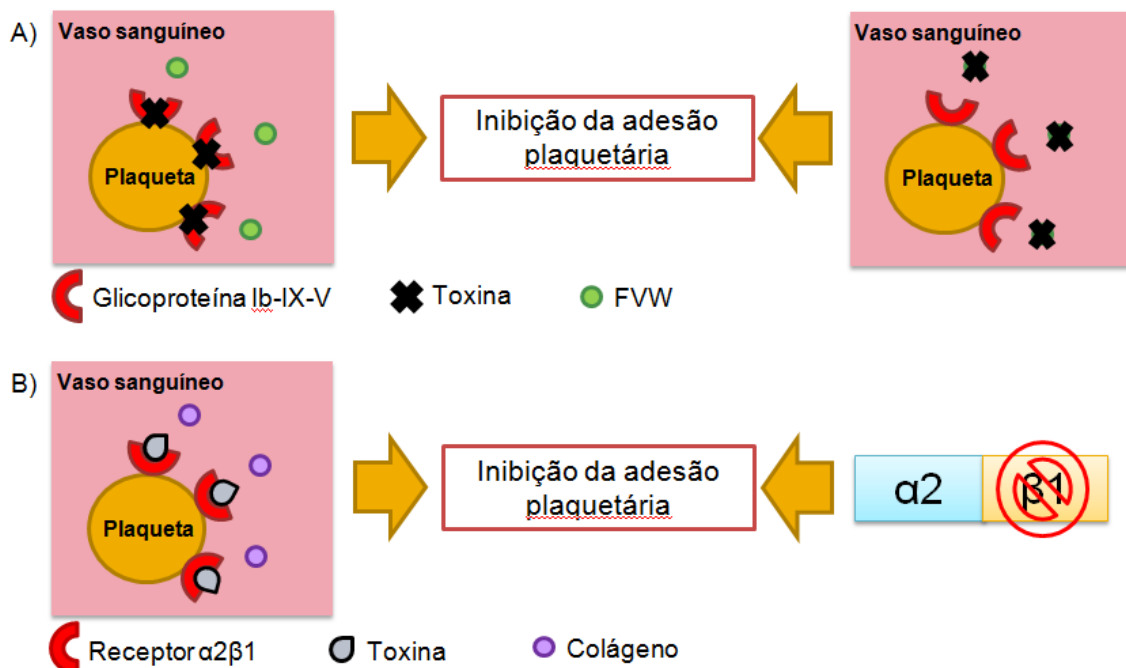
Figura 10: Demonstração da atuação das SVMPs via desintegrina.



Fonte: Elaborado pela autora.

As SVMPs de classe P-I e P-III também podem intervir nas plaquetas, no entanto, por não apresentarem o tripeptídeo RGD, elas atuam através do colágeno e do fator de Von Willebrand (FVW), como demonstrado na figura 11. Os efeitos dessas toxinas via FVW podem ser causados pela clivagem do seu receptor glicoproteína Ib-IX-V presente nas plaquetas, ou pela hidrólise direta do FVW, resultando na inibição da adesão plaquetária ao endotélio (WANG; HUANG, 2002). Já a inibição da adesão plaquetária induzida via colágeno é atribuída somente à classe P-III, graças à presença dos domínios tipo desintegrina e cisteína, que é capaz de se ligar e bloquear a ligação do colágeno ao receptor $\alpha 2\beta 1$ nas plaquetas, ou ainda pela clivagem da subunidade $\beta 1$ do receptor (BALDO, 2009).

Figura 11: Atuação via FVW (A) e atuação via colágeno (B).



Fonte: Elaborado pela autora.

Com relação à fibrinólise, grande parte possui ação fibrino(geno)lítica, clivando as cadeias A α e B β do fibrinogênio, acarretando um rompimento do coágulo de fibrina. Além disso, as SVMPs tendem a aumentar a taxa fibrinolítica graças ao aumento da atividade do tPA e inativação do α 2-inibidor de plasmina (MARKLAND, 2012).

3.5 Serinoproteases do veneno de serpentes (SVSPs)

Correspondendo a 20% do veneno botrópico, as serinoproteases são a segunda classe de toxina mais presente no veneno. Essas enzimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos procaríotos, eucariotos, e até mesmo em vírus. As famílias das serinoproteases são divididas através das semelhanças na estrutura e na funcionalidade, sendo as tripsinas e as quimiotripsinas as melhores caracterizadas dentre essas enzimas (SERRANO; MAROUN, 2005).

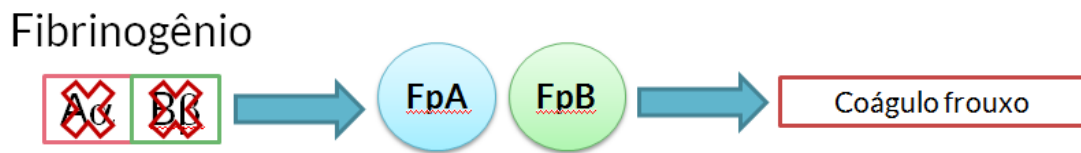
As serinoproteases são capazes de hidrolisar ligações peptídicas através de mecanismos catalisadores devido à presença de um resíduo de serina altamente reativo, formando um sítio catalítico estabilizado por um resíduo de histidina e um de ácido aspártico (His, Asp e Ser). Nos seres vivos, elas participam da digestão alimentar de proteínas, em vias de sinalização e diferenciação celular, e participam da hemostasia através da cascata da coagulação (CUNHA, 2012). Também chamadas de *Thrombin-Like*, as SVSPs são caracterizadas como enzimas tipo trombina, tendo cerca de 40% de similaridade com a trombina humana, e são capazes de afetar a cascata através da ativação de fatores da coagulação e fibrinólise (CASTRO, 2011).

3.5.1 Atuação das SVSPs na hemostasia

As SVSPs por possuírem uma região catalítica, são caracterizadas por serem capazes de gerar desequilíbrios na hemostasia por meio da interferência em variados pontos da cascata da coagulação, tanto pela proteólise, quanto pela ativação ou inibição dos fatores da coagulação e fibrinólise. A incoagulabilidade sanguínea é a mais importante alteração hemostática observada em quadros de envenenamento botrópico, e a serinoprotease *Thrombin-Like* (SVTLEs) é a principal causadora do quadro (SERRANO, 2013).

As SVTLEs, por possuírem ação proteolítica semelhante à trombina, atuam a partir da degradação das cadeias A α e B β do fibrinogênio (Figura 12), liberando fibrinopeptídeos A (FpA) e fibrinopeptídeos B (FpB), sendo assim, as SVTLEs são classificadas de acordo com a preferência de degradação das cadeias do fibrinogênio. As SVTLE-A possuem ação proteolítica preferencial para a cadeia A α do fibrinogênio; as SVTLE-B possuem preferência pela cadeia B β ; e as SVTLE-AB atuam sobre ambas as cadeias do fibrinogênio (CASTRO et al., 2004).

Figura 12: Formação do coágulo pela *Thrombin-Like*.



Fonte: Elaborado pela autora.

A conversão do fibrinogênio em monômeros de fibrina pelas *Thrombin-Like* libera fibrinopeptídeos que formam um coágulo, no entanto, não são capazes de ativar o FXIII em FXIIIa, que é responsável por unir os monômeros de fibrina e tornar o coágulo mais resistente. Sendo assim, o coágulo formado é frouxo e instável, sendo facilmente dissolvido pela plasmina do sistema fibrinolítico. O aumento da fibrinólise ocasiona um aumento de PDFs e uma redução dos níveis de fibrinogênio circulante, induzindo a um estado de hipofibrinogenemia, que acarreta retardos na coagulação e conseqüentemente hemorragias (PEREIRA et al., 2010).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os acidentes ofídicos no Brasil, ocasionados, principalmente, pelas serpentes botrópicas, representam um grande problema de saúde pública, devido sua alta incidência. As manifestações clínicas apresentadas pelas vítimas são decorrentes da grande diversidade de toxinas presentes no veneno, sendo as principais associadas a alterações na hemostasia, principal motivo de óbito nesses acidentes.

Dentre a gama de toxinas encontradas na peçonha, destacam-se as proteínas metaloproteinases e as serinoproteases do veneno das serpentes (SVMPs e SVSPs respectivamente), essenciais para o desencadeamento das complicações hemostáticas. Através da análise das pesquisas abordadas, constatou-se que as SVMPs desenvolvem hemorragia principalmente pela sua ação sobre a matriz extracelular dos vasos, a partir de dois mecanismos distintos envolvendo o colágeno e seu receptor, que comprometem a integridade do epitélio vascular.

Além disso, essas enzimas inibem a adesão plaquetária e a formação do tampão plaquetário atuando sobre o fator de Von Willebrand, sobre o colágeno, e sobre o fibrinogênio, por meio de hidrólise ou bloqueio de receptores. Já em relação à fibrinólise, foi visto que as SVMPs podem romper o coágulo formado e elevar a fibrinólise devido a um aumento na ação do ativador tecidual (t-PA) da plasmina e inativação do $\alpha 2$ -inibidor de plasmina.

As SVSPs podem afetar a cascata da coagulação através da ativação de fatores e da fibrinólise. Essas proteínas são as principais causadoras do quadro de incoagulabilidade

ocasionado pelo envenenamento, tanto por clivagem das cadeias do fibrinogênio, formando um coágulo frouxo, quanto pela incapacidade de ativação do fator XIII. Sendo instável, esse coágulo é facilmente degradado pelo sistema fibrinolítico. Com o aumento da fibrinólise, um estado de hipofibrogenemia é gerado, causando as hemorragias características do quadro.

Por fim, conclui-se que o estudo aprofundado sobre o metabolismo, estrutura molecular e fisiologia destas toxinas pode contribuir de maneira crucial para o alcance de novas e importantes informações sobre os efeitos biológicos destas substâncias no organismo. Sendo de grande proveito para o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos de importância biotecnológica, aprimorando tanto o tratamento do próprio envenenamento, quanto o de doenças hematológicas e tumores, podendo até mesmo ser usadas em procedimentos invasivos para impedir hemorragias.

6. REFERÊNCIAS

- ANDREWS, R. K., BERNDT, M. C. Platelet Physiology and Thrombosis. **Thrombosis Research**, New York, v. 114, n. 5-6, p. 447-453, nov. 2004.
- BALDO, C. **Mecanismos Envolvidos na Ação Hemorrágica de Metaloproteinases de Venenos de Serpentes**. 2009. 25-124f. Dissertação (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BERRIER, A. L.; YAMADA, K. M. Cell-Matrix Adhesion. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 213, n. 3, p. 565-573, dez. 2007.
- BRASIL. **Acidentes por Animais Peçonhentos: O que Fazer e Como Evitar**. Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br>>. Acesso em: 15 mar. 2019.
- CABRAL, M. A. F. **Estudo dos Potenciais Terapêuticos do Veneno da Serpente *Bothrops jararaca***. 2011. 8-25f. Trabalho de Conclusão de Curso Licenciatura em Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- CASTRO, F. O. F. **Avaliação da Atividade Não Citotóxica do Veneno da Cobra *Bothrops Pauloensis* em Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano**. 2011. 14-67f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2011.
- CASTRO, H. C. et al. Snake Venom Thrombin-Like Enzymes: From Reptilase to Now. **Cellular and Molecular Life Science**, Basileia, v. 61, n. 7-8, p. 843-856, abr. 2004.
- CESARMAN-MAUS, G.; HAJJAR, K. A. Molecular Mechanisms of Fibrinolysis. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 129, n. 3, p. 307-321, maio, 2005.

- CIDADE, D. A. P. *Bothrops jararaca* Venom Gland Transcriptome: Analysis of the Gene Expression Pattern. **Toxicon**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 437-461, set. 2006.
- CUNHA, E. M. Principais Compostos Químicos Presente nos Venenos de Cobras dos Gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 21-26, maio/ago. 2012.
- FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 416-421, set./out. 2010.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural Considerations of Snake Venom Metalloproteinases, Key Members of the M12 Reprolysin Family of Metalloproteinases. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 8, p. 969-985, jun. 2005.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights Into and Speculations About Snake Venom Metalloproteinase (SVMP) Synthesis, Folding and Disulfidebond Formation and Their Contribution to Venom Complexity. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, jun. 2008.
- FRANCO, R. F. **Fisiologia da Coagulação, Anticoagulação e Fibrinólise**. Medicina, Ribeirão Preto, v. 34, n. 3-4, p. 229-237, jul./dez. 2001.
- FRAUCHES, T. H. **Anticorpos Monoclonais Contra as Principais Toxinas do Veneno de *Bothrops atrox*: Uma Perspectiva Para o Uso Terapêutico**. 2007. 1-100f. Dissertação (Mestrado) do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- GUTIERREZ, J. M. et al. Hemorrhage Induced by Snake Venom Metalloproteinases: Biochemical and Biophysical Mechanisms Involved in Microvessel Damage. **Toxicon**, Basileia, v. 8, n. 4, p. 93, mar. 2016.
- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. H. **Fundamentos em Hematologia**, 6ª Edição. Porto Alegre: ArtMed, 2013.
- HOFFMAN, M. D. I. A Cell-Based Model of Hemostasis. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 85, n. 6, p. 958-965, jun. 2001.
- KANG, T. S. et al. Enzymatic Toxins From Snake Venom: Structural Characterization and Mechanism of Catalysis. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, dez. 2011.
- MANN, K. G., BRUMMEL, Z. K., ORFEO, T., BUTENAS, S. Models of Blood Coagulation. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, Califórnia, v. 36, n. 2, p. 108-117, mar. 2006.

- MARKLAND Jr, F. S. Snake Venom Metalloproteinases. **Toxicon**, Oxford, v. 62, n. 2013, p. 3-18, fev. 2012.
- MINAYA, M. A. B. **Avaliação das Atividades Farmacológicas de uma Serinoprotease, Isolada a Partir do Veneno Total de *Bothrops barnetti***. 2012. 1-74f. Dissertação (Mestrado) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.
- MORAES, R. A. **Variações em Caracteres Morfológicos em Populações de *Bothrops jararaca* (Serpentes Vipiridae) no Estado de São Paulo**. 2008. 1-146f. Dissertação (Mestrado) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- NICOLAU, C. A. **Venômica Translacional: Potenciais Contribuições para Terapêutica Antiveneno e Bioprospecção**. 2016. 1-156f. Dissertação (Doutorado) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.
- PEREIRA, J. M. et al. Predição da Neutralização do Efeito Coagulante da Peçonha de *Bothrops pauloensis* Pelo Extrato Aquoso de *Hedychium coronarium* (Zingerberaceae) Através de Modelos de Regressão. **Bioscience Journal**, Uberlândia v. 26, n. 6, p. 973-980, nov./dez. 2010.
- PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Goiás, v. 47, n. 1, p. 24-29, jan./mar. 2001.
- REZENDE, S. M. Distúrbios da Hemostasia: Doenças Hemorrágicas. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 20, n. 4, p. 534-553, ago. 2010.
- RODRIGUES, E. S. Novos Conceitos Sobre a Fisiologia da Hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.
- ROTHER, E. T. **Revisão sistemática X revisão narrativa**. Acta Paulista de Enfermagem, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 5-6, Jun. 2007.
- SANTORO, M. L. et al. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca* in Brazil. **Toxicon**, Oxford, v. 51, n. 8, p. 1440-1448, jun. 2008.
- SERRANO, S. M. The Long Road of Research on Snake Venom Serine Proteases. **Toxicon**, Oxford, v. 62, n. 2013, p. 19-26, fev. 2012.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake Venom Serine Proteases: Sequence Homology vs. Substrate Specificity, a Paradox to be Solved. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, jun. 2005.
- SINAN. **Acidentes por Animais Peçonhentos**. Sistema de Agravo de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake Venom Metalloproteinases: Structure, Function and Relevance to the Mammalian ADAM/ADAMTS Family Proteins. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1824, n. 1, p. 164-176, Jan. 2011.

VERSTEEG, H. H. et al. New Fundamentals in Hemostasis. **Physiological Reviews**, Washington, v. 93, n. 1, p. 327-358, jan. 2013.

WANG, W. J.; HUANG, T. F. Purification and Characterization of a Novel Metalloproteinase Acurhagin, From *Agkistrodon acutus* Venom. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 87, n. 4, p. 641-650, abr. 2002.

YAMASHITA, K. M. **Patogênese dos Distúrbios Hemostáticos Sistêmicos Induzidos pelo Veneno da Serpente *Bothrops jararaca***. 2013. 1-85f. Dissertação (Mestrado) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ZINGALI, R. B. et al. Bothrojaracin, a *Bothrops jararaca* Snake Venom-Derived (Pro)Thrombin Inhibitor, as an Anti-Thrombotic Molecule. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, Basileia, v. 34, n. 4-5, p. 160-163, 2005.